

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO.**

**SUBSÍDIOS PARA UM PLANO DE MONITORAMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS EM RESERVATÓRIOS COM VISTAS À
BALNEABILIDADE. ESTUDO DE CASO: RESERVATÓRIO
SALTO GRANDE, AMERICANA, SP.**

Livia Fernanda Agujaro

**Campinas
2007**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E
URBANISMO.**

**SUBSÍDIOS PARA UM PLANO DE MONITORAMENTO DE
CIANOBACTÉRIAS EM RESERVATÓRIOS COM VISTAS À
BALNEABILIDADE. ESTUDO DE CASO: RESERVATÓRIO
SALTO GRANDE, AMERICANA, SP.**

Livia Fernanda Agujaro

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lima Isaac
Co-orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore**

Tese apresentada à Comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil, na área de concentração de Saneamento e Ambiente.

**Campinas
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Ag93s Agujaro, Livia Fernanda
 Subsídios para um plano de monitoramento de
 cianobactérias em reservatórios com vistas à
 balneabilidade. Estudo de caso: Reservatório Salto
 Grande, Americana, SP / Livia Fernanda Agujaro.--
 Campinas, SP: [s.n.], 2007.

 Orientadores: Ricardo Lima Isaac, Marli de Fátima
 Fiore
 Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e
 Urbanismo.

 1. Cianobactéria. 2. Recreação. 3. Reservatórios. 4.
 Monitoramento ambiental. 5. Toxinas. 6. Biologia
 molecular. I. Isaac, Ricardo Lima. II. Fiore, Marli de
 Fátima. III. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e
 Urbanismo. IV. Título.

Título em Inglês: Studies to support the development of a cyanobacteria
monitoring plan for recreational waters. Case study: Salto
Grande Reservoir, Americana, Sao Paulo, Brazil.

Palavras-chave em Inglês: Cyanobacteria, Recreational waters, Reservoirs,
Monitoring plan, Microcystins, rDNA 16S, *mycA*,
NRPS, PKS.

Área de concentração: Saneamento Ambiental

Titulação: Doutor em Engenharia Civil

Banca examinadora: Célia Leite Sant'Anna, Maria Inês Zanolli Sato, Emilia
Wanda Rutkowski e Carlos Gomes da Nave Mendes

Data da defesa: 30/08/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Civil

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO

**“SUBSÍDIOS PARA UM PLANO DE MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS EM RESERVATÓRIOS
COM VISTAS À BALNEABILIDADE. ESTUDO DE CASO: RESERVATÓRIO SALTO GRANDE,
AMERICANA, SP.”.**

Livia Fernanda Agujaro

Tese de Doutorado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. Ricardo de Lima Isaac
Presidente e Orientador/UNICAMP

Dra. Célia Leite Sant'Anna
Instituto de Botânica

Dra. Maria Inês Zanoli Sato
CETESB

Profa. Dra. Emilia Wanda Rutkowski
FEC/UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Gomes da Nave Mendes
FEC/UNICAMP

Agosto/2007

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
A todos aqueles que, direta e indiretamente,
contribuíram para sua realização;
Às minhas filhas, Nina e Renata, pelo seu
carinho e alegria, pois são a razão do meu viver;
À minha mãe e meu pai (in memoriam) por me
apoiarem em todos os momentos de minha vida;
Ao meu companheiro Hélio por me incentivar e
estar junto nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Lima Isaac pela sua orientação e por acreditar na riqueza do trabalho multidisciplinar, orientando profissionais das mais diversas formações;

À Profa. Dra Marli de Fátima Fiore, um exemplo de dedicação e paixão pelo trabalho, que muito me guiou e gentilmente cedeu seu laboratório para a execução das análises moleculares;

Ao meu gerente, José Francisco Lussari e aos demais colegas do Laboratório de Campinas da CETESB pela agradável convivência e total apoio à realização deste trabalho;

Ao Biólogo e amigo Romeu Cantúcio e demais colegas dos laboratórios da SANASA – Campinas pela valiosa colaboração na realização das análises químicas, de clorofila-*a* e cromatográficas;

As Profas Dras Célia Leite Sant’Anna e Gisela de Aragão Umbuzeiro pelo constante incentivo e valiosas sugestões durante a qualificação;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, em especial à Adriana Lorenzi e Diego Genuário pela amizade e colaboração em todas as análises moleculares.

A minha colega de trabalho e grande amiga, Maria do Carmo Carvalho por seu exemplo de dedicação ao trabalho e realização profissional e pelas muitas trocas de idéias e conselhos preciosos;

Aos colegas do Barco Escola da Natureza de Americana, SP nas pessoas do João, José e Aline que muito nos apoiaram nos trabalhos de campo e que são um exemplo de trabalho educativo na melhoria da qualidade de nossos recursos hídricos;

À Dra Maria Tereza de Paiva Azevedo pela colaboração na identificação dos materiais de cultivo;

Aos colegas da CETESB, do Setor de Comunidades Aquáticas pela colaboração na aplicação estatística dos dados;

À companhia Paulista de Força e Luz – CPFL que através do colega Padilha nos cedeu gentilmente os dados de vazão e precipitação no Reservatório Salto Grande.

À diretoria e funcionários do Iate Clube de Americana por permitirem o acesso ao ponto de coleta;

À Profa. Heleny Catharina Fraige Agujaro pela revisão do texto em português e aos demais membros da minha família Nina e Renata pela ajuda com as ilustrações e formatação do texto, Hélio que me acompanhou nas coletas, Marlene, Nicolau e Luna, que muito me auxiliaram e estiveram presentes em todos os momentos;

Às amigas Edna Garbelotti e Regina Velten pela revisão do Abstract;

A DEUS, pela luz e força que me guia por todo o sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xii
LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 CIANOBACTÉRIAS: CARACTERIZAÇÃO, TAXONOMIA E ECOLOGIA	6
2.2 CIANOTOXINAS	10
2.3 MÉTODOS MOLECULARES NO ESTUDO DAS CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS COM ÊNFASE NAS MICROCISTINAS.....	17
2.4 CIANOBACTÉRIAS E BALNEABILIDADE.....	22
2.5 RESERVATÓRIO SALTO GRANDE - CARACTERIZAÇÃO GERAL, CO- MUNIDADE FITOPLANCTÔNICA E CIANOBACTÉRIAS	40
3 OBJETIVOS.....	44
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 ÁREA DE ESTUDO, ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM E COLETAS	45
4.2 ANÁLISES	49
4.2.1 VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS E LIMNOLÓGICAS.....	49
4.2.2 VARIÁVEIS BIOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS	50
4.2.2.1 CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DO FITOPLÂNCTON E CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS	51
4.2.2.2 ISOLAMENTO DAS CIANOBACTÉRIAS.....	53

4.2.2.3 ANÁLISES DE MICROCISTINAS	54
4.2.2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CIANOBACTÉRIAS	58
4.2.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	63
5 RESULTADOS	64
5.1 VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS E LIMNOLÓGICAS	64
5.2 VARIÁVEIS BIOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS.....	74
5.2.1 CLOROFILA <i>a</i> , CIANOBACTÉRIAS E FITOPLÂNCTON.....	74
5.2.2 ISOLAMENTO DAS CIANOBACTÉRIAS.....	82
5.2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CIANOBACTÉRIAS ...	82
5.2.4 MICROCISTINAS NAS AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	92
5.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	93
5.4 ATENDIMENTO ÀS RESOLUÇÕES CONAMA 274/2000 E CONAMA 357/2005	98
6 DISCUSSÃO	100
6.1 VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS E LIMNOLÓGICAS	100
6.2 VARIÁVEIS BIOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS.....	106
6.2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS	107
6.2.2 MICROCISTINAS E BALNEABILIDADE.....	115
7 PLANO DE MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO COM VISTAS À BALNEABILIDADE	123
8 CONCLUSÕES.....	127
9 RECOMENDAÇÕES.....	132
10 REFERÊNCIAS	138
ANEXOS	161
ANEXO 1 FOTOS DOS PONTOS DE COLETA	162
ANEXO 2 PONTOS DE COLETA, CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E USOS RECREACIONAIS	163
ANEXO 3 LISTA GERAL DOS TÁXONS DE CIANOBACTÉRIAS RELATADAS PARA O RESERVATÓRIO SALTO GRANDE.....	165

ANEXO 4 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS CIANOBACTÉRIAS ENCONTRADAS NO RESERVATÓRIO SALTO GRANDE	168
ANEXO 5 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS ENCONTRADOS NO RESERVATÓRIO SALTO GRANDE.....	173
ANEXO 6 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA E CONSTÂNCIA DE OCORRÊNCIA DAS CIANOBACTÉRIAS NA PRAIA DOS NAMORADOS	176
ANEXO 7 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA E CONSTÂNCIA DE OCORRÊNCIA DAS CIANOBACTÉRIAS NO IATE CLUBE.....	177
ANEXO 8 FOTOS DAS CIANOBACTÉRIAS DOS ISOLADOS E DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS	178
ANEXO 9 CROMATOGRAMAS	186
ANEXO 10 SEQUÊNCIAS DOS GENES rDNA 16S DAS LINHAGENS ISOLADAS DO RESERVATÓRIO SALTO GRANDE	188

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agrupamento dos genes envolvidos na síntese de microcistinas em diferentes gêneros de cianobactérias.	18
Figura 2. Reservatório Salto Grande, pontos de coleta na Praia dos Namorados (1), no Iate Clube (2), o rio Atibaia (3) e a barragem (4).	47
Figura 3. Fluxograma sintetizando o preparo das amostras para a análise no CLAE.	57
Figura 4. Precipitação média diária e vazão média mensal afluyente ao reservatório a partir de dados fornecidos pela Companhia Paulista de Força e Luz – CPFL no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	65
Figura 5. Variáveis físicas, químicas e biológicas no ponto de coleta na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	71
Figura 6. Variáveis físicas, químicas e biológicas no ponto de coleta no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	73
Figura 7. Número de organismos por mL dos principais grupos fitoplanctônicos na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	74
Figura 8. Porcentagem relativa das classes fitoplanctônicas na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	75
Figura 9. Porcentagem de ocorrência das células de cianobactérias por espécies encontradas na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	76
Figura 10. Número de organismos por mL dos principais grupos fitoplanctônicos no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	77
Figura 11. Porcentagem relativa das classes fitoplanctônicas no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	78
Figura 12. Porcentagem de ocorrência das células de cianobactérias por espécies encon-	

tradas no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.	79
Figura 13. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de 16S para as culturas isoladas.	85
Figura 14. Análise filogenética construída pelo método "Neighbor-joining" baseada em seqüências do gene de rDNA 16S das cianobactérias isoladas do reservatório Salto Grande.	87
Figura 15. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de NRPS (sintetase de peptídeo não ribossomal) para as culturas isoladas.	89
Figura 16. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de PKS (sintetase de policetídeo) para as culturas isoladas.	90
Figura 17. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR do gene <i>mycA</i> nas amostras ambientais.	92
Figura 18. Ordenação do biplot pelo ACP com a exclusão do NT, PT e microcistinas.	96
Figura 19. Ordenação do biplot pelo ACP com a exclusão das coletas de maio e junho.	97

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Características gerais dos principais grupos de cianotoxinas, alvo em mamíferos e gêneros produtores.	11
Quadro 2. Valores orientadores e de ingresso diário tolerável para microcistina-LR.	14
Quadro 3. Valores orientadores para a proteção da saúde humana em águas recreacionais.	26
Quadro 4. Categorização das águas em termos de frequência e intensidade de florações e a eficácia das ações de monitoramento.	29
Quadro 5. Categorias de risco relacionadas aos usos da água.	30
Quadro 6. Classificação dos corpos d'água e diretrizes para o enquadramento de acordo com a Resolução CONAMA Nº 357/2005.	36
Quadro 7. Informações gerais sobre o Reservatório de Salto Grande.	40
Quadro 8. Valores médios (M) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas – Praia dos Namorados.	46
Tabela 1. Valores médios (M) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas – Iate Clube.	66
Tabela 2. Valores médios (M) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas – Iate Clube.	67
Tabela 3. Valores médios (M) e Desvio Padrão (DP) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas para a estação das secas e chuvosa na Praia dos Namorados.	68
Tabela 4. Valores médios (M) e Desvio Padrão (DP) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas para a estação das secas e chuvosa no Iate Clube.	69
Tabela 5. Identidades das seqüências (%) dos genes rDNA 16S das linhagens isoladas do reservatório de Salto Grande comparadas com outras seqüências de cianobactérias do GenBank.	86

Tabela 6. Linhagens de cianobactérias isoladas do reservatório Salto Grande e valores de-	
tectados de microcistinas avaliados por ELISA e distribuição de genes de NRPS	
e PKS.	91
Tabela 7. Correlação entre o número de células de cianobactérias e parâmetros ambientais.	94
Tabela 8. Códigos das variáveis utilizadas na análise de ACP.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP - Análise de Componentes Principais
CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPFL - Companhia Paulista de Força e Luz
DMEAO - Dose de Mínimo Efeito Adverso Observável
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
DNEAO - Dose de Nenhum Efeito Adverso Observável
DP - Desvio Padrão
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ETE - Estação de Tratamento de Efluentes
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
IDT - Ingresso Diário Tolerável
LD - Limite de Detecção
LOAEL - Lowest Observed Adverse Effect Level
LPS - Lipopolisacarídeo
MC - Microcistinas
MC-LR - Microcistina LR
NOAEL - No Observed Adverse Effect Level
NRPS - Non-ribosomal Peptide Synthetases
NT - Nitrogênio Total
NT/PT - Razão Nitrogênio Total/Fósforo Total
OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

PKS - Polyketide Synthetases

PT - Fósforo Total

RT/PCR - Real Time/PCR

SANASA - Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S.A.

UGRHI - Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

UNESCO - United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

VMP - Valor Máximo Permitido

RESUMO

Agujaro, L.F. Subsídios para um plano de monitoramento de cianobactérias em reservatórios com vistas à balneabilidade. Estudo de caso: Reservatório Salto Grande, Americana, SP. (Tese de Doutorado). Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, 2007.

Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas têm sido detectadas em vários reservatórios no Estado de São Paulo, muitos deles com intenso uso recreacional, como o reservatório Salto Grande (Americana, SP). Poucos estudos no Brasil enfocam aspectos de balneabilidade e saúde pública por exposição a estes organismos em corpos d'água interiores. Planos de monitoramento para a avaliação dos riscos associados são inexistentes. Diante dos potenciais problemas de saúde pública, foi desenvolvido um estudo com o objetivo de: efetuar um levantamento qualitativo e quantitativo das cianobactérias, associar os fatores ambientais condicionantes de sua ocorrência, avaliar o potencial toxicológico destas águas e utilizar abordagens moleculares inéditas para o local estudado e ainda pouco empregadas no País. As coletas foram mensais, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006, nas margens e sempre aos domingos. Realizaram-se a contagem e a identificação de organismos e células de cianobactérias, contagem das principais classes fitoplanctônicas, determinação de clorofila *a*, avaliação de microcistinas pelo método ELISA e microcistina-LR por CLAE e determinação de parâmetros físicos e químicos. Paralelamente isolaram-se treze linhagens em culturas uniespecíficas para o aprofundamento dos estudos taxonômicos por meio do seqüenciamento do gene rDNA 16S. Linhagens de cianobactérias e amostras ambientais foram submetidas à detecção do gene *mycA* por PCR e foi verificada a distribuição dos genes NRPS e PKS nos isolados. Foram verificadas densidades elevadas de células de cianobactérias em todas as amostragens,

com predominância de isoformas de *Microcystis* spp.. As variáveis que apresentaram correlação elevada com as células de cianobactérias foram clorofila *a*, fósforo total, nitrogênio total e microcistina-LR. As concentrações médias detectadas de até 38,00 µg/L de microcistinas, quando comparadas aos valores internacionais, apontam riscos para a população exposta. Com relação à biodiversidade das amostras ambientais foram detectados treze táxons inéditos para o reservatório e sete para os isolados. A análise filogenética das cianobactérias isoladas demonstrou que há necessidade de revisão da sistemática e taxonomia do grupo. Os genes *mycA*, *NRPS* e *PKS* se mostraram satisfatórios para serem empregados no monitoramento. Variações ambientais sazonais condicionaram a ocorrência das populações de cianobactérias que são dominadas por espécies com elevado potencial toxigênico e oferecem riscos à balneabilidade. Os resultados obtidos subsidiaram a elaboração de um Plano de Monitoramento de Cianobactérias em Ecossistemas no Estado de São Paulo com vistas à Balneabilidade. Este plano permitirá que autoridades gestoras dos recursos hídricos e de saúde pública possam elaborar Planos de Ação Local – PAL para controle e prevenção dos riscos associados às cianobactérias em águas recreacionais.

Palavras-chave: cianobactérias, balneabilidade, reservatórios, plano de monitoramento, microcistinas, caracterização molecular, rDNA 16S, *mycA*, *NRPS*, *PKS*.

ABSTRACT

Agujaro, L.F. Studies to support the development of a cyanobacteria monitoring plan for recreational waters. Case study: Salto Grande Reservoir, Americana, Sao Paulo, Brazil. (PhD Theses). Civil Engineering, Architecture and Urbanism School, Campinas. 2007.

Potentially toxic cyanobacteria blooms have been detected in several water reservoirs with intense recreational use such as in Salto Grande Reservoir, Sao Paulo State, Brazil. Very few studies in this country focus on the related public health aspects. There are no monitoring plans developed by public authorities to evaluate the associated risks. A qualitative and quantitative cyanobacteria research was carried out at the recreational area of the reservoir, connected to the environmental factors which regulate its occurrence in order to evaluate the toxicological potential of these waters, using molecular approaches that have just recently been used in Brazil. The results obtained led to a Cyanobacteria Monitoring Plan for freshwater ecosystems in Sao Paulo State aiming to allow the safe recreational use of these water bodies. It was taken eleven monthly samples during the wet and dry seasons from April 2005 to February 2006 at Namorados Beach and at Iate Clube de Americana, on Sundays, when intense recreational use occurs. The following environmental variables were analyzed: water temperature, precipitation, water flow into the reservoir, Secchi depth, pH, total phosphorus and nitrogen levels, in addition to numbering and identifying organisms and cyanobacteria cells, main phytoplankton Classes, chlorophyll *a*, besides microcystins assessment by ELISA method and microcystin-LR by HPLC-MS. Simultaneously, thirteen strains were isolated in uni-specific cultures in order to deepen the taxonomic studies through sequencing of rDNA 16S gene. To evaluate the toxigenic potential, the strains of cyanobacterias and the environmental samples were tested to detect *mycA* by PCR

and it was investigated the distribution of NRPS and PKS genes in the isolated strains. It was observed high density of cyanobacteria cells in all samples, with predominance of *Microcystis* spp. isoforms. The variables that presented high correlation with the cyanobacteria cells were chlorophyll *a*, total phosphorus and nitrogen levels, and microcystin-LR. High average water temperature and high pH were observed both in wet and dry seasons and average values up to 38.00 µg/L of microcystins were detected pointing to health risks to the population exposed. During this survey, it was found non-conformities to Brazilian CONAMA Resolution 357/2005 for Class 2 waters, for primary contact recreation, mainly for chlorophyll *a*, total phosphorus and cyanobacteria cells. Regarding biodiversity of the environmental samples, it was detected twelve unknown taxa for the reservoir and seven for the isolated strains. The phylogenetic analysis with rDNA 16S of isolated cyanobacteria showed the need to revising the methodology for this taxonomic group. The molecular methodology employed to detect *mycA*, NRPS and PKS genes has proven to be satisfactory for the monitoring process. The seasonal and environmental changes and morphometric characteristics were important factors for the presence of cyanobacteria populations which were dominated by species with high toxigenic potential and pose risks to recreational uses of water. In this context, the Cyanobacteria Monitoring Plan should be implemented. It is suggested that the cyanobacteria population knowledge should be improved and that new methodology, such as the molecular one, which is faster and more precise, should be employed.

Key-words: Cyanobacteria, Recreational waters, Reservoirs, Monitoring plan, Microcystins, rDNA 16S, *mycA*, NRPS, PKS.

1 INTRODUÇÃO

A constante degradação ambiental em reservatórios com intensa ocupação antrópica em seu entorno tem alterado significativamente a qualidade da água, quer seja para abastecimento público, irrigação e recreação. O grande aporte de nitrogênio e fósforo, associado com a condição lântica do corpo hídrico, favorece o aparecimento de florações intensas de algas e cianobactérias, sendo mais comuns as de cianobactérias que são potenciais produtoras de cianotoxinas. De acordo com WATZIN et al. (2006), o aumento de florações de cianobactérias tem estimulado o interesse crescente no seu monitoramento e maior atenção dos agentes de saúde pública nos riscos à saúde associados com a exposição a esses organismos. Em uma síntese dos estudos já desenvolvidos com a comunidade fitoplanctônica no reservatório de Salto Grande, Americana, SP, TUCCI et al. (2004) relatam a importância quantitativa destes organismos na composição taxonômica, na estrutura e produção primária do local. DEBERDT (2002) estudou as florações de cianobactérias neste reservatório em relação aos seus aspectos toxicológicos, detectando pela primeira vez a ocorrência de microcistina-LR em pontos localizados em sua porção central.

De acordo com CARMICHAEL (2001), as cianotoxinas formam um grupo diverso de substâncias químicas e seu mecanismo tóxico em vertebrados é utilizado para separá-las em hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas como alcalóides ou organofosforados (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas), citotoxinas (cilindrospermopsinas), dermatotoxinas (lyngbyatoxinas) e toxinas irritantes (lipopolissacarídeos). Segundo a literatura, estudos realizados em vários países demonstraram que cerca de 50% a 70% das linhagens cianobactérias analisadas mostraram-se tóxicas (SIVONEN et al., 1990; LAWTON & CODD, 1991; BAKER & HUMPAGE, 1994; VASCONCELOS, 1994; YOO et al., 1995 *apud* VIEIRA, 2002). No Brasil,

foram confirmadas florações tóxicas em diversas regiões (AZEVEDO & CARMOUZE, 1994; AZEVEDO et al., 2002; COSTA et al., 2006; JARDIM et al., 2001; LAGOS et al., 1999; MARINO et al., 2001; MATTHIENSEN et al., 1999; MOLICA et al., 2002; VIEIRA et al., 2003; YUNES et al., 2003). Os principais relatos de cianobactérias tóxicas nas diversas regiões do país encontram-se compilados em CODD et al. (2005b); HONDA et al. (2006) e ODEBRECHT et al. (2002). A função ecológica das toxinas de cianobactérias permanece ainda sob investigação. Recente análise filogenética dos genes que codificam a microcistina sintetase sugere que a habilidade para produzir esta toxina é anterior ao aparecimento dos metazoários, e estes metabólitos secundários produzidos por algumas cianobactérias como *Microcystis* spp., poderiam servir como moléculas sinalizadoras (SCHATZ et al., 2007). Esses autores demonstraram em cultivo, que a lise celular de células de *Microcystis*, seja mecanicamente, seja por condições de stress, induziram o acúmulo do gene *mcyB* que permitiu o aumento da produção de microcistinas pelas células que permaneceram intactas. Desse modo, o aumento da toxicidade do meio poderia eliminar competidores. RANTALA et al. (2004) *apud* DITTMANN & WIEGAND (2006) comentam que a toxicidade aos vertebrados pode ter ocorrido como um efeito lateral durante a evolução

Estudo realizado em 63 mananciais de abastecimento em 17 estados brasileiros por MURAKAMI et al. (2001), demonstrou que as cianobactérias estão presentes na quase totalidade dos mananciais investigados, apontando um risco permanente de produção de toxinas.

Com relação aos potenciais efeitos das cianotoxinas na saúde humana, no Brasil, a Portaria 518/2004 (BRASIL, 2004), que dispõe sobre qualidade de água para consumo humano, contempla as cianobactérias e exige seu monitoramento nas tomadas d'água das captações e análise de suas toxinas, estabelecendo limites máximos de concentrações aceitáveis. Para atendimento ao padrão de potabilidade, seguindo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde - OMS exige-se apenas a análise das microcistinas por serem de ocorrência mais comum, apresentarem alternativas metodológicas mais simplificadas e estudos consistentes que permitem estabelecer critérios de VMP (valor máximo permitido) de 1,0 µg/L para a microcistina-LR. Para as demais cianotoxinas há apenas a recomendação de seu monitoramento e indicação de VMP. Também a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) que dispõe sobre a classificação dos

corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, estabelece os VMP de densidade de células de cianobactérias, de clorofila *a* e fósforo total.

Um aspecto bastante preocupante do efeito das cianotoxinas na saúde humana está relacionado ao uso das águas para fins recreacionais. Diversos trabalhos e manuais (CHORUS & CAVALIERI, 2000; ENVIRONMENTAL HEALTH UNIT, 2001; FRANK, 2002; SCOTTISH EXECUTIVE, 2002, WHO, 2003; CODD et al., 2005a, DIETRICH & HOEGER, 2005; WATZIN et al., 2006; STEWART, 2006, AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) apresentam estudos de avaliação de risco à saúde humana em águas recreacionais, planos de monitoramento e ações mitigadoras. Valores máximos permitidos - VMP de cianotoxinas em águas recreacionais são mais difíceis de estabelecer por causa das muitas vias de exposição pelos usuários (PILOTTO et al., 1997; CHORUS & BARTRAM, 1999; CHORUS & FASTNER, 2001 *apud* WATZIN et al., 2006). Há carência de estudos epidemiológicos com informações de efeitos agudos e crônicos das cianotoxinas em humanos para embasar avaliações de risco que possam proteger o público dos riscos presentes em ambientes aquáticos recreacionais, sendo necessário, também, o desenvolvimento de biomarcadores de exposição, susceptibilidade e efeito de cianotoxinas em humanos e populações naturais.

No Brasil, a Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000) referente às condições de balneabilidade, não contempla valores orientadores para florações de cianobactérias, porém considera passível de interdição pelos órgãos de controle ambiental, trechos dos corpos d'água em que ocorram toxicidade ou formação de espuma decorrente de florações de algas. A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) estabelece VMP de clorofila *a* e células de cianobactérias nas diferentes classes de uso dos corpos d'água para recreação de contato primário e secundário.

Poucos estudos (WOSIACK, 2005; SILVA, 2005) são voltados para os efeitos das cianobactérias e cianotoxinas em águas doces recreacionais no país e observa-se, também, que os órgãos de controle ambiental ainda não apresentam monitoramentos sistemáticos da ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas voltados para a avaliação de riscos e balneabilidade. Apesar dos diversos estudos já realizados no reservatório Salto Grande enfocando a comunidade

fitoplanctônica e as cianobactérias (COSTA, 1988; DEBERDT, 2002; SOUZA, 2000; TUCCI et al., 2004), nenhum aborda diretamente a avaliação dos riscos à saúde para atividades recreacionais quando da presença das cianobactérias e quantificação de suas células com abordagens moleculares e toxicológicas.

Atualmente, inúmeros trabalhos (BAKER et al., 2002; DITTMANN & BÖRNER, 2005; MOFFIT & NEILAN, 2004; NEILAN et al., 1999; NISHIZAWA et al., 1999; OUAHID et al., 2005; RANTALA et al., 2004; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000), têm utilizado a abordagem molecular no estudo das cianobactérias, caracterizando os genes envolvidos na síntese de algumas cianotoxinas como a microcistina e cilindrospermopsina. A determinação molecular da presença destes genes torna-se um fator importante na medida em que determinada cianobactéria pode possuir o potencial genético para a produção de toxinas, porém, por influência de determinados fatores ambientais, as toxinas podem não estar sendo liberadas no momento da avaliação química. Os trabalhos e teses publicados no Brasil envolvendo esta abordagem ainda são escassos (ANJOS et al., 2006; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2001, 2007; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; FIORE et al., 2000, 2005, 2007; LORENZI, 2004; SILVA, 2006). Portanto, o presente trabalho é o primeiro a focar esses aspectos para o reservatório Salto Grande.

Considerando um tema de suma importância para a saúde pública do ponto de vista da promoção da saúde e da prevenção de doenças, é condição fundamental que se trabalhe em ações coordenadas e intersetoriais envolvendo diversas áreas do conhecimento para aproximar-se da qualidade de vida e promover políticas públicas saudáveis. Para tanto, fazem-se necessários estudos que tracem um planejamento das ações a partir dos conhecimentos biológicos, toxicológicos, do saneamento e da gestão de recursos hídricos na avaliação dos riscos à saúde.

A Promoção da Saúde, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), deve ser entendida e considerada em sentido mais amplo, não daquele do combate às doenças e delineamento de políticas apenas para dentro do setor saúde, mas sim como uma estratégia de articulação transversal, integrada e intersetorial, que faça dialogar as diversas áreas do setor sanitário, setores do Governo, o setor privado e não governamental e a sociedade, compondo

redes de compromissos e co-responsabilidades quanto à qualidade de vida da população (SPERANDIO, 2006).

O presente estudo objetiva realizar o levantamento qualitativo e quantitativo de cianobactérias em pontos com significativa atividade recreacional no reservatório Salto Grande, Americana, SP, determinar o potencial de toxicidade na água bruta e nas linhagens isoladas, detectar e caracterizar molecularmente as cianobactérias potencialmente tóxicas isoladas e presentes em amostras ambientais, gerando informações biológicas e toxicológicas para subsidiar um plano de monitoramento de cianobactérias com vistas à balneabilidade a ser utilizado pelos gestores de recursos hídricos na caracterização e avaliação dos riscos associados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIANOBACTÉRIAS: CARACTERIZAÇÃO, TAXONOMIA E ECOLOGIA

Cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes pertencentes ao domínio Bacteria e que devido a sua habilidade de sintetizar clorofila a, foram consideradas durante longo tempo como algas, que são organismos pertencentes ao domínio Eukarya, sendo denominadas cianofíceas ou algas verde-azuladas (“blue green algae”). O posicionamento atual desse grupo de microrganismo dentro do Filo Cyanobacteria do domínio Bacteria (BOONE et al., 2001) foi possível após o desenvolvimento dos estudos de microscopia eletrônica de transmissão e moleculares.

O ponto de partida na taxonomia das cianobactérias com THURET em 1875 e os primeiros trabalhos taxonômicos foram publicados baseados puramente em observações morfológicas, seguindo a tradição botânica. Os sistemas de classificação e identificação de cianobactérias que se seguiram, foram também baseados principalmente em características morfológicas (GEITLER 1932, HOLLERBACH, 1953, DESIKACHARY, 1959, STARMACH 1966 *apud* KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). As cianobactérias são organismos procariotos, muitos dos quais de estrutura bastante simples e pouco diferenciados morfológicamente e apenas o critério morfológico apresenta-se pouco consistente e “pobre” na separação de grupos relacionados.

Até o início dos anos 1980, sistemas alternativos foram propostos, ora unindo táxons,

como o sistema proposto por Drouet, baseado no pressuposto de que a variabilidade no grupo era decorrente da ampla adaptabilidade e polimorfismo, ora sistemas que descreviam cada ecomorfo como um táxon separado; porém, estes sistemas não tiveram aceitação, pois não correspondiam à diversidade observada na natureza e nas culturas e, variações morfológicas em cianobactérias são ainda pouco conhecidas e subestimadas (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). Esses autores enfatizam que uma única abordagem para avaliar a variação das espécies não existe e que cada uma tem sua própria plasticidade e diferentes reações às condições ambientais.

Ainda de acordo com KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (2005) estudos sistemático-ecológicos, geralmente têm mostrado que formas morfolologicamente estáveis, altamente invariáveis ou oligomórficas são encontradas em condições ambientais ecologicamente homogêneas enquanto que formas polimórficas altamente variáveis e morfolologicamente instáveis são usualmente distribuídas em condições ambientais não homogêneas e temporalmente variáveis; também diferentes estágios no ciclo de vida do organismo podem influenciar em sua morfologia. Estudos morfométricos e de crescimento em diferentes condições de cultivo, como os estudos de “gradientes-cruzados”, podem evidenciar os limites da variação potencial em diferentes genótipos em distintas condições de cultivo, sendo tais estudos importantes para evidenciar a variabilidade morfológica, ecofisiológica e bioquímica que compõem as populações naturais.

Abordagens da taxonomia bacteriana foram introduzidas por STAINER et al. (1971), STAINER (1977), RIPKA et al. (1979) *apud* KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999), dando ênfase aos aspectos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares, além dos morfológicos, no estudo de cepas isoladas em culturas axênicas. Considerando o aspecto prático que pudesse conciliar o sistema nomenclatural no Código de Nomenclatura Bacteriano e Botânico, um sistema proposto por K. Anagnostidis e J. Komárek (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1985, 1988, 1990; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005) contempla a abordagem multidisciplinar, aliando os critérios botânicos tradicionais e atuais de populações naturais e em culturas a aspectos ambientais e geográficos.

KOMÁREK (2003) comenta que apesar da categoria taxonômica “espécie” ser

considerada básica para todos os organismos, para cianobactérias é problemática à luz dos modernos critérios de classificação que levam em consideração aspectos paleontológicos, fenotípicos (morfológicos), ecológicos, ultraestruturais (microscopia eletrônica) e moleculares (seqüenciamento molecular e hibridização DNA/DNA), sendo que a classificação taxonômica deve estar de acordo com as relações filogenéticas. A caracterização genotípica de numerosos gêneros pelo rDNA 16S já está definida e corresponde, perfeitamente, aos caracteres morfológicos tradicionais, sendo estas caracterizações suficientemente robustas para serem aceitas pelo “Bergey’s Manual”. Problemas aparecem com a classificação em nível infragenérico que tem utilizado caracteres como tamanho e forma das células, presença de bainhas, pigmentação e tipo de ramificação que são freqüentemente instáveis e variáveis e que, em muitos casos, não acompanham o seqüenciamento molecular, provavelmente por omitirem a especificidade ecofisiológica.

KOMÁREK (2003) relata ainda, que em contraste com a variabilidade descrita para gêneros geneticamente delimitados, são encontrados na natureza “morfotipos” dentro dos gêneros que são estáveis, podendo ocorrer algumas vezes em diferentes áreas e persistirem por anos nos biótopos com condições ecológicas mais ou menos estáveis, apresentando-se como agrupamentos coerentes em árvores filogenéticas. A eliminação da categoria “espécie” em cianobactéria em função da ausência de critérios geneticamente uniformes pode não ser satisfatória para ecologistas que necessitam identificar os diferentes ecotipos e morfotipos para caracterizar a complexa diversidade da natureza. A estabilidade de critérios fenotípicos, caracteres ecológicos e critérios genotípicos devem ser considerados em conjunto para a delimitação das espécies em uma abordagem polifásica. De acordo com esta abordagem, a maioria dos gêneros e espécies deve ser reavaliada no futuro e o conhecimento da diversidade das cianobactérias, particularmente de ambientes tropicais e biótopos extremos, poderá contribuir para a descrição de novas espécies.

HOFFMANN et al. (2005) propuseram um sistema de classificação para cianobactérias com uma abordagem polifásica unindo dados do seqüenciamento genético para o estudo da filogenia e taxonomia e informações ultra-estruturais como por exemplo, o arranjo dos tilacóides, além de tipos de reprodução e morfologia. Características ecofisiológicas têm importante papel

em níveis taxonômicos mais baixos como gêneros e espécies. Os autores sugerem que o sistema de classificação de cianobactérias em níveis mais altos (supragenéricos) utilizado atualmente, separando formas cocóides de filamentosas, não reflete a história evolucionária do grupo e necessita ser corrigido. De acordo com dados moleculares disponíveis, formas unicelulares e filamentosas simples estão dispersas através do sistema, enquanto que apenas os táxons heterocitados são um grupo monofilético. A correta caracterização taxonômica e o isolamento de populações de cianobactérias para o seqüenciamento genético de ambientes tropicais que tenham suas características ecológicas bem estudadas, como o realizado no presente estudo, muito têm a contribuir para o incremento deste conhecimento, tão necessário neste período de definições e mudanças.

Do ponto de vista ecológico, estes microrganismos têm sido reconhecidos por sua capacidade de formar pigmentos como as ficocianinas que lhes conferem a coloração azulada e pela sua longa história evolutiva, tendo surgido em nosso planeta há aproximadamente 3,5 bilhões de anos. Algumas das razões para a dominância e ampla ocorrência das cianobactérias em diversos ambientes aquáticos estão relacionadas a essa longa história evolutiva que lhes conferem inúmeras vantagens adaptativas como: resistência a metais e baixas concentrações de oxigênio dissolvido, alta tolerância à radiação ultravioleta, sendo que algumas espécies são capazes de utilizar H_2S como doador de elétrons ao invés da H_2O (WHITTON & POTTS, 2000). A excelente habilidade para se aclimatar a uma ampla faixa de condições ambientais é baseada em estratégias adaptativas altamente sofisticadas.

As cianobactérias podem apresentar crescimento intenso no ambiente aquático, denominado florações ou “blooms”, quando condições ambientais são apropriadas e poucas ou apenas uma espécie domina. Um conjunto de fatores pode favorecer este crescimento como elevadas concentrações de nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo, temperaturas elevadas, luz adequada e condições estáveis da coluna d’água. De acordo com OLIVER & GANF (2000) as florações podem ser definidas em valores de número de células ($2,0 \times 10^4$ céls./mL) ou clorofila *a* (10 mg/m^3). Algumas espécies possuem aerótopos e podem formar “escumas” superficiais, porém outras espécies formam florações em diferentes profundidades na coluna d’água. Condições climáticas e meteorológicas que influenciam a estratificação térmica em

ambientes aquáticos possibilitam condições estáveis que favorecem esta ocorrência, associadas às condições eutróficas e hipereutróficas. Temperaturas elevadas também contribuem para este “fenômeno”, pois esses organismos atingem sua taxa máxima de crescimento em temperaturas acima de 25°C (CHORUS & BARTRAM, 1999). Segundo FRANK (2002), a concentração inicial crítica de fósforo total para o desenvolvimento de florações é de 40 µg/L.

2.2 CIANOTOXINAS

As cianotoxinas são basicamente formadas por três grandes grupos de substâncias químicas, os peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (Quadro 1). Também são classificadas quanto aos seus efeitos no organismo de mamíferos, sendo os principais as de efeito neurotóxico como alcalóides ou organofosforados (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas) e hepatotóxicas como peptídeos ou alcalóides (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas), de efeitos crônicos ou agudos e são liberadas por vários gêneros de cianobactérias. De grande relevância para o uso recreacional estão os lipopolissacarídeos de efeitos alergênicos. A maioria são endotoxinas que são liberadas para o meio ambiente em decorrência da lise celular. O aparecimento de linhagens produtoras de toxinas em populações é elevado e florações de cianobactérias podem ser multiespecíficas, podendo apresentar variações espaciais e temporais na sua toxicidade.

QUADRO 1 Características gerais dos principais grupos de cianotoxinas, alvo em mamíferos e gêneros produtores.

Fonte: DEBERDT (2002) e STEWART et al. (2006).

GRUPO DA TOXINA	ALVO PRIMÁRIO EM MAMÍFEROS	GÊNEROS DE CIANOBACTÉRIA
Peptídeo cíclico		
Microcistinas	Fígado	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Snowella</i> , <i>Woronichinia</i> .
Nodularina	Fígado	<i>Nodularia</i>
Alcalóides		
Anatoxina-a, Homoanatoxina-a	Nervo Simpático	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Raphidiopsis</i> .
Anatoxina-a(S)	Nervo Simpático	<i>Anabaena</i>
Aplisiotoxina, Debromoaplysiotoxina	Pele, trato gastrointestinal	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix</i>
Cylindrospermopsinas	Órgãos múltiplos (fígado, rim, baço, trato gastrointestinal, coração, timo, pele)	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> .
Lyngbyatoxina-a	Pele, trato gastrointestinal	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxinas	Nervo axônico	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i>
Lipopolissacarídeos (LPS)	Potencial irritante; afeta qualquer tecido exposto	Todos

Estudos sobre a ocorrência, distribuição e frequência das cianotoxinas tiveram grande desenvolvimento na década de 1980-1990, empregando principalmente bioensaios com camundongo. No final dessa década, se iniciaram estudos com métodos analíticos para quantificar cianotoxinas, que têm crescido desde então.

AZEVEDO (1998) relata estudos realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro sobre as linhagens isoladas de corpos

d'água brasileiros em que 82% mostraram-se tóxicas quando testadas por bioensaios. Segundo VIEIRA (2002), cerca de 25 gêneros e mais de 40 espécies já foram constatadas como produtoras de cianotoxinas nocivas aos animais e ao homem. Pesquisas desmonstram que em florações de cianobactérias, 50 a 70% são constituídas por espécies tóxicas. Em estudos realizados pelo mesmo autor, em uma represa de abastecimento público em Belém (PA) foi registrado o efeito altamente hepatotóxico para camundongos pela microcistina para as espécies *Microcystis viridis* e *Radiocystis fernandoi*. A produção de toxina por esta última espécie é o primeiro relato na literatura. CODD et al. (2005b) resumizam a ocorrência das cianobactérias e suas toxinas no mundo no relatório da CYANONET – “A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management – Initial Situation Assessment and Recommendations”, um projeto da United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization - UNESCO para avaliar as cianobactérias, cianotoxinas e seus impactos nos diversos continentes.

Recentemente para o Brasil, HONDA et al. (2007) apresentam síntese de 29 relatos de cianobactérias tóxicas para diversas regiões do país, descrevendo o tipo de material analisado, porcentagem de amostras tóxicas, métodos de análise, toxina encontrada, valor detectado e referência. Do total, 19 referem-se à ocorrência de microcistinas e nove são para a isoforma microcistina-LR. Como a detecção da microcistina é facilmente verificada pelo uso do imunoensaio ELISA, comercializado em forma de “kit” e os padrões de microscitina-LR são mais facilmente comercializados, estes valores podem estar mais associados com esta facilidade do que com a ocorrência real no ambiente. Já os alcalóides neurotóxicos (anatoxinas e saxitoxinas), que são típicos dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e os alcalóides hepatotóxicos (cilindrospermopsinas) típicos de *Cylindrospermopsis* e *Aphanizomenon* são menos comuns.

De acordo com WHO (2003) as toxinas de cianobactérias de ocorrência mais ampla são as microscistinas e as neurotoxinas. Os estudos relatados anteriormente para o Brasil indicam a predominância das cianotoxinas representadas por peptídeos cíclicos (microcistinas) cuja produção é característica de gêneros de ocorrência comum como *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* e com obrigatoriedade da determinação pela Portaria 518/2004 (BRASIL, 2004). *Microcystis* é um gênero que se apresenta quase sempre tóxico, porém cepas não tóxicas podem

ocorrer. A toxicidade não é um traço específico para certas espécies, pois cepas não tóxicas ocorrem simultaneamente com tóxicas de acordo com KURMAYER et al. (2002) *apud* WHO (2003). Populações no campo podem ser uma mistura de genótipos com ou sem os genes para a produção da toxina. Enquanto as condições que levam à proliferação das cianobactérias são bem conhecidas, os fatores que levam à dominância das cepas tóxicas sobre não tóxicas ainda são desconhecidos.

Microcistinas

As microcistinas fazem parte do grupo das hepatotoxinas cuja atuação ocorre principalmente no fígado. Elas são heptapeptídeos cíclicos, contendo um aminoácido específico (ADDA) que até o presente tem sido encontrado somente em microcistinas e nodularinas (um pentapeptídeo cíclico ocorrente em cianobactérias de águas salobras). Cerca de 70 formas análogas de microcistinas têm sido identificadas e variam com respeito ao grupo metil e dois aminoácidos dentro do anel com conseqüências para a estrutura terciária da molécula, resultando em diferenças na toxicidade, bem como em suas propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas (WHO, 2003).

A microcistina-LR é uma das mais tóxicas e ocorre com frequência em altas concentrações. Esta é a variante que dispõe de informações suficientes para a derivação de valores orientadores para o cálculo do Ingresso Diário Tolerável – IDT (“Tolerable Daily Intake” - TDI), que é o nível de exposição abaixo do qual se pensa que nenhum efeito adverso possa ocorrer. É importante observar que o fato de exceder os limites de IDT não significa que possa haver efeitos adversos para a saúde, pois dependerá da duração da exposição e da concentração das toxinas presentes. Para o cálculo dos valores orientadores há a necessidade de dados quantitativos derivados de estudos com animais por determinado período de tempo para estimar a Dose de Nenhum Efeito Adverso Observável - DNEAO (“No Observed Adverse Effect” - NOAEL) e a Dose de Mínimo Efeito Adverso Observável - DMEAO (“Low Observed Effect Level” - LOAEL) (QUADRO 2)

QUADRO 2 Valores orientadores e de ingresso diário tolerável para a microcistina-LR

Fonte: CODD, et al. (2005a) e AUSTRALIAN GOVERNMENT (2006)

População	ABASTECIMENTO PÚBLICO		BALNEABILIDADE
	Adulto	Criança	Adulto
Valores orientadores	0,1 µg/L	10,0 µg/L	44,0 µg/L
IDT (DMEAO)	0,04 µg/Kg peso do corpo/dia		0,04 µg/Kg peso do corpo/dia
DMEAO	100 µg/Kg peso do corpo/dia	100 µg/Kg peso do corpo/dia	100 µg/Kg peso do corpo/dia
DNEAO	40 µg/Kg peso do corpo/dia		
Taxa de ingestão	2 L/dia	0,1 L/dia	0,1 L/dia

As microcistinas bloqueiam as proteínas fosfatases 1 e 2a que são importantes “transportadores” moleculares em todas as células eucarióticas com uma ligação covalente irreversível. Para vertebrados uma dose letal de microcistina causa morte por necrose e hemorragia no fígado em horas ou dias. Há evidências da permeabilidade de outras membranas celulares que não das células hepáticas à microcistina, possivelmente para as formas hidrofóbicas que podem penetrar em outros tipos de células (WHO, 2003). FITZGEORGE et al. *apud* WHO (2003) publicou evidências da ruptura de tecidos nasais por microcistina-LR, uma forma hidrofílica. Esta via de absorção pode ser relevante para atividades esportivas que levam à inalação de aerossóis e gotas. Esse autor também demonstrou que a toxicidade de microcistina é cumulativa; uma única dose oral não resultou em aumento do peso do fígado (uma medida de seu dano), porém, a mesma dose aplicada diariamente por sete dias causou um aumento no fígado de 84% e apresentava o mesmo efeito que uma única dose oral 16 vezes maior. Isto pode ser explicado pelas ligações covalentes irreversíveis entre as microcistinas e as proteínas fosfatases com danos substanciais na estrutura celular. Para a balneabilidade e para o risco ocupacional, este fator pode ter graves conseqüências, considerando as exposições moderadas mais freqüentes em períodos de veraneio, especialmente, quando os usuários não são informados. Estes danos de efeitos subagudos no fígado são difíceis de serem diagnosticados e relacionados com a exposição, pois os danos no fígado resultam em sintomas externos já quando são severos.

Florações em um mesmo corpo d'água podem variar de tóxicas e não tóxicas no tempo e no espaço, e a avaliação da diferença na composição das linhagens, ou seja, tóxicas e não tóxicas, não pode ser feita microscopicamente, mesmo pertencendo à mesma espécie; a confirmação somente pode ser feita por meio da detecção da presença dos genes produtores de toxinas e das análises para verificação da produção de cianotoxinas no momento da avaliação. O estímulo para a produção da toxina é desconhecido. Variáveis ambientais como luz, temperatura, nutrientes e metais traço tem sido reproduzidas em laboratório e seus efeitos investigados na produção da toxina (SIVONEN & JONES, 1999). A influência da luz e nutrientes no crescimento e conteúdo de microcistina em *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix agardhii* tem sido relatada em trabalhos de BÖTTCHER et al. (2001); HESSE & KOHL, 2001 *apud* AME et al. (2003).

No reservatório Salto Grande, DEBERDT (2002) estudou as florações de cianobactérias, detectando pela primeira vez a ocorrência de microcistina-LR em dois pontos de coleta localizados no meio do reservatório, durante 8 coletas distribuídas nos meses de seca e cheia, em geral com concentrações abaixo do limite de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, recomendado pela Organização Mundial da Saúde - OMS para água tratada, com exceção de duas coletas, que apresentaram valores de $3,98 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $39,53 \mu\text{g.L}^{-1}$. A autora destaca, em suas considerações finais, que a concentração de microcistina esteve associada aos fatores favoráveis ao desenvolvimento das espécies tóxicas, que foram diferentes para as três escalas estudadas. No macrocosmo a estabilidade da coluna d'água teve papel fundamental, provavelmente porque a autora localizou as estações de coleta em pontos de maior profundidade, no meio do reservatório, onde este aspecto pode ter maior influência. Nos tanques de cultivo (mesocosmo) o enriquecimento com nutrientes foi responsável pelo aumento da densidade das espécies tóxicas e nas culturas a disponibilidade de fósforo foi quem influenciou o crescimento.

AME et al. (2003) ao estudar o reservatório San Roque na Província de Córdoba, Argentina, um reservatório eutrofizado em área de urbanização intensa e destinado a múltiplos usos, relata que florações de *Microcystis aeruginosa* têm ocorrido no local por 30 anos. Foram analisadas 35 florações entre 1998 e 2002 e em somente uma não foi detectada microcistina. Baseado na Análise de Discriminantes, os autores avaliaram que o fósforo inorgânico, sólidos totais, COD (Carbono Orgânico Dissolvido), coliformes fecais, carbonato, bicarbonato, sulfato,

transparência e dureza foram as variáveis mais significativas para discriminar entre a presença e ausência de florações de cianobactérias. Também, neste estudo, foram correlacionadas as quantidades de microcistinas com as variáveis ambientais como a temperatura, carbonatos, nitrogênio amoniacal, nitritos, ferro, magnésio, sólidos voláteis dissolvidos, sólidos suspensos e sólidos voláteis suspensos que foram os mais significativos para discriminar populações com altas e baixas concentrações de microcistina. Os autores não encontraram correlação positiva entre a abundância de cianobactérias e altas concentrações de microcistinas. A temperatura foi a variável que mais deu correlação positiva com a concentração de microcistinas, favorecendo uma produção mais elevada (acima de 23°C); porém, com a produção desfavorecida em altas concentrações de nitrogênio amoniacal ($>36\mu\text{M}$) e Fe($>2\mu\text{M}$). WHITE et al. (2003) estudaram as mudanças na população de *Microcystis* e concentrações de microcistina associadas com fatores ambientais e constataram que sua concentração pode variar com a penetração de luz, temperatura, disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura.

SCHATZ et al. (2007) na busca de clarear a função biológica das microcistinas mostraram que a lise celular de *Microcystis* em culturas de laboratório induziu a acumulação de mycB, que pertence ao complexo de genes que codifica a microcistina sintetase e aumentou a produção de microcistinas nas células que permaneceram intactas, sendo que as microcistinas e outras substâncias liberadas durante a lise celular seriam responsáveis por este aumento. Estudos sobre o efeito de stress oxidativo no aumento de microcistinas em meio de cultura (ROSS et al., 2006 *apud* SCHATZ, 2007) são citados pelos autores, bem como a relação complexa entre disponibilidade de nutrientes e formação de microcistinas em culturas (BABICA et al., 2006; *apud* SCHATZ, 2007). Cepas não tóxicas de *Microcystis* cresceram melhor que as tóxicas sob condições de limitação de nutrientes e a formação de microcistinas foi fortemente afetada pela disponibilidade de nutrientes em algumas cepas tóxicas, mas não em outras. Sob condições de limitação de nutrientes o estímulo da formação do mycB pela exposição ao produto da lise celular pode ocorrer concomitantemente com a inibição da síntese protéica. Os autores sugerem como resultado deste estudo o importante papel dos peptídeos não ribossômicos na comunicação intraespecies (um sinalizador info-químico), especialmente com relação aos competidores

Exposição crônica a microcistinas, caracterizada pelo consumo via oral de peixes

durante longos períodos, pode representar risco à saúde humana, uma vez que estas toxinas são promotoras de tumores hepáticos (SOARES et al., 2004). Assim, a ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas, que produzem microcistinas em lagos e reservatórios destinados à pesca e aquicultura, pode representar risco à qualidade do peixe a ser consumido e, conseqüentemente, esta rota de exposição deve tornar-se uma importante preocupação para as autoridades em saúde pública.

De grande importância para os aspectos da balneabilidade são os lipopolissacarídeos, que são componentes estruturais da parede de bactérias Gram-negativas e são discutidos em revisão elaborada por STEWART et al. (2006). Em recente trabalho, COX et al. (2005) relatam a ocorrência de um aminoácido neurotóxico não proteico β -N-methylamino-L-alanina (BMMA), associado com sintomas de demência e que é produzido por uma ampla variedade de cianobactérias. Este aminoácido é capaz de se ligar a proteínas endógenas e podem funcionar como uma “slow toxin”, uma toxina de efeito lento que pode estar relacionada na etiologia de doenças neuro-degenerativas de longa latência como o “Mal de Alzheimer”, sendo difícil avaliar seus riscos nas populações expostas.

A exposição de populações humanas às cianotoxinas ocorre por meio de algumas vias principais bastante conhecidas como: mananciais de abastecimento público contaminados, água utilizada para hemodiálise, alimentos, atividades recreacionais e ocupacionais (CODD et al., 2005a; MAGALHÃES et al., 2003; DITTMANN & WIEGAND, 2006).

2.3 MÉTODOS MOLECULARES NO ESTUDO DAS CIANOBACTÉRIAS E MICROCISTINAS

As toxinas de cianobactérias são sintetizadas por meio do metabolismo secundário e elaboradas por um mecanismo enzimático paralelo à síntese protéica, portanto não-ribossômico, tratando-se de uma via biossintética bastante utilizada por microrganismos na produção de antibióticos e toxinas (ETCHEGARAY, 1998; MARAHIEL et al., 1997; VON DÖHREN et al.,

1997).

Dentre as hepatotoxinas, as microcistinas têm recebido maior atenção, uma vez que são encontradas com maior frequência nos corpos d'água. Na biossíntese de microcistinas observa-se a presença de sintetases de peptídeos não ribossômicos (NRPSs), sintetases de policetídeos (PKSs) e sintetases híbridas (NRPS-PKS e PKS-NRPS), onde todas as sintetases identificadas são modulares (ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000). As NRPSs e PKSs são enzimas multifuncionais, ou seja, uma mesma enzima pode catalisar várias reações parciais. Como essas reações parciais são repetitivas, as seqüências de aminoácidos dentro dos módulos das NRPSs são altamente conservadas, ocorrendo alta similaridade no alinhamento de suas seqüências (ETCHEGARAY et al., 2004). O alto grau de conservação na estrutura primária das NRPSs também é evidenciado em nível de DNA. Assim, com a informação prévia sobre o agrupamento dos genes de biossíntese de um determinado peptídeo, é possível desenhar iniciadores capazes de amplificar regiões particularmente distintas dos demais genes. Para as cianobactérias, isso foi possível a partir da descoberta dos agrupamentos de genes *mcy*, codificadores de subunidades da sintetase de microcistinas em *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Nodularia* (CHRISTIANSEN et al., 2003; MOFFITT & NEILAN, 2004; NISHIZAWA et al., 1999; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000)

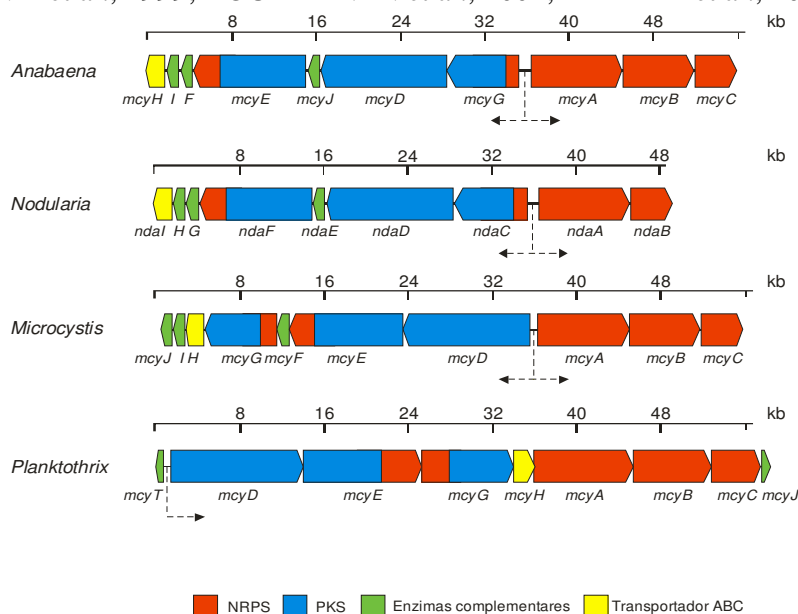


Figura 1 Agrupamento dos genes envolvidos na síntese de microcistinas em diferentes gêneros de cianobactérias (CHRISTIANSEN et al., 2003; MOFFITT & NEILAN, 2004; NISHIZAWA et al., 1999; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000)

Para a *Microcystis aeruginosa* PCC7806 o agrupamento dos genes que participam da biossíntese das microcistinas, denominado *mcy*, localizado no cromossomo, contém 55 kb de DNA codificando dez (10) ORFS (quadro aberto de leitura), *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, *mcyH*, *mcyI*, *mcyJ*. Os genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* são responsáveis pela incorporação de aminoácidos, o gene *mcyF* está envolvido na etapa de epimerização, o *mcyI* na desidratação e o *mcyJ* na metilação da biossíntese, enquanto que o *mcyH* codifica para uma proteína putativa homóloga a um transportador ABC, cuja função especulativa seria o transporte extracelular ou subcelular de microcistinas. A comparação entre os agrupamentos de genes *mcy*, responsáveis pela produção de microcistinas nos quatro diferentes gêneros de cianobactérias, ou seja, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Nodularia*, mostraram que a maioria dos genes estava em ordem diferente, nem todos os genes estavam presentes nos quatro organismos e a identidade entre eles foi baixa (TILLET, PARKER & NEILAN, 2001).

Inicialmente, as regiões que codificam os domínios de adenilação do gene *mcyB* foram consideradas as mais promissoras para serem usadas como alvo na amplificação de genes da biossíntese de microcistinas, uma vez que são umas das responsáveis pelas diferentes isoformas desta toxina. Assim, os primeiros conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores tiveram como alvo parte das seqüências de nucleotídeos do domínio de adenilação do gene *mcyB* e foram denominados FAA/RAA e core1/core2R (degenerados) (NEILAN et al., 1999; NISHIZAWA et al., 1999). Embora esses dois conjuntos de iniciadores tenham mostrado boa correlação com a produção da toxina, foram observados vários problemas de especificidade por TILLET, PARKER & NEILAN (2001). Esses mesmos autores sugeriram que a falta de especificidade poderia ser devido à alta identidade da seqüência da região de adenilação do gene *mcyB* com outros domínios de adenilação de sintetases de peptídeos não-ribossômicos (DITTMANN et al., 1997; TILLET, PARKER & NEILAN, 2001) e a ocorrência de domínios múltiplos de adenilação em *Microcystis* sp. tóxica e não tóxica (NISHIZAWA et al., 1999).

Dessa forma, buscando um domínio de NRPS não comum, TILLET, PARKER & NEILAN (2001) confeccionaram um conjunto de iniciadores (MSF/MSR) que tinham como alvo o domínio da *N*-metiltransferase (NMT), presente, somente, numa região do gene *mcyA*. Utilizando esse domínio, BAKER et al. (2002) estudaram a determinação direta de cianobactérias

potencialmente tóxicas na represa de Malpas, na região de Nova Inglaterra, Austrália. Esses autores, além de detectar linhagens tóxicas de *Anabaena* sp. e *Microcystis* sp. presentes no local, mostraram, também, que ao longo do curso de suas florações, esses organismos apresentavam mudanças nos tipos de célula e toxicidade.

Recentemente, seqüências do gene *mcyD* (KAEBERNICK et al., 2002; OUAHID; et al., 2005; RANTALA et al., 2004) e do *mcyE* (OUAHID; et al. 2005; RANTALA et al., 2004; VAITOMAA et al., 2003) estão sendo usadas para detectar a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas, inclusive em ambientes naturais. OUAHID et al. (2005) desenvolveram uma metodologia capaz de distinguir *Microcystis* produtoras e não produtoras de microcistinas pela amplificação de seis seqüências características de sintetases de microcistinas do agrupamento de genes *mcy*, três delas correspondentes às NRPSs, genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyC*, e as outras três correspondentes às PKSs, genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*. Para isso, cinco novos conjuntos de oligonucleotídeos foram desenvolvidos e testados usando DNA purificado, cultura de células e amostras ambientais. Os amplicons resultantes foram todos obtidos de *Microcystis* produtoras de microcistinas, mas não foram obtidos nas não produtoras. Segundo esses autores, esses resultados suportam a idéia de que a presença de vários genes *mcy* em *Microcystis* pode ser usada como critério para acessar o potencial de toxicidade em espécies de amostras ambientais, contribuindo significativamente para simplificar os testes de toxicidade.

Novos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores estão sendo descritos na literatura com freqüência, principalmente diante do crescente aumento no conhecimento de genes envolvidos na biossíntese de cianotoxinas. Em vários estudos usando alguns desses conjuntos de iniciadores, a técnica da Reação de Polimerização em Cadeia - PCR foi aplicada em amostras ambientais, visando detectar precocemente florações de *Microcystis* potencialmente tóxicas (BAKER et al., 2001, 2002; LORENZI, 2004; NONNEMAN & ZIMBA, 2002; PAN et al., 2002;). Estudos da diversidade, identidade e relações filogenéticas dos principais gêneros de cianobactérias produtoras de microcistina como *Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena* podem ser realizados também utilizando seqüência do gene *mycA* para distinguir entre populações de diferentes gêneros potencialmente produtores de microcistinas (RINTA-KANTO, 2006) em locais com elevadas concentrações de microcistina-LR e determinar qual organismo dentro de

uma população pode ser responsável pela produção de microcistina em regiões espacialmente separadas de um lago ou reservatório.

A estrutura química de muitas cianotoxinas e seus efeitos adversos em animais tem sido elucidada e recentemente revisada (SIVONEN & JONES, 1999). Entretanto, a atual função fisiológica e a regulação das toxinas de cianobactérias permanecem um grande mistério. Estudos em regulação e função das cianotoxinas têm sido focados nos seus efeitos no ecossistema, bem como no efeito das variáveis ambientais na produção das toxinas. Os autores discutem nesta revisão, hipóteses relativas à ecofisiologia das cianotoxinas.

Com os avanços em biologia molecular, tem sido possível, recentemente, elucidar a genética das vias biossintéticas de algumas destas toxinas e começar a investigar a regulação da síntese das toxinas em nível molecular. Esta combinação de pesquisas ecológicas e moleculares é parte de uma nova era de pesquisa na qual as interações no ecossistema são compreendidas em termos de seus determinantes moleculares. Microcistinas e nodularinas são as únicas cianotoxinas na qual a via biossintética e o cluster gênico foram identificados (DITTMANN & BÖRNER, 2005)

No Brasil, ainda são escassos os trabalhos com abordagem molecular das cianobactérias. Aspectos toxicológicos e moleculares são abordados nas publicações de ANJOS et al. (2006) que utilizaram a abordagem molecular para a confirmação de espécies tóxicas utilizando a técnica de PCR e amplificação da região do *mcyB* em um episódio de floração de cianobactérias na represa Billings – São Paulo, SP e de BITTENCOURT-OLIVEIRA (2003) sobre o uso do marcador molecular *mycB* para a detecção de cianobactérias produtoras de microcistinas isoladas de 15 reservatórios artificiais eutróficos no sul, sudeste e nordeste do Brasil.

Trabalhos de cunho taxonômico que procuram estudar a variabilidade morfológica de gêneros e espécies encontrados no Brasil com dados moleculares são os de BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. (2001) que estudaram a variabilidade genética de isolados brasileiros de *Microcystis aeruginosa* utilizando o espaço intergênico da ficocianina, BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. (2007a e 2007b) que utilizaram as seqüências de HIP₁ para estudar o

polimorfismo em *Microcystis panniformis* e espécies de *Geitlerinema*, além de FIORE et al. (2006) que estudaram a diversidade de cianobactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de sedimentos na região amazônica baseada em critérios morfológicos e sequenciamento genético do gene rRNA 16S e FIORE et al. (2007) descreveram um novo gênero de cianobactérias, *Brasilonema*, de hábito subaerofítico, baseado no estudo de critérios citomorfológicos e de sequenciamento genético do gene rRNA 16S.

LORENZI (2004) em sua Dissertação de Mestrado estudou a diversidade de cianobactérias presentes na Represa Billings e Guarapiranga na Região Metropolitana de São Paulo – SP, empregando a técnica de DGGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante) e construção de uma mini-biblioteca de amplicons do gene de rRNA16S e testou com sucesso o emprego do domínio da N-metiltransferase do gene *mycA* em linhagens de *Microcystis* produtoras de microcistinas. SILVA (2006) também estudou a diversidade de cianobactérias identificando 25 linhagens de cianobactérias isoladas de vários locais no Brasil utilizando o espaço intergênico (IGS) com suas subunidades flaqueadoras (*cpcB*) e (*cpcA*) do operon da ficocianina e para avaliar o potencial da produção de produtos naturais por cianobactérias em 59 linhagens utilizando dois conjuntos de iniciadores degenerados para produzir seqüências amplificadas de sintetases de peptídeos não ribossômicos (NRPSs) e de sintases de policetídeos (PKs).

2.4 CIANOACTÉRIAS E BALNEABILIDADE

Um importante aspecto na gestão dos recursos hídricos está relacionado aos usos recreacionais dos corpos d'água, que em determinadas regiões pode representar um importante fator econômico e social, aliado ao desenvolvimento turístico. Pouca atenção tem sido dada pelas autoridades gestoras de recursos hídricos de águas interiores aos impactos na saúde pela exposição às florações de cianobactérias em atividades recreacionais no país. São escassos os trabalhos enfocando estes aspectos, e apenas as dissertações de WOSIACK (2005) e SILVA, (2005) citam esta problemática. Diversos manuais (CHORUS & CAVALIERI, 2000; SCOTTISH

EXECUTIVE, 2002, ENVIRONMENTAL HEALTH UNIT, 2001; WHO 2003, AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006), que são orientadores e não mandatórios, têm focado as cianobactérias em águas recreacionais e apresentam conteúdos generalizados usados como suporte para a tomada de decisão em níveis locais, de acordo com suas características e especificidades, além de contribuir para a adoção de abordagens mais uniformes em níveis nacionais e continentais. Apesar dos muitos manuais publicados por diferentes órgãos públicos na área de saúde e meio ambiente de diferentes países, são poucos os trabalhos científicos sobre o tema.

FRANK (2002), em intenso monitoramento de 155 lagos no sudoeste da Alemanha que apresentavam florações de cianobactérias analisou nutrientes, toxinas e espécies do fitoplâncton dominantes e propôs um esquema de monitoramento para lagos com a finalidade de proteção da vida humana e rebanhos. Este estudo visou avaliar se os locais estudados estavam de acordo com os guias para proteção de banhistas à exposição de cianobactérias tóxicas daquele país (Bundesgesundheitsblatt, 1977 *apud* FRANK, 2002). O autor constatou que para 80% das amostras que apresentavam dominância de cianobactérias, os níveis de clorofila *a* e fósforo total estavam acima dos valores orientadores para a proteção de banhistas, que são 40µg/L de fósforo total e 40µg/L de clorofila *a*, respectivamente.

Vias de Exposição

O manual da WHO (2003) considera três vias de exposição às cianobactérias em águas recreacionais:

- Contato direto de partes expostas do corpo, incluindo ouvidos, olhos, boca, garganta e áreas cobertas com roupa de banho que podem capturar e concentrar células;
- Ingestão acidental de água contendo células de cianobactérias;
- Inalação de água contendo células de cianobactérias.

Uma via não muito considerada em exposições recreacionais é a atividade de pesca, seja para consumo seja pesca esportiva, sendo que na pesca para consumo há risco da

biomagnificação na cadeia trófica. No Brasil, MAGALHÃES et al. (2001; 2003) verificaram a ocorrência de microcistinas em vísceras, músculo e fígado de *Tilapia rendalli*, espécie bastante consumida nas diversas regiões do país, em concentrações próximas ou acima dos limites estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde para consumo diário (IDT = 0,04 µg de microcistina-LR.Kg⁻¹ de peso corpóreo), principalmente no tecido muscular, o mais consumido pela população. Na pesca esportiva, os riscos podem estar associados à manipulação do pescado e aspiração de aerossóis.

O manual da WHO (2003) considera que os efeitos na saúde podem ser de dois tipos: 1) sintomas principalmente irritativos provocados por substâncias associadas com cianobactérias e ainda não conhecidas e 2) perigos potencialmente mais severos de exposição às altas concentrações de cianotoxinas conhecidas, principalmente microcistinas. Neste contexto, um único valor orientador é inadequado e o guia associa alguns valores de células de cianobactérias e clorofila *a* à probabilidade de ocorrência de efeitos adversos à saúde.

Exposição por contato dérmico

Reações cutâneas alérgicas ou irritativas com vários graus de severidade têm sido relatadas para exposições em águas doces com elevadas densidades de *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Lyngbya* entre outras espécies. Roupas de banho e tecidos molhados tendem a agravar estes efeitos, pois podem acumular células entre suas fibras, funcionando como um filtro e as células podem ser rompidas pelos movimentos da natação. Estudos epidemiológicos conduzidos por PILLOTO et al. 1997 *apud* WHO (2003) evidenciaram que irritação na pele foi um sintoma freqüente, porém mais relacionado com a densidade de células de cianobactérias e não com as concentrações de microcistina, sugerindo que estes sintomas possam estar associados com outras substâncias ainda não identificadas.

Exposição por ingestão e aspiração

Essas vias de exposição são as que mais têm casos documentados de doenças em humanos associadas com cianobactérias e envolvem um risco que pode ser estimado pela densidade de células, conteúdo das cianotoxinas e mecanismos de toxicidade, tanto para efeito agudo quanto para exposição crônica, principalmente para as microcistinas e neurotoxinas. O número baixo de casos registrados pode ser devido à falta de conhecimento sobre a toxicidade das cianobactérias e seus sintomas, tanto pelos médicos como pelos pacientes.

De acordo com WHO (2003) os níveis de cianotoxinas aceitos em águas recreacionais ainda não são claros; poucos estudos são direcionados para avaliar a variabilidade do conteúdo de toxinas ao longo do desenvolvimento das cianobactérias, apesar deste conhecimento ser importante para a avaliação de risco. Este monitoramento é importante, pois a toxicidade cumulativa das microcistinas representa um perigo para pessoas expostas regularmente às florações e, se a concentração de toxinas mostra pouca variação durante várias semanas ou meses de florações para certas espécies chave, predições podem ser baseadas em contagens de células. As análises de toxinas, que tem um custo mais elevado ou uma complexidade analítica maior, podem ser realizadas esporadicamente. A adoção de um único valor orientador para cianotoxinas não é apropriado devido ao fato de que muitas cianotoxinas podem causar efeitos diferentes como irritações dérmicas, alergias e perigos à saúde mais graves como as hepatotoxinas e neurotoxinas de efeitos agudos e crônicos.

Grande parte dos programas e manuais voltados para o monitoramento de cianobactérias em águas recreacionais continentais utiliza como valores orientadores os apresentados em WHO (1998, 2003) constantes no Quadro 3.

QUADRO 3 Valores orientadores para a proteção da saúde humana em águas recreacionais (WHO, 2003)

PROBABILIDADE DE EFEITO ADVERSO À SAÚDE	VALORES ORIENTADORES OU SITUAÇÕES
Baixa – Nível 1	
Microcistina (µg/L)	2-4 (valor esperado)
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	10
Células de cianobactérias (célis./mL)	20.000
Riscos à Saúde	Efeitos adversos agudos (ex. irritações da pele e sintomas gastrointestinais) são pouco prováveis
Ações Recomendadas	Sinalização e informação às autoridades pertinentes
Moderada – Nível 2	
Microcistina (µg/L)	20 (valor esperado)
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	50
Células de cianobactérias (célis./mL)	100 000
Riscos à Saúde	Efeitos adversos agudos resultam em irritações na pele e sintomas gastrointestinais em baixas frequências; potencial para efeitos crônicos, quando algumas espécies estão presentes
Ações Típicas	Procurar “escumas”, restringir banhos, sinalizar o local, alertando para riscos moderados, informar autoridades locais e posteriormente investigar os perigos.
Alta – Nível 3	
Microcistina (µg/L)	sem valores
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	sem valores
Células de cianobactérias (célis./mL)	“escumas”, milhões de células.
Riscos à Saúde	-Potencial para envenenamentos agudos severos; -Potencial para enfermidades crônicas, dependendo da espécie presente; -Efeitos adversos agudos: irritações cutâneas e enfermidades gastro intestinais
Ações Típicas	Ações imediatas para prevenir contato com a “escuma”, sinalizar o local, alertando para riscos altos, informar às autoridades locais.

Os valores apresentados para as baixas probabilidades de efeitos adversos são mais voltados para a prevenção dos efeitos alergênicos ou irritativos do que para a toxicidade da cianotoxina, e os valores referenciados para a clorofila *a* e concentração de microcistina valem para quando cianobactérias produtoras de microcistinas são dominantes no plâncton. Esses valores foram derivados do estudo de PILLOTO et al. 1997 *apud* WHO (2003). Neste grau de exposição, prover informações aos usuários pode ser suficiente para prevenir riscos. Os valores recomendados para microcistina estão próximos dos valores de 1 µg/L de microcistina-LR recomendados para água de consumo humano (WHO, 1998) em exposições de mais longo prazo. Neste nível de ocorrência, as autoridades de saúde pública e ambientais já devem ser informadas.

De acordo com WHO (2003), em moderada probabilidade de efeito adverso, os sintomas irritativos são mais elevados e cianotoxinas podem ser impactantes à saúde humana. Os valores apresentados foram derivados de valores de referência provisórios de microcistinas-LR em água de consumo humano e outras cianotoxinas. O valor esperado de 20 µg/L de microcistina é derivado do fato da floração ter como dominância *Microcystis* com um conteúdo médio de toxina de 0,2 pg/cel ou 0,4 µg/µg de clorofila *a*; este valor é 20 vezes maior do que o recomendado para água de consumo humano e um valor muito próximo ao ingresso diário tolerável (IDT) para um adulto de 60 Kg que consome 100 mL de água enquanto nada. Com base nas informações disponíveis para microcistina-LR, se um adulto de 60 Kg consumiu 100 mL de água contendo 20 µg/L enquanto nadava, este nível de toxina poderia resultar em um nível de consumo próximo da IDT de 0,04 µg/Kg de peso corporal. Crianças que podem se expor até 10 vezes mais para o IDT, ou grupos de risco como portadores de hepatite B crônica. Em locais onde a predominância das florações é de *Microcystis* e *Anabaena* há o risco de em poucas horas os valores multiplicaram-se até mil vezes, elevando o risco de moderado para alto. Nestes casos, recomenda-se uma inspeção visual diária para detectar a formação de “escumas”, além do monitoramento regular e implementação de medidas preventivas com informações aos usuários. Em áreas onde esta situação é freqüente, a interdição é recomendada.

Existem abundantes evidências de danos severos à saúde associados com formações de “escumas”, indicando uma probabilidade de efeito adverso alta; ocorrências em animais suportam esta hipótese já que os registros de fatalidades em humanos associados com uso recreacional são

raros. Concentrações em milhões de células são encontradas nesta situação e concentrações acima de 24 mg/L de microcistina relatadas (CHORUS & FASTNER, 2001 *apud* WHO, 2003). Riscos para as crianças que se banham em locais com formação de “escuma” são ainda mais intensos, baseados nas evidências que uma dose oral letal de microcistina-LR em ratos é 5000-11600 µg/L.Kg de peso corporal e a ingestão de 5-50 µg de microcistina poderia causar danos agudos no fígado de uma criança de 10 Kg.

No Guia “Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Inland Waters: Assessment and Control of Risks to Public Health” editado pelo “Scottish Executive Health Department” (SCOTTISH EXECUTIVE, 2002) são consideradas as implicações para a saúde pública durante recreação, trabalho e exposição pela água e alimentos. É citada nesta publicação que, além da ocorrência comum na coluna d’água formando florações, as cianobactérias podem crescer no fundo de corpos d’água rasos e margens, formando massas gelatinosas, que podem se destacar do fundo flutuando pelo aprisionamento de oxigênio como produto da fotossíntese em seu interior e podem apresentar também riscos à balneabilidade.

Planos de Ação Local - PAL – (“Local Action Plan” – LAP) são recomendados e incluem a avaliação da natureza e intensidade das florações, avaliação de riscos para a saúde humana e animal, ações resultantes destas avaliações e informação ao público. As avaliações devem incluir, quando apropriado: 1) inspeções visuais da aparência pela cor, formação de “escumas” e aparência particulada da água no local, 2) monitoramento (amostragens e análises) e 3) registro e avaliação dos resultados (SCOTTISH EXECUTIVE, 2002). A indicação de monitoramentos sistemáticos de acordo com as características das florações está descrita no Quadro 4.

QUADRO 4 Categorização das águas em termos de frequência e intensidade de florações e a eficácia das ações de monitoramento (SCOTTISH EXECUTIVE, 2002)

CATEGORIA	DESCRIÇÃO DA FLORAÇÃO	MONITORAMENTO SISTEMÁTICO
1	Grandes populações de cianobactérias ocorrendo sistematicamente ao longo do ano	Não indicado, acrescenta pouca informação ao que já é conhecido
2	Florações em curtos períodos por vários anos	De algum valor; a habilidade de detecção de florações em curtos períodos depende da frequência do monitoramento
3	Florações intermitentes por curtos períodos	De menos valor que a categoria 2; amostragens muito freqüentes resultam em muitos resultados negativos e a pouca frequência da amostragem pode falhar em detectar florações rápidas
4	Nenhuma ocorrência de florações	Não indicado

Para as categorias 1 e 2, quando a exposição às águas recreacionais é persistente, pode ser apropriado a colocação de avisos permanentes ou semipermanentes ao público e efetuar inspeções ou monitoramentos para determinar o início e final do período de perigo. Para a categoria 3, inspeções visuais em intervalos determinados de acordo com os usos do local devem ser efetuadas e para as categorias 3 e 4 quando as florações são transitórias e raras e a exposição humana ou animal é limitada, inspeções visuais ou amostragens freqüentes não compensam o custo.

Avaliações de risco em corpos d'água individuais incluem uma abordagem proativa, contemplando programas de inspeção e monitoramento com ações preventivas específicas como sinalização, ou reativa como consequência do aparecimento de florações ou suspeitas de incidentes relacionados. Neste caso, devem ser considerados os usos da água no momento, os riscos associados e a necessidade de intervenção (SCOTTISH EXECUTIVE, 2002). Também são definidas categorias de risco relacionadas aos diferentes usos que definem a probabilidade e a extensão da exposição. (Quadro 5).

QUADRO 5 Categorias de risco relacionadas aos usos da água (SCOTTISH EXECUTIVE, 2002, adaptado)

CATEGORIA NATUREZA E INTENSIDADE DO USO DE RISCO	
Alto	Águas consumidas por pessoas ou animais ou usadas para atividades envolvendo imersão ou considerável contato com a pele.
Médio	Águas nas quais o risco de ingestão de cianobactérias ou cianotoxinas é pequeno e contato com a pele é pouco provável
Baixo	Águas que são inacessíveis ou são utilizadas apenas para pesca ou atividades que não tenham contato com o meio aquático.

O manual “Cyanobacteria in recreational and drinking waters” preparado pela “Environmental Health Unit Queensland Health” – Austrália (QUEENSLAND GOVERNMENT, 2001) utiliza a metodologia de avaliação de riscos desenvolvida pela “National Academy of Science” dos Estados Unidos, a “Health Risk Assessment” (HRA). Esta metodologia consiste resumidamente nos seguintes passos:

- 1) Identificação do perigo – determinar o potencial das cianobactérias produzirem efeitos adversos à saúde e os níveis de células e toxinas presentes na água, pela coleta de amostras e identificação das cianobactérias presentes e quantificação de suas células e toxinas.
- 2) Avaliação da exposição – consiste em determinar o potencial para indivíduos serem expostos pelas diferentes vias de exposição, seu nível e duração e levar em conta outros fatores, como indivíduos suscetíveis, a presença de material seco remanescente das florações nas margens e aerossóis em praias que podem ser inalados.
- 3) Avaliação dose-resposta: a informação disponível é limitada para níveis de exposição que produzem efeitos adversos e não há valores orientadores para águas recreacionais dos diferentes tipos de toxinas que são estabelecidos pela avaliação dose-resposta para determinar a “Dose de Nenhum Efeito Adverso Observável - DNEAO”

4) Caracterização do risco: quando os resultados do monitoramento excedem valores orientadores ou níveis de alerta, contemplados em manuais, há um aumento do risco para efeitos adversos à saúde. A extensão nos quais os níveis são excedidos, irá determinar amplamente a probabilidade de efeitos adversos na população exposta. Como toda a avaliação de risco contempla incertezas, no caso de cianobactérias, estas estariam mais associadas aos níveis variáveis de células de cianobactérias e toxinas no ambiente para as águas recreacionais; nesta etapa, todas as fontes de incerteza devem ser identificadas para permitir, quando necessário, o estabelecimento de estratégias apropriadas para a minimização dos riscos.

O manual do “National Health and Medical Research Council” da Austrália (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) também utiliza uma abordagem preventiva de manejo de risco para águas recreacionais, enfocando a avaliação e manejo dos perigos e eventos perigosos, que é consistente com a abordagem desenvolvida pela World Health Organization – WHO em seus manuais. Define “perigo” como “um agente físico, químico ou biológico que tem o potencial para causar danos (i.e. perda da vida, lesões ou doenças)” e “evento perigoso” como “um incidente ou situação que pode levar à presença de um perigo (i.e. que pode acontecer e como acontece)”. Neste contexto, a presença das cianobactérias no ambiente é um potencial perigo e a formação de florações e “escumas” um evento perigoso. Sobre a avaliação de risco, as diretrizes contidas nos guias requerem que o risco seja reduzido a um nível tolerável mais do que sua eliminação, o que é impossível. Determinar riscos envolve considerar a probabilidade de que um perigo ou evento perigoso irá ocorrer e as consequências que ele provoca, estabelecendo prioridades de intervenção.

Diferentemente do manual da WHO (2003), o “Guia para manejo de riscos em águas recreacionais” (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) propõe dois níveis baseados em exposição às cianobactérias em águas recreacionais. A diferença deste último está na eliminação do nível de mais baixo risco (20.000 céls./mL), pois este não foi considerado significativo. Estudos de PILLOTO et al. (2004) concluíram que apenas 20% de voluntários expostos ao extrato de cianobactérias apresentaram sintomas irritativos ou alergênicos leves, que foram resolvidos sem tratamento.

O Nível 1 deste Guia é baseado na probabilidade de efeitos adversos na saúde, resultantes da ingestão de toxinas conhecidas como a microcistina e o Nível 2 na probabilidade de aumento de efeitos adversos não específicos, como os respiratórios, alergênicos e irritativos para a exposição a altas densidades de células de cianobactérias em geral, sem levar em conta a presença de toxicidade ou toxinas conhecidas. Os valores orientadores para o Nível 1 de microcistinas totais foram originados de estudos toxicológicos em animais (porcos) – baseados na Dose de Mínimo Efeito Adverso Observável - DMEAO para microcistina-LR de 100 µg/Kg de peso do corpo por dia, derivado do estudo de KUIPER GOODMAN et al. 1999 *apud* AUSTRALIAN GOVERNMENT (2006) para uma exposição de curta duração (14 dias) à microcistina via ingestão em adultos e crianças.

Para corpos de água doce, utilizados para fins recreacionais não devem ser excedidos os valores de 10 µg/L de microcistinas totais (valor derivado da exposição em crianças, medido como microcistinas totais e que foram expressos como equivalentes de toxicidade para microcistina-LR) ou ≥ 50.000 céls./mL de *Microcystis aeruginosa* tóxica (conversão da concentração de microcistina para densidade de células de *Microcystis aeruginosa*, considerando 2×10^{-7} µg de microcistina total/célula, para o valor mais restritivo, que é para crianças) ou biovolume equivalente ≥ 4 mm³/L (biovolume aproximado equivalente a 50.000 céls./mL de *Microcystis aeruginosa*) para todas as cianobactérias, quando um produtor de toxina é dominante. No Nível 2, que considera a ocorrência de cianobactérias em geral, apenas a contagem de células foi levada em consideração por sua avaliação mais simples e rápida e o valor orientador é 10 mm³/L de biovolume celular de cianobactérias em geral, derivado dos estudos de STEWART (2004) *apud* AUSTRALIAN GOVERNMENT (2006).

STEWART et al. (2006) fizeram extenso trabalho de revisão de literatura sobre os efeitos da exposição recreacional e ocupacional às cianobactérias de água doce. Apesar de não trabalharem com artigos de jornal, citam duas reportagens que descrevem o único relato de morte relacionada à exposição de cianobactérias por atividades recreacionais, quando autoridades americanas concluíram que um adolescente morreu devido à ingestão de anatoxina-a em um lago de um campo de golfe. Posteriormente, alguns autores questionaram os resultados destas análises

(CARMICHAEL et al., 2004 *apud* STEWART et al., 2006).

Uma série de doenças e sintomas associados ao contato com cianobactérias foi descrita por diversos autores, como comentado em STEWART et al. (2006) sendo as mais frequentes febres, como a febre-do-feno, erupções cutâneas com prurido e sintomas gastrointestinais, além de respostas alérgicas, dores de cabeça, pneumonia, febre, mialgia, vertigem e vesículas na boca. Para o autor, as principais vias de exposição são pelo contato direto com a pele e mucosas, por inalação e ingestão, seja acidental ou deliberada.

Casos sintomáticos em várias partes do mundo (não há nenhum caso relatado no Brasil) são apresentados nesta revisão, que procura prover informações sobre o ano de ocorrência com relatos desde 1934 até 2003, local, número de pessoas afetadas e idade, atividade que estavam praticando, sintomas, organismo dominante, tempo decorrido para apresentação dos sintomas e duração, análises realizadas para o diagnóstico e demais ocorrências associadas, como mortes de animais. Foram sete relatos de nadadores que apresentaram sintomas como febre-do-feno (conjuntivite, rinite e espirros); 13 relatos de sintomas cutâneos em nadadores, praticantes de esportes náuticos, pescadores e coletores; oito relatos para sintomas gastrointestinais (náusea, vômitos, diarreias, dores abdominais) em atividades de nado, queda acidental no lago e recreação. Sintomas de resfriados e gripes (febre, dor-de-cabeça, mialgia, artralgia, dor-de garganta, sintomas respiratórios e gastrointestinais) foram oito relatos também para nadadores e praticantes de windsurf e, sintomas mistos em 18 relatos principalmente em nadadores, esquiadores, velejadores e canoagem. Muito dos casos de reações cutâneas apresentadas podem estar relacionados à hipersensibilidade de alguns indivíduos já predispostos, especialmente crianças, pois casos em massa são mais raros.

Exposições ocupacionais são raras e relacionadas com coletores de águas, porém há dois casos bem conhecidos e que também estão citados nesta revisão que envolveram soldados britânicos e marinheiros conduzindo canoas em águas com fortes florações de *Microcystis spp* e *Oscillatoria*.

Em relação aos estudos epidemiológicos, STEWART et al. (2006) citam seis estudos de

exposição recreacional às cianobactérias, três estudos na Inglaterra de prevalência (seccionais ou transversais) que, sem levar em conta os acontecimentos passados ou futuros, medem a suposta causa e respectivo efeito em dado momento ou lapso de tempo, um estudo de caso-controle na Austrália que parte de um conjunto de casos já diagnosticados da doença em foco e dois estudos de coorte, também na Austrália, que é a observação de determinado grupo de pessoas através do tempo com o objetivo de estabelecer as possíveis associações entre a exposição e a frequência no aparecimento da doença em foco. Nos três primeiros casos, foi feita a aplicação de questionários com informações de exposição e sintomas associados de uma floração que ocorreu 14 dias antes do recebimento. No estudo de caso-controle, sintomas gastrointestinais e dermatológicos foram identificados em cada usuário das principais fontes de água para uso doméstico e recreacional (sem contato, contato direto com água do rio e contato com outras fontes) semanas antes. Nos dois últimos estudos, de coorte, pessoas expostas pré-selecionadas de locais onde ocorreram florações anteriores tiveram seu grau de exposição determinados e foram seguidas no tempo para avaliar o desenvolvimento dos sintomas. O ambiente foi avaliado quando da presença das cianobactérias no dia do recrutamento para o estudo e grupos que nunca tiveram contato com a água ou que se banhavam em locais sem cianobactérias foram os controles; em ambos, os entrevistados completaram um questionário para determinar as atividades recreacionais, doenças recentes e crônicas; STEWART et al. (2006) usaram categorias de exposição: baixa, intermediária e alta, de acordo com a presença de cianobactérias no local. Uma síntese dos estudos encontra-se descrita no Quadro 6, enfocando suas vantagens e desvantagens, que poderão ser mais bem avaliadas no trabalho de STEWART (2004).

Muitas doenças relacionadas com a água podem ter seus sintomas confundidos com os das cianobactérias, o que dificulta a avaliação dos sintomas diretamente relacionados a elas; tais como: esquistossomose, infecção por bactérias gram-negativas como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, doenças gastrointestinais causadas por *Shigella*, *Escherichia coli*, viroses como causadas pelo vírus de Norwalk, amebíases e infecções por *Legionella*. No Brasil, não há publicações de estudos epidemiológicos realizados com cianobactérias em águas recreacionais, apenas há evidências no trabalho de TEIXEIRA et al. (1993) que apontam as toxinas produzidas pelas cianobactérias como o agente responsável por uma epidemia de gastroenterite na região de Paulo Afonso, Bahia e o estudo de coorte prospectivo dos pacientes de

hemodiálise em Caruaru, Pernambuco (JOCHIMSEM, 1998).

A maioria dos estudos relacionados com a exposição de humanos às cianobactérias e os efeitos na saúde contemplam poucas evidências para a elaboração de valores seguros para a exposição. STEWART et al. (2006) comentam na conclusão de sua revisão que a verdadeira incidência de doenças agudas relacionadas com cianobactérias associadas à exposição recreacional ainda é desconhecida, pois muitos sintomas são tênues e o tratamento médico não é procurado; há uma lacuna entre a atenção primária, sintomas e sinais não específicos que levam a um sub-diagnóstico.

Um importante avanço na compreensão dos impactos na saúde humana vem da toxicologia, pois a maioria das toxinas tem sido intensamente estudada e caracterizada e trabalhos envolvendo toxicologistas e epidemiologistas irão refinar o conhecimento. O autor afirma: “A epidemiologia da exposição recreacional às cianobactérias está incompleta no presente”. Todas as abordagens da epidemiologia com suas vantagens e desvantagens, identificação de biomarcadores de exposição, susceptibilidade e efeitos, devem levar no futuro ao aperfeiçoamento da percepção dos riscos para banhistas em águas com cianobactérias. O conhecimento dos estudos e metodologias aplicadas em outros países poderá subsidiar futuros estudos em nosso país que tem apresentado elevada incidência destes organismos em águas recreacionais interiores.

QUADRO 6 Síntese dos estudos epidemiológicos realizados com cianobactérias em águas recreacionais.

Fonte: STEWART (2006).

PAÍS, ANO DO ESTUDO E AUTOR	METODOLOGIA	VANTAGENS/DESVANTAGENS	POPULAÇÃO ESTUDADA (n)	SINTOMAS REGISTRADOS
Inglaterra, 1990, PHILIPP <i>apud</i> STEWART (2006)	estudo de prevalência (seccionais ou transversais);	Vantagem: razoável custo/benefício; podem ser aplicados no momento da floração; Desvantagem: Dificuldade de avaliar exposições prévias	246 (usuários recreacionais e indivíduos controles não expostos)	Resultados estatisticamente não relevantes
Inglaterra, 1990, PHILIPP <i>apud</i> STEWART (2006)	estudo de prevalência (seccionais ou transversais);	Idem ao anterior	363 (usuários recreacionais e indivíduos controle não expostos)	Resultados estatisticamente não relevantes
Inglaterra, 1990, PHILIPP et al. <i>apud</i> STEWART 2006	estudo de prevalência (seccionais ou transversais)	Idem ao anterior	246 (usuários recreacionais e indivíduos controle não expostos)	Resultados estatisticamente não relevantes
Austrália, 1992, EL SAADI et al. <i>apud</i> STEWART, 2006; floração de <i>Anabaena circinalis</i> ao longo do rio Murray	estudo de caso-controle	Vantagem: podem ser aplicados no momento da floração; investigam episódios esporádicos; neste caso, foi realizado por médicos, o que evitou o autodiagnóstico. Desvantagem: falsas medidas (autodiagnóstico, o resultado já ocorreu quando do questionário); difícil identificar os grupos, especialmente em grandes cidades.	Aprox. 48	Resultados estatisticamente não relevantes

PAÍS, ANO DO ESTUDO E AUTOR	METODOLOGIA	VANTAGENS/DESVANTAGENS	POPULAÇÃO ESTUDADA (n)	SINTOMAS REGISTRADOS
Austrália, 1995, PILOTTO e et al. <i>apud</i> STEWART, 2006	estudo de coorte prospectivos	Vantagem: habilidade para determinar a doença no início e estudá-la no ambiente.		
		Desvantagem: podem ser caros e usar muitos recursos; a biomassa de cianobactérias coletadas no momento da avaliação da exposição pode mudar no tempo e não corresponder à predição; necessidade de registros históricos precisos com informações dos resultados de interesse e informações da exposição.	338 (sem exposição prévia ou sintomas)	Aumento dos sintomas em 7 dias após exposição a mais que 5000 céls./mL de banhistas versus não-banhistas
Austrália e Estados Unidos, 1992-2002, STEWART et al. <i>apud</i> STEWART, 2006	estudos de coorte prospectivos		1331 (1131 sem sintomas anteriores e 1149 sem sintomas respiratórios anteriores)	Aumento de sintomas respiratórios fracos e outros sintomas em 3 dias após exposição. (> 12 mm ² céls./mL versus <2,4 mm ² céls./mL)

São poucos os relatos sobre sintomas ou mortes em banhistas no país relacionados com ocorrência de cianobactérias. TEIXEIRA et al.(1993) relatam a ocorrência de 2000 casos de gastroenterite no recém preenchido reservatório de Itaparica, Bahia, em um período de 42 dias, quando 88 resultaram em morte. Na investigação das potenciais causas, foi identificada uma grande população de cianobactérias tóxicas no manancial localizado na área afetada apontada como o principal agente. YUNES et al. (1996) relataram a presença de florações de *Microcystis aeruginosa* que provocaram irritações cutâneas na pele de pescadores nativos no estuário da Lagoa dos Patos (RS). WOSIACK (2005) em sua dissertação de Mestrado sobre a presença das cianobactérias em uma praia artificial no Reservatório de Itaipu (PR) verificou, ao enquadrar o ambiente estudado pela Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), que em um mês amostrado, a classificação Classe 2 não permitiu atividades primárias de recreação.

No Estado de São Paulo há relato de sintomas apresentados por um competidor de triathlon no reservatório de Barra Bonita em 2006, quando foram encontradas 4.000.000 e 3.900.000 de células de cianobactérias/mL e 89,12 µg/L e 424,6 µg/L de microcistina pelo método ELISA, respectivamente (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB - comunicação pessoal).

A CETESB, empresa responsável pelo controle da poluição no Estado de São Paulo (CETESB, 2007) mantém um programa de Balneabilidade de lagos que está estruturado para atender às especificações da Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000), que define critérios para a classificação de águas destinadas à recreação de contato primário. Para a classificação das praias em Excelente, Muito Boa, Satisfatória e Imprópria, esta legislação utiliza as densidades de coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* resultantes de análises feitas em cinco semanas consecutivas em uma abordagem mais voltada para os aspectos sanitários. De acordo com esta resolução, uma praia pode ser considerada imprópria também quando ocorrerem circunstâncias que desaconselham a recreação de contato primário, e dentre estas estão mencionadas as florações de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana. A recreação de contato primário é caracterizada quando existir o contato direto do usuário com os corpos de água como, por exemplo, atividades de natação, esqui aquático e mergulho.

O monitoramento realizado pela CETESB contempla 33 pontos de amostragem em praias interiores, 21 deles localizados nos dois principais reservatórios da Região Metropolitana de São Paulo, Billings e o do Guarapiranga. São realizadas apenas análises bacteriológicas colimétricas, atendendo à Resolução CONAMA 274/2000, não contemplando a quantificação das cianobactérias, que são apenas detectadas quando formam florações superficiais. Foi desenvolvido pela CETESB um Índice de Balneabilidade – IB para facilitar o entendimento da população, que é baseado numa qualificação anual das praias, indicando uma tendência de qualidade a partir das análises mensais de coliformes termotolerantes. Os resultados do Relatório de Qualidade das Águas Interiores da CETESB para 2006 (CETESB, 2007) para as Praias dos Reservatórios Jaguari, Cachoeira e Atibaia em um total de 6 pontos e que são os monitorados na UGRHI 5 por este programa, mostraram índices de Balneabilidade de Ótimo a Bom, com uma classificação Própria para o banho em 100% do tempo, apenas levando em consideração a avaliação de *Escherichia coli*. Somente nas praias dos Reservatórios Billings e Guarapiranga foram feitas observações visuais sobre a presença de algas, cuja presença tornou algumas impróprias em determinadas épocas do ano.

Com relação aos potenciais efeitos das cianotoxinas na saúde humana, no Brasil, a Portaria 518/2004 (BRASIL, 2004), que dispõe sobre qualidade de água para consumo humano, contempla as cianobactérias, exigindo seu monitoramento nas tomadas d'água das captações e análise de suas toxinas, estabelecendo limites máximos de concentração aceitáveis para microcistina. Para atendimento ao padrão de potabilidade, exige-se apenas a análise das microcistinas com o VMP de 1,0 µg/L. Para as demais cianotoxinas há apenas a recomendação de seu monitoramento e indicação de valores máximos permitidos. Também a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, estabelece os valores densidade de células de cianobactérias, clorofila *a* e fósforo total (Quadro 7). Esta legislação define recreação de **contato primário** como aquela de contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático) na qual a possibilidade do banhista ingerir água é elevada e recreação de **contato secundário** com àquela associada às atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir água é pequena (pesca e na navegação).

QUADRO 7 Classificação dos corpos d'água e diretrizes para o enquadramento de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 para água doce.

CLASSES	CLOROFILA <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CIANOBACTÉRIA (cél.s.mL ⁻¹)	FÓSFORO TOTAL (mg.L ⁻¹)
1 abastecimento após tratamento simplificado, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças consumidas cruas.	10	20.000	0,020 (lêntico) 0,025 (interm.) 0,1 (lótico)
2 abastecimento após tratamento convencional, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças e frutíferas, aquicultura e pesca.	30	50.000	0,030 (lêntico) 0,050 (interm.)
3 abastecimento após tratamento convencional ou avançado, recreação de contato secundário, dessedentação de animais.	60	100.000 50.000 (dessedentação de animais)	0,05 (lêntico) 0,075 (interm.) 0,15 (lótico)

2.5 RESERVATÓRIO SALTO GRANDE – CARACTERIZAÇÃO GERAL, COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA E CIANOBACTÉRIAS

O reservatório Salto Grande encontra-se localizado na Bacia do Rio Piracicaba, pertencente ao 5º grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo e é formado pelo Rio Atibaia em sua porção inferior, um corpo d'água classificado como Classe 2. As águas do reservatório destinam-se, principalmente, à recreação de contato primário e secundário e geração de energia elétrica e influenciam a qualidade da água das captações de Americana e Piracicaba, localizadas a jusante. Recebe grande aporte de efluentes domésticos e industriais pontuais e agrícolas difusos de municípios a montante, especialmente de Campinas e do Pólo Petroquímico de Paulínia. Diversos estudos foram realizados para caracterizar este corpo hídrico, e os principais encontram-se sumarizados em ESPINDOLA et al. (2004). As principais características estão descritas no QUADRO 8.

DEBERDT (2002) estudou as cianobactérias e cianotoxinas no reservatório de Salto Grande – Americana, SP em três escalas. No macrocosmo (ambiente) determinou a ocorrência de cianobactérias expressa em organismos/mL relacionada aos fatores ambientais em amostras coletadas em 3 meses chuvosos (janeiro/fevereiro/março de 1998) e 4 meses de seca (junho/julho/agosto/setembro de 1998) em pontos de coleta localizados no meio do reservatório e próximo da barragem. Também avaliou seu potencial tóxico pela análise de microcistina-LR. Os estudos de mesocosmo envolveram manipulação da razão N/P em tanques fechados, contendo água do reservatório no período de seca para verificar sua influência na ocorrência das classes fitoplanctônicas. Os estudos de microcosmo foram realizados com culturas de cepas de *Microcystis aeruginosa* isoladas do local para testar efeitos da redução de fósforo e aumento da razão N/P no crescimento e produção de toxinas. As maiores concentrações de clorofila *a*, densidade fitoplanctônica, incluindo as cianobactérias nas estações amostradas, ocorreram no inverno, período em que foram verificadas as menores vazões. Em geral as cianobactérias foram predominantes com relação às demais classes de algas fitoplanctônicas e foram relacionados 19 táxons de cianobactérias. Os táxons mais abundantes foram *Pseudanabaena mucicola*, *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena crassa* (ANEXO 3). Em síntese, a autora concluiu em seu trabalho que a estrutura da comunidade fitoplanctônica no Reservatório Salto Grande nos pontos amostrados foi governada pela estabilidade da coluna d'água, disponibilidade de luz subaquática, mobilidade dos organismos e interações biológicas, e que o desenvolvimento de *Microcystis aeruginosa* pode ter sido favorecido mais pela alta estabilidade da coluna d'água do que pelas concentrações de nutrientes. Houve, também, correlação positiva entre a concentração de microcistina e a densidade de cianobactérias, porém, não foi avaliada naquele estudo a relação com o número de células de cianobactérias e biovolume celular, dados ainda inéditos neste ambiente.

TUCCI et al. (2004) realizaram uma síntese das dissertações e teses que abordaram a comunidade fitoplanctônica no reservatório Salto Grande, analisando dados de cinco autores que realizaram estudos entre os anos de 1997 e 2000 com diferentes periodicidades de amostragens, em distintos pontos de coleta e profundidades. Os trabalhos que quantificaram o fitoplâncton e as cianobactérias expressaram os resultados em organismos/mL e Unidade Padrão de Área (UPA). Em uma síntese dos resultados apresentados, as cianobactérias compreenderam 61 táxons

identificados com destaque para a elevada presença de espécies potencialmente tóxicas como *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis* spp., *Anabaena* spp. e *Cylindrospermopsis raciborski*. As cianobactérias dominaram nos diferentes períodos de estudo, especialmente nas porções mais lânticas do reservatório, porém diferiram quanto aos aspectos sazonais pelos vários autores, ora com dominância apenas no verão, ora com dominância ao longo de todo o ano com picos no verão e quedas no inverno. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes peridiocidades das amostragens, como as de curto prazo (nictimerais e semanais) ou mais de longo prazo (mensais, semestrais ou anuais).

SOUZA (2000) que estudou a comunidade fitoplanctônica com frequência semanal durante três anos, relata a dominância das cianobactérias ao longo do ano sem variação sazonal marcante, característica de reservatórios em avançado processo de eutrofização. As florações de *Microcystis* spp foram mais prolongadas no inverno, quando são registrados os menores valores de precipitação e ventos menos intensos, o que provocaria maior estabilidade da coluna d'água. Uma importante consideração levantada pela autora foi a hipótese das macrófitas funcionarem como barreiras protetoras contra ventos e correntes e contribuírem para o aumento das florações de *Microcystis* spp, especialmente nas margens.

COSTA (1998) estudou a ocorrência do gênero *Microcystis* no período de chuvas no reservatório Salto Grande com coletas quinzenais e análises de algumas variáveis físicas, químicas e contagem de organismos, em dois pontos de coleta, um na Praia dos Namorados e outro na Praia Azul, que estão próximos aos dos amostrados no trabalho de SOUZA (2000) e DEBERDT (2002), ou seja, localizados na porção central do reservatório. A autora constatou que a variável fósforo foi indicadora de eutrofização no reservatório e a relacionou com a frequente ocorrência de florações de *Microcystis* no período estudado, concluindo que a predominância das florações nos dois pontos amostrados é favorecida pela posição geográfica dos pontos de coleta, que concentra os organismos devido à predominância dos ventos. Os ventos predominantes nos trechos médio e inferior da sub-bacia do Atibaia são predominantes na direção NE/SO (SOUZA, 2000 *apud* ESPÍNDOLA et al., 2004a)

HONDA (2005) estudou cepas *Microcystis aeruginosa* em cultivo isoladas do

reservatório Salto Grande e foi o único a realizar um estudo taxonômico mais aprofundado, pois os trabalhos até então realizados neste local são de cunho ecológico e apresentam apenas listagem dos táxons, sem ilustrações e caracterização morfológica e morfométrica.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral:

Elaborar um plano de monitoramento para cianobactérias com fins recreacionais no local estudado com informações biológicas, ecológicas e toxicológicas, que poderá ser utilizado em ambientes dulciaquícolas nas demais regiões do Estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

1. Realizar levantamento qualitativo das cianobactérias no reservatório Salto Grande.
2. Realizar levantamento quantitativo de cianobactérias no reservatório Salto Grande para que se possa fazer um diagnóstico de sua ocorrência espacial e temporal nos pontos amostrados, associadas a determinados fatores ambientais.
3. Determinar o potencial de toxicidade relacionado à presença das microcistinas na água bruta e nas linhagens isoladas.
4. Detectar e caracterizar molecularmente cianobactérias potencialmente tóxicas isoladas de amostras ambientais pelo uso de marcadores moleculares taxonômicos e genes envolvidos com a biossíntese de toxinas.

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA DE ESTUDO, ESTAÇÕES DE AMOSTRAGEM E COLETAS

O estudo foi desenvolvido no reservatório Salto Grande Salto Grande no município de Americana, SP (Figura 2). Os pontos de coleta foram alocados em locais com maior frequência de banhistas em frente ao Iate Clube de Americana (S22°43'13,9''; W47°16'22,9'' - Altitude: 545m) e na Praia dos Namorados (S22°42'15,3''; W47°16'00,3'' - Altitude: 550m). O reservatório Salto Grande tem sido amplamente estudado em suas características limnológicas que foram detalhadamente descritas em DEBERDT (2002) e ESPÍNDOLA et al. (2004) e sumarizadas no QUADRO 8.

Foram realizadas coletas mensais ao longo de 11 meses para cobrir eventos sazonais de seca e cheia que influenciam o aparecimento das florações, sempre aos domingos para observar a utilização do reservatório para fins recreacionais. As amostras foram coletadas com balde de inox, subsuperficiais e em 2 réplicas. Foram registradas as condições climáticas e os principais usos recreacionais na hora das coletas. Estas observações encontram-se no Anexo 2.

As coletas, conservação e transporte das amostras foram realizados de acordo com as recomendações técnicas descritas em CETESB (1987).

QUADRO 8 Informações gerais sobre o reservatório Salto Grande (DEBERDT, 2002; ESPÍNDOLA et al., 2004)

PARÂMETROS	VALORES
Localização	Americana – SP
Latitude	22° 43'
Longitude	47° 16'
Elevação (m)	530
Principal rio	Rio Atibaia
Área de drenagem	2.770 km ²
Área mínima inundada	10,55 km ²
Área máxima inundada	13,80 km ²
Perímetro do reservatório	64 km
Profundidade máxima	19 m
Profundidade média	9,2 m
Comprimento do reservatório	17 km
Volume máximo do reservatório	106 x 10 ⁶ m ³
Vazão máxima	37,1 m ³ /s
Tempo médio de retenção da água	30 dias
Tipo de circulação	Polimítico
Uso principal	Geração de energia elétrica
Capacidade nominal	30,0 MW
Capacidade efetiva	33,6 MW
Geração média	9,0 MW
Tomada de água	Barragem (porção inferior)
Altura da barragem	25 m
Comprimento da crista	228 m
Número de comportas	3
Número de geradores	3



Figura 2 Reservatório Salto Grande - Pontos de coleta na Praia dos Namorados (1) e no Iate Clube (2), o Rio Atibaia (3), barragem (4), direção do vento (5). (*Fonte: Google Earth, acesso em 15/11/2006, às 17:00hs*).

A região onde está situado o reservatório Salto Grande faz parte da Região Metropolitana de Campinas – RMC, considerada um dos maiores aglomerados urbanos do Estado, com aproximadamente 2,5 milhões de habitantes distribuídos por 19 municípios. O intenso crescimento urbano e industrial das últimas décadas aliado à modernização das práticas agrícolas afetou significativamente a qualidade ambiental da região, deixando os recursos hídricos em situação bastante crítica, não apenas em relação aos aspectos de quantidade, mas também de qualidade. Como reflexo principalmente da falta de coleta e tratamento de esgotos domésticos despejados durante anos nos corpos hídricos sem tratamento adequado e também da

falta de uma política de controle da eutrofização para promover uma remoção efetiva de nutrientes dos efluentes domésticos, industriais, agrícolas, os corpos hídricos da região encontram-se em avançado processo de eutrofização, com destaque para o reservatório Salto Grande, classificado como hipereutrófico.

O reservatório Salto Grande, localiza-se na porção mais baixa do rio Atibaia e faz parte da Sub-bacia do Atibaia, uma das formadoras da Bacia do rio Piracicaba, pertencente à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 05– UGRHI 05, que abrange um total de 62 municípios e uma área de drenagem de 15.303,67 km², com 92,6% de sua área localizada no Estado de São Paulo e 7,4% no Estado de Minas Gerais. Informações detalhadas sobre as Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí e da UGRHI 05 encontram-se nos Relatórios de Situação e Planos de Bacia (CBH-PCJ, 2000; CBH-PCJ, 2001; CBH-PCJ, 2004a; CBH-PCJ, 2004b) e Relatório de Qualidade das Águas Interiores da CETESB (CETESB, 2007). A disponibilidade hídrica da sub-bacia do Atibaia é considerada crítica, pois parte de seus recursos hídricos que contemplam um sistema de reservatórios em suas cabeceiras é revertida pelo sistema Cantareira para a Região Metropolitana de São Paulo, suprimindo 60% dos seus habitantes (cerca de 8 milhões de pessoas). Como contrapartida da renovação da outorga em 2004 para operar o sistema, a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP comprometeu-se a tratar os esgotos dos municípios por ela operados, muito destes a montante do reservatório, que, aliado ao comprometimento de diversos municípios de tratarem seus esgotos, está promovendo um ganho substancial na qualidade das águas do rio Atibaia à montante do reservatório.

Conforme os dados apresentados em CETESB (2007) os corpos d'água das Bacias dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí – PCJ encontram-se em uma região com elevada densidade populacional onde descargas contínuas de efluentes domésticos lançados *in natura*, representam o grande estressor ambiental que acarreta a degradação da qualidade da água e conseqüentemente alteram as comunidades biológicas. Também a atividade industrial e as fontes difusas são apontadas como agentes ativos e significativos no desequilíbrio ecológico desses ambientes aquáticos, que encontram-se em elevado processo de eutrofização devido às elevadas cargas de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, como evidenciado pelos elevados valores de Índice de Estado Trófico - IET em quase todos os pontos amostrados. AGUIJARO & ISAAC

(2003) registraram vários episódios de florações de cianobactérias em corpos d'água das Bacias dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí.

A coleta e tratamento adequado dos esgotos domésticos com implementação de tratamento terciário para eliminação dos nutrientes são apontados no “Plano de Gestão do Reservatório Salto Grande” (IRRIGART, 2006) como fundamentais para atenuação deste quadro, pois a maioria das ETEs contempla apenas o tratamento primário e secundário com baixas remoções de nutrientes. Processos erosivos na bacia e poluição difusa urbana também contribuem para o agravamento deste quadro.

No monitoramento realizado pela CETESB em seu Relatório de Qualidade das Águas (CETESB, 2006) referente ao ano de 2005, em ponto no rio Atibaia que se localiza logo à montante da entrada do reservatório e à jusante do município de Paulínia, foram observadas altas concentrações de fósforo total, um quadro que vem se repetindo anualmente nesta avaliação. Nesse relatório encontram-se também descritas, as porcentagens de coleta e tratamento de esgoto nas Bacias PCJ e cargas orgânicas lançadas, potenciais e remanescentes. A porcentagem de tratamento de esgotos domésticos na Bacia ainda é baixa, em torno de 25% do esgoto coletado e, no rio Atibaia, as principais fontes de nutrientes são o ribeirão Anhumas, que recebe grande parte do esgoto lançado no município de Campinas e os lançamentos do município de Paulínia, muito próximos da entrada do reservatório. As Estações de Tratamento de Esgoto - ETEs destes dois municípios, em início de operação, estarão contribuindo significativamente para a redução das cargas.

4.2 ANÁLISES

4.2.1 VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS E LIMNOLÓGICAS

Os dados médios diários (mm) de pluviosidade e vazões afluentes referentes aos

períodos das coletas no reservatório Salto Grande foram obtidos no Centro de Operação e Geração – COG da Companhia Paulista de Força e Luz - CPFL Energia.

As temperaturas do ar (°C) e da água (°C) e o pH foram medidas com o auxílio de termômetro de mercúrio e potenciômetro marca ORION, mod. 420A, respectivamente. A transparência da água (m) foi obtida pelo desaparecimento do Disco de Secchi com 20 cm de diâmetro (ESTEVES, 1998). Não foi medido o coeficiente de extinção a partir das medidas do Disco de Secchi por se tratar de um ambiente raso de margem.

As determinações de nitrogênio total (NT, em mg/L) e fósforo total (PT, em mg/L) foram realizadas no laboratório da Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A – SANASA, segundo os Métodos Analíticos 4500N B e 4500P, respectivamente, descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 1998). As determinações de nitrogênio total e fósforo total nos meses de maio, junho, agosto e outubro não foram realizadas por avarias no equipamento.

As análises de clorofila *a* (µg/L) foram realizadas segundo a técnica descrita em NUSCH (1980). Após a coleta, as amostras para a clorofila *a* foram filtradas com volumes variáveis em função da concentração do fitoplâncton usando filtros de microfibras de vidro AP20 Millipore, retenção de 0,8 a 8,0 micra e diâmetro de 47 mm. Em seguida foram acondicionadas em envelope de papel, colocadas em frasco escuro com sílica e conservadas a temperatura de – 20°C até sua determinação. A extração do pigmento foi feita utilizando etanol 80% sob baixa iluminação, com choque térmico por meio do aquecimento em banho-maria a 75°C por 5 minutos. Imediatamente após, foram resfriados em recipiente contendo cubos de gelo por mais 5 minutos e deixados 15 h (“over-night”) sob refrigeração (4 °C) no escuro. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro (Hach – DR 2500) nos comprimentos de onda de 665 nm e 750 nm e os cálculos finais foram realizados de acordo com a bibliografia anteriormente referenciada.

4.2.2 VARIÁVEIS BIOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS

4.2.2.1 CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DO FITOPLÂNCTON E DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS

O objetivo da contagem dos organismos fitoplanctônicos é assegurar que o número quantificado represente o mais próximo possível o tamanho da população natural. Em função dos erros inerentes ao método, nunca é alcançado o valor real, mas é avaliada a probabilidade de que o valor medido se encontre, dentro de certos limites, em torno do valor verdadeiro.

Para a quantificação das células de cianobactérias e da comunidade fitoplanctônica em água bruta, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar com capacidade de 130 mL e preservadas com lugol (10 g de iodo puro, 20 g de iodeto de potássio, 20 mL de ácido acético glacial em 200 mL de água destilada) utilizando-se de 0,3 a 1,0 mL/100 mL dependendo da concentração de organismos. Células e organismos de cianobactérias e as classes de algas que compõem o fitoplâncton foram quantificados. Para a quantificação das células foi utilizada solução de hidróxido de potássio 0,10 mol/L na diluição de 1:1, aquecendo-se posteriormente em banho-maria a 80-90 °C por 40 minutos para a dissolução da mucilagem. Foram considerados organismos de *Microcystis* spp as colônias com mais de 10 células.

A contagem foi feita em microscópio invertido (invertoscópio) (Leica, mod. DM IRB, Westzlar, Germany), usando ocular com aumento de 10X, objetiva com aumento de 40X e contraste de fase, segundo a técnica de Utermöhl (CHORUS & BARTRAM, 1999; APHA, AWWA, WEF, 1998). Câmaras de Utermöhl (também chamadas de câmaras de invertoscópio), com capacidade de 2 e 5 mL, foram utilizadas conforme a densidade dos organismos e os resultados destas contagens foram multiplicados pelo respectivo fator de conversão, calculado de acordo com a Norma Técnica CETESB L5. 303 (CETESB, 2005).

Dependendo da quantidade de organismos, o fundo da câmara foi analisado parcialmente por meio da contagem de transectos ou campos aleatórios com o auxílio do retículo de Whipple calibrado. Os campos foram distribuídos aleatoriamente no fundo da câmara de contagem por coordenadas geradas em uma tabela de números aleatórios e posicionadas nas

régua horizontais e verticais que se encontram no “charriot” do microscópio. O número de campos e de transectos depende do erro aceitável. Ao se iniciar a contagem, é essencial avaliar o nível de precisão requerido. Para um limite de confiança de 95%, o erro de contagem expresso em porcentagem pode ser estimado pela fórmula:

$$\text{Erro de contagem (\%)} = 2 / \sqrt{N} \times 100$$

Onde: N é o número de unidades contadas.

Foram enumerados no mínimo 100 indivíduos do fitoplâncton e 400 células de cianobactérias a fim de se obter um erro de $\pm 20\%$ e $\pm 10\%$ respectivamente, para um intervalo de confiança de 95%, assumindo uma distribuição randômica dos organismos no fundo da câmara de contagem. A expressão dos resultados para organismos foi em org./mL e para células de cianobactérias os resultados foram expressos em notação científica com dois algarismos significativos.

A identificação e os estudos taxonômicos foram realizados em material fresco e preservados com formol 2-4%, e com o auxílio de bibliografia especializada (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2003; KOMÁREK, 2000, 2005; SANT’ANNA & AZEVEDO, 2000; SANT’ANNA et al., 2003, 2006, 2007). Os demais grupos fitoplanctônicos foram quantificados em nível de classe de acordo com BICUDO & MENEZES (2005). Além disso, buscou-se combinar as abordagens molecular e morfológica tradicional. Para auxiliar na visualização de estruturas hialinas, como os septos, foi utilizado o contraste de fase. O uso de nanquim para visualização de bainhas, principalmente para as cianobactérias, também foi utilizado na análise taxonômica. As fotos foram feitas em microscópio invertido (invertoscópio) (Leica, mod. DM IRB, Westzlar, Germany) do laboratório da CETESB-Campinas e microscópio Axioskop40 marca Zeiss do Laboratório de Carbono 14, CENA/USP.

Para a análise da estrutura da comunidade de cianobactérias foram considerados, conforme SOUZA (2000):

- *Densidade total da amostra: número total de organismos encontrados na amostra;*
- *Abundância relativa (%) das classes fitoplanctônicas;*

- *Espécies dominantes e abundantes (LOBO & LEIGHTON, 1986 apud SOUZA, 2000) sendo consideradas Dominantes as que ocorreram em densidade ou biomassa iguais ou superiores a 50% do total da amostra e Abundantes as que ocorreram em densidade ou biomassa igual ou superior à média da amostra;*
- *Constância de ocorrência (DAJOZ, 1972 apud SOUZA, 2000) determinada pela percentagem de ocorrência da espécie em relação ao total de amostras de cada ponto de amostragem [$c=(p \times 100)/P$], onde c = constância, p = n° de coletas contendo a espécie e P = n° total de coletas efetuadas. A constância de ocorrência é definida em termos de: 1) espécies constantes, quando $c >$ que 50%; 2) espécies acessórias, quando $c > 25$ e 50% e 3) espécies acidentais, quando $c < 25\%$*

4.2.2.2 ISOLAMENTO DAS CIANOBACTÉRIAS

O isolamento das cianobactérias foi realizado no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP e iniciou-se até no máximo 24 horas após a coleta das amostras, as quais foram mantidas a 4°C em frascos escuros. Esse procedimento visou à obtenção de biomassa necessária para os testes de toxicidade e caracterização molecular das linhagens isoladas.

Inicialmente, procedeu-se à homogeneização manual das amostras e, em fluxo laminar, inoculou-se 100 uL das amostras em meio de cultura específico para crescimento de cianobactérias, BG-11 (ALLEN, 1968), solidificado com 1% de ágar em placas de Petri esterilizadas e acrescidas com ciclohexamida com concentração final de 70 mg/L. Repiques sucessivos até a obtenção das linhagens em estado uniespecífico foram realizados e após a confirmação por meio de visualização em microscópio óptico, as linhagens foram transferidas para o respectivo meio de cultivo em estado líquido.

A manutenção das culturas foi feita em temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob luminosidade fluorescente constante de $40\ \mu\text{mol photon.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP, Piracicaba, SP.

4.2.2.3 ANÁLISES DE MICROCISTINAS

Método ELISA

As análises de microcistinas pelo método ELISA (“Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay”), utilizando o Kit Beacon® em placas, foram realizadas no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, do CENA/USP.

Para as análises de água bruta, 100 mL de amostras foram coletados e armazenados a -20°C até o momento das análises. Desse volume, após descongelamento das amostras, alíquotas de 1 mL foram submetidas ao gelo/degelo por três vezes, utilizando-se nitrogênio líquido (-180°C) e banho-maria (35°C). O mesmo procedimento foi realizado para alíquotas de 1 mL das linhagens de cianobactérias isoladas. O procedimento visou a lise celular por choque térmico, liberando para o meio as toxinas produzidas internamente.

O Kit Beacon® em placas é um teste laboratorial imunológico, quantitativo, para análise de microcistinas-LR, YR, RR e nodularinas em água. Nesse teste, anticorpos policlonais ligam-se às microcistinas e ao conjugado microcistina-enzima. A microcistina na amostra compete com o conjugado microcistina-enzima por um número limitado de sítios de ligação de anticorpos. O resultado é lido colorimetricamente em um leitor de placas a partir de padrões que alcançam o máximo de 2,0 ppb. As amostras que apresentaram resultados acima desse valor na primeira leitura foram refeitas usando diluições até que o resultado estivesse dentro da curva e o resultado final foi multiplicado pelo respectivo fator de conversão.

Método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação das cianotoxinas por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção por espectrometria de massa ou HPLC-MS (“High Performance Liquid Chromatography”), permite a separação, quantificação e identificação de compostos orgânicos em misturas complexas. Os procedimentos para extração e uso de colunas são específicos para as microcistinas e a metodologia está descrita em ISO/DIS 20.179 (ISO, 2005).

Em parte das amostras (meses de abril, maio, junho, julho, agosto, setembro e outubro de 2005), as células foram rompidas usando gelo/degelo três vezes seguidas e agitando-se oitenta vezes entre cada uma (Figura 3). As amostras foram então filtradas para separação da biomassa e a fração líquida foi quantificada. A extração foi feita em metanol 90% v/v (9:1 metanol:água) com cartucho SPE (Oasis – marca Waters, Milford – Massachusetts – USA) de sílica e foram processadas no Sistema de Cromatografia Líquida marca Waters, mod 2695, com detector de UV mod. 2996 e Espectrofotômetro de Massa Micromass ZQ, nos laboratórios da SANASA – Campinas, SP, com padrões de microcistina-LR da Alexis® Biochemicals – Lausen – Switzerland.

As demais análises (meses de novembro, dezembro de 2005 e janeiro e fevereiro de 2006) seguiram a mesma metodologia, porém, após o descongelamento o material foi filtrado em filtros de microfibras de vidro AP20 Millipore, retenção de 0,8 a 8,0 micra e diâmetro de 47 mm e foram realizadas determinações do material retido no filtro e no filtrado, sendo o resultado final somado. Após a filtração, os filtros foram dobrados, picotados e colocados em tubos de ensaio, quando foram adicionados 5 mL de uma solução recém-preparada de metanol:água, na proporção de 75:25, respectivamente. Esse material foi submetido à sonificação por 2 minutos (frequência) e deixado em repouso por 24 horas (“over-night”), sob refrigeração. Após esse período, os tubos foram sonificados novamente por mais 2 minutos e a fração líquida foi retirada cuidadosamente dos tubos e transferida para frascos de vidro de 25mL com tampa. Nos tubos ainda contendo os filtros, foram adicionados mais 5 mL de solução metanol:água, na proporção de 75:25 e sonificado por mais 2 minutos. A solução foi retirada novamente dos tubos e transferida para os

frascos que continham a fração líquida da primeira extração. Desse material, uma alíquota de 8 mL foi transferida para um tubo de ensaio de 10X130mm e centrifugada por 5 minutos a 2400rpm. Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi retirada e transferida para o Vial de 2 mL do amostrador para a análise em HPLC-MS. No tratamento do filtrado, inicialmente o volume foi quantificado usando proveta graduada, enquanto preparava-se o cartucho SPE (Oasis – marca Waters) no sistema de filtração a vácuo, condicionando-o adequadamente com metanol. O filtrado foi lentamente transferido para o cartucho SPE, o qual foi lavado com 1 mL de solução de metanol:água com 0,1% TFA (Ácido tri-fluor-acético), na proporção de 90:10, lentamente, anotando-se o volume de extração (solução final). A solução final foi transferida após a extração para o Vial de 2 mL do amostrador para a análise em HPLC-MS.

O cromatógrafo usado foi o Cromatógrafo Líquido da marca Waters – mod. 2695, trabalhando com fluxo 0,29 mL/min, coluna Atlantis d C18, 3 µm e 2,1 x 150 mm, na seguinte seqüência:

- Isocrático por 2 minutos com a mistura inicial: 88% de água Milli-Q/2% de Acetonitrila/10% de solução 0,2% Ácido Tri-fluor-acético(TFA);
- Gradiente por 30 minutos até a mistura: 20% de água Milli-Q/70% de Acetonitrila/10% de solução 0,2% Ácido Tri-fluor-acético(TFA);
- Gradiente por 6 segundos até atingir a mistura: 10% de água Milli-Q/80% de Acetonitrila/10% de solução 0,2% Ácido Tri-fluor-acético(TFA);
- Permanência nesta última mistura de solventes por 2 minutos, retornando na mistura inicial em 6 segundos como gradiente;
- Permanência nesta mistura inicial por 3 minutos, tendo como tempo total de análise 35 minutos.

O detector usado foi o Detector Espectômetro de Massa marca Waters- mod. Micromass ZQ4000 (Manchester, UK)), cuja massa monitorada foi 995Da, usando a probe EletroSpray Positivo (SIR 995,60 ES+, CV=70); temperatura de desolvatação de 280°C com fluxo de 450 L/hora; temperatura da fonte de 150°C e fluxo de Cone de 160 L/h. O software empregado foi o EMPOWER (Marca WATERS - Milford – Massachusetts – USA) para recolhimento de dados, com uma curva recém-preparada de microcistina–LR na faixa de 10-400ppb.

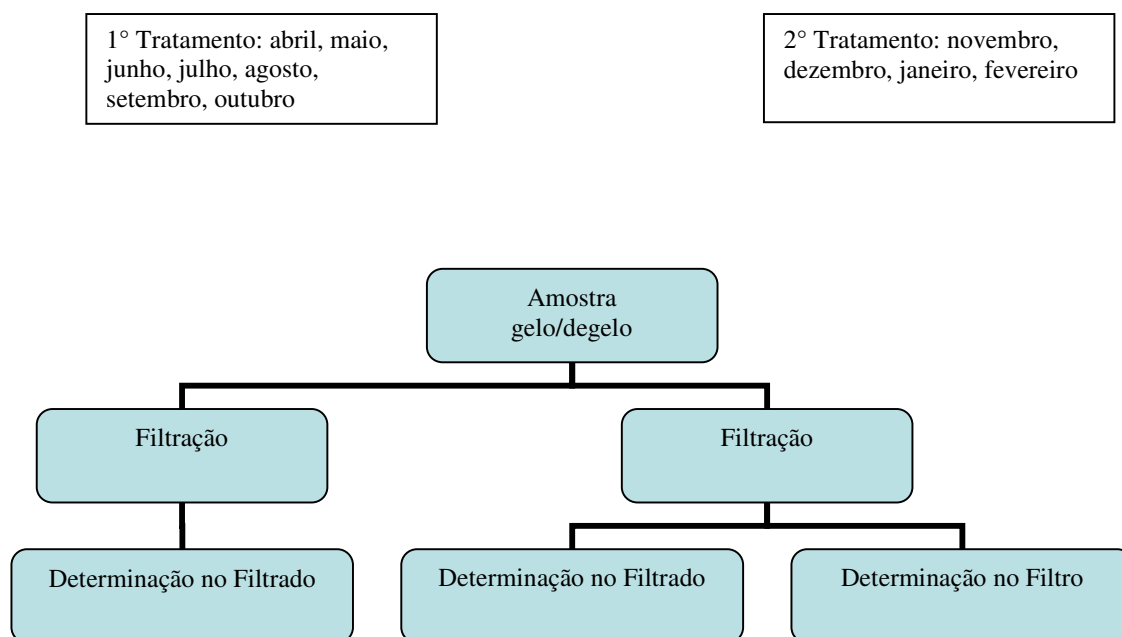


Figura 3 Fluxograma sintetizando o preparo das amostras para a análise no CLAE

Paralelamente a essa análise, foi realizada uma coleta em 31 de agosto de 2006, no dia anterior ao processamento das amostras, na Praia dos Namorados e foi utilizado um pré-tratamento diferenciado para a amostra in natura. Uma alíquota de 10mL foi transferida da amostra para um Becker de 50mL e levada ao microondas na potência máxima até a ebulição. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. O conteúdo do Becker foi transferido para um tubo de ensaio e centrifugado por 10 minutos a 3200rpm. O sobrenadante foi transferido para o Vial de 2 mL do amostrador para análise em HPLC-MS, seguindo as condições cromatográficas descritas anteriormente. O sedimentado da centrifugação foi tratado com 2 mL de solução metanol:água com 0,1% TFA, na proporção 90:10, sonificado por 3 minutos e filtrado com filtro fechado descartável CHROMAFIL RC 54/25 (celulose regenerada de 45µm). O filtrado foi recolhido no Vial de 2 mL, o qual foi colocado no amostrador para análise em HPLC-MS. Esse procedimento foi utilizado por SILVA-ESTÊNICO & CANTÚSIO-NETO (2006) em estudos de comparação de pré-tratamentos para extração das microcistinas-LR intra e extracelulares.

4.2.2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CIANOBACTÉRIAS

Extração de DNA genômico. Para a extração de DNA genômico das linhagens isoladas, uma suspensão de 1,5–3,0 mL de células de cianobactérias na fase de crescimento exponencial foi coletada e centrifugada a 10000 rpm durante 15 min para a obtenção de um pélete. A extração do DNA genômico dos isolados foi feita de acordo com o protocolo descrito por FIORE et al. (2000). Os DNAs extraídos (5 µL) foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%). A integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,0%, contendo brometo de etídio (0,3 µg/mL de gel) em corrida eletroforética usando tampão TBE 0,5 X (TBE 1 X: Tris-borato 44 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita, utilizando o programa “Multi Analyst” do “Fluor-S® MultiImager” (BioRad, Hercules, CA, EUA). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular Lambda DNA/EcoR I + Hind III (Promega, Madison, E.U.A.). As amostras foram estocadas à temperatura de –20oC até a próxima etapa.

Amplificação por PCR do gene que codifica para o rDNA 16S. Para a amplificação das seqüências do gene de rDNA 16S do DNA extraído dos isolados, utilizou-se o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: 27F1 (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) e 149Rc (5’-tacggctacctgttacgac-3’) (NEILAN et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM de MgCl₂; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA); 10 ng de DNA; 5 µmol de cada primer; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada no termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 94°C/4min; 30 ciclos 94°C/20s, 50°C/30s, 72°C/2min; extensão final a 72°C/7min. A verificação do tamanho e quantificação dos amplicons resultantes foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se como padrão o marcador de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Clonagem de produtos de PCR. Após a amplificação por PCR das seqüências de DNA, foi realizada a clonagem dos amplicons, utilizando-se o Kit de clonagem “pGEM®-T Easy Vector Systems”, fabricado pela Promega, seguindo as instruções do fabricante, presentes em seu Manual de Instruções.

Transformação. A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita por meio de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH & MANIATIS, 1989). Alíquotas de 10 µL do produto de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado em gelo por 30 minutos. Após decorrido esse tempo, o microtubo foi levado ao banho-maria a 42°C e deixado por 30 segundos e, em seguida, incubado novamente no gelo por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se a ele 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH & MANIATIS, 1989) à temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C por 1 hora sob agitação de 180 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen) nas respectivas concentrações finais de 100 µg/mL e 100µg/mL de meio. As placas foram incubadas por 15 horas à temperatura de 37°C.

PCR de colônias. Após o plaqueamento em meio de cultivo LB, contendo ampicilina e X-GAL, foram escolhidas 4 colônias brancas para a nova reação de PCR, a qual visou a confirmação dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células transformadas de cada clone foi adicionada a 25 µL de reação de PCR, utilizando-se os iniciadores: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTTCAC ACAGG-3'). A amplificação foi feita em solução conforme descrito acima no mesmo termociclador já usado nas seguintes condições: 94°C/5 min; 25 ciclos 95°C/20 s, 50°C/15s, 60°C/1 min. A verificação do tamanho e quantificação dos amplicons resultantes foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente.

Extração do DNA plasmidial. A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5α que continham os insertos, foi feita pelo método de preparação em pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina de acordo com BIMBOIM & DOLY (1979). As colônias brancas que

fizeram parte da seleção foram transferidas para 3 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 14-16 horas a 37°C sob agitação de 150 rpm. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 3 mL de cultura das células produzidas e, em seguida, foram centrifugadas a 5.000 rpm por 7 minutos. O pélete formado foi ressuspensionado em 100 µL de solução gelada (Tris-HCl 1 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M; 0,9 de glucose e água para um volume final de 100 mL). Em seguida, 200 µL de uma solução 1:1 (NaOH 0,4 N e SDS 2%) foram adicionados e misturados gentilmente. Após uma incubação no gelo por 5 minutos, foram adicionados aos microtubos 150 µL de outra solução também gelada (acetato de potássio 5m, 11,5 mL de ácido acético glacial e água para um volume final de 100 mL). Posteriormente, foram centrifugados a 14.000 x g durante 20 min e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi tratado com RNase (10mg/mL) por 30 min a 37 °C. Adicionou-se 1 mL de etanol 100% gelado, misturando-se e centrifugando-se em seguida (14.000 x g, 15 min). O sobrenadante foi eliminado e o pélete lavado com 750 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 14.000 x g por 5 min. O pélete foi ressuspensionado em 30 µL de água ultrapura (Milli-Q) e incubado a 37°C por 10 min. Os plasmídeos, assim extraídos, foram verificados em gel de agarose 1% conforme descrito acima e armazenados a -20°C até a próxima etapa.

Sequenciamento do rDNA 16S. Os amplicons clonados foram reamplificados por PCR usando o “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para a reação foram utilizados 200 ng de cada plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol/µL do iniciador T7 promotor (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e do SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'). Os oligonucleotídeos 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAG), 357-341R (CTGCTGCCTCCCGTAGG), 685-704F (GTAGSGGTGAAATSCGTAGA), 704-685R (TCTACGSATTTACCSCTAC), 1099-1114F (GCAACGAGCGCAACCC), e 1114-1099R (GGGTTGCGCTCGTTGC) foram usados em reações adicionais, buscando-se o sequenciamento de fragmentos com aproximadamente 1500 pb. A reação de sequenciamento foi feita no mesmo termociclador usado anteriormente, tendo início a 94°C por 5 min, seguida de 25 ciclos das seguintes condições: 20s a 95°C, 15s a 50°C, e 1 min a 60°C. Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se à precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing”. Posteriormente, os microtubos com as reações precipitadas foram inseridos no sequenciador

capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP para o seqüenciamento dos fragmentos de DNA por aproximadamente 2:30 horas. Os dados gerados pelo seqüenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

Processamento e análise filogenética das seqüências. As seqüências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) com o uso do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998) em sistema operacional Linux. Essas seqüências foram comparadas com outras seqüências previamente depositadas no Ribosomal Database Project II (RDP) (MAIDAK et al., 1999) e/ou no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990), para a identificação das espécies de cianobactérias. Para a análise filogenética, as seqüências obtidas e outras selecionadas de bancos de dados públicos foram alinhadas, editadas e usadas para a construção de árvores filogenéticas. Essas árvores foram construídas usando os métodos de distância “neighbour-joining” (NJ) e máxima parsimônia (MP) existentes no programa MEGA versão 3.1 (KUMAYER et al. 2004) e o método de maximum-likelihood (ML) por meio do programa PHYLIP v3.6 (FELSENSTEIN, 1993). Para os métodos NJ e MP, as inferências filogenéticas foram estabelecidas por bootstrap (1000 replicações). Para a análise de ML, esse procedimento não foi realizado em decorrência de limitações computacionais.

Distribuição de genes NRPSs e PKSs em linhagens de cianobactérias isoladas

Os DNAs genômicos extraídos das cianobactérias isoladas foram usados, também, para a amplificação de seqüências conservadas de sintases de peptídeos (NRPSs), as quais empregaram o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: MTF (5'-GCNGGYGGYG CNTAYGTNCC-3') e MTR (5'-CCNCGDATYTTNACYTG-3') (NEILAN et

al., 1999). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 5 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol/μL de cada iniciador; 4% de DMSO (dimetilsulfóxido); água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 μL. A reação foi realizada no termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94°C/2 min; 5 ciclos 94°C/1 min, 45°C/1 min, 72°C/1 min; 30 ciclos de 94°C/30s, 50°C/1 min, 72°C/4 min; extensão final a 72°C/15min. Para a amplificação de sequências conservadas de sintetases de policetídeos (PKs) foi empregado o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: KSFF (5’-MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG-3’) e KSR (5’-GGRTCICCIARISWIGTICCI GTICCRTG-3’) (BEYER et al., 1999) e as condições de amplificação foram as mesmas utilizadas para as sintetases de peptídeos (NRPSs). A verificação dos tamanhos dos amplicons resultantes foi feita gel de agarose 1%, nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se como padrão o marcador de massa molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen).

Distribuição do domínio N-metiltransferase - NMT do gene *mycA* em linhagens de cianobactérias isoladas e amostras ambientais de água

As linhagens de cianobactérias isoladas e amostras ambientais de água foram submetidas à detecção do domínio NMT do gene *mycA* por PCR.

Os procedimentos para a extração do DNA genômico das linhagens isoladas de cianobactérias, encontram-se descritos no item 4.2.5. Para a extração de DNA das amostras ambientais de água o procedimento utilizado foi o descrito em FIORE et al. (2000), após centrifugação para concentração do material a 10.000 x g, durante 30 min a 10°C. Em ambos os casos, o material peletizado foi lavado três vezes com água ultrapura esterilizada (Milli-Q), alterando-se o tempo de centrifugação e a rotação entre as lavagens na seguinte sequência: 5 min a 10.000 rpm; 3 min. a 10.000 rpm e 5min a 8.000 rpm para a completa sedimentação de células com pesos diferentes, em seguida o material liofilizado e armazenado a -20°C.

Para a amplificação do domínio *N*-metiltransferase (NMT) do *mcyA*, empregou-se o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: MSF (5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3') e MSR (5'-TGCAGATAACTCC GCAGTTG-3') (TILLET et al., 2001). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl, 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM de MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 µmo/µL de cada primer; água ultrapura (Milli-Q), esterilizada para um volume final de 25 µL. A reação foi feita no mesmo termociclador até então utilizado, nas seguintes condições: 94°C/4 min; 30 ciclos 94°C/12 s, 55°C/30 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min. Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular Low Mass DNA (Invitrogen) de 200pb. A integridade dos produtos amplificados foi verificada em gel de agarose 1%, conforme descrito acima.

4.2.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A estatística descritiva utilizada para a análise dos resultados foi a média aritmética como medida de tendência central para os dados coletados em duplicata e o desvio padrão (DP) como medida do grau de dispersão absoluta dos dados das médias sazonais. A avaliação dos resultados abióticos e das avaliações quantitativas das cianobactérias e fitoplâncton (número de células e total de organismos) com relação aos pontos de coleta foi feita utilizando Índice de Correlação de Pearson (*r*) que reflete a extensão linear entre dois conjuntos de dados, no caso, células de cianobactérias e variáveis abióticas, e a Análise de Componentes Principais – ACP com os dados normalizados transformados por meio de log_x+1, utilizando o programa FITOPAC versão 1.6 de autoria de SHEPERD (2006) para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS E LIMNOLÓGICAS

Os valores de precipitação média diária e vazão afluyente ao reservatório fornecidos pela CPFL, durante os meses estudados variaram de 0,10mm a 9,99mm e 7,63m³/s a 58,5 m³/s respectivamente. De modo geral, os valores de precipitação acompanharam os valores de vazão afluyente ao reservatório, indicando que neste sistema o regime hidrológico está fortemente condicionado pelo regime de chuvas, mesmo com o Sistema Cantareira em operação, que nas épocas de elevadas precipitações estaria aumentando o estoque hídrico nos reservatórios de montante. Os maiores valores de precipitação média mensal foram registrados nos meses de janeiro e fevereiro de 2006 (7,86mm e 9,99mm), coincidindo com os maiores valores da vazão média mensal afluyente ao reservatório 37,0 m³/s e 58,5 m³/s e os valores mínimos destas duas variáveis foram registrados nos meses de julho e agosto de 2005 (Figura 4, Tabelas 1 e 2). Esses valores acompanharam as médias históricas registradas anteriormente na bacia do Rio Piracicaba (CETESB, 2007) e no Reservatório Salto Grande (ESPINDOLA et al., 2004) e a partir destas observações foram definidos para este estudo dois períodos de variação sazonal, os períodos de abril/2005 a setembro/2005 para o período seco e de outubro/2005 a fevereiro/2006 para o período chuvoso. O valor médio de precipitação diária para o período seco foi 1,4mm enquanto que para o chuvoso foi de 6,2mm e o valor médio para vazão afluyente no período de seca foi 15,7 m³/s (Tabelas 3 e 4).

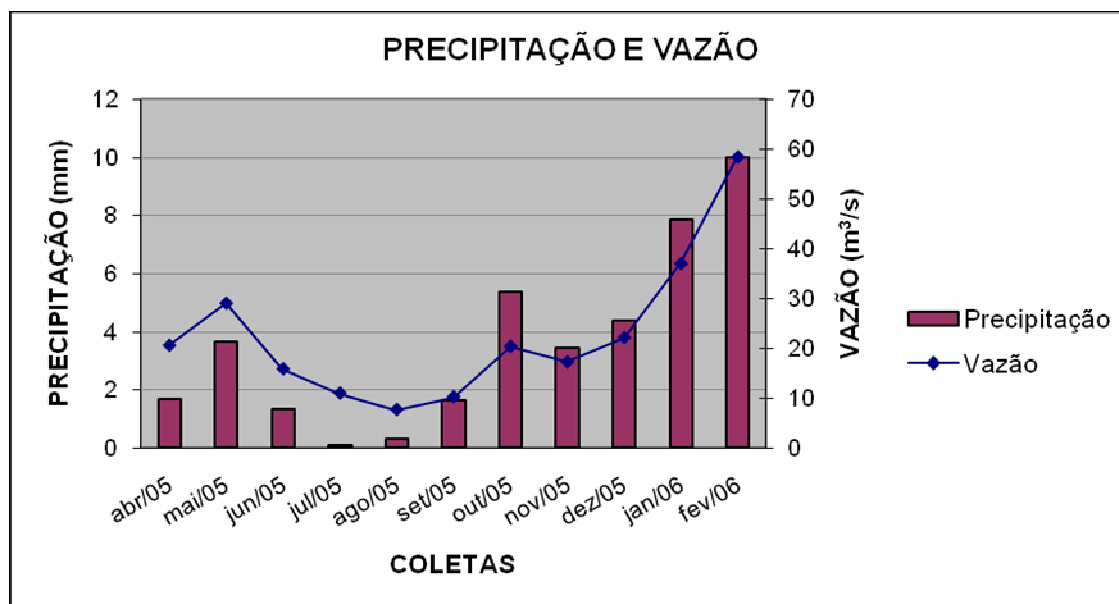


Figura 4 Precipitação média diária e vazão média mensal afluente ao reservatório a partir de dados fornecidos pela Companhia Paulista de Força e Luz - CPFL no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

TABELA 1 Valores médios (M) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas - Praia dos Namorados

Variáveis		FÍSICOS E QUÍMICOS									TOXICOLÓGICOS			BIOLÓGICOS		
		Temperatura da água	Temperatura do ar	Transparência	pH	Fósforo Total	Nitrogênio Total	NT/PT	Vazão média mensal	Precipitação média diária	Microcistina LR	Microcistina (ELISA)	Clorofila <i>a</i>	Células de Cianobactérias	Cianobactérias	Fitoplâncton
UNIDADE		°C	°C	m		mg/L	mg/L		m³/s	mm	µg/L	µg/L	µg/L	cél/mL	org/mL	org/mL
Padrão Conama 357/05	Classe 1	-	-	40	6 a 9	0,02*	1,27	-	-	-	-	-	10	20.000	-	-
	Classe 2	-	-	100	6 a 9	0,03*	1,27	-	-	-	-	-	30	50.000	-	-
abr/05	V1	28,5	30,5	0,5	7,2	0,250	1,04	4	-	-	0,27	2,00	517,0	1,80E + 06	9590	10055
	V2	28,5	30,5	0,5	7,2	0,100	1,65	17	-	-	0,24	2,00	558,0	2,19E + 06	7923	8459
	M	28,5	30,5	0,5	7,2	0,175	1,35	10	20,56	1,65	0,25	2,00	537,5	1,99E + 06	8757	9257
mai/05	V1	22,0	21,0	0,8	7,0	-	-	-	-	-	0,03	-	92,1	1,92E + 04	1906	3068
	V2	22,0	21,0	0,8	7,0	-	-	-	-	-	0,03	-	150,7	4,31E + 04	1595	2280
	M	22,0	21,0	0,8	7,0	-	-	-	29,06	3,63	0,03	-	121,4	3,12E + 04	1751	2674
jun/05	V1	21,5	20,5	0,7	6,5	-	-	-	-	-	0,02	0,15	94,9	6,47E + 04	507	815
	V2	21,5	20,5	0,7	6,7	-	-	-	-	-	0,04	0,83	309,7	3,68E + 05	1550	1878
	M	21,5	20,5	0,7	6,6	-	-	-	15,84	1,32	0,03	0,49	202,3	2,16E + 05	1029	1347
jul/05	V1	21,0	24,0	0,4	7,6	0,010	1,28	128	-	-	0,05	1,36	92,1	4,10E + 04	925	2058
	V2	21,0	24,0	0,4	7,7	0,010	1,20	120	-	-	0,04	0,88	78,1	2,95E + 04	547	1591
	M	21,0	24,0	0,4	7,7	0,010	1,24	124	10,93	0,10	0,05	1,12	85,1	3,53E + 04	736	1825
ago/05	V1	24,0	26,0	0,3	9,1	0,110	-	-	-	-	0,64	50,68	2480,3	2,53E + 06	7028	8160
	V2	24,0	26,0	0,3	9,2	0,190	-	-	-	-	1,54	25,32	4586,7	2,40E + 06	12031	13222
	M	24,0	26,0	0,3	9,2	0,150	-	-	7,63	0,31	1,09	38,00	3533,5	2,47E + 06	9530	10691
set/05	V1	23,0	21,0	0,5	7,6	0,020	0,77	39	-	-	<0,004	0,92	86,0	9,34E + 04	342	2070
	V2	23,0	21,0	0,5	7,7	0,020	0,92	46	-	-	<0,004	0,91	70,0	8,02E + 04	357	3693
	M	23,0	21,0	0,5	7,7	0,020	0,85	42	10,23	1,62	<0,004	0,92	78,0	8,68E + 04	350	2882
out/05	V1	25,0	23,0	0,5	7,2	-	-	-	-	-	<0,004	0,11	141,0	3,26E + 05	3574	4265
	V2	25,0	23,0	0,5	7,0	-	-	-	-	-	<0,004	0,12	275,6	4,08E + 05	3895	4550
	M	25,0	23,0	0,5	7,1	-	-	-	20,36	5,37	<0,004	0,12	208,3	3,67E + 05	3735	4408
nov/05	V1	28,0	24,5	0,1	7,1	0,050	2,31	46	-	-	1,43	0,10	316,1	4,85E + 05	1648	1801
	V2	28,0	24,5	0,1	7,1	0,010	1,97	197	-	-	0,69	1,52	183,6	3,56E + 05	950	1105
	M	28,0	24,5	0,1	7,1	0,030	2,14	122	17,24	3,44	1,06	0,81	249,9	4,21E + 05	1299	1453
dez/05	V1	25,0	24,5	1,3	7,1	0,170	1,01	6	-	-	0,59	1,46	57,8	5,57E + 04	494	745
	V2	25,0	24,5	1,3	7,1	0,190	1,10	6	-	-	0,71	1,81	71,1	4,06E + 04	404	499
	M	25,0	24,5	1,3	7,1	0,180	1,06	6	22,11	4,36	0,65	1,64	64,5	4,82E + 04	449	622
jan/06	V1	27,5	23,5	0,4	8,0	0,280	7,40	26	-	-	39,17	7,14	228,8	9,02E + 06	41897	42881
	V2	27,5	23,5	0,4	7,6	0,060	4,00	67	-	-	28,11	7,60	209,8	1,05E + 07	16410	16678
	M	27,5	23,5	0,4	7,8	0,170	5,70	47	37,05	7,86	33,64	7,37	219,3	9,77E + 06	29154	29780
fev/06	V1	31,5	29,5	0,5	7,3	0,020	1,03	52	-	-	8,70	3,24	155,0	1,97E + 04	4134	4706
	V2	31,5	29,5	0,5	7,2	0,010	1,51	151	-	-	12,28	3,28	155,1	1,82E + 04	2776	3003
	M	31,5	29,5	0,5	7,3	0,015	1,27	101	58,50	9,99	10,49	3,26	155,1	1,90E + 04	3455	3855

* para ambientes lênticos, V1 = valor da réplica 1; V2 = valor da réplica 2, M = média

TABELA 2 Valores médios (M) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas – Iate Clube.

Variáveis		FÍSICOS E QUÍMICOS							TOXICOLÓGICOS				BIOLÓGICOS			
		Temperatura da água	Temperatura do ar	Transparência	pH	Fósforo Total	Nitrogênio Total	NT/PT	Vazão média mensal	Precipitação média diária	Microcistina LR	Microcistina (ELISA)	Clorofila - <i>a</i>	Células de Cianobactérias	Cianobactérias	Fitoplâncton
UNIDADE		°C	°C	m		mg/L	mg/L		m³/s	mm	µg/L	µg/L	µg/L	cél/mL	org./mL	org/mL
Padrão	Classe 1	-	-	40	6 a 9	0,02*	1,27	-	-	-	-	-	10	20.000	-	-
Conama 357/05	Classe 2	-	-	100	6 a 9	0,03*	1,27	-	-	-	-	-	30	50.000	-	-
abr/05	V1	29,0	31,0	0,7	7,1	0,040	1,08	27	-	-	0,27	1,97	380,0	5,21E + 05	2014	2247
	V2	29,0	31,0	0,7	7,1	0,050	1,17	23	-	-	0,24	1,85	338,0	3,29E + 05	1827	2403
	M	29,0	31,0	0,7	7,1	0,045	1,13	25	20,56	1,65	0,25	1,91	359,0	4,25E + 05	1921	2325
mai/05	V1	22,0	18,5	1,3	7,1	-	-	-	-	-	0,02	1,38	51,6	2,34E + 04	200	616
	V2	22,0	18,5	1,3	7,1	-	-	-	-	-	0,02	1,07	55,1	3,13E + 04	323	651
	M	22,0	18,5	1,3	7,1	-	-	-	29,06	3,63	0,02	1,23	53,4	2,74E + 04	262	634
jun/05	V1	21,5	19,5	1,4	6,7	-	-	-	-	-	0,02	0,58	63,5	7,98E + 04	268	1063
	V2	21,5	19,5	1,4	6,7	-	-	-	-	-	0,02	0,42	74,6	4,91E + 04	378	1004
	M	21,5	19,5	1,4	6,7	-	-	-	15,84	1,32	0,02	0,50	69,1	6,44E + 04	323	1034
jul/05	V1	20,0	20,0	0,9	7,6	0,050	3,45	69	-	-	0,09	0,17	1540,1	8,54E + 05	3336	6266
	V2	20,0	20,0	0,9	7,6	0,090	6,40	71	-	-	0,12	0,14	3124,8	2,36E + 06	9074	13243
	M	20,0	20,0	0,9	7,6	0,070	4,93	70	10,93	0,10	0,11	0,16	2332,4	1,61E + 06	6205	9755
ago/05	V1	24,0	23,5	0,4	9,5	0,070	-	-	-	-	0,03	50,31	2187,4	9,00E + 05	4348	6612
	V2	24,0	23,5	0,4	9,5	0,140	-	-	-	-	0,06	17,29	4360,8	7,42E + 05	6791	7744
	M	24,0	23,5	0,4	9,5	0,105	-	-	7,63	0,31	0,04	33,80	3274,1	8,21E + 05	5570	7178
set/05	V1	21,0	19,5	1,2	7,8	0,010	1,01	101	-	-	<0,002	1,68	115,8	1,03E + 05	1489	3693
	V2	21,0	19,5	1,2	7,7	0,030	0,84	28	-	-	<0,002	1,34	120,5	1,98E + 05	1074	3099
	M	21,0	19,5	1,2	7,8	0,020	0,93	65	10,23	1,62	<0,002	1,51	118,2	1,50E + 05	1282	3396
out/05	V1	25,5	24,5	0,8	7,5	-	-	-	-	-	<0,002	1,96	169,2	3,72E + 05	1715	4288
	V2	25,5	24,5	0,8	7,7	-	-	-	-	-	<0,002	0,21	188,2	3,04E + 05	1819	2423
	M	25,5	24,5	0,8	7,6	-	-	-	20,36	5,37	<0,002	1,09	178,7	3,38E + 05	1767	3356
nov/05	V1	27,0	24,0	0,6	7,4	0,010	3,19	319	-	-	0,37	1,50	499,1	4,94E + 05	4131	6227
	V2	27,0	24,0	0,6	7,5	0,040	2,54	64	-	-	0,55	1,47	359,3	3,78E + 05	1311	2979
	M	27,0	24,0	0,6	7,5	0,025	2,87	191	17,24	3,44	0,46	1,49	429,2	4,36E + 05	2721	4603
dez/05	V1	26,0	23,0	1,1	7,0	0,130	0,71	5	-	-	0,23	1,74	681,9	2,13E + 04	602	723
	V2	26,0	23,0	1,1	7,1	0,120	1,22	10	-	-	0,17	1,66	484,1	6,61E + 03	169	293
	M	26,0	23,0	1,1	7,1	0,125	0,97	8	22,11	4,36	0,20	1,70	583,0	1,39E + 04	386	508
jan/06	V1	27,5	23,0	0,6	8,3	0,010	2,31	231	-	-	9,56	3,24	509,8	1,09E + 06	11420	11480
	V2	27,5	23,0	0,6	8,5	0,020	2,19	110	-	-	10,42	3,80	394,2	1,12E + 06	5632	5751
	M	27,5	23,0	0,6	8,4	0,015	2,25	170	37,05	7,86	9,99	3,52	452,0	1,10E + 06	8526	8616
fev/06	V1	29,5	29,0	0,6	7,3	0,010	0,89	89	-	-	1,42	7,34	53,6	5,02E + 04	388	496
	V2	29,5	29,0	0,6	7,2	0,020	0,85	43	-	-	1,86	7,60	51,1	7,00E + 04	1004	1234
	M	29,5	29,0	0,6	7,3	0,015	0,87	66	58,50	9,99	1,64	7,47	52,4	6,01E + 04	696	865

* para ambientes lênticos, V1 = valor da réplica 1; V2 = valor da réplica 2, M = média

A seguir são apresentados os resultados médios das análises das variáveis físicas, químicas e biológicas agrupadas por pontos de coleta e os valores de cada parâmetro que podem ser observados nas Figuras 5 e 6 e Tabelas 1 e 2. Os valores médios e desvios padrões dos valores obtidos durante os períodos de seca (de abril de 2005 a setembro de 2005) e de cheia (de outubro de 2005 a fevereiro de 2006) por ponto de coleta são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 Valores médios (M) e Desvio Padrão (DP) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas para a estação das secas e chuvosa na Praia dos Namorados

Praia dos Namorados				
Variável	Estação das Secas		Estação Chuvosa	
	Média (M)	Desvio Padrão (DP)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
Transparência (m)	0,5	0,2	0,6	0,4
pH	7,6	0,9	7,3	0,3
Temperatura da água (°C)	23,3	2,8	27,4	2,7
Temperatura do ar (°C)	23,8	3,9	25,0	2,6
Microcistina (µg/L) - LR	0,2	0,4	9,2	14,3
Microcistina (µg/L) - ELISA	8,5	16,5	2,6	2,9
Fósforo total (mg/L)	0,1	0,1	0,1	0,1
Nitrogênio total (mg/L)	1,1	0,3	2,5	2,2
NT/PT	58,7	58,8	69,0	52,6
Células de Cianobactérias (cél/mL)	8,05E + 05	1115643,3	2,12E + 06	4276887,1
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	759,6	1369,8	179,4	72,8
Precipitação (mm)	1,4	1,3	6,2	2,7
Vazão (m³/s)	15,7	8,0	31,0	17,1

TABELA 4 Valores médios (M) e Desvio Padrão (DP) das variáveis físicas, químicas, biológicas e toxicológicas para a estação das secas e chuvosa no Iate Clube

Iate Clube				
Variável	Estação das Secas		Estação Chuvosa	
	Média (M)	Desvio Padrão (DP)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
Transparência (m)	1,0	0,4	0,7	0,2
pH	7,6	1,0	7,5	0,5
Temperatura da água (°C)	22,9	3,3	27,1	1,6
Temperatura do ar (°C)	22,0	4,7	24,7	2,5
Microcistina (µg/L) - LR	0,1	0,1	2,5	4,3
Microcistina (µg/L) - ELISA	6,5	13,4	3,1	2,6
P total (mg/L)	0,1	0,0	0,1	0,1
N total (mg/L)	2,3	2,3	1,7	1,0
NT/PT	46,5	23,9	64,8	48,2
Células de Cianobactérias (cél/mL)	5,16E + 05	610748,6	3,90E + 05	436456,4
Clorofila <i>a</i> (µg/L)	1034,4	1406,5	339,1	217,0
Precipitação (mm)	1,4	1,3	6,2	2,7
Vazão (m³/s)	15,7	8,0	31,1	17,1

Ponto de Coleta Praia dos Namorados (PN)

A temperatura da água variou de 22°C (julho de 2005) a 32°C (fevereiro de 2006) e a variação da temperatura do ar esteve entre 21°C (junho de 2006) a 30°C (fevereiro de 2006). A temperatura média da água no período de seca foi 23,3°C, mais baixa que no período de cheia que foi de 27,4°C enquanto que a temperatura média do ar, também, foi mais baixa (23,8°C) no período de seca, que no período de cheia (25,0°C); observa-se, entretanto, não há variações muito bruscas entre os dois períodos e as médias mantêm-se elevadas.

A medida de transparência da água variou de 0,10m em novembro de 2005 a 1,30m em dezembro de 2005; o valor médio para o período de seca (0,5m) esteve muito próximo do valor médio para o período de cheia (0,6m). Os perfis temporais de pH tiveram amplitude de variação de 6,6 em junho de 2005 a 9,2 em agosto de 2005 não havendo muita variação entre a média dos valores para o período de seca (7,5) quando comparada à média para o período de cheia (7,3).

Para os nutrientes, foram verificadas concentrações de fósforo total, variando de 0,010mg/L no mês de julho de 2005 a 0,180mg/L em dezembro de 2005 e de nitrogênio total de 0,85mg/L em setembro de 2005 a 2,14mg/L em novembro de 2005; por problemas operacionais, nos meses de maio e junho não foram efetuadas as análises de fósforo total e nitrogênio total que também não foi analisado em agosto de 2005. O valor médio mensal de PT registrado no período de seca foi semelhante ao de cheia (0,10 mg/L) e o de NT foi menor no período de seca (1,1mg/L) que no período de cheia (2,5mg/L). O cálculo da razão NT/PT que pode ser calculado em apenas 7 coletas, apresentou maiores valores no mês de julho e novembro (124 e 122 respectivamente) e o menor valor no mês de dezembro de 2005 (6), não podendo ser observado nenhum padrão sazonal característico; entretanto, a média para o período de seca (58,7) foi menor que para o período de cheia (69,0)

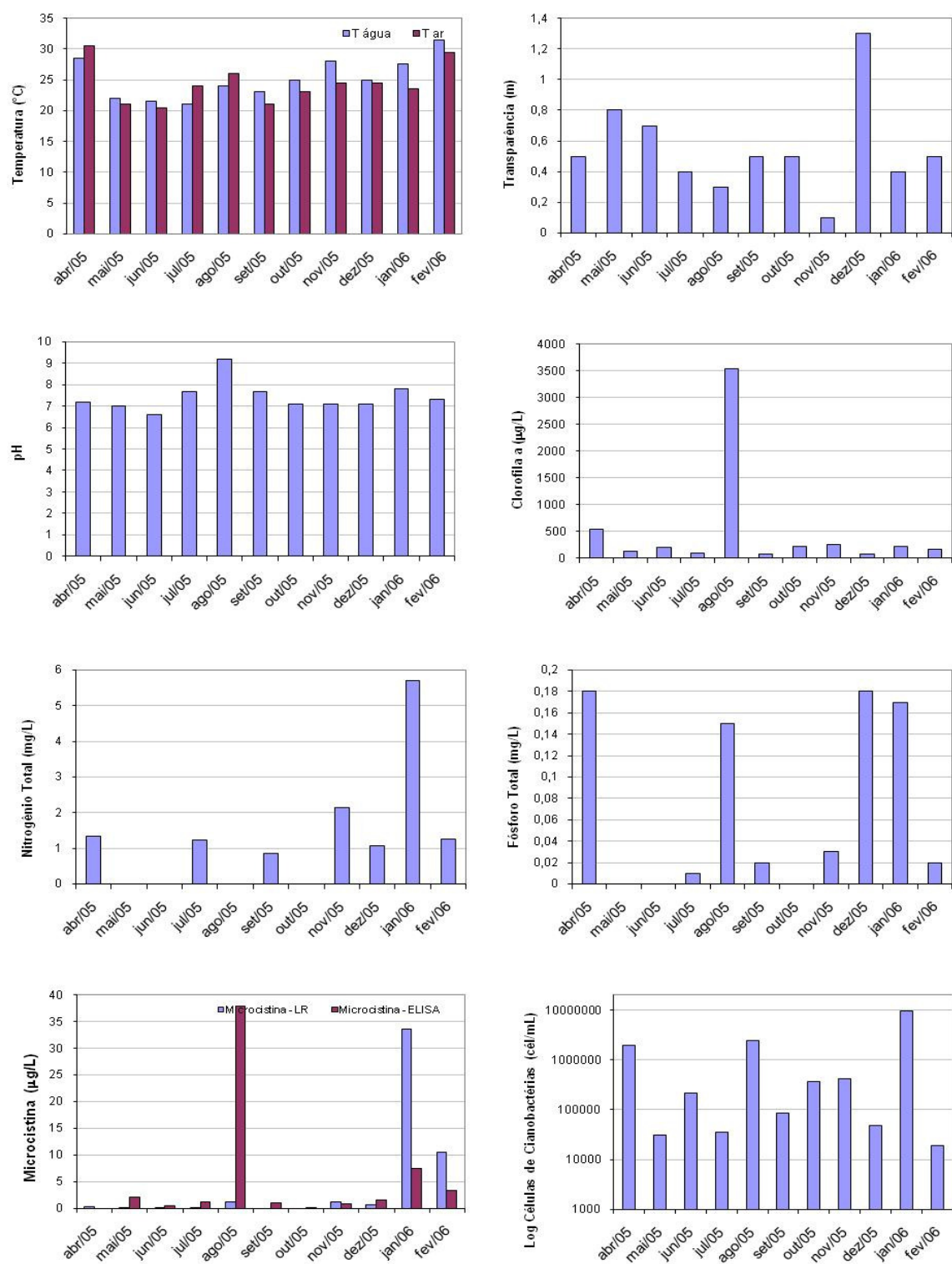


Figura 5 Variáveis físicas, químicas e biológicas no ponto de coleta na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

Ponto de Coleta IATE CLUBE (IC)

A temperatura da água variou de 20,0 °C (julho de 2005) a 30,0°C (fevereiro de 2006) e a variação da temperatura média do ar esteve entre 19°C (maio de 2005) a 31,0°C (abril de 2005). A temperatura média da água no período de seca foi 22,9°C, mais baixa que no período de cheia que foi de 27,1°C enquanto que a temperatura média do ar também foi mais baixa (22,0°C) no período de seca, que no período de cheia (24,7°); entretanto, não há variações muito bruscas entre os dois períodos.

A medida de transparência da água (m) variou de 0,4m em agosto de 2005 a 1,4m em junho de 2005; valor médio para o período de seca foi mais elevado (1,0m) que o valor médio para o período de cheia (0,7m). Os perfis temporais de pH tiveram amplitude de variação de 6,7 em junho de 2005 a 9,5 em agosto de 2005 não havendo muita variação entre a média dos valores para o período de seca (7,6) quando comparada à média para o período de cheia (7,5).

Para os nutrientes, foram verificadas concentrações de fósforo total variando de 0,02mg/L nos meses de janeiro e fevereiro de 2005 a 0,13mg/L em dezembro de 2005 e de nitrogênio total de 0,87mg/L em setembro de 2005 a 4,93mg/L em julho de 2005; por problemas operacionais, nos meses de maio e junho não foram efetuadas as análises de fósforo total e nitrogênio total que também não foi analisado em agosto de 2005. O valor médio mensal de PT registrado no período de seca foi semelhante ao de cheia (0,10 mg/L) e o de NT foi maior no período de seca (2,3 mg/L) que no período de cheia (1,7mg/L) A razão NT/PT que pode ser calculada apenas em 7 coletas, apresentou maior valor no mês de janeiro de 2006 (113) e o menor valor no mês de dezembro de 2005 (7) também não apresentando nenhum padrão sazonal característico e o valor médio para o período de seca (46,5) foi menor que para o período de cheia (64,8)

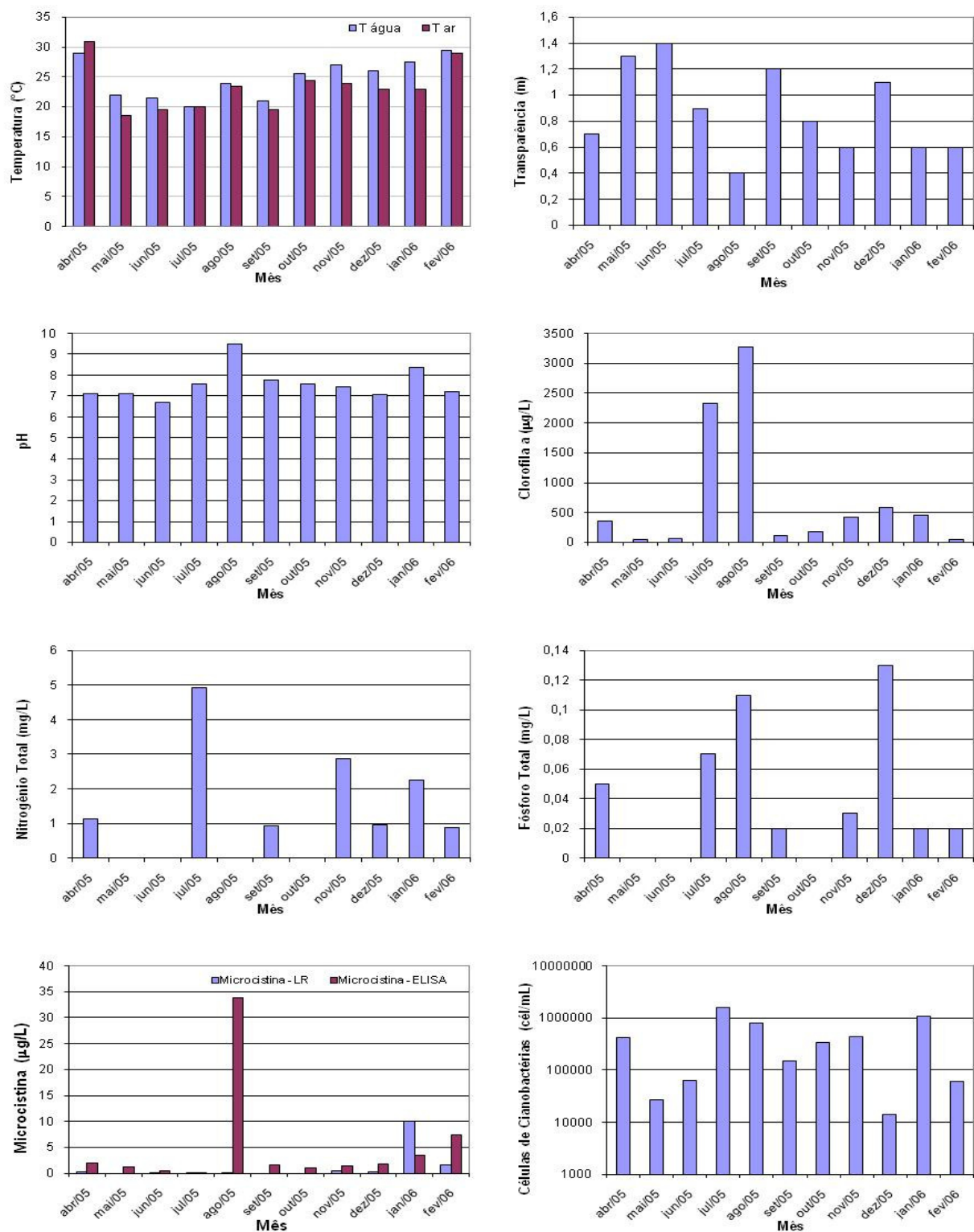


Figura 6 Variáveis físicas, químicas e biológicas no ponto de coleta no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

5.2 VARIÁVEIS BIOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS

5.2.1 CLOROFILA *a*, CIANOACTÉRIAS E FITOPLÂNCTON

Os valores de clorofila *a*, células de cianobactérias, abundância, ocorrência e composição taxonômica do fitoplâncton, encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 e Anexo 6, 7. Foram registrados ao todo neste estudo 27 táxons de cianobactérias, ocorrendo nos dois pontos de coleta, sendo que 12 foram registros inéditos para o reservatório. As ilustrações e descrições encontram-se no Anexo 4 e Anexo 8.

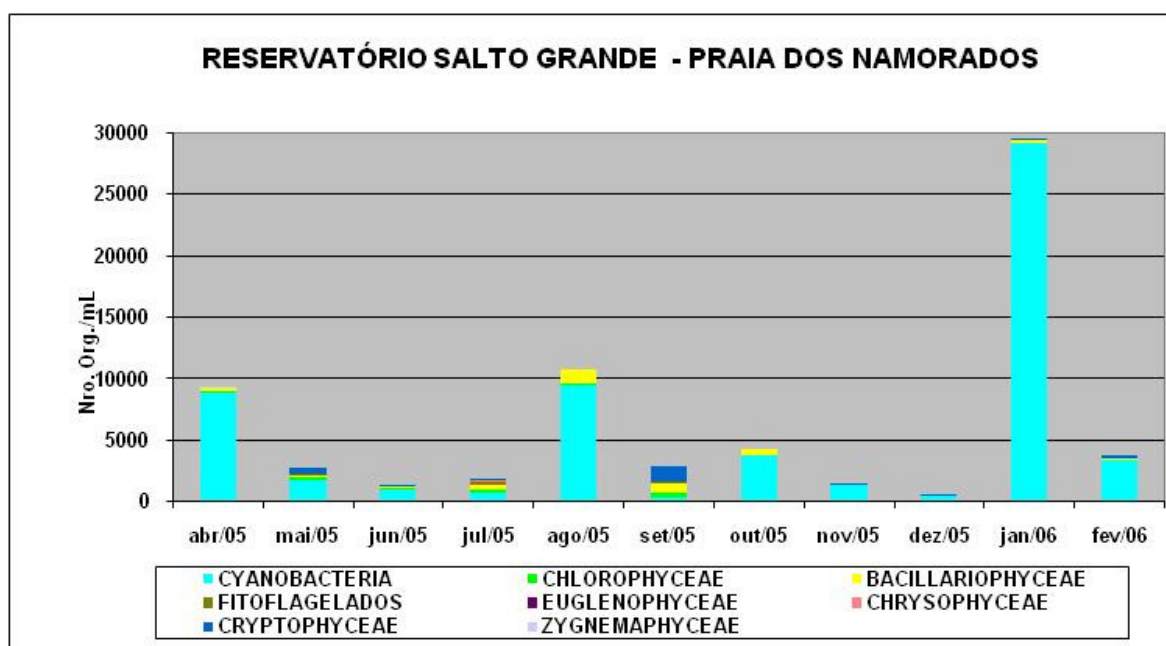


Figura 7 Número de organismos por mL dos principais grupos fitoplanctônicos na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

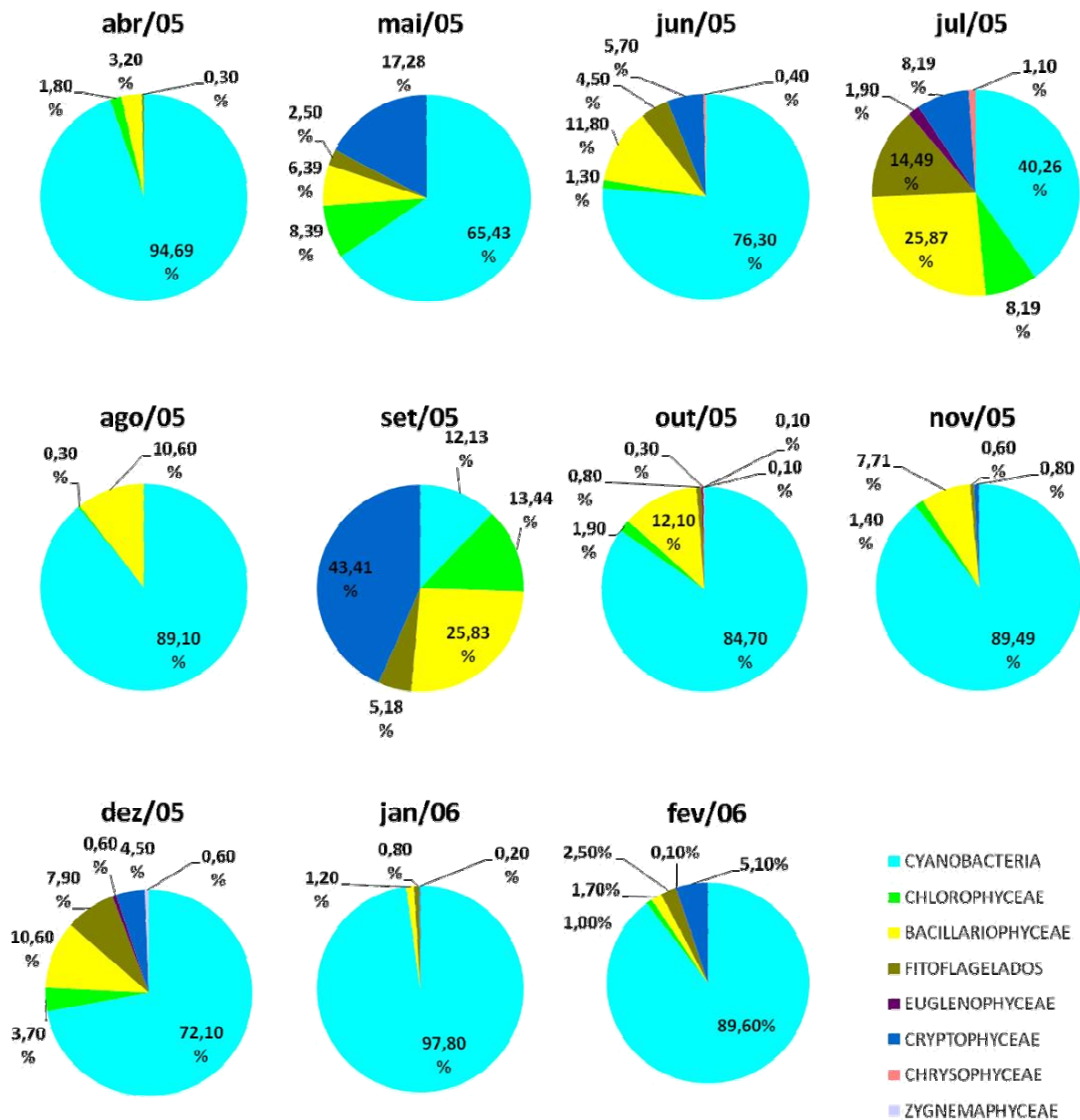


Figura 8 Porcentagem relativa das classes fitoplanctônicas na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

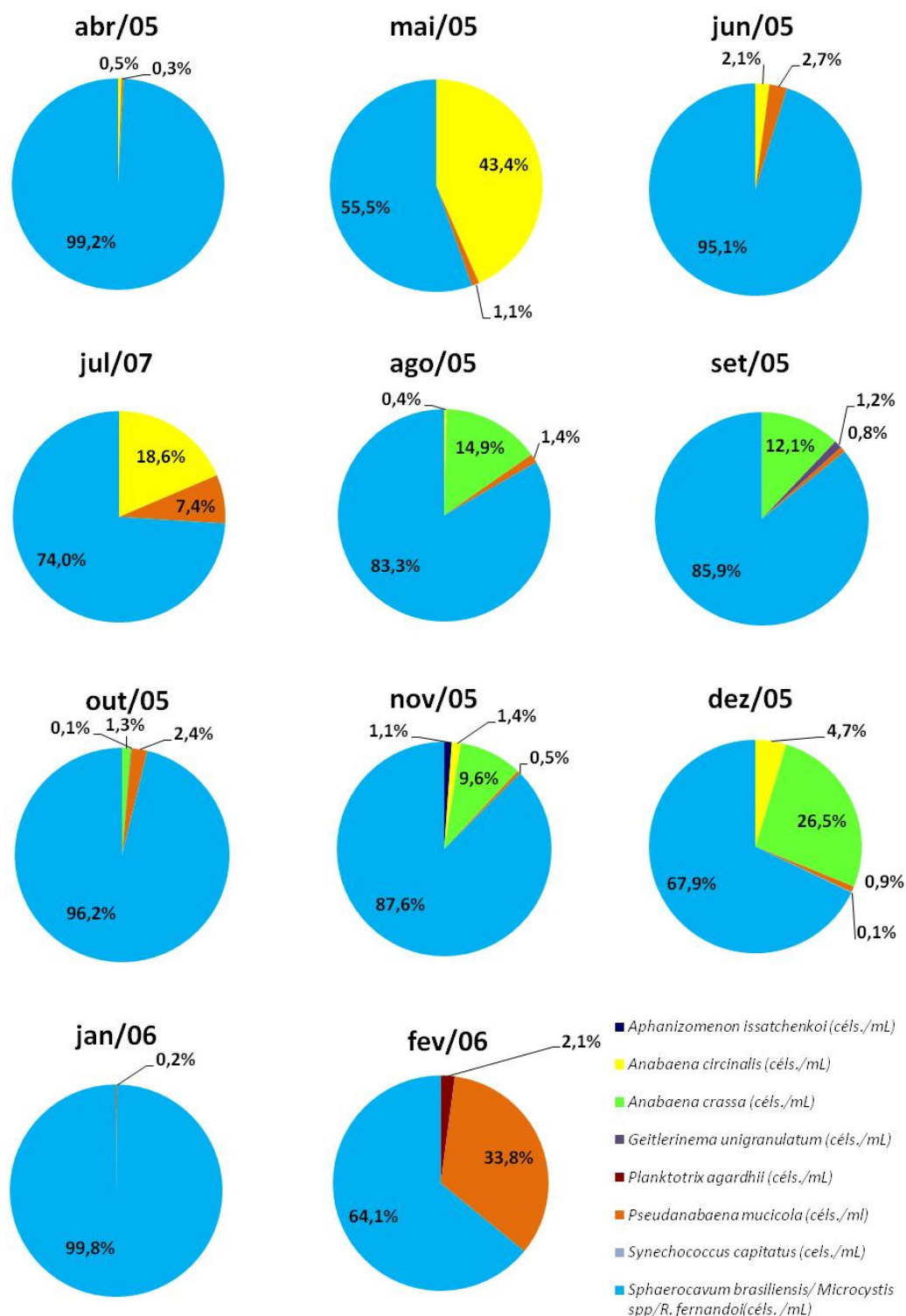


Figura 9 Porcentagem de ocorrência das células de cianobactérias por espécies encontradas na Praia dos Namorados, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

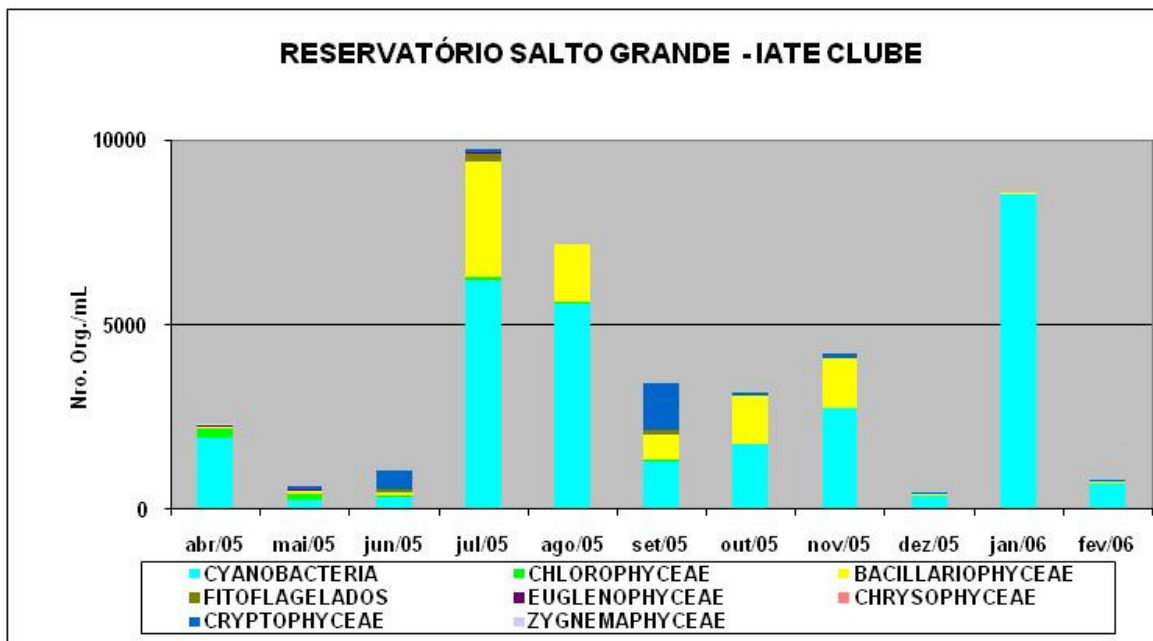


Figura 10 Número de organismos por mL dos principais grupos fitoplanctônicos no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

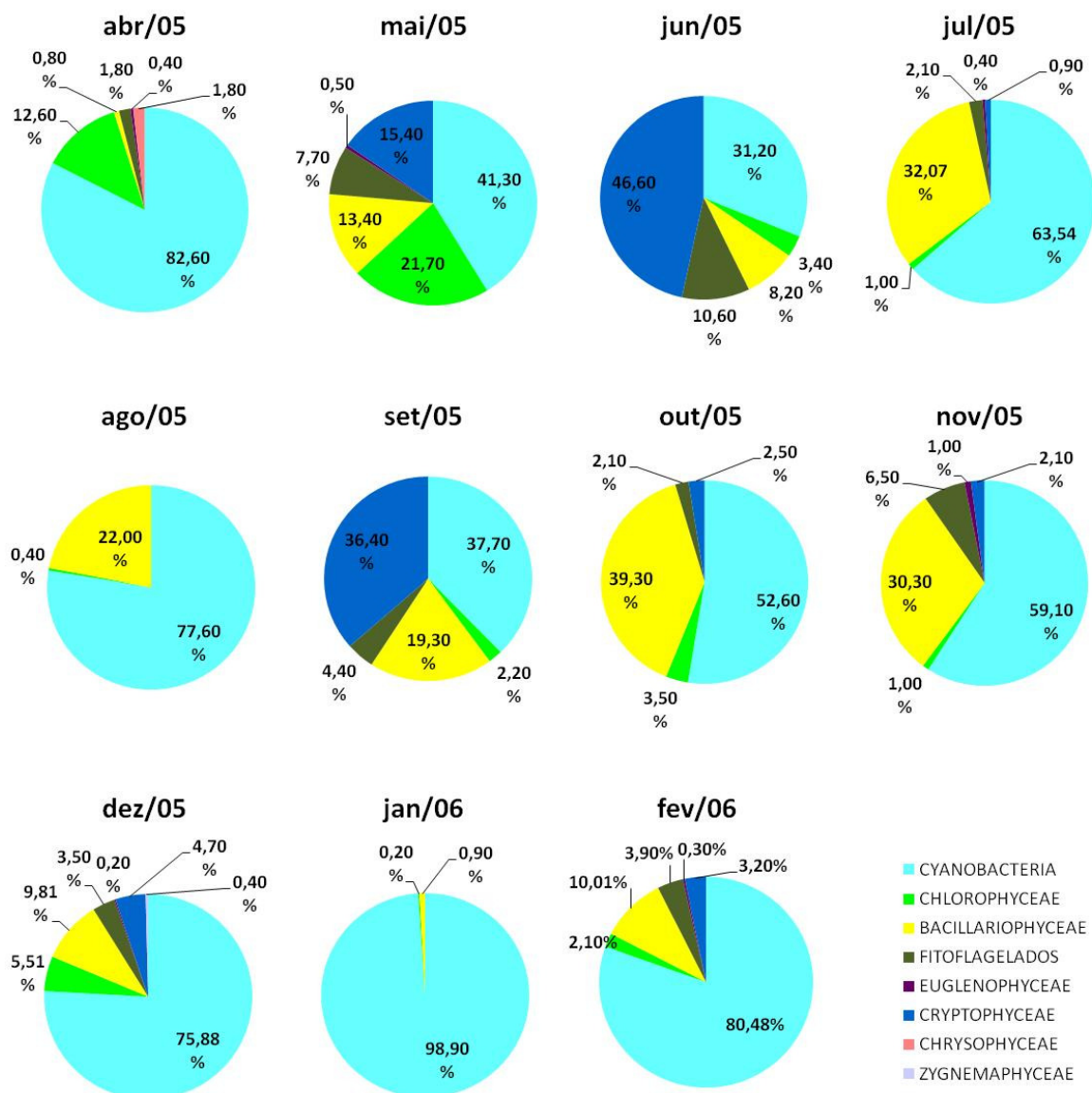


Figura 11 Porcentagem relativa das classes fitoplanctônicas no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

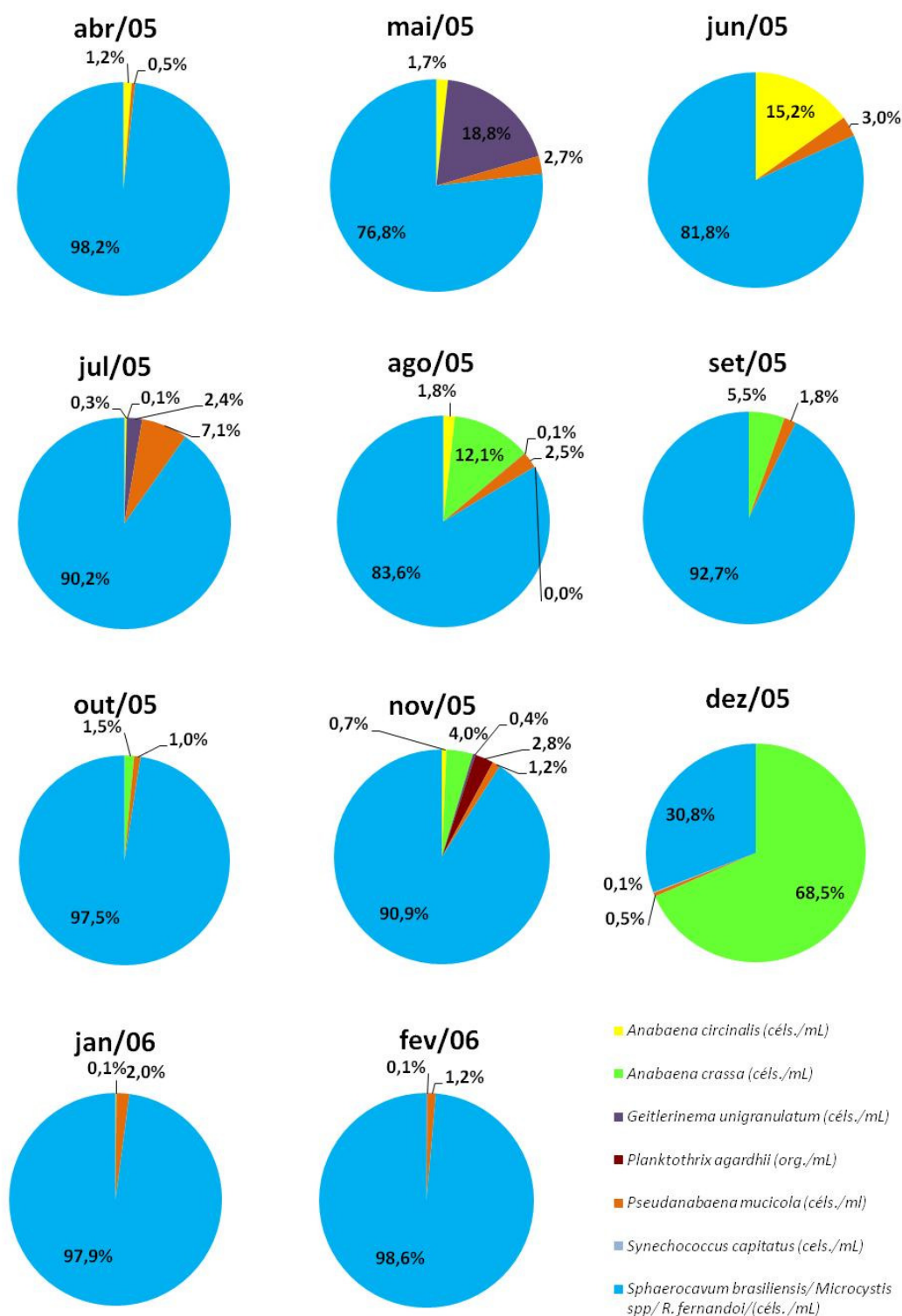


Figura 12 Porcentagem de ocorrência das células de cianobactérias por espécies encontradas no Iate Clube, no período de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

As cianobactérias estiveram presentes em todos os meses de coleta nas duas estações amostradas como grupo dominante (acima de 50% do total de organismos fitoplanctônicos) com exceção dos meses de julho e setembro de 2005 para a Praia dos Namorados, e maio, junho e setembro para o Iate Clube. Foram quantificados também indivíduos pertencentes às classes Zygnemaphyceae, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Cryptophyceae, Chrysophyceae, Euglenophyceae e vários fitoflagelados de difícil identificação pela perda de estruturas, como flagelos, durante o processo de preservação.

Ponto de Coleta Praia dos Namorados (PN)

Um pico de clorofila *a* foi obtido no mês de agosto (3533,5 µg/L) no período seco e os demais valores sempre mantiveram-se elevados, variando de 64,5 µg/L a 537,5µg/L, com a média para o período seco de 759,6 µg/L e para o período cheia 179,4 µg/L (Figura 5).

O número total de células de cianobactérias variou de 1,90E+04 céls./mL em fevereiro de 2006 a 9,77E+06 céls./mL em janeiro de 2006 com porcentagem sempre superior a 50% dos morfotipos de *Microcystis* e espécies relacionadas como *Sphaerocavum brasiliense* e *Radiocystis fernandoi* (Figura 9). Em relação à composição fitoplanctônica, a quantificação dos organismos/mL demonstrou que as cianobactérias representaram mais de 50% da comunidade para quase todos os meses amostrados, com exceção dos meses de julho de 2005 e setembro de 2005 quando as Bacillariophyceae representaram 25,9% da comunidade e as Cryptophyceae representaram 49,4% (Figura 8). No total foram encontrados 24 táxons (Anexo 4) sendo que as espécies *Microcystis panniformis* e *Pseudanabaena mucicola* foram dominantes em pelo menos um dos meses de coleta e as abundantes foram *Anabaena circinalis*, *A. crassa*, *Geitlerinema unigranulatum*, *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis*, *Pseudanabaena mucicola* e *Synechococcus elongatus*. Espécies de ocorrência constante, acessórias e acidentais estão demonstradas no Anexo 6.

Ponto de Coleta IATE CLUBE (IC)

Valores muito elevados de clorofila *a* foram obtidos nos meses de julho (2332,4 µg/L) e

agosto (3274,1 µg/L) no período seco e os demais valores, também, mantiveram-se elevados, variando de 53,4 µg/L a 429,2 µg/L, com a média para o período seco de 1034,4 µg/L e para o período cheia de 339,1 µg/L (Figura 6).

O número total de células de cianobactérias variou de 6,00E+04 céls./mL em fevereiro de 2006 a 1,61E+06 céls./mL em julho de 2005 enquanto que a média para o período seco foi de 5,15E+05 céls./mL e para o período de cheia foi de 3,90E+05 céls./mL em um mesmo nível de grandeza nos dois períodos. As células dos morfotipos de *Microcystis* e espécies relacionadas como *Sphaerocavum brasiliense* e *Radiocystis fernandoi* predominaram em quase todas as contagens com porcentagem acima de 50%, com exceção do mês de dezembro de 2005 quando as células da espécie *Anabaena crassa* foram predominantes, representando 68,5% do total amostrado (Figura 12). Em relação à composição fitoplanctônica, a quantificação dos organismos/mL demonstrou que as cianobactérias representaram mais de 50% da comunidade para oito meses amostrados, com exceção dos meses de maio, junho e setembro, ambos meses de seca que apresentaram outras classes também com quantidades expressivas de organismos, como as Chlorophyceae e Cryptophyceae respectivamente (Figura 11). No total foram também encontrados 26 táxons sendo que as espécies *Anabaena crassa*, *Microcystis panniformis* e *Pseudanabaena mucicola* foram dominantes em pelo menos um dos meses de coleta e as espécies *Anabaena crassa*, *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* e *Pseudanabaena mucicola* tiveram ocorrência abundante. Espécies de ocorrência constante, acessórias e acidentais estão demonstradas no Anexo 7.

As contagens de células não necessariamente refletem os resultados das contagens de número de organismos por terem sido empregados tratamentos diferentes nas duas contagens (hidrólise alcalina para células de cianobactéria). Devido à alta densidade da amostra, apenas 10 campos já foram suficientes para uma contagem representativa e, portanto as células dos táxons mais raros dificilmente são quantificadas.

5.2.2 ISOLAMENTO DAS CIANOBACTÉRIAS

Foram isoladas ao todo 14 linhagens de cianobactérias em culturas monoespecíficas para as quais foi avaliada a presença de microcistinas pelo método ELISA e foram utilizadas também na detecção do domínio NMT do gene *mycA* por PCR. Como não houve a detecção do gene *mycA* na amplificação para os isolados optou-se por utilizar os oligonucleotídeos iniciadores de PCR para a detecção de genes de NPRS e PKS para estimar o potencial de biossíntese de metabólitos secundários nas cepas (Anexo 5)

Esses isolados foram também utilizados para o sequenciamento do rDNA 16S e construção da árvore filogenética.

5.2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CIANOBACTÉRIAS

As extrações de DNA genômico das culturas monoespecíficas de cianobactérias e da amostra ambiental foram realizadas com sucesso, usando o protocolo descrito por FIORE et al. (2000) que foi desenvolvido visando à obtenção de DNA de todos os gêneros deste grupo de organismos conhecidos até o momento. A boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR das seqüências de interesse. Neste estudo foram amplificadas por PCR e seqüenciados os genes rDNA 16S. Os amplicons resultantes foram de aproximadamente 1600pb, conforme o esperado (Figura 13).

Nesse estudo são apresentados os resultados de treze seqüências quase inteiras (tamanho variando de 1490 a 1420 pb) do gene que codifica para rDNA 16S de cianobactérias isoladas do reservatório Salto Grande (Tabela 5). As seqüências de alta qualidade (>20) obtidas podem ser observadas no Anexo 10. Na análise BLAST usando o gene de rDNA 16S costuma-se considerar dois organismos do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (LUDWIG et al., 1998) e de mesma espécie se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994)

Na análise BLAST as três seqüências de rDNA 16S de *Microcystis* (CENA 120, CENA 121 e CENA 133) compararam favoravelmente com a *Microcystis aeruginosa* OBF29S03 encontrada em uma lagoa em Finissagio, Imola, Itália (CASTIGLIONI et al., 2005). As três seqüências de *Microcystis* tiveram entre si identidade maior que 99%.

As duas seqüências de *Aphanothece* obtidas (CENA 118 e CENA 122) tiveram maior porcentagem de identidade com uma *Aphanothece* isolada de uma lagoa em Bubano, Imola, Itália (CASTIGLIONI et al., 2005) e entre si apresentaram identidade de 99,8%.

A seqüência de *Synechococcus* sp. CENA126 mostrou-se idêntica com a de *Synechococcus elongatus* PCC7942 proveniente de água doce da Califórnia, EUA. Entretanto, a de *Synechococcus nidulans* CENA132 teve maior semelhança com a de *Synechococcus* sp. PCC7920 isolada de uma lagoa na Finlândia. Essas duas seqüências de *Synechococcus* apresentaram baixa similaridade (90,8%) entre si.

As duas seqüências de *Leptolyngbya* (CENA129 e CENA131) não tiveram identidade favorável com seqüências do GenBank e a seqüência distantemente relacionada foi a da *Leptolyngbya borayarum* PCC73110. Entre si, as seqüências das duas linhagens de *Leptolyngbya* também apresentaram baixa identidade (95,1%). A única seqüência de *Lyngbya* (CENA128) mostrou baixa identidade com a *Leptolyngbya* sp. OBB32S02 encontrada em uma lagoa em Bubano, Imola, Itália (CASTIGLIONI et al., 2005). Não há seqüência de rDNA 16S depositada em bancos de dados públicos para o gênero *Romeria*. Assim, a seqüência da linhagem de *Romeria victoriae* CENA123 isolada na represa de Salto Grande teve identidade baixa com a *Pseudanabaena* sp. PCC7408 proveniente do rio Tâmis na Inglaterra. A seqüência da cianobactéria *Chroococcidiopsis* sp. CENA124 foi mais proximamente relacionada com a seqüência da *Chroococcidiopsis* sp. CC3 isolada de uma rocha de quartzo originária do deserto da China (Pointing et al., 2007). A única cianobactéria filamentosa heterocitada isolada por meio do método utilizado foi a *Calothrix* sp. CENA127, cuja seqüência de rDNA 16S mostrou similaridade com a seqüência da *Calothrix desertica* PCC7120 isolada de areia proveniente de Antofagasta, Chile (SIVONEN et al., 2007).

Verificou-se também nesta análise a identidade de 95,8 % entre *Lyngbya* sp. CENA128 e *Leptolyngbya* sp. 0BB32S02 que poderiam caracterizar um agrupamento em nível genérico assim como *Romeria victoriae* CENA123 com *Pseudanabaena* sp. PCC7408 para uma identidade de 96,3%.

A árvore filogenética do gene de rDNA 16S construída usando o método da distância (“Neighbor-joining”) (Figura 14) mostra as relações evolutivas entre as seqüências das cianobactérias isoladas e outras seqüências escolhidas do GenBank. Essa árvore foi enraizada usando como grupo externo uma seqüência de nucleotídeo retirada do GenBank, referente a bactéria *Escherichia coli* K12 (NC_000913). Como pode ser observado na Figura 14, as linhagens de Oscillatoriales e Chroococcales ficaram misturadas e pelo menos cinco agrupamentos foram formados. O primeiro clado agrupou 21 linhagens de Chroococcales com valor de reamostragem de 52%, onde estão inseridas as três linhagens de *Microcystis* provenientes deste estudo (CENA120, CENA 121 e CENA133). Um segundo agrupamento (reamostragem inferior a 50%), foi formado por nove linhagens de Oscillatoriales. O terceiro agrupamento (reamostragem de 65%) foi formado por dois cladogramas internos, onde em um está o isolado *Chroococcidiopsis* sp. CENA124 e estranhamente também está uma seqüência de *Phormidium autumnale* UTEX1580. O segundo clado interno foi formado por linhagens de Nostocales incluindo o isolado *Calothrix* sp. CENA127. No quarto agrupamento (reamostragem inferior a 50%) estão inseridas as duas linhagens de *Leptolyngbya* e também a linhagem de *Romeria*. O quinto agrupamento (reamostragem de 97%) foi formado por dois cladogramas internos, um contendo linhagens da ordem Oscillatoriales, onde a *Lyngbya* CENA128 isolada ficou agrupada e o outro foi formado por linhagens pertencentes à ordem Chroococcales onde ficaram agrupadas as linhagens de *Synechococcus* (CENA126 e CENA132) e de *Aphanothece* (CENA118 e CENA122).

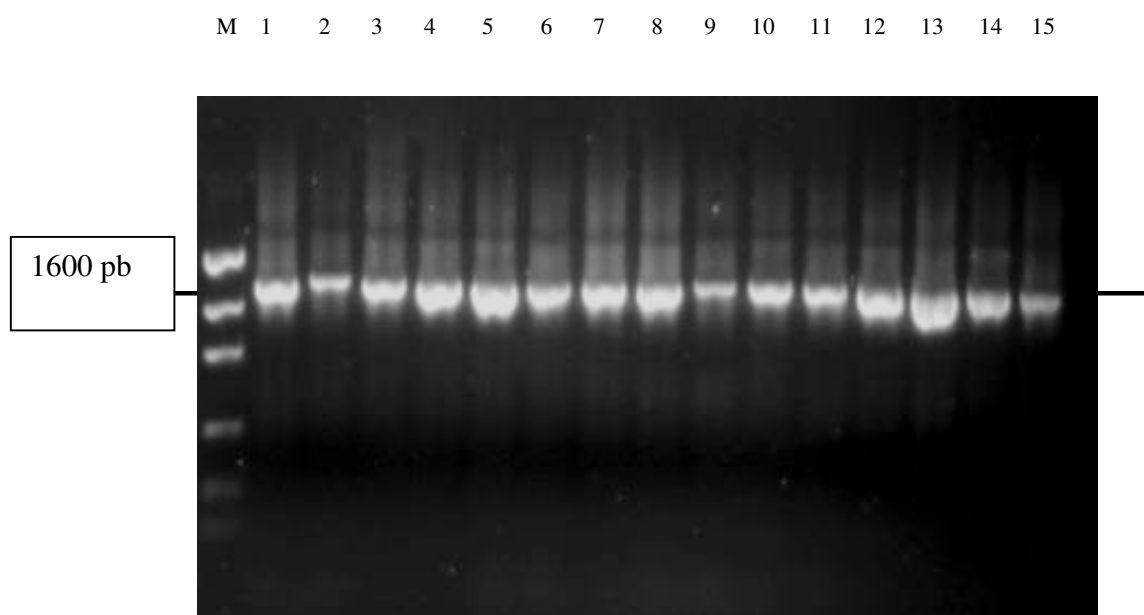


Figura 13. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de rDNA 16S para as culturas isoladas. M (marcador) Low Mass; 1. CENA118; 2.CENA120; 3. CENA121; 4.CENA122; 5. CENA123; 6.CENA124; 7. CENA 125; 8. CENA126; 9. CENA127; 10. CENA128; 11. CENA 129; 12. CENA 130; 13. CENA131; 14. CENA 132; 15. CENA 133.

TABELA 5 Identities das seqüências (%) dos genes rDNA 16S das linhagens isoladas do reservatório de Salto Grande comparadas com outras seqüências de cianobactérias do GenBank.

MORFOTIPO (ISOLADO)	TAMANHO DO FRAGMENTO DO GENE RDNA 16S (PB)	IDENTIDA DE (%)	COBER- TURA (%)	SEQÜÊNCIAS DO GENBANK COM MAIOR SIMILARIDADE (Nº. DE ACESSO)
<i>Aphanothece</i> sp. CENA118	1409	97,8	98	<i>Aphanothece</i> sp. 0BB21S01 (AJ639901)
<i>Microcystis</i> sp. CENA120	1420	99,7	99	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BF29S03 (AJ635432)
<i>Microcystis</i> <i>panniformis</i> CENA121	1413	99,8	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BF29S03 (AJ635432)
<i>Aphanothece</i> sp. CENA122	1409	97,8	98	<i>Aphanothece</i> sp. 0BB21S01 (AJ639901)
<i>Romeria victoriae</i> CENA123	1410	96,3	100	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC7408 (AB039020)
<i>Chroococidiopsis</i> sp. CENA124	1416	90,9	100	<i>Chroococidiopsis</i> sp. CC3 (DQ914865)
<i>Synechococcus</i> <i>elongatus</i> CENA126	1413	99,8	100	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 (NC_007604)
<i>Calothrix</i> sp. CENA127	1410	98,0	95	<i>Calothrix desertica</i> PCC7120 (AM230699)
<i>Lyngbya</i> sp. CENA128	1412	95,8	100	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB32S02 (AJ639894)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA129	1415	88,6	94	<i>Leptolyngbya boryarum</i> PCC73110 (X84810)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA131	1415	88,0	99	<i>Leptolyngbya boryarum</i> PCC73110 (X84810)
<i>Synechococcus</i> <i>nidulans</i> CENA 132	1409	99,1	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7920 (AF216948)
<i>Microcystis</i> sp. CENA133	1413	99,8	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BF29S03 (AJ635432)

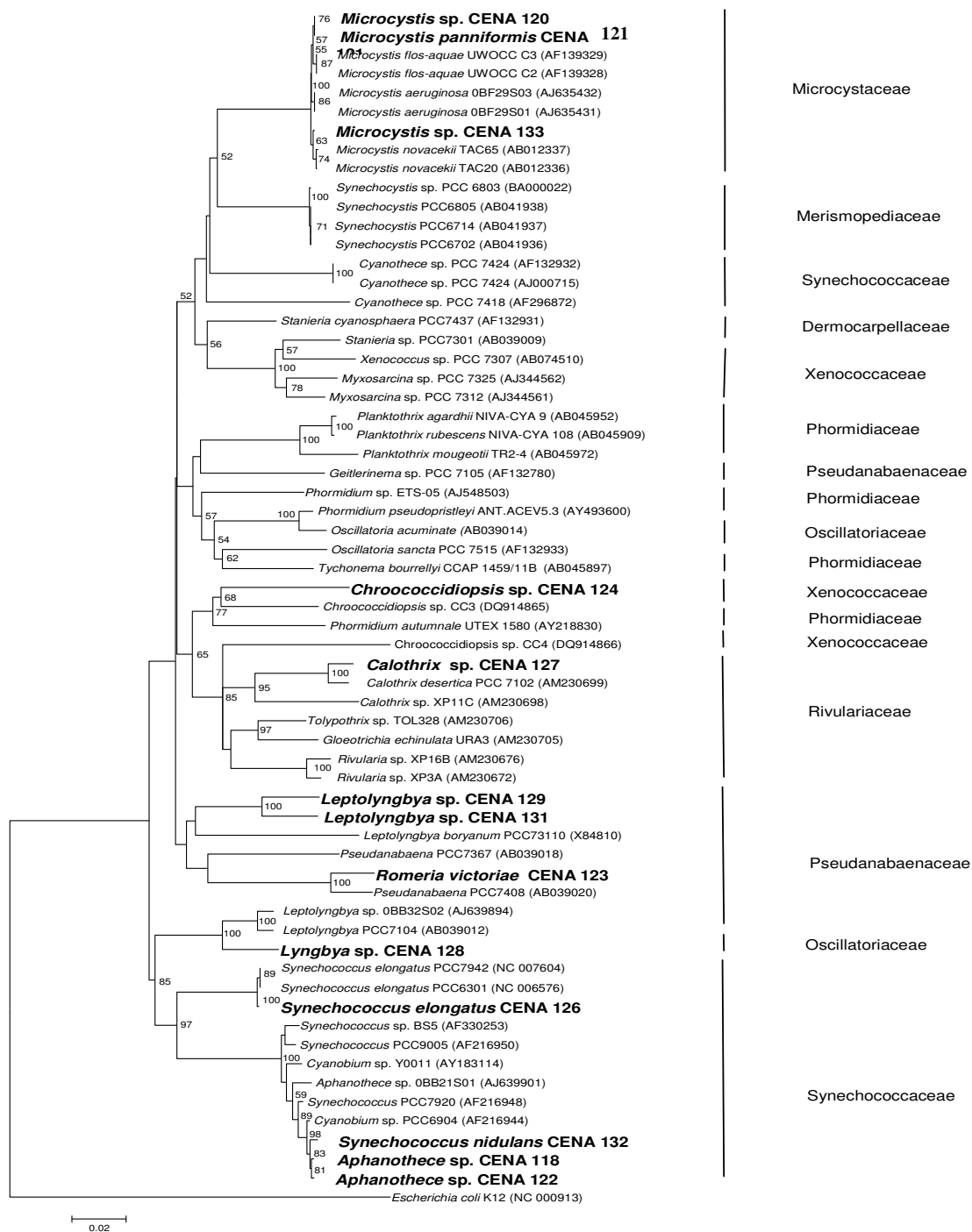


Figura 14 Análise filogenética construída pelo método “Neighbor-joining”, baseada em seqüências do gene de rDNA 16S das cianobactérias isoladas do reservatório Salto Grande (em negrito). Valores superiores a 50% na reamostragem de 1000 árvores são indicados nos nós.

DETECÇÃO MOLECULAR DE GENES *mycA* e NRPS E PKS

Os resultados da avaliação da presença das microcistinas pelo método ELISA nos isolados foram todos abaixo do LD ($<0,1\mu\text{g/L}$) em duas datas diferentes de avaliação da cepa, exceto para a cepa CENA129, uma *Leptolyngbya* ($2,31\mu\text{g/L}$) (Tabela 6) e os resultados da amplificação por PCR das seqüências de NRPS e PKS estão nas Figuras 15 e Figura 16 respectivamente.

Foi utilizado um conjunto de iniciadores (MTF/MTR) usados para amplificar o fragmento de NRPS que tem como alvo o domínio de adenilação (A) dessas enzimas e produz fragmentos de aproximadamente 1000 pares de bases. Neste estudo, os fragmentos foram amplificados com sucesso em 10 das cepas isoladas, incluindo três *Microcystis* (CENA 120, CENA121 e CENA 133), a cepa CENA 124 do gênero *Chroococcidiopsis*, além de *Synechococcus elongatus*, *S. nidulans*, *Calothrix* sp, *Lyngbya* sp., *Plankolyngbya* sp.1 e *Planktolynbya* sp.2 A cepa CENA 129 referente ao gênero *Leptolyngbya* deu resultado positivo para a amplificação do NRPS e PKS e foi o único isolado com microcistina detectado em cultivo. Outro grupo de enzimas envolvidas na produção de metabólitos secundários são as PKS e os genes envolvidos na sua biossíntese podem fornecer informações sobre o potencial para a produção de microcistinas. Oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados, tendo como alvo regiões da seqüência do domínio da cetossintase (KS) das PKS, têm sido utilizados detectando fragmentos de aproximadamente 700 pares de bases. Nas linhagens estudadas, as que não apresentaram amplicons são *Aphanothece* sp CENA 118 e *Synechococcus nidulans* CENA 125 que, também, foram negativas para o NRPS. A linhagem *Synechococcus nidulans* CENA 132 foi negativa para o PKS e positiva para o NRPS.

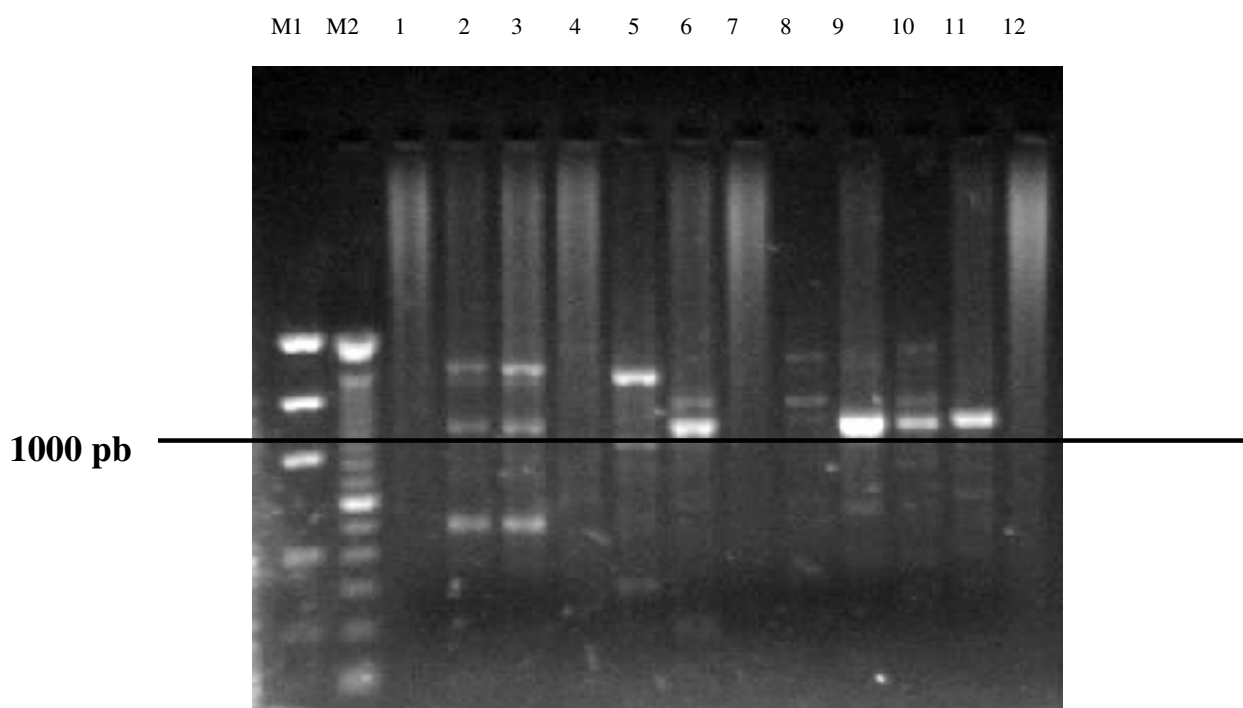


Figura 15 Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de NRPS (sintetase de peptídeo não ribossomal) para as culturas isoladas. M1. 100pb; M2. Low Mass; 1. CENA118; 2.CENA120; 3. CENA121; 4.CENA122; 5. CENA123; 6.CENA124; 7. CENA 125; 8. CENA126; 9. CENA127; 10.CENA128; 11. CENA 129; 12. Controle Negativo.

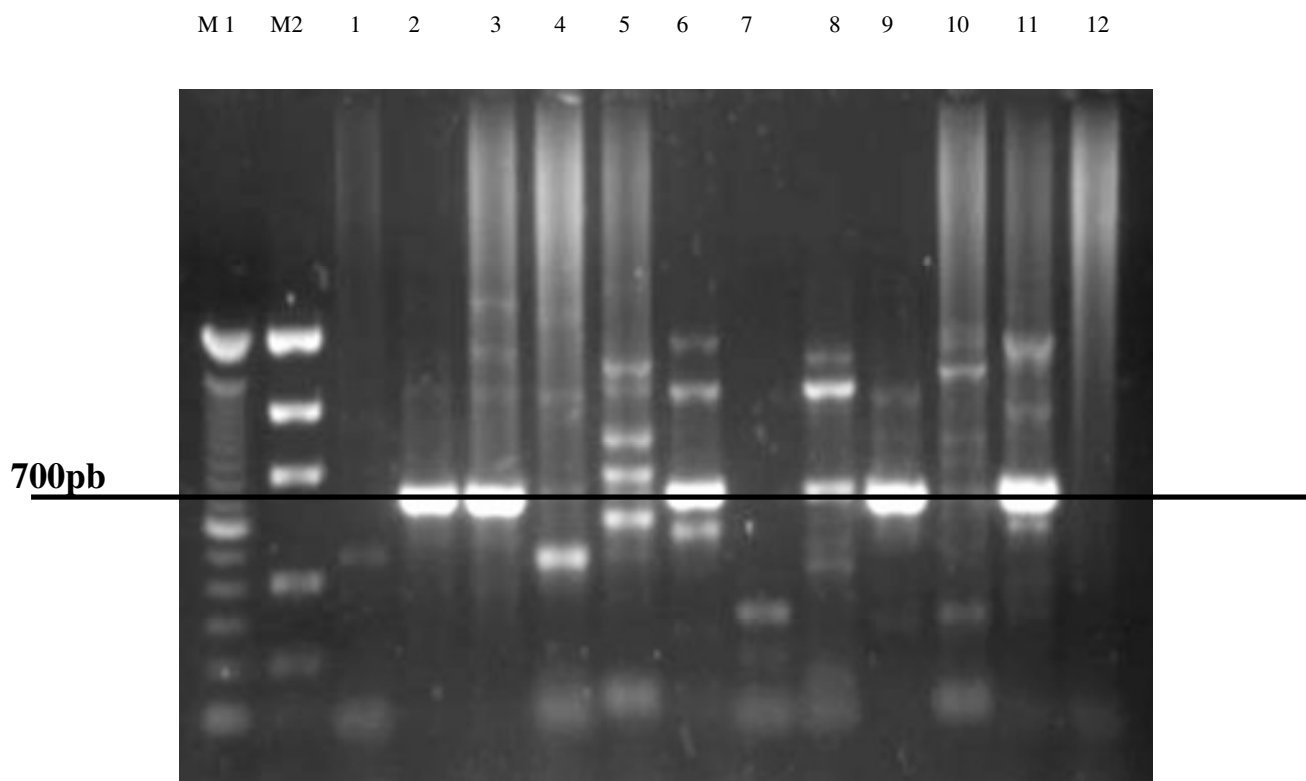


Figura 16 Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de PKS (sintetase de policetideo) para as culturas isoladas. M1. 100pb; M2. Low Mass; 1. CENA118; 2.CENA120; 3. CENA121; 4.CENA122; 5. CENA123; 6. CENA124; 7. CENA 125; 8. CENA126; 9. CENA127; 10.CENA128; 11. CENA 129, 12. Controle Negativo.

TABELA 6. Linhagens de cianobactérias isoladas do reservatório Salto Grande e valores detectados de microcistinas avaliados por ELISA e distribuição de genes de NRPS e PKS

CÓDIGO	LINHAGEM	NRPS	PKS	MC	MC
				(µg/L) 12.07.06	(µg/L) 14.12.06
CENA118	<i>Aphanothece</i> sp.1	-	-	-	-
CENA120	<i>Microcystis</i> sp.	+	+	-	-
CENA121	<i>Microcystis panniformis</i> Azev. & Sant.	+	+	-	-
CENA122	<i>Aphanothece</i> sp. 2	-	+	-	-
CENA123	<i>Romeria victoriae</i> Kom. & Cronb.	-	+	-	-
CENA124	<i>Chroococcidiopsis</i> sp	+	+	-	-
CENA125	<i>Synechococcus nidulans</i> (Prings)Kom. in Bourr.	-	-	-	-
CENA126	<i>Synechococcus elongaius</i>	+	+	-	-
CENA127	<i>Calothrix</i> sp	+	+	-	-
CENA128	<i>Lyngbya</i> sp.	+	+	-	-
CENA129	<i>Leptolyngbya</i> sp. 1	+	+	(2,31)	-
CENA131	<i>Leptolyngbya</i> sp. 2	+	+	-	-
CENA132	<i>Synechococcus nidulans</i> (Prings)Kom. in Bourr.	+	-	-	-
CENA133	<i>Microcystis</i> sp.	+	+	-	-

(+) presença; (-) ausência

A viabilidade da utilização do protocolo de extração descrito em FIORE et al.(2000) para as amostras ambientais e a amplificação por PCR do gene *mycA* nas amostras ambientais foram efetuadas nas coletas no início do estudo em abril/2005 na Praia dos Namorados e no Iate Clube, cujos resultados encontram-se na Figura 17.

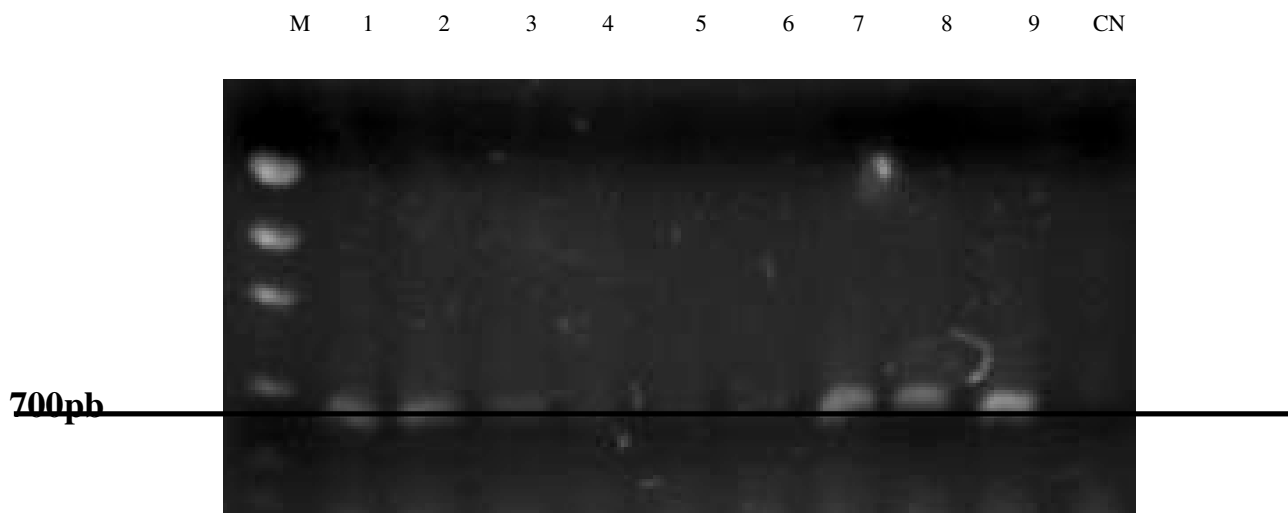


Figura 17 Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR do gene *mycA* nas amostras ambientais. 1-3. Praia dos Namorados; 4-6. Iate Clube; 7-9. Praia Azul (Não utilizado nesse estudo).

5.2.4 MICROCISTINAS NAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

As concentrações de microcistinas avaliadas pelo método ELISA na Praia dos Namorados variaram de 0,1 $\mu\text{g/L}$ (limite de detecção) a 38,0 $\mu\text{g/L}$ que foi um pico de concentração que ocorreu em agosto de 2005 acompanhando valores, também, bastante elevados de clorofila *a* e células de cianobactérias (Tabela 1) e fez com que valor médio no período de seca fosse mais elevado (8,5 $\mu\text{g/L}$) do que no período das cheias (2,6 $\mu\text{g/L}$). Esta ocorrência, também esteve presente no ponto de coleta do Iate Clube, cujos valores detectados para as microcistinas variaram de 0,5 $\mu\text{g/L}$ a 33,8 $\mu\text{g/L}$ com o pico máximo no mês de agosto e com as médias dos períodos de seca e cheia de 6,6 $\mu\text{g/L}$ e 3,1 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Para a microcistina-LR avaliada por HPLC (CLAE) na amostra da Praia dos Namorados, nos meses de setembro e outubro de 2005, os resultados ficaram abaixo do limite de detecção-LD que foi de 0,004 $\mu\text{g/L}$ e os demais valores variaram de 0,03 a 33,64 $\mu\text{g/L}$, que foi um pico registrado em janeiro de 2006, uma coleta com elevados valores de organismos e células de

cianobactérias, principalmente os morfotipos *Microcystis aeruginosa* e *M. panniformis*. (Tabela 1 e Figuras 8 e 9). O valor médio para o período de seca foi 0,2 µg/L e para o período de cheia foi 9,2 µg/L.

Para a amostra do Iate Clube de setembro/2005 e outubro/2005, os valores estiveram abaixo do LD que foi de 0,002 µg/L; as demais concentrações variaram de 0,02 µg/L em maio e junho de 2005 até 9,99 µg/L em janeiro de 2006 que, também, apresentaram elevadas concentrações de células de *Microcystis aeruginosa* e *M. panniformis*, porém mais baixas que as concentrações de células de cianobactérias verificadas para a Praia dos Namorados.

No primeiro conjunto de análises realizadas, correspondentes às coletas dos meses de junho, julho, agosto, setembro e outubro de 2005, quando foi analisada apenas a fração líquida pós-filtração e após o procedimento de gelo/degelo para o rompimento das células, verificou-se que a concentração de microcistina-LR foi abaixo do limite de detecção (<2 µg/L) em todas as amostras, exceto no mês de agosto, quando uma das réplicas apresentou o valor de 3,74µg/L.

Como os resultados de clorofila *a* e células de cianobactérias estavam bastante elevados em todos os meses, na etapa seguinte, optou-se por extrair também as microcistinas-LR do filtro para verificar se este estaria retendo uma quantidade significativa da toxina. Ao analisar os resultados verificou-se que a quantidade retida no filtro após o tratamento com gelo e degelo foi abaixo do limite de detecção em todas as amostras e apenas na amostra de janeiro na Praia dos Namorados foram detectadas no filtro as concentrações de 0,1328µg/L e 0,1348µg/L, porém representando apenas 0,34% e 0,49% do total, respectivamente. Estes resultados fazem com que sejam aceitos os resultados do primeiro tratamento quando apenas o filtrado foi analisado, considerando-se que a parcela que eventualmente poderia ter sido retida no filtro não representa um montante significativo do total.

5.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados obtidos das correlações de Pearson (*r*) entre número de células de

cianobactérias e demais variáveis avaliadas encontram-se na Tabela 7. As variáveis que apresentaram correlação significativa com o número de células de cianobactéria na Praia dos Namorados foram fósforo total, nitrogênio total e microcistina-LR e para o ponto Iate Clube foram a clorofila *a*, nitrogênio total e razão NT/PT, sendo as maiores correlações ($r=0,96$ e $r=0,88$) com o parâmetro nitrogênio total, para os dois pontos de coleta respectivamente. Correlações negativas foram observadas com transparência em ambos os pontos, uma correlação já esperada. Além disso, foi observada também correlação negativa com a razão NT/PT na Praia dos Namorados e com as variáveis climatológicas (temperatura da água, temperatura do ar, vazão e precipitação) no Iate Clube.

TABELA 7 Correlação entre o número de células de cianobactérias e parâmetros ambientais analisados. Os valores em negrito representam as correlações significativas ($>0,5$)

ÍNDICE DE CORRELAÇÃO (R) ENTRE:	PRAIA DOS NAMORADOS	IATE CLUBE
n° de células de cianobactérias x clorofila <i>a</i>	0,15	0,68
n° de células de cianobactérias x Ph	0,35	0,53
n° de células de cianobactérias x transparência	-0,25	-0,46
n° de células de cianobactérias x temperatura da água	0,27	-0,18
n° de células de cianobactérias x temperatura do ar	0,01	-0,08
n° de células de cianobactérias x vazão	0,22	-0,26
n° de células de cianobactérias x precipitação	0,32	-0,25
n° de células de cianobactérias x P total (8 coletas)	0,58	0,03
n° de células de cianobactérias x N total (7 coletas)	0,96	0,88
n° de células de cianobactérias x NT/PT (7 coletas)	-0,24	0,60
n° de células de cianobactérias x MIC (10 coletas)	0,27	0,19
n° de células de cianobactérias x MIC –LR (10 coletas)	0,90	0,38

Os resultados da Análise de Componentes Principais –ACP estão representados nas Figuras 18 e 19. Este tipo de análise não aceita dados ausentes na matriz construída e, portanto, foram feitas 2 análises diferentes, sendo que na primeira (Figura 18) foram excluídas as variáveis NT, PT e microcistinas que não foram quantificadas em todos os meses e na segunda avaliação foram excluídos os meses que não havia sido quantificada a variável NT que apresenta mais dados faltantes. Os códigos representativos das variáveis das Figuras 18 e 19 encontram-se na Tabela 8

TABELA 8 Códigos das variáveis utilizadas na análise de ACP

Código	Variável
Tran	Transparência
pH	pH
Tear	Temperatura do ar
Teag	Temperatura da água
McLR	Microcistina-LR
Mc	Microcistinas
Ptot	Fósforo Total
Ntot	Nitrogênio Total
NTPT	NT/PT
Celc	Células de cianobactérias
Clor	Clorofila <i>a</i>
Prec	Precipitação
vaz	Vazão
Org	Organismos de cianobactérias
Orgt	Organismos fitoplanctônicos

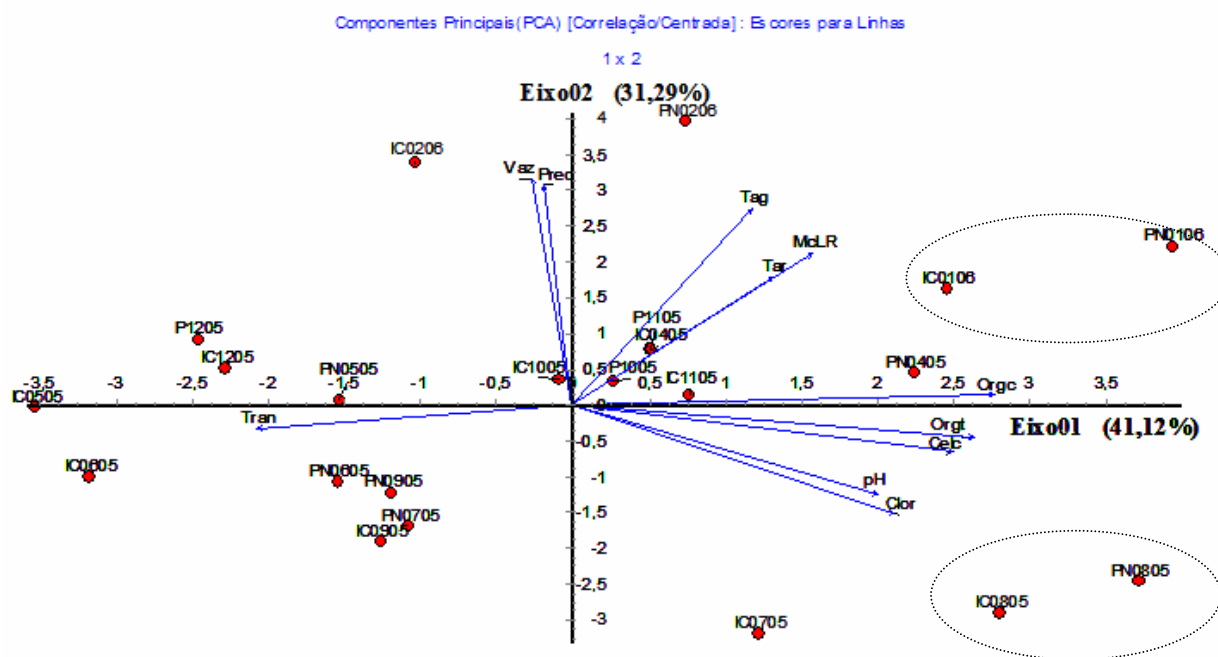


Figura 18 Ordenação biplot pelo ACP das unidades amostrais (pontos de coleta e das variáveis físicas e químicas analisadas) com a exclusão do NT, PT e microcistinas. As letras localizadas na frente das unidades amostrais correspondem aos meses amostrados e pontos de coleta (PN = Praia dos Namorados) e (IC = Iate Clube) e os números correspondem ao mês e ano.

EIXO 1 (41,12% da variância explicada)

Este eixo foi positivamente relacionado com organismos de cianobactérias, organismos fitoplancônicos, células de cianobactérias, clorofila *a*, pH, temperatura do ar e microcistina; em oposição projeta-se negativamente no eixo 1 a variável transparência. Pode-se observar por meio deste componente principal que houve uma variação temporal principalmente pelas elevadas densidades de cianobactérias nos meses de agosto/2005 e janeiro/2006. Por outro lado, entre estações não foram observadas diferenças.

EIXO 2 (31,29% da variância explicada).

O Eixo 2 mostrou correlação positiva com vazão, precipitação e temperatura da água.

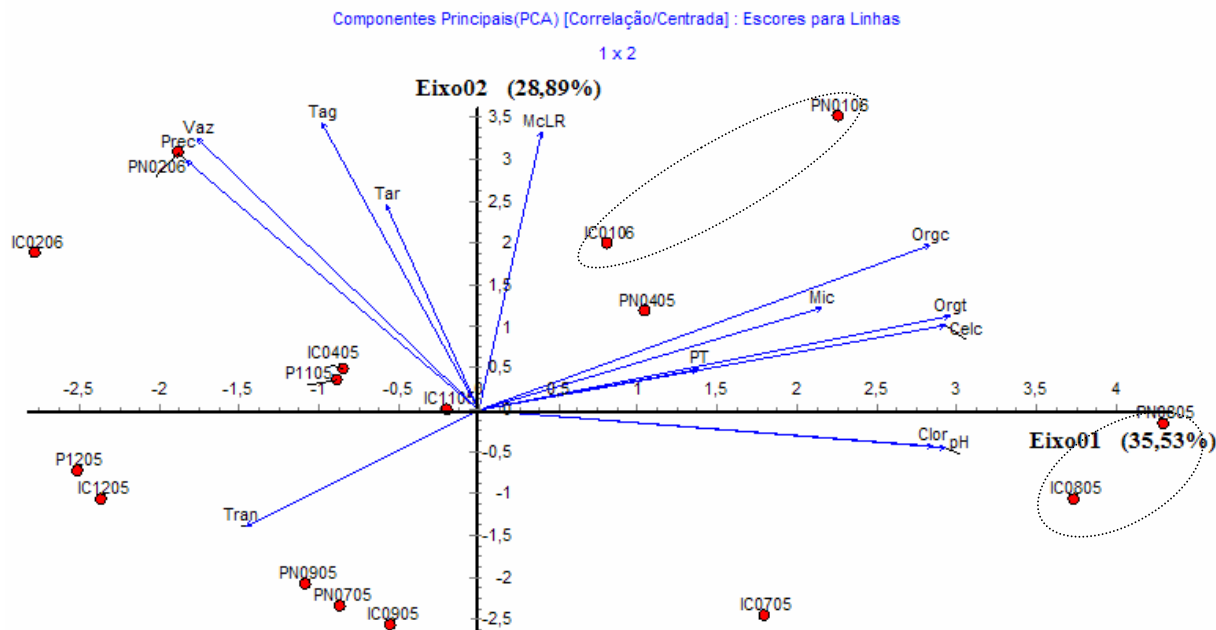


Figura 19 Ordenação biplot pelo ACP das unidades amostrais (pontos de coleta e das variáveis físicas e químicas analisadas) com exclusão das coletas de maio e junho. As letras localizadas na frente das unidades amostrais correspondem aos meses amostrados e pontos de coleta (PN = Praia dos Namorados) e (IC = Iate Clube) e os números correspondem ao mês e ano

EIXO 1 (35,53% da variância explicada)

Este eixo foi positivamente relacionado com as variáveis organismos de cianobactérias, microcistinas, organismos fitoplancctônicos, células de cianobactérias, clorofila *a* e pH e negativamente com transparência e precipitação. Este primeiro componente principal também separou os meses de coleta (em destaque) e não as estações e sintetizou o efeito das elevadas concentrações de cianobactérias nos meses de agosto/2005 e janeiro/2006 nos dois pontos de coleta em oposição aos demais meses de baixas densidades.

EIXO 2 (28,89%) da variância explicada.

O Eixo 2 mostrou correlação negativa com a variável transparência, clorofila *a*, pH e positiva para as variáveis microcistina-LR, temperatura do ar e da água.

As análises realizadas por meio dos componentes principais resumiram em 72,41% e 64,42% da variabilidade total dos dados em seus dois principais eixos (Figura 18 e Figura 19). No primeiro eixo houve clara separação das variáveis em períodos sazonais, época chuvosa e seca, sendo que a chuvosa esteve associada às elevadas densidades de cianobactérias, altos valores de clorofila *a* e pH. De forma geral os gráficos explicaram bem o fato do ambiente estar eutrofizado, ou seja, as maiores densidades ficaram correlacionadas com o PT e opostamente à transparência. Valores elevados de pH e clorofila *a* também estão correlacionados com elevadas densidades. A Figura 18 demonstra que organismos de cianobactérias foi a variável que teve maior relação com o Eixo 1, logo pode ser uma variável importante, assim como clorofila *a* e organismos do fitoplâncton, que podem ser variáveis importantes no monitoramento de ambientes com estas características.

Na Figura 19, as variáveis células de cianobactérias, organismos fitoplanctônicos, clorofila *a*, pH e PT contribuem significativamente para o gradiente apresentado no Eixo 1 e por apresentarem um ângulo próximo ao eixo podem ter o mesmo peso na explicabilidade do mesmo. Por meio da análise de ACP pode-se observar que a legislação CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) que contempla as análises de clorofila *a*, células de cianobactérias e PT para indicar a eutrofização e proteger as comunidades aquáticas e os usos pretendidos dos corpos d'água quanto à problemática das cianobactérias, está bem embasada nos estudos de campo.

5.4 ATENDIMENTO ÀS RESOLUÇÕES CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) E CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2004)

Quando comparados com a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para a Classe 2, de acordo com o enquadramento do Rio Atibaia, formador do reservatório Salto Grande, os valores de pH no mês de agosto de 2005 foram 9,2 no ponto Praia dos Namorados e 9,5 no Iate Clube, portanto acima dos limites desta classe (pH= 6-9). Isso pode ser devido aos elevados valores de células de cianobactérias encontrados, que aumentam substancialmente o pH em consequência da elevada atividade fotossintética. Em relação ao fósforo total – PT, foram

verificadas concentrações acima das indicadas para ambientes lênticos (Classe 2 = 0,03 mg/L) nos meses de abril de 2005, agosto de 2005, dezembro de 2005 e janeiro de 2006 para a Praia dos Namorados e abril, julho, agosto e dezembro de 2005. (Tabelas 1 e 2)

Em relação à clorofila a, todos os valores ao longo do estudo estiveram acima do limite estabelecido para a Classe 2, que é até 30µg/L. Para o número de células de cianobactérias cujo valor limite para esta classe é até 50.000 céls./mL, apenas no mês de fevereiro de 2006 para a Praia dos Namorados (1,90E+04 céls./mL) e no mês de junho no Iate Clube (2,74E+04 céls./mL) é que os valores foram atendidos.

A Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000) que estabelece critérios para avaliação da balneabilidade, considera como uma das condições impróprias para banho, a ocorrência de floração de algas ou outros organismos que oferecem risco à saúde humana. (§ 4º, inciso f).

Observou-se durante as coletas a formação de “escuma” indicando a presença de florações de cianobactérias por meio de inspeções visuais nos meses de abril/2005 e agosto/2005 na Praia dos Namorados e agosto/2005, outubro/2005 e novembro/2005 (Anexo 2). Entretanto, apenas para os meses de maio/2005 na Praia dos Namorados e Iate Clube, julho/2005 e fevereiro/2006 na Praia dos Namorados e dezembro/2005 no Iate Clube os valores de células de cianobactérias estiveram abaixo de 50.000 céls./mL que é o valor limite utilizado pelo Governo Australiano (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) acima do qual há probabilidade de efeitos adversos à saúde para a exposição de crianças às atividades recreacionais e é o valor máximo permitido para a Classe 2 da Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para recreação de contato primário. Observa-se assim, que em várias coletas, apesar de visualmente não terem sido detectadas “escumas”, as concentrações de células de cianobactérias encontravam-se elevadas. Estes resultados indicam que apenas a inspeção visual adotada na Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000) não oferece garantias à população de uma exposição segura.

6 DISCUSSÃO

6.1 VARIÁVEIS CLIMATOLÓGICAS E LIMNOLÓGICAS

São inúmeros os fatores que podem levar à dominância de cianobactérias em lagos e reservatórios. Apesar de ser claro que o aumento da entrada de nutrientes é a causa primária da forte pressão seletiva no fitoplâncton é o sistema como um todo que determina os resultados finais deste processo, especialmente a morfologia dos lagos e reservatórios e seu funcionamento. São vários os fatores ambientais e fisiológicos que determinam o sucesso das cianobactérias como competidoras em relação aos demais organismos fitoplanctônicos nos ambientes aquáticos, como: elevadas temperaturas, baixo requerimento de luz, cinética de absorção de carbono inorgânico superior, baixa razão NT/PT e dominância do nitrogênio inorgânico em forma de amônia. Mecanismos que permitem a migração na coluna d'água, como a presença de aerótopos e o estoque intracelular de fósforo favorecem gêneros formadores de florações como *Microcystis*. Baixa pressão de predação, inibição do crescimento de outros grupos fitoplanctônicos pela excreção de compostos orgânicos inibidores e produção de toxinas como proteção à predação são também responsáveis pelo sucesso das cianobactérias (DOKULIL & TEUBNER, 2000). Como já mencionado neste trabalho, recentes pesquisas moleculares descartam esta última hipótese pelo fato de que os genes produtores de toxinas têm aparecimento mais antigo e paralelo na evolução, anterior aos metazoários. No entanto, muitos dos fatores mencionados são sabidamente relevantes e confirmados em extensa literatura e muitos deles representam papel importante para a ocorrência das cianobactérias no local estudado.

As temperaturas médias do ar observadas estão de acordo com a caracterização climática da região onde está localizado o reservatório, caracterizada pela tropicalidade e clima Cwa, segundo a classificação climática de Köppen nos trechos médio e inferior da Bacia do Atibaia, com inverno seco e verão quente. Os valores observados de temperatura do ar estiveram quase sempre acima da temperatura média anual registrada na sub-bacia do Atibaia para as porções média e inferior, que é 20°C (ESPÍNDOLA et al, 2004 a, 2004b), com exceção do mês de maio de 2005 que apresentou temperatura mínima de 19°C. As temperaturas mínimas encontradas em estudos anteriores na região do reservatório, citados pelo autor, foram de até 4,4 °C para o ar, variando de 16,6°C a 33°C em estudos realizados desde 1972. As temperaturas observadas por SOUZA (2000) em monitoramento realizado na Praia dos Namorados durante três anos (1995, 1996 e 1997) variaram de 12°C a 32°C para o ar e de 12°C a 30°C para a água. No ponto de monitoramento da CETESB, localizado no Rio Atibaia, próximo da entrada do reservatório (ATIB02800), as temperaturas da água variaram de 18°C a 28°C em monitoramento realizado durante 5 anos (2002-2006), com médias anuais em torno de 24°C. De acordo com GRAHAM & WILCOX (2000), a maioria das cianobactérias apresenta melhor crescimento em temperaturas entre 15 a 30°C e atingem sua taxa máxima em temperaturas acima dos 25°C.

No presente estudo, as temperaturas médias da água nos períodos de seca e cheia foram 23,3°C e 27,4°C para a Praia dos Namorados e 22,9°C e 27,1°C para o Iate Clube e estiveram muito próximas dos valores máximos de crescimento. No mês de agosto, quando houve um pico de crescimento de cianobactérias, as temperaturas foram elevadas apesar de ser considerado inverno, pois houve dias sem chuva ou vento e com elevada insolação, o que pode provocar a ocorrência de temperaturas da água mais elevadas na margem, como as encontradas nos dois pontos de coleta (24°C), próximas daquela que favorecem o crescimento das cianobactérias. A temperatura, por ser um parâmetro importante, deve ser avaliada em futuros estudos de monitoramento quanto à tendência a sua elevação, devido, possivelmente, aos efeitos das alterações climáticas globais relatadas em estudos recentes.

No ponto de coleta localizado na Praia dos Namorados, aparentemente os valores de transparência não estiveram diretamente relacionados com os valores de precipitação, apesar de ser esperado um aumento de turbidez na água pelo carreamento de material em suspensão no

período chuvoso, principalmente pelo fato do ponto de coleta estar localizado próximo à margem. Esta relação também não foi diretamente verificada para a clorofila *a* e células de cianobactérias. O mês de novembro, que apresentou menor transparência, ou seja, a menor profundidade do Disco de Secchi apresentou valores elevados de células de cianobactérias e clorofila *a*. Estes resultados podem ser explicados pela dominância de espécies de *Microcystis* que formam florações superficiais. O Índice de Correlação de Pearson (*r*) para células de cianobactérias e transparência apresentou correlação negativa com baixos valores. Os valores médios do período de seca e cheia não apresentaram quase nenhuma diferença (0,5m e 0,6m, respectivamente) para a Praia dos Namorados e estiveram mais baixos que as médias registradas no Iate Clube (1,0m e 0,7m). Valores menores do Disco de Secchi podem estar relacionados à maior concentração de material particulado no ponto Praia dos Namorados, que é mais exposto que o Iate Clube, e que apresentou maiores concentrações de células de cianobactérias na média dos períodos amostrados.

Também para o ponto Iate Clube, os valores de transparência não estiveram relacionados diretamente aos valores de precipitação, porém para este ponto, o menor valor de transparência (0,4m) pode ser atribuído ao maior valor de clorofila *a* (3274,1 µg/L) registrado no mês de agosto de 2005, com a predominância de *Anabaena crassa* que pode ter contribuído para o aumento da turbidez de modo geral, já que é melhor distribuída na coluna d'água, não formando florações superficiais. O Índice de Correlação de Pearson (*r*) para este parâmetro com o número de células de cianobactérias apresentou valores negativos e baixos.

A ausência de uma relação entre a transparência e as médias mensais de precipitação podem estar relacionadas ao fato de que os pontos de coleta estão localizados em margens abrigadas e bastante urbanizadas, com cobertura vegetal de gramíneas e pavimentadas, além de ocorrer uma densa barreira de macrófitas, que pode estar impedindo a grande pluma de sedimentos carregada para o reservatório como observado na Figura 2.

Os valores mais elevados de pH nos dois pontos de coleta (9,2 para a Praia dos Namorados e 9,5 para o Iate Clube) no mês de agosto de 2005 acompanharam os maiores valores da clorofila *a* (3533,5 µg/L e 3274,1µg/L, respectivamente). Valores mais elevados relacionados

com as maiores concentrações de clorofila *a* no período de inverno, que correspondeu ao período seco, também foram encontrados por DEBERDT (2002), com valores bastante elevados para o mês de agosto, e SOUZA (2000), que encontrou valores mais elevados de pH nos meses de agosto a dezembro na Praia dos Namorados. Elevados valores de pH (em torno de 8) afetam diretamente o balanço do carbono da direção da produção de CO_3 , favorecendo o crescimento das cianobactérias (OLIVER & GANF, 2000), que raramente ocorrem em pH menores que 5. Observou-se no presente estudo, que os valores de pH estiveram sempre acima 6,6, indicando um ambiente favorável ao crescimento das cianobactérias.

Elevadas concentrações de fósforo total foram detectadas nas coletas de abril de 2005 (0,180mg/L), agosto de 2005 (0,150mg/L), dezembro de 2005 (0,180mg/L) e janeiro de 2006 (0,170mg/L) na Praia dos Namorados, sendo que nos meses de agosto e janeiro ocorreram também elevadas concentrações de células de cianobactérias e clorofila *a*. Já no ponto Iate Clube, as concentrações foram em geral menores, sendo que apenas nos meses de agosto de 2005 e dezembro de 2005 foram detectadas concentrações mais elevadas (0,110mg/L e 0,130mg/L) respectivamente. Apesar das variações sazonais nas concentrações de PT, os valores médios mensais registrados no período de seca e cheia nos dois pontos de coleta foram iguais e mantiveram-se elevados (0,10 mg/L), acima dos valores que estimulam o crescimento das cianobactérias, e que, aliado às demais variáveis ambientais favoráveis, vem suportando estas intensas e constantes florações. Valores de PT já registrados para o reservatório (ESPINDOLA et al., 2004b) alcançaram até 0,89 mg/L, porém, em geral, os maiores valores estão na faixa de 0,11 mg/L até 0,45mg/L. Os valores médios máximos de PT encontrados por DEBERDT (2002) foram no período de verão (0,118mg/L) em estações de coleta localizadas na porção central do reservatório.

Em relação ao NT, foram já registrados valores de até 33,7mg/L (ESPINDOLA et al, 2004b) para o reservatório, porém neste estudo as concentrações estiveram mais baixas, sendo o valor máximo encontrado (4,93mg/L) em julho de 2005. As médias para os períodos de seca e cheia para a Praia dos Namorados foram de 1,1mg/L e 2,5mg/L respectivamente e 2,3mg/L e 1,7mg/L para o Iate Clube, próximos dos valores médios encontrados por DEBERT (2002). Nota-se, que no período de cheia, na Praia dos Namorados, os valores médios de NT estiveram

mais elevados, ao contrário do ponto localizado no Iate Clube; isto pode ser devido ao fato de que o ponto localizado na Praia dos Namorados é mais exposto às influências da porção central do reservatório, como comentado anteriormente, e o NT pode ser mais oriundo de fontes alóctones com maior entrada no período de cheia, ao contrário do fósforo que é comum ser proveniente de cargas internas do sistema.

DOKULIL & TEUBNER (2000) comentam que a ausência de cianobactérias é melhor garantida em concentrações de PT <50 µg/L, um valor mais elevado do que a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) que é 0,03 mg/L para ambientes lênticos. Valores menores que 0,05 mg/L foram encontrados nos meses de setembro/2005 e novembro/2005 nos dois pontos de coleta e em janeiro e fevereiro de 2006 no Iate Clube e fevereiro/2006 na Praia dos Namorados. Essas quantidades corresponderam às menores concentrações de células de cianobactérias, com exceção de novembro/2005 nos dois pontos, quando *Anabaena crassa* foi abundante.

Elevadas correlações ($r > 0,5$) de células de cianobactérias com NT foram detectadas nos dois pontos amostrados e valores elevados de NT em julho/2005 no ponto Iate Clube suportaram intenso crescimento das cianobactérias, quando 90,2% da comunidade era representada por *Microcystis* spp e formas relacionadas, tendência que se repetiu para o ponto da Praia dos Namorados. As concentrações mais elevadas desse nutriente nos período de seca são comuns em sistemas aquáticos de regiões climáticas com estas características, pois as baixas vazões favorecem um aumento da concentração dos mesmos. Na Praia dos Namorados, observou-se que um pico na concentração de NT e células de cianobactérias ocorreu no mês de janeiro de 2006, que foi um mês atípico, com um longo período de estiagem no meio do mês e temperaturas elevadas (do dia 09/01/2006 a 29/01/2006 houve apenas um dia de chuva com 19,9mm – fonte: Centro Tecnológico de Hidráulica e Recursos Hídricos – CTH/USP). Isso pode ter contribuído para a concentração maior para esses resultados, pois a coleta referente a esse mês foi realizada no dia 29/01/2006.

Segundo BOTHWELL & LOWE (1996) razões NT/PT maiores que 20/1 indicam limitações por fósforo e menores do que 10:1 limitação por nitrogênio; valores intermediários não

sugerem limitações para o crescimento fitoplanctônico. No presente estudo, a relação NT/PT esteve acima de 20/1 em quase todas as coletas com exceção do mês de dezembro para o Iate Clube e abril/2005 e dezembro/2005 para a Praia dos Namorados, indicando um ambiente predominantemente limitado pelo fósforo, já que os valores médios também para os períodos de seca e cheia nos dois pontos de coleta estiveram acima deste valor. Mesmo sendo limitante, as cianobactérias podem acumular este elemento no citoplasma em forma de grânulos de polifosfato e utilizar para a divisão celular por várias gerações, como citado em WHITTON & POTTS (2000). Este mecanismo, associado ao excesso de nitrogênio, poderia suportar florações quase permanentes de gêneros não heterocitados como *Microcystis*, como ocorre no local do presente estudo.

No estudo de DEBERDT (2002), o valor médio de 15,5 na relação NT/PT foi mais baixo nos meses de verão (período chuvoso), demonstrando uma limitação por nitrogênio; estas diferenças podem ser explicadas pelo fato dos pontos de coleta no estudo realizado pela autora estarem localizados na porção central do reservatório e sofrerem influência das maiores vazões no período chuvoso. Baixas razões NT/PT, que favorecem o crescimento das cianobactérias, tanto fixadoras como não fixadoras de nitrogênio, segundo DOKULIL & TEUBNE (2000), foram encontradas em poucos meses de coleta (abril/2005 e dezembro/2005 para a Praia dos Namorados e dezembro/2005 para o Iate Clube) e o número de células de cianobactérias não foi expressivo nestes meses, com exceção de abril/2005.

Verificou-se, nesse estudo, que condições ambientais diversas favoreceram o crescimento das cianobactérias, como a baixa turbulência, altas temperaturas, alto pH, alto NT e alto PT. Como evidenciado em DEBERDT (2002) o fator ambiental mais importante que determinou o crescimento das cianobactérias em pontos localizados no meio do reservatório foi a vazão, que é um fator físico que pode estar influenciando a mistura da coluna d'água, auxiliado pelo vento como relatado por COSTA (1998) e SOUZA(2000). Os locais amostrados no presente estudo, por se tratarem de pontos localizados em margens, são mais abrigados e protegidos constantemente pela barreira de macrófitas, apresentando ambientes estáveis. Por estarem localizados também na direção oposta ao vento predominante, o acúmulo das “escumas” tóxicas é favorecido, o que oferece alto risco à população.

6.2 VARIÁVEIS BIOLÓGICAS E TOXICOLÓGICAS

Como já evidenciado por autores estudando outros reservatórios no Brasil (HUSZAR et al., 2000; WOSIACK, 2005), as espécies de cianobactérias apresentaram períodos de alternância de formas heterocitadas, fixadoras de nitrogênio como espécies de *Anabaena* e não heterocitadas como espécies de *Microcystis*, que são grupos funcionalmente distintos que podem estar associados às concentrações das formas nitrogenadas disponíveis. Nos meses de maio/2005 e dezembro/2005 na Praia dos Namorados e em junho/2005 e dezembro/2005 no Iate Clube predominaram as *Anabaena*, sendo que as células/mL de *A. crassa* dominaram neste último local. Neste mês a concentração de microcistinas pelos dois métodos avaliados não se mostrou elevada, pois estes gêneros são conhecidos como potenciais produtores também de saxitoxinas. Já no mês seguinte, quando as concentrações de NT foram bem elevadas, predominou *Microcystis*, que não é um gênero fixador de nitrogênio e em condições nutricionais favoráveis, é competidor mais agressivo, excluindo as populações de *Anabaena*. WOSIACK (2005) também observou cianobactérias não heterocitadas quando ocorriam altos teores de nitrogênio total na coluna d'água em estudo na represa de Itaipú. JANSEN et al (1994) *apud* WOSIACK (2005) estudou a dominância do fitoplâncton em 32 lagos ao longo de um gradiente de fósforo em região temperada e observou que as cianobactérias heterocitadas tendem a dominar em concentrações de $PT < 0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e não heterocitadas entre $0,25$ e $0,80 \text{ mg.L}^{-1}$. Apesar da estratificação térmica também influenciar na alternância destes grupos, não foi possível avaliar esta influência no presente estudo, pois os locais amostrados, por estarem localizados em margens, possuíam profundidades pequenas. Também a turbidez pode influenciar esta sucessão, sendo que *Microcystis* é mais favorecida em ambientes com elevada turbidez do que *Anabaena* e observa-se que no mês de dezembro/2005 a transparência foi maior em ambas as estações de coleta, confirmando esta tendência para o favorecimento de *Anabaena*.

A clorofila a, uma variável que expressa a biomassa de cianobactérias quando elas são dominantes na amostra fitoplanctônica apresentou sempre valores elevados (acima de $10 \mu\text{g/L}$), caracterizando o ambiente como eutrófico a hipereutrófico e acima dos limites da Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para a Classe 2 ($30 \mu\text{g/L}$), confirmando os resultados

anteriores avaliados por outros autores. Alguns “picos” de concentração bastante elevados, como em agosto/2005 na Praia dos Namorados e Iate Clube que apresentaram os valores de 3533,5µg/L e 3274µg/L respectivamente, nunca foram antes registrados para o local, e podem ser devido ao fato das amostragens terem sido realizadas nas margens, que oferece uma condição mais propícia para a formação de intensas florações.

FRANK (2002) utilizou uma estimativa de concentração de microcistina por clorofila *a*, sendo que para um pior caso, 1 µg de microcistinas corresponderia a 1 µg de clorofila *a* e encontrou valores de clorofila *a* de até 5488 µg/L com predominância de *Microcystis* e de 6040 µg/L com predominância de *Anabaena* e *Aphanizomenon* em lagos da Alemanha. Era de se esperar que os valores de microcistinas encontrados neste estudo fossem bem mais elevados, em torno de 3000µg/L em função das concentrações elevadas de clorofila *a*; porém, isto não ocorreu e pode ter sido devido a vários fatores, como problemas metodológicos de extração, condições ambientais que possam ter influenciado na produção e degradação das microcistinas, análise em CLAE apenas para a microcistina –LR sendo que outras isoformas podem ter sido dominantes e à baixa reatividade com anticorpos para várias isoformas do método ELISA. É importante que sejam feitos mais estudos de tipologia de lagos e reservatórios no Estado de São Paulo e no Brasil com este enfoque, para confirmação destes valores.

6.2.1 ASPECTOS TAXONÔMICOS

Amostras ambientais

Dos 26 táxons de cianobactérias identificados neste estudo, metade (13) são citações inéditas para o reservatório dos quais as espécies *Aphanizomenon gracile*, *Microcystis panniformis*, *M. wesenbergii* e *M. botrys* são comprovadamente produtoras de ciatonoxinas (Anexo 4). O gênero que apresentou maior número de espécies foi *Microcystis* e dominou em todas as épocas do ano. Este gênero apresenta sua taxonomia ainda problemática pela variação

intraespecífica de seus morfotipos, além do que, são utilizadas predominantemente características morfológicas como o arranjo celular e forma da colônia para a delimitação das espécies. Uma revisão para este gênero tem sido recomendada por diversos autores (KOMÁREK, 2000; OUTSUKA, 2001), mas são necessários mais estudos que contemplem maior variedade de ecotipos em estudos de filogenia molecular mais abrangentes. Populações de *M. panniformis* que foram predominantes na média dos meses amostrados e não haviam sido anteriormente relatadas em estudos no reservatório, podem ter sido confundidas com *M. lamelliformis*, freqüentemente citada para o local. COSTA (1998) já tinha detectado um possível novo táxon para um morfotipo de *Microcystis* que corresponde à descrição de *M. panniformis*, mas a descrição desta espécie só ocorreu em 2002. Também a espécie *Sphaerocavum brasiliense* descrita apenas em 2003 pode ter sido confundida com *M. aeruginosa* que era tida como predominante no local.

Grande parte dos trabalhos de cunho ecológico, não leva em consideração uma identificação precisa dos táxons e em populações muito densas de cianobactérias, como florações de *Microcystis* spp, estes morfotipos podem ser facilmente confundidos.

Espécies picoplanctônicas como *Aphanocapsa incerta*, *A. delicatissima*, *Merismopedia tenuissima* e *Synechococcus elongatus* devem ser mais bem avaliadas quanto a sua importância para a comunidade fitoplanctônica e seu potencial para a produção de toxinas, pois são ainda escassas as informações para este grupo, principalmente *S. elongatus*, que foi uma espécie considerada abundante em número de organismos nos meses de cheia.

Algumas espécies acessórias e acidentais encontradas, não mencionadas por autores anteriores, como *Chroococcus minor* e *Jaaginema subtilissimum* são espécies de hábitos bentônicos ou metafíticas, ocorrendo acidentalmente no plâncton, especialmente em locais rasos de margem.

SOUZA (2000) avaliou semanalmente a comunidade de cianobactérias em ponto localizado na porção central do reservatório, em frente à Praia dos Namorados e verificou que as cianobactérias dominam durante todo o ano, apresentando picos sazonais. Neste estudo, em alguns meses, as cianobactérias não dominaram em número de organismos em relação aos

demais organismos fitoplanctônicos, porém o número de células do restante da comunidade fitoplanctônica não foi avaliado e o espaçamento das coletas pode não ter detectado esta dominância constante. A autora também aponta *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae) e *Pseudanabaena mucicola* (Cyanobacteria) como espécies oportunistas que ocorreram associadas à mucilagem de *Microcystis* spp, o que também foi observado neste estudo.

É importante enfatizar a necessidade de aprofundar o conhecimento das cianobactérias no Brasil em termos de sua ecologia e taxonomia para uma real avaliação do seu impacto nos ecossistemas e na saúde humana.

Isolados

As amostras coletadas no reservatório Salto Grande continham uma rica flora planctônica característica de ambientes tropicais eutrofizados. Entretanto, os espécimes isolados apresentaram-se bastante diversificados em relação aos habitats, especialmente por se tratar de material coletado em margem, com abundante crescimento de macrófitas e portanto, algumas espécies metafíticas e perifíticas foram isoladas.

Dos 13 isolados, três pertencem ao gênero *Microcystis* típico do plâncton e ocorreram também nas amostras ambientais, sendo que apenas no isolado CENA 121 foi possível caracterizar o morfotipo *M. panniformis*, pois a colônia manteve-se íntegra no isolado. Também *Romeria victoriae* foi uma espécie encontrada nas amostras ambientais. O gênero *Romeria* é bastante próximo de *Pseudanabaena*, do qual se distingue por apresentar tricoma mais arcuado ou flexuoso com as extremidades das células contíguas, às vezes com mudança abrupta de posição, formando uma “quebra”. O isolamento e o sequenciamento genético deste material é muito interessante do ponto de vista taxonômico, pois são raros os materiais isolados em cultura, sendo que todas as espécies conhecidas provêm de descrições da natureza. Os materiais isolados apresentaram limites métricos para o comprimento celular menores do que citados em literatura para esta espécie, mas concordam com sua ocorrência que também é descrita para ambientes

tropicais na África. KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (2005) citam que o caráter filamentosos de *Romeria* (presença de poros entre as células) não foi ainda provado e que há uma forte semelhança morfológica e ultraestrutural com vários tipos cocóides.

Algumas cianobactérias picoplanctônicas foram isoladas e foram identificadas com os gêneros *Aphanothece* e *Synechococcus*, sendo que apenas *Synechococcus elongatus* foi observado na cultura e na natureza. Estas cianobactérias picoplanctônicas na natureza são de mais difícil observação e muitas podem estar alojadas na densa mucilagem de alguns morfotipos de *Microcystis*.

Foram isolados também outros exemplares que integram o picoplancton mas que não ocorreram nas amostras ambientais como dois morfotipos do gênero *Aphanothece*, distintos principalmente pelo tamanho e forma do arranjo colonial. A cepa CENA 122 apresentou arranjo bem característico da colônia, diferente dos existentes em literatura com pequenos agregados tipo “esferas” que se unem formando um todo. A cepa CENA 126 foi de um espécime de *Synechococcus* com células bastante alongadas, não encontradas na amostra ambiental. Das espécies descritas em literatura (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1999) que apresentam tais dimensões estão *S. capitatus* que é descrita para lagos frios não poluídos de regiões temperadas e *S. elongatus* descrita para regiões temperadas e de hábito sub-aerofítico. Como já mencionado anteriormente, o material foi coletado em margem e poderia estar oportunisticamente nas amostras, mas estudos mais aprofundados devem ser realizados.

Os demais isolados são característicos de materiais comumente encontrados no metafiton ou perifiton como *Calotrix* sp. que é caracterizado por seus tricomas heteropolares com uma base alargada e ápice fortemente atenuado, formando um “pêlo” hialino e são imersos em bainha mucilaginosa conspícua. A espécie *C. fusca* tem sido citada para o Brasil e as características morfométricas do material isolado parecem estar de acordo com o apresentado em literatura (BRANCO et al., 1999; WERNER, 2002). Este foi o único gênero de cianobactéria heterocitada isolado. Também característico destes habitats, outro gênero isolado, *Chroococcidiopsis* é um gênero colonial que forma agregados típicos de células envolvidos por mucilagem hialina e incolor; sua forma de reprodução por baeocitos é bastante característica, e

foi observada no material isolado. *Chroocidiopsis cf indica* é a espécie descrita em água doce para o Brasil (KOMÁREK et al., 2001) e os limites métricos estão de acordo com o material encontrado.

O gênero *Lyngbya*, também isolado neste material é caracterizado por tricomas largos, com uma bainha mucilaginosa firme e células discóides achatadas. Os espécimes isolados apresentam-se ligeiramente atenuados em direção ao ápice do tricoma, com espessamento na célula apical (caliptra) e não foram encontrados exemplares nas amostras ambientais, o que poderia indicar a origem não planctônica deste material. Neste reservatório já foram encontrados exemplares de *L. hieronymusii*, de hábito tipicamente planctônico, presença de aerótopos, sem caliptra e não atenuado nas extremidades, distinta do material isolado. Por não terem sido encontradas em literatura espécies que teriam todas as suas características concordantes, este material não foi identificado em nível específico, necessitando de estudos mais completos.

Finalmente, duas cepas isoladas de *Leptolyngbya* sp. CENA 129 e *Leptolyngbya* sp. CENA 131, gêneros característicos por apresentarem tricomas emaranhados, diferem entre si pelas menores dimensões celulares da *Leptolyngbya* sp. CENA 129. São inúmeras as espécies descritas para este gênero (mais de 100) e este morfotipo tem suas características concordantes com *L. margaretheana* que apresenta células um pouco mais isodiamétricas e largura mais estreita, comum em “wetlands” de regiões tropicais e sub-tropicais. *Leptolyngbya*. sp. CENA 131, por ter células um pouco mais longas que largas e largura do tricoma um pouco maior, estaria mais próxima da espécie *L. aeruginea*, uma espécie cosmopolita típica de zona litoral de ambientes mais parados.

Foram isolados exemplares que ainda não haviam sido observados na natureza em estudos anteriores no local e o isolamento de cepas de cianobactérias para estudos taxonômicos, moleculares e toxicológicos aumenta o conhecimento da biodiversidade do grupo, pois espécies raras que normalmente são excluídas por competição, em condições de cultivo podem ser favorecidas. O conhecimento da biodiversidade das cianobactérias é extremamente relevante pela intensa produção de oligopeptídeos e metabólitos secundários poucos estudados com evidências de bioatividade que este grupo apresenta (CHORUS, 2001).

A maioria (oito) das seqüências de rDNA 16S geradas neste estudo apresentaram valores de identidades superiores a 97,5% com seqüências disponíveis em bancos de dados públicos e, portanto, provavelmente pertencem à mesma espécie. Para os organismos pertencentes ao domínio *Bacteria* foi demonstrado que dois organismos podem ser considerados da mesma espécie se eles apresentarem reassociação de DNA-DNA de aproximadamente 70% ou maior (WAYNE et al., 1987) e que linhagens com seqüências do gene de rDNA 16S que apresentam valores de identidades superiores a 97,5%, provavelmente, possuem reassociação de DNA-DNA maior que 60-70% e, portanto, pertenceriam à mesma espécie (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994). Como consequência desses estudos, ficou estabelecido que em análise BLAST utilizando o gene de rDNA 16S, dois organismos podem ser considerados do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (LUDWIG et al., 1998). Neste estudo três seqüências apresentaram valores de identidades inferiores a 95% (*Chroococcidiopsis* CENA124, *Leptolyngbya* CENA129 e *Leptolyngbya* CENA131), indicando que alguns dos organismos pertencentes a esses dois gêneros necessitam de revisão.

As seqüências de rDNA 16S correspondem aos genes que codificam para a subunidade menor do ácido ribonucléico ribossômico e, por essa característica estrutural são conservados e permitem inferir relações filogenéticas entre os organismos, além de possibilitarem, em alguns casos, a identificação de espécies. Todavia, deve-se ter em mente o questionamento da congruência entre a identificação das cianobactérias ao interpretar essas inferências e identidades. WILMOTTE & HERDMAN (2001) e KOMAREK & ANAGNOSTIDIS (1989) chamam atenção para o fato de que muitas linhagens de cianobactérias são identificadas erroneamente, por isso os pesquisadores devem utilizar linhagens bem caracterizadas para análises comparativas ou usar de uma abordagem polifásica, envolvendo descrições morfológicas, ecológicas, bioquímicas, ultraestruturais e moleculares. Entretanto, isso nem sempre é possível devido ao número limitado de dados existentes atualmente para alguns táxons. A análise filogenética revelou agrupamentos parafiléticos de Oscillatoriales e Chroococcales. Esses resultados estão de acordo com os relatados anteriormente para as espécies dessa família de cianobactérias (ISHIDA et al., 2001). As árvores filogenéticas das cianobactérias construídas com seqüências de rDNA 16S parecem indicar que esses organismos divergiram ao mesmo tempo numa época passada (HONDA et al.,

1999; ISHIDA et al., 1997; ISHIDA et al., 2001; NELISSEN et al., 1994; TURNER et al., 1999), e assim fica difícil elucidar o seu processo de evolução. Como resultado, linhagens de Oscillatoriales e Chroococcales podem ser encontradas no mesmo clado em algumas posições filogenéticas nas árvores atuais.

Na análise BLAST, a sequência de rDNA 16S de linhagem de alguns isolados como *Calotrix* apresentou identidade de 98% com *Calotrix desertica* PCC 7102 isolada de uma fina areia do deserto de Antofagasta, no Chile, indicando que a identidade genética pode correlacionar indivíduos com habitats e requerimento eco-fisiológicos distintos. Por outro lado, nas amostras ambientais, a espécie *Synechococcus elongatus* foi identificada com base nos critérios morfológicos e foi detectada em quantidades significativas nas coletas de dezembro/2005 e janeiro/2006 na Praia dos Namorados e dezembro/2005 no Iate Clube, sendo isolada com sucesso, o que permitiu seu sequenciamento. Esta espécie, de acordo com KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999) é distribuída por toda a região temperada, crescendo como sub-aerofítica em solos úmidos e pedras molhadas nas zonas litorâneas de lagos e reservatórios e registros de países tropicais ou outros biótopos devem ser revisados. Verificou-se pelo resultado do sequenciamento que a cepa isolada apresentou 99,8% de identidade com duas cepas já isoladas de *Synechococcus elongatus*, PCC7942, o que fez com que fosse mantida a identificação.

Conforme comentado por PALINSKA & GOLUBIC (2007), foi aberta a possibilidade de usar as relações filogenéticas como base para a classificação taxonômica em procariotos; entretanto, o uso de espécies como uma unidade da diversidade procariótica tem que ainda ser definido em termos de evolução. Por outro lado, o poder de resolução taxonômica do gene rDNA 16S é limitado e refinamentos nas análises genéticas têm sido empregados para avaliar a diversificação do grupo. Variantes geneticamente estáveis formam agrupamentos monofiléticos denominados ecotipos (populações procarióticas que são geneticamente coesas e ecologicamente distintas) que se correlacionam com diferentes condições ambientais e seus requerimentos e respostas eco-fisiológicas descrevem interdependências, que são conceitualmente associadas com nichos ecológicos. Neste contexto, o estudo da genética e da ecologia molecular em populações naturais de cianobactérias é extremamente importante para a definição da sistemática e

taxonomia do grupo, de acordo com critérios mais naturais. Sempre que possível, os estudos ecológicos devem começar a incorporar estes novos conhecimentos para que auxiliem na definição dos ecotipos.

Como resultado da análise filogenética dos isolados, observou-se que as cepas *Leptolyngbya* sp CENA 129 e *Leptolyngbya* sp CENA 131 apresentaram baixa identidade com a sequência de *L. boryarum* depositada no GenBank, porém elas foram identificadas morfológicamente como morfotipos distintos entre si, sendo que as células da CENA 129 são um pouco mais isodiamétricas e com largura menor que as da CENA 131 que tem células um pouco mais longas que largas e largura do tricoma um pouco maior. Como são muitas as espécies descritas para este gênero, em torno de cem, estudos mais aprofundados levando em conta a abordagem polifásica nestas populações devem ser realizados. Também a cepa CENA 128, representada por uma *Lyngbya* apresentou 95,8% de identidade com a cepa do gênero *Leptolyngbya* OBB32S02 do qual se distingue por ter tricomas mais largos e células mais achatadas.

KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (2005) comentam que a família das Pseudanabaenaceae, com tricomas mais finos e células mais longas que largas, representam um grupo bem caracterizado com arranjo dos tilacóides parietal e características morfológicas, ultraestruturais e moleculares bem definidas. Em árvores filogenéticas, baseadas no rDNA 16S, tipos cocóides formam agrupamentos com gêneros filamentosos e a Família Oscillatoriaceae representa um único agrupamento bem delimitado por critérios moleculares. Observa-se que os trabalhos citados pelo autor, inclusive a árvore filogenética apresentada (derivada do “Gen Bank” de fevereiro de 2002) não são tão recentes (WILMOTTE & GOLUBIĆ, 1991 in KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005) e novos conhecimentos devem ser adicionados.

A espécie *Romeria victoriae* apresentou 96,3% de identidade com a cepa de *Pseudanabaena* PCC7408 que são gêneros próximos, porém com características morfológicas distintas; estes resultados confirmam a necessidade de estudos mais aprofundados para a manutenção ou unificação destes dois gêneros.

Um agrupamento formado pela espécie *Synechoccus nidulans* CENA 132 com dois isolados de *Aphanothece* (CENA 118 e CENA 122) sugerem também um aprofundamento dos estudos para estas cianobactérias picoplanctônicas aliado ao fato de que os limites métricos das células estão bastante próximos e a característica distintiva entre os dois gêneros é a presença da bainha mucilaginosa que pode estar ausente em condições de cultivo. JEZBEROVÁ et al.(2007) no estudo da diversidade fenotípica e genética de isolados de picocianobactérias, que pertencem ao grande “clado picofitoplanctônico” *sensu* URBACH et al. (1998) *apud* JEZBEROVÁ et al. (2007) empregam a abordagem ecofisiológica em combinação com técnicas moleculares para avaliar a diversidade, que pode ser mais ampla do que a descrita em literatura em países tropicais e ambientes extremos.

6.2.2 MICROCISTINAS E BALNEABILIDADE

Isolados

Na estimativa do potencial de biossíntese de metabólitos secundários das cianobactérias isoladas foi feita a amplificação das seqüências dos genes NRPS e PKS, sendo que os fragmentos do domínio A de NRPS foram amplificados em 8 isolados. SILVA (2006), em estudo sobre a caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais, verificou que genes NRPS estão distribuídos na maioria das cianobactérias brasileiras estudadas, sendo que nas linhagens estudadas da Ordem Chroococcales, 88% apresentaram o fragmento esperado de 1000 pares de bases que também esteve presente em 92% de linhagens da Ordem Oscillatoriales e 95% das cianobactérias das Ordens Nostocales e Stigonematales estudadas. A autora verificou que todas as Nostocales analisadas apresentaram genes de NRPS com exceção de *Raphidiopsis brookie* e, no presente estudo, o único representante desta Ordem, *Calothrix* sp também apresentou resultado positivo. A espécie *Synechococcus elongatus* apresentou resultado positivo para o fragmento de genes de NRPS que também foi confirmado na cepa *Synechococcus* sp. PCC7942 estudada pela autora, contrariando as observações de

CHRISTIANSEN et al. (2001) *apud* (SILVA, 2006) que relatam que os genes de NRPS são raros ou ausentes em linhagens pertencentes ao gênero *Synechococcus*. Ainda SILVA (2006) detectou nas linhagens brasileiras que os genes de PKS foram encontrados em menor número do que os genes NRPS, o que se confirmou para as linhagens estudadas no reservatório Salto Grande.

O ensaio imunológico ELISA realizado nas linhagens estudadas identificou a produção de microcistinas apenas para *Leptolyngbya* CENA 129. Até o presente, todos os operons identificados como envolvidos com a síntese de microcistinas e nodularinas possuem genes que codificam para as enzimas NRPS e PKS e as linhagens que apresentaram resultados positivos para estes genes e que não amplificaram para o gene *mycA* devem ser melhor aprofundadas nos estudos de produção de microcistinas em condições de cultivo.

Amostras Ambientais

As concentrações de microcistinas avaliadas pelo ensaio imunológico ELISA, que identifica a produção de microcistinas do tipo LR, RR ou YR nos locais amostrados, apresentaram um pico de concentração de 38,0 µg/L para a Praia dos Namorados e 33,8 µg/L para o Iate Clube em agosto de 2005 acompanhando valores bastante elevados de células de cianobactérias. Nesta ocasião houve uma quantidade significativa de células de *Anabaena crassa* que poderiam estar liberando outras isoformas de microcistina que não a LR, o que explicaria o valor mais baixo de microcistina-LR (1,09 µg/L e 0,04 µg/L respectivamente) nestes pontos. Neste mês, no ponto localizado no Iate Clube foi observada uma intensa mortandade de peixes, que poderia ter ocorrido pela depleção do oxigênio dissolvido, típica destes episódios ou efeito de outra toxina que não a microcistina-LR, podendo ser até uma neurotoxina, frequentemente liberada por este gênero. No momento da coleta não havia mais peixes moribundos para serem observados os efeitos neurológicos.

Valores de microcistinas resultantes da avaliação pelas duas metodologias produziram resultados diferentes como os observados nas Tabelas 1 e 2, sendo que os valores avaliados pela

técnica do imunoensaio ELISA foram quase todos mais elevados do que os avaliados pela técnica do CLAE. MORENO et al. (2005), que também avaliaram as microcistinas por estas duas técnicas, ELISA e HPLC-UV (ou CLAE), em um lago na Espanha, comentaram estas diferenças nos resultados quando também foram observados valores mais elevados de microcistinas por ELISA, principalmente quando as quantidades detectadas de microcistinas estão próximas ao LD do método (0,1µg/L). RAPALA et al. (2002) *apud* MORENO et al. (2005) compararam as duas técnicas, utilizando diferentes matrizes (toxinas puras - padrões, culturas de laboratório e florações de cianobactérias tóxicas no ambiente) e apesar dos resultados da avaliação com padrões por HPLC terem sido maiores, nas amostras ambientais os resultados por HPLC foram sempre menores dos que por ELISA. O autor sugere que isto pode ser devido à necessidade de se concentrar amostras para o ensaio de HPLC e de purificá-las enquanto que o imunoensaio ELISA é avaliado diretamente na amostra em pequenas quantidades. Para o autor, a possibilidade de ambas as técnicas produzirem diferentes resultados, não está relacionado ao desempenho do método, mas ao fato de medirem substâncias diferentes.

Dos 26 táxons encontrados, nove espécies são comprovadamente relatadas em literatura como sendo produtoras de cianotoxinas pela literatura e seis espécies pertencem a gêneros produtores de toxinas, porém não foram encontradas informações que comprovem sua produção. Duas espécies descritas para o Brasil, *Coelosphaerium evidenter-marginatum* e *Sphaerocavum brasiliense*, não são tóxicas de acordo com SANT'ANNA et al. (2007) Os demais ainda não relatados, são considerados “potencialmente” produtores até que estudos cobrindo um maior número de táxons sejam realizados. (ANEXO 4)

A toxicidade pode mudar no tempo e no espaço; no presente estudo verificou-se que o gênero *Microcystis* esteve presente em todas as coletas com valores médios de microcistina determinada pelo imunoensaio ELISA acima de 1,0µ/L em todas as amostras, com exceção das coletas de junho e julho em ambos os pontos, e setembro, outubro e novembro na Praia dos Namorados.

De acordo com WHO (2003), a demonstração da toxicidade em um determinado local não necessariamente implica em um perigo ambiental ou humano quando as células permanecem

dispersas; desenvolvimentos em massa e especialmente formação de “escumas” superficiais é que apresentam riscos. Em estudo anterior realizado no reservatório (DEBERDT, 2004) relatou a presença de microcistina em amostragens no meio do reservatório onde a formação de espuma não é favorecida, encontrando valores de 39,5 µg/L no mês de janeiro de 1999. No presente estudo, os pontos de amostragem foram nos locais próximos das margens, onde populações de cianobactérias se desenvolvem com mais intensidade e onde a exposição da população é maior; nesses locais também a dispersão da espuma superficial não é favorecida, prolongando a situação de risco. Em locais de margem, a lise das células libera o pigmento ficocianina que adquire coloração de cobre e a decomposição bacteriana gera uma rápida putrefação do material, conferindo ao local aspecto bastante repulsivo. Esta situação foi verificada diversas vezes durante as coletas, sendo que na coleta de janeiro, a situação foi mais crítica devido a uma forte mortandade de peixes ocorrida no local, provavelmente devido a esta condição. Verificou-se, também, na ocasião, que era grande o número de pessoas que freqüentavam o local para alimentação, inclusive com a prática de “windsurf”, um esporte que favorece muito a exposição.

Em estudo realizado por FASTNER et al., 1999 *apud* WHO (2003) as concentrações de microcistina variaram de 0,01 a 0,35mg/L em locais onde as cianobactérias estavam mais dispersas. Em “escumas” amostradas em margens, as concentrações foram maiores que 1 mg/L em 7 de 34 amostras, com um máximo de 24 mg/L (CHORUS & FASTNER, 2001 *apud* WHO, 2003). Levando-se em consideração estes valores e as concentrações médias máximas encontradas nos pontos amostrados que foram $9,77E + 06$ céls./mL para um valor de 33,63 µg/L de microcistina-LR, as concentrações médias de toxinas observadas neste estudo estariam abaixo do esperado.

De acordo com WHO (2003), para uma floração com 100000 céls/mL ($1,00E + 05$) e um conteúdo de 0,2 pg de microcistinas/cél., espera-se uma concentração de 20µg/L. Para o resultado do ELISA que contempla outras isoformas de microcistina, os máximos valores foram 38,0µ g/L para um número de células de $2,47E + 06$ céls./mL. Observa-se que, mesmo tendo número elevado de células em algumas coletas e observação de “escumas”, as concentrações de microcistinas foram mais baixas do que o esperado, porém estes valores chegam a ser até 30 vezes maiores do que o valor estabelecido de 1,0 µg/L para o consumo de água potável e de 3

vezes mais que o valor orientador de 10 µg/L para a exposição de crianças em atividades recreacionais (Quadro 5).

Em análise realizada em 31 de agosto de 2006 com uma coleta isolada da Praia dos Namorados, apenas para testar uma nova forma de extração utilizando microondas como um pré-tratamento diferenciado em amostra fresca, os resultados encontrados no sobrenadante após a centrifugação e no precipitado após a extração foram respectivamente 59,336 µg/L e 12,797µg/L, totalizando 61,90 µg/L, a maior concentração de microcistina-LR já relatada no reservatório Salto Grande, para uma concentração de células de 7,51E+05 céls./mL. Estes resultados indicam que a continuidade dos estudos para otimizar métodos de extração em matrizes orgânicas são importantes e necessários.

Verificou-se que o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r) foi bem elevado (0,90) para células de cianobactérias e microcistina-LR na Praia dos Namorados e picos de microcistinas acompanharam elevados valores de PT e clorofila *a* nos dois pontos amostrados.

No aspecto da Balneabilidade, a Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000) que define os critérios para a classificação de águas destinadas à recreação de contato primário, diz que uma praia pode ser considerada imprópria quando ocorrerem circunstâncias que desaconselhem a recreação de contato primário como florações de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana. No entanto, a floração neste caso é definida como “proliferação excessiva de microorganismos aquáticos, principalmente algas, com predominância de uma espécie, decorrente do aparecimento de condições ambientais favoráveis, podendo causar mudança na coloração da água e/ou formação de uma camada espessa na superfície” não havendo a quantificação das cianobactérias ou limites para as diferentes categorias de risco. De acordo com OLIVER & GANF (2000), considera-se uma floração, quando o número de células de cianobactérias ultrapassa 10.000 céls./mL que, dependendo da espécie, não promove nenhuma alteração de coloração ou formação de espumas. Neste caso, a população pode estar sendo exposta ao risco sem o conhecimento das autoridades de saúde pública.

Estudos de percepção ambiental da população realizado no reservatório Salto Grande por TONISSI et al (2004) evidenciaram que a população do entorno do reservatório não relaciona as cianobactérias e cianotoxinas como um dos principais problemas e nem menciona os aspectos de coloração, formação de “escumas” superficiais e odores associados como riscos para a exposição por atividades recreacionais. Os principais problemas ambientais mencionados foram a presença das macrófitas flutuantes (aguapés), sujeira, bichos, e algumas pessoas citam a poluição e os peixes doentes como um problema ambiental. Do total avaliado, 74% avaliam como péssima a qualidade ambiental no reservatório e 88% reconhecem a relação existente entre a situação ambiental e a saúde. Dentre os problemas citados, está a “micose” ou o “corpo empolado pela água suja”, associada com dermatites que podem bem estar relacionadas com os efeitos alergênicos das cianobactérias. O presente estudo vem reforçar a necessidade e urgência de informar à população os riscos associados. Uma iniciativa já foi feita neste sentido pela Secretaria Municipal de Saúde de Americana em 2006 com a distribuição de um folheto informativo com descrição das cianobactérias e recomendações para reconhecer e evitar o contato.

Com relação ao consumo de peixe, o manual escocês (SCOTTISH EXECUTIVE, 2002), em suas ações recomendadas quando de florações de cianobactérias, estabelece que acima de 20.000 céls./mL deve-se avaliar as toxinas nos peixes para permitir seu consumo. Observou-se que apenas para o mês de fevereiro na Praia dos Namorados o número médio de células esteve abaixo deste valor (18961 céls./mL) e para o Iate Clube no mês de dezembro com número médio de 13.948 céls./mL. Durante as amostragens ocorreu a presença constante de pescadores no local, mas não existem dados relatados para concentrações de microcistinas em músculos e vísceras nas populações locais de peixes.

Medidas para reduzir os riscos em águas recreacionais que apresentam toxicoses associadas às cianobactérias sugeridas pelo AUSTRALIAN GOVERNMENT (2006) contemplam controle da eutrofização, monitoramento e registro das populações de cianobactérias, limitações de uso durante as florações e recomendações para lavar o corpo e equipamentos após as atividades recreacionais em atividades de contato primário e secundário. Os alertas à população são de extrema importância que deve ser esclarecida quanto aos riscos aos quais estão expostas.

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) constata-se que os valores máximos permissíveis de clorofila *a* (até 30 µg/L) para a Classe 2, que permite atividades de recreação de contato primário como natação, esqui aquático e mergulho, foram ultrapassados em todos os meses nos dois pontos de coleta; já o número de células de cianobactérias em quatro coletas na Praia dos Namorados e três coletas no Iate Clube estiveram abaixo do valor máximo permitido que é 50000 céls./mL, indicando que mais estudos em ambientes aquáticos continentais brasileiros devem ser efetuados para confirmar estes valores de clorofila *a* ou até permitir em revisões posteriores da legislação, valores mais elevados

CHORUS & CAVALIERI (2000) propõem algumas etapas para o monitoramento das cianobactérias e na etapa 1, para a determinação da capacidade suporte do ambiente para florações de cianobactérias, são propostas concentrações de PT que não devam ultrapassar 0,01-0,02 mg/L e, se não há variação ao longo do ano, as florações são pouco prováveis de acontecerem e os monitoramentos podem ser mais espaçados.

Na proposta do plano de monitoramento voltado para a balneabilidade neste trabalho, as concentrações sugeridas para o PT são aquelas da Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) (até 0,03 mg/L) e observou-se ao longo das coletas, uma variabilidade alta nos valores de PT sem padrões característicos sendo que a sugestão do autor não se aplicaria neste caso.

Na fase 2, quando o monitoramento está voltado para avaliar possíveis desenvolvimentos massivos de fitoplâncton (algas e cianobactérias), a frequência recomendada do monitoramento é quinzenal e informações sobre a direção do vento devem ser coletadas nas últimas 24 horas, além de se determinar a transparência do Disco de Secchi, que deve ser menor que 1,0 m, para que as células de cianobactérias sejam monitoradas.

No presente estudo, nos locais amostrados, a transparência com valores acima de 1,0 m e células acima de 50.000 células/mL (Classe 2 da Resolução CONAMA 357/2005) ocorreram apenas na coleta de junho/2005 e setembro/2005 no Iate Clube, o que demonstra ser esta variável, de medida bastante simples, um bom indicador em um monitoramento preventivo. Se as concentrações de clorofila *a* permanecem abaixo de 10µg/L, altas densidades de cianobactérias

são pouco prováveis. Se as concentrações estão acima deste valor, as análises microscópicas devem ser realizadas para determinar a concentração de células de cianobactérias. Nas amostras realizadas, as concentrações de clorofila *a* sempre estiveram acima deste valor e, neste caso, recomendar-se-ia que apenas as células fossem monitoradas.

Medidas de controle da eutrofização para o reservatório Salto Grande são urgentes e necessárias e foram amplamente avaliadas em DEBERDT (2002) e IRRIGART (2006)

A continuidade dos estudos e um monitoramento sistemático no reservatório Salto Grande, como o proposto neste estudo, para o conhecimento da ocorrência espacial e temporal das células de cianobactérias em locais mais freqüentados por banhistas, poderão subsidiar futuros estudos epidemiológicos e ações de prevenção aos riscos da exposição às cianobactérias.

Um importante aspecto foi observado neste estudo sobre a dificuldade de se realizar amostragens em margens com florações intensas devido a grande heterogeneidade espacial resultante da dispersão da “escuma” superficial. As amostras coletadas em duplicatas mostraram, em alguns casos, diferenças significativas entre réplicas. O ideal seria adotar a estratégia descrita no “Guia para manejo de riscos em águas recreacionais” (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) de coletar uma única amostra composta por cinco subamostras em um transecto de 20-30m numa profundidade de 50cm. Também populações bentônicas e metalimnéticas, devem ser monitoradas e seu potencial de produção de cianotoxinas avaliado, principalmente pela ocorrência em janeiro/2007 de intensa proliferação de *Lyngbya* sp, na Praia dos Namorados (observação pessoal), um gênero comumente relatado como produtor de lipopolissacarídeos com alto efeito alergênico e que jamais tinha sido registrada ou observada no reservatório Salto Grande.

7 PLANO DE MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO COM VISTAS À BALNEABILIDADE.

Os programas de monitoramento contemplados nos diversos manuais sobre qualidade da água para fins recreacionais indicam que qualquer desenvolvimento em massa de cianobactérias pode representar um risco em potencial para a saúde, pois se estima que muitos metabólitos secundários ainda não identificados possam ser produzidos por estes organismos e podem ter impacto na saúde da população (CHORUS & CAVALIERI, 2000). Assim, o monitoramento deve ser endereçado primeiramente para avaliação das cianobactérias enquanto que a análise das cianotoxinas deve ser adequada em situações específicas. A inspeção visual, como atualmente realizada em monitoramentos de diversos órgãos ambientais, é uma prática que pode gerar resultados rápidos sobre a presença das florações, principalmente quando observadas mudanças de coloração, mas florações podem se dispersar ou se acumular em curtos períodos de tempo, além do que, populações metalimnéticas ou bentônicas podem ser subestimadas. Foi verificado no presente estudo que, mesmo não havendo observação de “escumas”, valores acima de 50.000 céls./mL foram encontrados, o que já restringiria o uso do corpo d’água para atividades de contato primário de acordo com o CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). Em uma abordagem preventiva é importante a avaliação das características físicas (morfometria e ventos) e químicas (nutrientes) de determinado corpo d’água e seu potencial para o desenvolvimento das florações. Idealmente, um programa para proteger a população dos efeitos nocivos da exposição às cianobactérias deve contemplar uma avaliação de risco, que é constituída pelas etapas de avaliação da exposição, identificação do perigo, avaliação dose-resposta e caracterização do risco. A avaliação da exposição pode auxiliar na fase preliminar do monitoramento quando vão

ser definidos os locais e as frequências de amostragem. A identificação do perigo pode ser resultante do monitoramento reativo quando já ocorreram episódios de florações ou efeitos adversos à saúde no local ou de um monitoramento preventivo, que pode ser sintetizado em 3 etapas principais:

1. Avaliação dos usos e da exposição;
2. Determinação da capacidade suporte do ambiente para o desenvolvimento das florações e inspeções visuais locais para detectar florações;
3. Avaliação quantitativa da biomassa para identificação do perigo quando florações podem ocorrer.

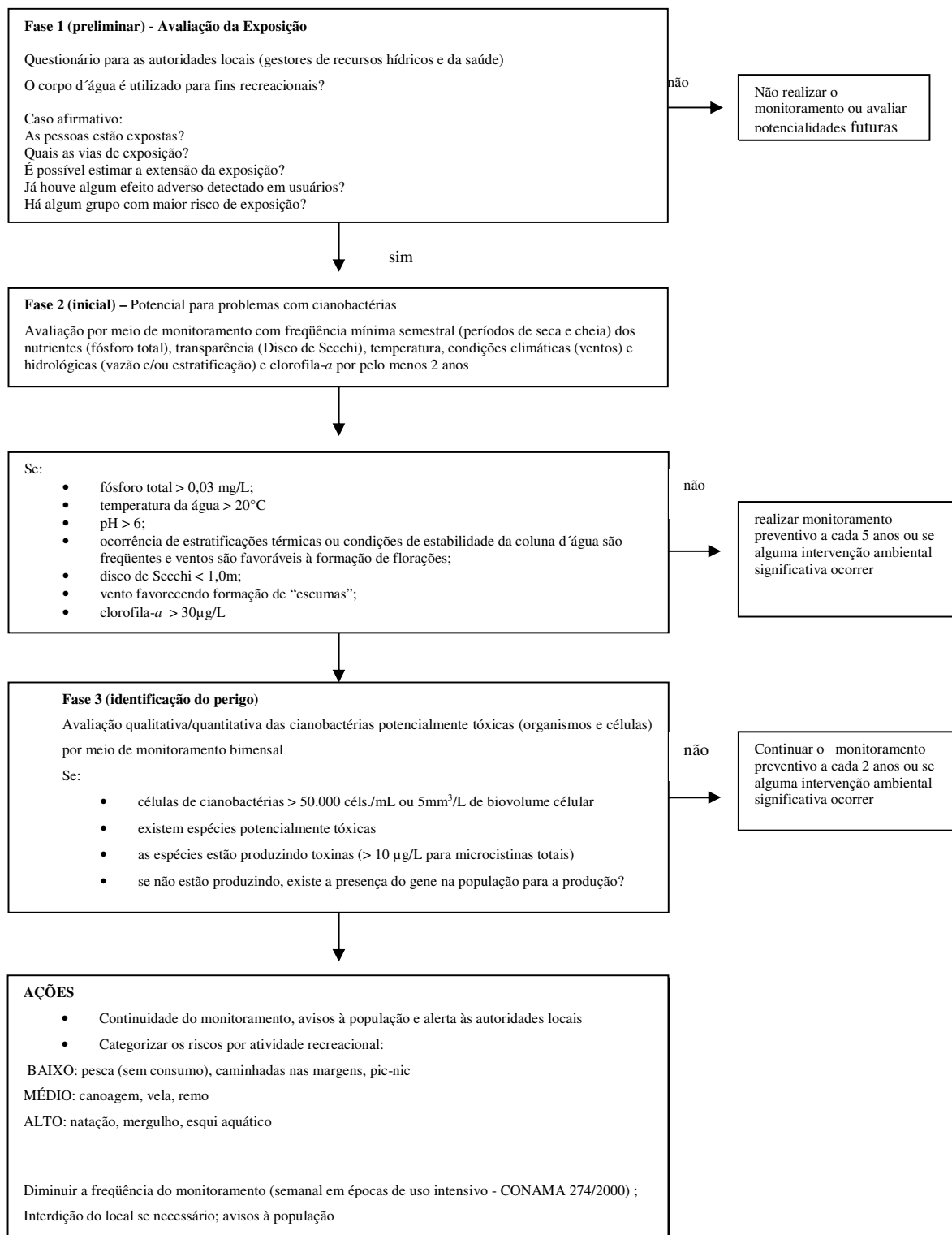
Análises complementares de toxicidade e concentração de toxinas devem sempre ser realizadas quando há indícios de efeitos adversos à saúde.

O planejamento amostral deve levar em conta a distribuição horizontal e vertical das cianobactérias condicionadas pelos fatores físicos (principalmente vento e morfometria) e químicos e a frequência do monitoramento deve se concentrar nos períodos de maior uso recreacional ou de acordo com o estabelecido em legislação pertinente. Os valores sugeridos para este plano de monitoramento foram derivados de bibliografias referenciadas neste trabalho e na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005); as frequências de amostragem bimensais são sugeridas a partir da rotina de monitoramento dos órgãos ambientais e o valor de cinco anos para o monitoramento preventivo foi baseado nos resultados do monitoramento da comunidade fitoplanctônica realizado pela Companhia de Tecnologia em Saneamento Ambiental - CETESB (CETESB, 2007) quando foi detectado que nos pontos amostrados não houve variações significativas ao longo deste período.

Estudos de dose-resposta têm sido realizados apenas para microcistinas, sendo que outras toxinas podem estar presentes e devem ser avaliadas quando gêneros produtores estão ocorrendo; porém, ainda não há limites a serem considerados. Os valores considerados nesta proposta para fins de balneabilidade para microcistinas totais foram originados de estudos toxicológicos (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) para uma exposição de curta duração (14

dias) à microcistina por ingestão em crianças. Para corpos de água doce, utilizados para fins recreacionais, não devem ser excedidos os valores de 10 µg/L de microcistinas totais (valor derivado da exposição em crianças, medido como microcistinas totais e que foram expressados como equivalentes de toxicidade para microcistina-LR) ou ≥ 50.000 céls./mL de *Microcystis aeruginosa* tóxica (conversão da concentração de microcistina para densidade de células de *Microcystis aeruginosa*, considerando 2×10^{-7} µg de microcistina total/célula, para o valor mais restritivo, que é para crianças) ou biovolume equivalente $\geq 4 \text{ mm}^3/\text{L}$ (biovolume aproximado equivalente a 50.000 céls./mL de *Microcystis aeruginosa*) para todas as cianobactérias quando um produtor de toxina é dominante. Os valores de células de cianobactérias nesta proposta referem-se aos valores do total de cianobactérias de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005). A estratégia descrita no “Guia para manejo de riscos em águas recreacionais” (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006) de coletar uma única amostra composta por 5 subamostras em um transecto de 20-30m numa profundidade de 50cm, deve ser adotada.

PLANO DE MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO COM VISTAS À BALNEABILIDADE



8 CONCLUSÕES

Em relação aos objetivos propostos quanto ao levantamento qualitativo e quantitativo das cianobactérias, sua ocorrência espacial e temporal nos pontos amostrados e relação com as variáveis ambientais, este estudo permitiu concluir:

- Existem variações ambientais sazonais definindo os meses de seca e cheia que influenciaram diferentemente algumas variáveis nas duas estações de coleta. Os resultados indicam que há diferentes características morfológicas e climáticas entre os locais amostrados, que devem ser levadas em conta na alocação de pontos de monitoramento.
- Os maiores valores de correlação entre as células de cianobactérias e os parâmetros ambientais foram obtidos para o NT nos dois pontos de coleta, o que é explicado pela dominância de cianobactérias não fixadoras de nitrogênio na maior parte das amostras. A disponibilidade deste nutriente pode ser um fator chave para suportar florações permanentes de espécies não fixadoras de nitrogênio como *Microcystis spp* no reservatório.
- Das variáveis físicas e químicas amostradas, o pH, NT e PT apresentaram, em algumas coletas, valores acima dos padrões de qualidade para as águas Classe 2, estabelecidos na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), indicando que o reservatório mantém sua condição de elevada trofia.

- Os valores de clorofila *a* para todas as coletas em todos os pontos amostrados, estiveram acima dos padrões de qualidade estabelecidos na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para a Classe 2 (30 µg/L), enquanto que o número de células de cianobactérias que estiveram próximas de 50.000 células/mL corresponderam a um mínimo de 64,45 µg/L de clorofila *a*. Este valor de número de células é o valor limite utilizado pelo Governo Australiano (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2006), acima do qual há probabilidade de efeitos adversos à saúde para a exposição de crianças às atividades recreacionais e é o valor máximo permitido para a Classe 2. Conclui-se que, o valor máximo permitido de clorofila *a* com vistas à proteção da saúde humana em atividades contempladas na Classe 2, poderia ser elevado para 60,0 µg/L desde que suportado por mais estudos em ambientes duciaquícolas brasileiros.
- Por meio da análise de ACP, pode-se observar que a legislação CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005), que contempla as análises de clorofila *a*, células de cianobactérias e PT para indicar a eutrofização, proteger as comunidades aquáticas e os usos pretendidos dos corpos d'água quanto à problemática das cianobactérias, está bem embasada nos estudos de campo, bastando apenas a recomendação da revisão para os valores da clorofila *a*.
- As cianobactérias estiveram presentes em todos os meses de coleta, representando mais de 50% da comunidade fitoplanctônica. As concentrações médias de células de cianobactérias estiveram acima dos padrões de qualidade para as águas Classe 2, estabelecidos na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) em 55% das amostras da Praia dos Namorados e 80% das amostras no Iate Clube. Células de *Microcystis spp* e espécies relacionadas como *Radiocystis fernandoi* e *Spaerocavum brasiliense* e a espécie acessória *Pseudanabaena mucicola* foram dominantes em todo o período da coleta. O gênero *Anabaena* foi abundante nos meses de agosto/2005 e dezembro/2005 no Iate Clube, que apresentaram concentrações mais elevadas de PT. Estas cianobactérias heterocitadas fixadoras de nitrogênio atmosférico podem ter uma vantagem competitiva em elevadas concentrações de fósforo e baixas concentrações de nitrogênio. Os gêneros *Microcystis spp* e *Anabaena* são potentes produtores de cianotoxinas.

- Dos treze táxons isolados, sete não haviam sido observados até então nas amostras ambientais e o isolamento de cepas de cianobactérias para estudos taxonômicos, moleculares e toxicológicos aumentou o conhecimento da biodiversidade do grupo no local.
- A diversidade das cianobactérias ainda é pouco conhecida na região e no país pois foram detectados nas amostras ambientais 12 táxons inéditos para o reservatório, mesmo com um grande número de estudos já realizados no local. É necessário aprofundar o conhecimento da ecologia e taxonomia das cianobactérias brasileiras para uma real avaliação do seu impacto nos ecossistemas e na saúde humana.

Quanto à ocorrência de microcistinas e o potencial de toxicidade na água bruta e isolados, foi possível concluir que:

- Existe a ocorrência de microcistinas no local, em concentrações acima dos limites recomendados de exposição para uso recreacional em crianças, que é 10 µg/L. A utilização do reservatório para fins de balneabilidade deve ser evitada até que monitoramentos sistemáticos sejam implementados.
- Os valores de microcistinas encontrados neste estudo foram abaixo dos valores esperados para as elevadas concentrações de clorofila-*a* e células de cianobactérias detectadas, conforme descrito em literatura. Há necessidade do aprofundamento dos estudos de caracterização de outras isoformas, que não a microcistina-LR e de eficiência das metodologias de extração de cianotoxinas em matrizes orgânicas.
- Espécies como *Sphaerocavum brasiliense*, que não apresentam resultados positivos para cianotoxinas em literatura, ocorreram em densidades elevadas nas coletas dos meses quentes e chuvosos e devem ser melhor avaliadas por meio de estudos moleculares para detectar a presença de genes responsáveis pela produção de cianotoxinas.

Quanto à geração de informações moleculares das cianobactérias do reservatório Salto Grande:

- Treze novas seqüências de rDNA 16S pertencentes a diferentes linhagens de cianobactérias representativas das Ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales foram geradas neste estudo. Vários gêneros e espécies ainda não haviam sido seqüenciados para o grupo das cianobactérias, contribuindo para a geração de informações moleculares inéditas.
- Na análise BLAST do rDNA 16S, isolados pertencentes a duas Ordens distintas, Chroococcales e Oscillatoriales estiveram agrupados, o que indica que eles não formam clados naturais e confirma a necessidade da revisão da sistemática das cianobactérias.
- Foi comum nas análises efetuadas dos isolados a presença de pelo menos um dos genes de NRPS e PKS, que são enzimas multifuncionais envolvidas na produção de metabólitos secundários como as microcistinas, confirmando que estes genes são freqüentes nas linhagens isoladas de cianobactérias brasileiras.
- A técnica de PCR e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados constituíram eficiente estratégia para a detecção de genes utilizados em estudos filogenéticos e toxicológicos neste grupo de organismos.
- Foram geradas informações genéticas inéditas de cianobactérias no reservatório Salto Grande, que aliadas às descrições e ilustrações completas, permitem um maior conhecimento do grupo, pois apenas descrições morfológicas precárias e listagem de espécies existiam nos trabalhos anteriores.
- A metodologia empregada neste estudo para a amplificação do gene *mycA* mostrou-se satisfatória e de fácil utilização para as amostras ambientais. Sendo assim, pode ser utilizada com freqüência para a avaliação do potencial de produção de microcistinas em monitoramentos voltados para a avaliação de risco de corpos d'água para usos

recreacionais ou de abastecimento.

Quanto à elaboração do Plano de Monitoramento:

- Os resultados deste trabalho, complementados com os estudos já publicados em manuais e na literatura científica, permitiram propor um “Plano de Monitoramento de Cianobactérias” para ecossistemas no Estado de São Paulo com vistas a Balneabilidade” que poderá ser implementado no Reservatório Salto Grande, em pontos mais freqüentados por banhistas e, também, em corpos d’água utilizados para recreação, especialmente de lagos e reservatórios em outras regiões do Estado. Uma vez implementado, este plano irá permitir aos gestores de recursos hídricos e de saúde pública desenvolverem ações para a remediação do reservatório e promoção e proteção da saúde da população usuária do local.
- A partir da análise das variáveis ambientais, toxicológicas e biológicas levantadas neste estudo, conclui-se que se fazem urgentes e necessárias medidas que contenham informações ao público sobre detecção visual do perigo e sintomas associados, pois os maiores riscos estão associados com a formação de “escumas” superficiais, principalmente quando gêneros como *Microcystis* e *Anabaena* predominam. O público deve ser informado sobre os diferentes graus de exposição e risco, de acordo com as atividades praticadas.

9 RECOMENDAÇÕES

Os resultados do presente estudo permitiram recomendar algumas ações com vistas à proteção da população em atividades recreacionais nas praias do reservatório Salto Grande e aumento do conhecimento das cianobactérias no local, que são apresentadas a seguir:

- Devem ser incrementados no local e no país, estudos para avaliar a variabilidade do conteúdo de toxinas ao longo do desenvolvimento das florações de cianobactérias e as características ambientais que favorecem a produção de microcistinas, o que permitirá elaborar predições quantitativas com segurança.
- Sendo que o NT mostrou-se um importante fator para a manutenção de florações de cianobactérias no reservatório, as distintas formas nitrogenadas devem ser avaliadas que poderão indicar suas diferentes origens. Medidas já implementadas como a construção de Estações de Tratamento de Efluentes no Rio Atibaia a montante, poderão surtir efeito na queda das concentrações de nitrogênio, mas outras fontes de efluentes lançadas em tributários, contaminação de tanques sépticos e escoamento superficial agrícola, podem ser significativas e devem ser investigadas.
- Medidas de controle da eutrofização para o reservatório Salto Grande são urgentes e necessárias e devem ser implementadas, conforme sugerido no Plano de Gerenciamento Integrado para a Remediação e Proteção dos Recursos Hídricos da Sub-Bacia do Atibaia com ênfase no Reservatório Salto Grande – Americana, dos Comitês dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí – CBH-PCJ.

- Este ambiente é caracterizado por um elevado grau de trofia, fazendo-se necessária a implementação de medidas preventivas internas e externas para o controle de florações, com prioridade para as porções do reservatório como enseadas, por exemplo, que abrigam clubes náuticos e praias. Tais medidas devem contemplar o controle dos nutrientes e avaliação do regime de operação do reservatório que possa influenciar nas condições hidrodinâmicas, como diminuição do tempo de residência e aumento do fluxo da água. Medidas corretivas como uso de aeradores ou misturas artificiais da coluna d'água e a utilização de barreiras mecânicas para isolamento das “escumas” devem ser avaliadas nos locais de intenso uso recreacional.
- Faz-se necessário um estudo da influência das macrófitas nas florações de cianobactérias e de como seu manejo pode auxiliar no controle das florações.
- Por ser a temperatura um parâmetro importante que favorece o crescimento de cianobactérias acima de 25 °C, e pelos maiores valores encontrados neste estudo e demais monitoramentos sistemáticos recentes no Rio Atibaia, este parâmetro deve ser avaliado em futuros estudos quanto à tendência a sua elevação, associado, provavelmente, aos efeitos das alterações climáticas globais.
- Recomenda-se a continuidade dos estudos em isolados nesse e nos demais reservatórios localizados em regiões tropicais do País, pois o conhecimento da diversidade das cianobactérias é extremamente relevante pela intensa produção de oligopeptídeos e metabólitos secundários com evidências de bioatividade ainda poucos estudados. Tais estudos devem contemplar uma abordagem multidisciplinar para gerar mais informações sobre a ecologia, fisiologia e diversidade genética deste grupo de organismos.
- Alguns gêneros e espécies estudados geneticamente neste trabalho apresentaram problemas em relação a sua posição taxonômica e devem ter suas espécies revistas dentro de uma abordagem polifásica como o gênero *Leptolyngbya* que apresenta muitas espécies

descritas baseadas em critérios morfológicos e de habitat. Algumas linhagens morfológicamente distintas apresentaram identidade alta como resultado da análise filogenética.

- Foi significativa a presença de cianobactérias picoplanctônicas, isoladas neste estudo e observadas nas amostras ambientais. Recomenda-se que sejam aprofundados os estudos taxonômicos, moleculares, toxicológicos e ecológicos para a avaliação de seu real papel na comunidade fitoplanctônica em ecossistemas aquáticos continentais hipereutrofizados. Gêneros de hábitos diferentes como *Aphanothece* (colonial) e *Synechococcus* (unicelular) foram agrupados no mesmo clado nas análises filogenéticas. Há sugestões em literatura para o aprofundamento dos estudos polifásicos para obter informações sobre o comportamento de células únicas ou indivíduos coloniais para este agrupamento.
- Neste momento de mudanças e definições na taxonomia e sistemática das cianobactérias, especialmente com relação à definição da categoria “espécie” para o grupo, recomenda-se a execução de projetos integrados multidisciplinares, envolvendo taxonomistas, biólogos moleculares e ecólogos para aumentar o conhecimento da diversidade de cianobactérias em regiões tropicais e definir seus ecotipos (populações procarióticas que são geneticamente coesivas mas ecologicamente distintas) que subsidiem estudos ecológicos, fisiológicos e de monitoramento.
- Recomenda-se que estudos sejam realizados para avaliar problemas metodológicos de extração de cianotoxinas em matrizes orgânicas, verificar condições ambientais que possam influenciar na produção e degradação das microcistinas e análise em CLAE para outras isoformas que não a microcistina –LR. É importante que sejam feitos mais estudos de tipologia de lagos e reservatórios no Estado de São Paulo e no Brasil com este enfoque, para confirmação de valores que possam ser utilizados no gerenciamento de riscos.
- Foram encontrados diversos gêneros de cianobactérias no Reservatório Salto Grande, como apresentado neste e demais trabalhos realizados no local, que podem produzir outras toxinas, que não as microcistinas, indicando a necessidade de avaliar outras

ciatoxinas, qualitativamente e quantitativamente, especialmente àquelas que representam riscos à saúde em relação aos aspectos da balneabilidade.

- Recomenda-se um aprofundamento dos estudos moleculares em locais que apresentam baixas concentrações de microcistinas ou sua ausência e que apresentem número significativo de células de cianobactérias para avaliação da sensibilidade do método.
- Deve haver continuidade dos trabalhos de validação de métodos moleculares quantitativos, por serem mais precisos, demandarem menos tempo e permitem respostas mais rápidas e das investigações moleculares para aperfeiçoar a detecção precoce do potencial de produção de cianotoxinas e identificação rápida de um maior número de espécies/linhagens no ambiente.
- As concentrações de clorofila *a* sempre estiveram acima do valor máximo permitido para a Classe 2 da Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) e, neste caso, recomenda-se que apenas as células de cianobactérias sejam monitoradas na avaliação do risco à saúde humana para atividades recreacionais neste ambiente.
- Populações bentônicas e metalimnéticas devem ser monitoradas e seu potencial de produção de cianotoxinas avaliado, principalmente pela observação no local de intensa proliferação de *Lyngbya* sp de hábito bentônico na Praia dos Namorados, um gênero comumente relatado como produtor de lipopolissacarídeos de efeito alergênico.
- Como parte das atividades de lazer no reservatório, a pesca ocupa local de destaque e a presença de microcistinas em músculos e vísceras do pescado devem ser avaliados quando os valores de células de cianobactérias estiveram acima de 20.000 céls./mL de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para a Classe 2, que permite atividade de pesca e piscicultura (apenas para os meses de fevereiro/2006 na Praia dos Namorados e dezembro/2005 no Iate Clube o número médio de células de cianobactérias esteve abaixo deste valor).

- Existe a ocorrência de cianotoxinas no local, em concentrações acima dos limites de exposição propostos em literatura para uso recreacional. Como a utilização do reservatório para fins de balneabilidade foi constatada durante as observações de campo, estudos epidemiológicos devem ser realizados, não apenas neste local, mas em outros reservatórios com potencialidade para a ocorrência deste quadro, a fim de avaliar o risco de exposição para atividades recreacionais. Deve-se utilizar metodologias que levem em conta o fato de que muitos banhistas que freqüentam o local são oriundos de outros municípios da região ou freqüentam locais de maior poder aquisitivo, como clubes náuticos e, possivelmente não procurarão a rede pública para atendimento médico. Os estudos devem ser realizados por meio de questionários com posterior contato telefônico ou eletrônico. Um treinamento específico para os profissionais da saúde em locais onde a atividade recreacional em lagos e reservatórios têm significativa importância se faz necessário, bem como a divulgação dos diagnósticos, para que se inicie a elaboração de um banco de informações disponíveis ao público. Funcionários de clubes recreativos, quiosques e lanchonetes, localizados nas margens do reservatório, devem ser alertados quanto ao risco de exposição as cianobactérias em atividades ocupacionais.
- Há necessidade de revisão da Resolução CONAMA 274/2000 (BRASIL, 2000) para inserir nos critérios para classificação de águas destinadas à recreação de contato primário, o monitoramento das células de cianobactérias voltado para a avaliação de risco à saúde humana, que deverá estar associado, também, com o monitoramento das cianotoxinas, quando potencialmente presentes. A simples inspeção visual não garante que, quando o número de células de cianobactérias está acima dos limites para a Classe 2 da Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) são observadas mudanças de cor ou formação de “escumas”. Mesmo sendo exigidas a avaliação de células de cianobactérias e clorofila *a* na Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) para a definição das classes de uso, não há indicação da implementação de pontos de monitoramento sistemático nem freqüências para avaliar clorofila *a* e células de cianobactérias e suas toxinas.
- Há necessidade do desenvolvimento e validação de novas metodologias para diagnóstico

das cianobactérias e cianotoxinas a serem aplicados no monitoramento como, por exemplo, PCR quantitativo (RT/PCR) que possam de maneira rápida e precisa avaliar as cianobactérias e cianotoxinas, para que a população possa ter estes resultados com maior rapidez e segurança, evitando os riscos da exposição.

- Deve ser verificada a potencialidade turística de novos locais no reservatório Salto Grande onde as condições morfométricas e climáticas, especialmente ventos não favoreçam o acúmulo de “escumas” de cianobactérias, com uma gestão responsável do poder público para a desocupação irregular das áreas de proteção permanente que poderão ser adequadamente manejadas e disponibilizadas ao público para o lazer.
- Sugere-se que as autoridades gestoras dos recursos hídricos e de saúde pública implementem o Plano de Monitoramento de Cianobactérias em Ecossistemas no Estado de São Paulo com vistas à Balneabilidade elaborado neste trabalho que permitirão a elaboração de Planos de Ação Local – PAL para controle e prevenção dos riscos associados às cianobactérias. Estas ações devem contemplar no mínimo, 1) a avaliação das ocorrências no espaço e no tempo das florações, 2) sua toxicidade 3) medidas de controle a serem implementadas para diminuir o número de células e toxinas sem efeitos negativos ao ambiente, 4) comunicação dos riscos à população e 5) treinamento dos gestores para o enfrentamento desta problemática.

10 REFERÊNCIAS

AGUIARO, F. L.; ISAAC, R. L.. Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nas Bacias dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí – Estado de São Paulo, Brasil e avaliação dos mananciais em relação à eutrofização. In: 22º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2003, Joinville. **Anais.**: ABES, 2003. 1 CD-ROM.

ALLEN, M.B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **J. Phycol.**, v.4, p. 1-4, 1968.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, p. 403-410, 1990.

AME,V.M.; DIAZ, M.P.; WUNDERLIN, D.A.Occurrence of Toxic Cyanobacterial Blooms in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina): A field and chemometric study. **Environ. Toxicol.** v.18, p.192-201, 2003.

ANAGNOSTIDIS, K; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 – Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v.38/39, p.291-302, 1985.

_____. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 – Oscillatoriales. **Algological Studies**, Stuttgart, v.50/53, p.327-472, 1988.

_____. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5 – Stigonematales. **Algological Studies**, Stuttgart, v.59, p.1-73, 1990.

ANJOS, F. M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.D. ; ZAJAC, M. P.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B. ; ERLER, K. ; LUCKAS, B. ; PINTO, E.. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, Netherlands, v. 48, n. 3, p. 239-245, 2006.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater**. 20. ed. APHA, Washington, 1998, 1137 p.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias: Causas e conseqüências para a saúde pública. **Medicina On Line**, v.1, n. 3, p.1-19, 1998.

AZEVEDO, S. M. F. O. & CARMOUZE, J. P. Uné mortalité de poissons dans une lagune tropicale (Brésil) durant une période de dominance de Cyanophyceae. **Ver. Hydrobiol. Trop.**, v.27, n.3, p.265-272, 1994.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v.181-182, p. 441-446, 2002.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Guidelines for Managing Risks in Recreational Water. 2006. 219p. Disponível em: <http://www.nhmrc.gov.au/consult/_files/ACF227.pdf>. Acesso em: 22 de março de 2007.

BAKER, P.D.; & HUMPAGE, A.R. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling Basin, Australia. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v.45(5), p.773 – 786, 1994.

BAKER, J. A.; NEILAN, B. A.; ENTSCH, B.; MCKAY, D. B. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. **Inc. Environ. Toxicol.** v.16, p. 472-482, 2001.

BAKER, J.A.; ENTSCH, B.; NEILAN, B.A.; MCKAY, D.B. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.6070-6076, 2002.

BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B.; MÜLLER, R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* Soce 90. **Biochimica et Biophysica Acta. Amstredam**, v. 1445, p. 185-195. 1999.

BICUDO, C.E.M. & MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima. p.489, 2005.

BIMBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.7, p.1513-1523, 1979.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M.C.; BOLSCH, C.J.S. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). **J. Phycology**, v.37, n.5, p.810-818, 2001.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with *mycB* , molecular marker. **Harmful Algae**, v.2, p.51-60, 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOURA, A.N.; GOUVÊA-BARROS, S.; PINTO, E. HIP₁ DNA fingerprinting in *Microcystis panniformis* (Chroococcales, Cyanobacteria). **Phycologia**, v.46, n.1, p.3-9. 2007a.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MASSOLA, N. S.; HERNANDEZ-MARINE, M.; ROMO, S.; MOURA, A.N. Taxonomic investigations using DNA fingerprinting in *Geitlerinema*

species (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **Phycological Research**, v.55, n.3, p. 214-221. 2007b.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2^a ed. New York: Springer-Verlag, 2001. 721 p.

BÖTTCHER, G.; CHORUS, I.; EWALD, S; HINTZE, T.; WALZ, N.. Light limited growth and microcystin content of *Planktothrix agardhii* and *Microcystis aeruginosa* in turbidostats, p. 115-133. In I. Chorus (ed.), **Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences**. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. 2001.

BOTHWELL, M.L.; LOWE, R.L. **Algal ecology: freshwater bentic ecosystems**. San Diego: Academic Press, cap.3, p.31-56, 1996.

BRANCO, L.H.; NECCHI, O.; BRANCO, C. Ecological distribution of cyanophyceae in lotic ecosystems of São Paulo State. **Revta Brasil. Bot.**, São Paulo, v.24, n.1, p.99-108, 2001.

BRASIL. Resolução CONAMA N° 274, 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jan. 2001. Seção 1, p. 266-270.

BRASIL. Portaria N° 518, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p.70.

BRASIL. Resolução CONAMA N° 357, 17 de março de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Portaria MS/GM No. 67, 30 de março de 2006. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 mar.. 2006. Seção 1, p. 138

CARMICHAEL, W.W. Health effect of toxin-producing cyanobacteria: The Cyano HAB. **Human Ecol. Risk Assess.** v.7, p.1393-1407. 2001.

CASTIGLIONI, B.; RIZZI, E.; FROSINI, A.; SIVONEN, K.; RAJANIEMI, P.; RANTALA, A.; MUGNAI, M. A.; VENTURA, S.; WILMOTTE, A.; BOUTTE, C.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, P.; CONSOLANDI, C.; BORDONI, R.; MEZZELANI, A.; BATTAGLIA, C.; DE BELLIS, G. Development of a Universal Microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p.7161-7172, 2004.

CBH-PCJ. **Situação dos Recursos Hídricos das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí – UGRH 5.** Relatório Técnico Final (Relatório Zero), 2000. p. Disponível em <http://www.comitepcj.sp.gov.br>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

CBH-PCJ. Plano de Bacia Hidrográfica 2000-2003. Relatório Técnico Final- Fase 3. 2001. p. Disponível em <http://www.comitepcj.sp.gov.br>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

CBH-PCJ. Relatório de Situação dos Recursos Hídricos das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí – 2002/2003. Relatório Final (Relatório Um), volumes 1-4. IRRIGART, São Paulo. 2004a. p. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

CBH-PCJ. Plano de Bacias Hidrográficas 2004-2007, 2004b. p. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

CETESB. **Guia de coleta e preservação de amostras de água.** 1 ed. São Paulo: CETESB, 1987. 150p.

CETESB. **Fitoplâncton de Água Doce. Métodos Qualitativo e Quantitativo.** Norma Técnica CETESB L5.303. São Paulo: CETESB, 2005. 23p.

CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2005**. Série Relatórios, São Paulo, CETESB, 2006. p.327. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 25 de junho de 2007.

CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo 2005**. Série Relatórios, São Paulo, CETESB, 2007. p.4. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2007.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health. Consequences, Monitoring and Management**. 1. ed. London: E&FN Spon, 1999. 416 p.

CHORUS, I & CAVALIERI, M. Cyanobacteria and Algae. In CHORUS, J. & REES, G. **Monitoring Bathing Waters. A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes**. 1 ed. Londres: E& FN Spon, 2000. p.205-258.

CHORUS I (Ed). **Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences**. Berlin: Springer Verlag., 2001. 330p.

CODD, G.A.M.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.203, p. 264-272, 2005a.

CODD, G.A.; AZEVEDO, S.M.F.O. BAGCHI, S.N.; BURCH, M.D.; CARMICHAEL, W.W; HARDING, W.R.; KAYA, K.; UTKILEN, H.C. CYANONET. A global Network for cyanobacterial bloom and toxin risk management. Initial situation assessment and recommendations. **UNESCO. International Hydrological Programme. IHP-VI. Technical Documents in Hydrology**. N. 76, UNESCO, Paris. 2005b.138 p.

COSTA, I.A.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; SENNA, P.A.C.; BERNARDO, R.R.; COSTA, S.M.; CHELLAPPA, N.T. The occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a

Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian Journal of Biology**. v.66, p. 211-219. 2006

COSTA, M.N. **Ocorrência de Microcystis (Cianoprokariote, Cyanophyceae) no período de chuvas no reservatório Salto Grande (Americana, SP) e variáveis físicas e químicas**. 1988. 98f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.

COX P.A., BANACK S.A., MURCH S.J., RASMUSSEN U., TIEN G., BIDIGARE R.R., METCALF J.S., MORRISON L.F., CODD G.A., BERGMAN B. Diverse taxa of cyanobacteria produce B-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. **Proc Natl Acad Sci U S A** v.102, p.5074–5078, 2005.

CHRISTIANSEN, G. FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. **Journal of Bacteriology**. v. 185, p. 564-572. 2003.

CRONBERG, G.; ANNADOTTER, H. Manual on aquatic cyanobacteria. A photo guide and synopsis of their toxicology. **UNESCO. Intergovernmental Oceanographic Commission. ISSHA.** , 2007. 106p.

DEBERDT, G. L. B. **Estudo de cianobactérias em reservatório com elevado grau de trofia (Reservatório Salto Grande – Americana – SP)**. 2002. 207f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Molecular Microbiology**. v.26, p.779-787, 1997.

DITTMANN, E., BÖRNER, T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment - lessons from biosynthesis genes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.203, p. 192-200, 2005.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 50, p. 7-17, 2006.

DIETRICH, P. & HOEGER, S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.203, p. 273-289, 2005.

DOKULIL, MT. & TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiology**. v. 438, p.1-12, 2000.

ENVIRONMENTAL HEALTH UNIT. **Environmental Health Assessment Guidelines: Cyanobacteria in Recreational and Drinking Waters**. Queensland Health. Queensland Government. Brisbane. 2001. Disponível em: <<http://www.health.qld.gov.au/phs/Documents/ehu/11870.pdf>>. Acesso em: 20 de abril de 2006.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; FARIA, O.B.; LEITE, M.A. Reservatório Salto Grande: Uma caracterização geral do sistema. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004a. cap. 1, p 1-17.

ESPINDOLA, E.V.; ROCHA, O.; RIETZLER. A.C. Caracterização Limnológica do Reservatório de Salto Grande (Americana, SP); Uma análise espacial e temporal. In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; LEITE, M.A.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, Impactos e Propostas de Manejo**. 1 ed. São Carlos: Rima, 2004b. cap. 3, p 37-54.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 575p

ETCHEGARAY, A. Biossíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. p.393-419, 1998.

ETCHEGARAY, A.; SILVA-STENICO, M.E.; MOON, D.H.; TSAI, S.M. In silico analysis of nonribosomal peptide synthetases of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: identification of putative siderophore and lipopeptide biosynthetic genes. **Microbiological Research**, v.159, p.425-437, 2004.

EWING, B; GREEN, P. Base-calling of automated sequences traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** v.8 n.3, p.186 -196, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequences traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.** v.8. n.3, p. 175-185, 1998.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP Phylogeny Inference Package, version 3.5c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.

FIGLIORE, M. F., MOON D. H., TSAI S. M., LEE, H. TREVORS, J. T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **J. Microbiol. Methods**, v.39, p.159-169, 2000.

FIGLIORE, M. F. ; NEILAN, B. A. ; COPP, J. N. ; RODRIGUES, J. L. M. ; TSAI, S.M. ; LEE, H. ; TREVORS, J. T. . Caracterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**, Amsterdam, v.39, n.20, p.5017-5026, 2005.

FIGLIORE, M. F. ; SANT'ÁNNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, v.43, n.4, p. 789-798, 2007.

FRANK, C.A. Microcystin producing cyanobacteria in recreational waters in Southwestern Germany. **Environ. Toxicol.** v.17, p.361-366, 2002.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research.** v.8. n.3, p. 195-202, 1998.

GRAHAM L.AND WILCOX L. **Algae**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2000. 415p.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Algological Studies** 117, p. 95-115. 2005.

HONDA, R. H. **Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp (Cyanobacteria/Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo.** 2005. 75f. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Instituto de Botânica, Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo, 2005.

HONDA, R.Y.; MERCANTE, C.T.J; VIEIRA, J.M.S; ESTEVES, K.E.; CABIANCA, M.A.A. AZEVEDO, M.T.P. Cianotoxinas em Pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo. In: ESTEVES, K. E. & SANT'ÁNNA, C.L.. **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. Um estudo na Região Metropolitana de São Paulo.** 1 ed. São Carlos: Rima, 2006. cap. 8, p 105-20.

HUSZAR, V.L.; SILVA, L.H.S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P. SANT'ANNA, C.L.. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. **Hidrobiologia**, v.424, p.67-77, 2000.

IRRIGART. Plano de Gerenciamento Integrado para a Remediação e Proteção dos Recursos Hídricos da Sub-bacia do Atibaia com Ênfase no Reservatório de Salto Grande – Americana- SP. Piracicaba. 2006. 1 CD-ROM.

ISHIDA, T., YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. **Journal of General and Applied Microbiology**. v.43, p.237-241, 1997.

ISHIDA, T.; WATANABE, M.M.; SUGIYAMA, J. YOKOTA, A. Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**. v.201, p.79-82, 2001.

ISO /DIS 20179. **Water quality. Determination of microcystins. Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection**. 1 ed., p.17. 2005.

JARDIM, F.A.; FONSECA, Y.M.F.; VIANNA, L.N.L., AZEVEDO, S.M.F.O.; CISCOTTO, P.H.C. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA – Minas Gerais – Brasil. **Bios, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas Gerais**. v. 9, p. 83-91. 2001.

JEZBEROVÁ, J.; SOLDATI, E.; MUGNAI, M.A.; VENTURA, S. Genetic and phenotypic diversity of picocyanobacteria in reservoirs of higher trophic level. (2007) In: 17th SYMPOSIUM OF INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CYANOPHYTE RESEARCH. SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO., 2007, Mérida. **Resumos**. Mérida: México , IAC.2007.p. 37.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL W.W.; AN, J.S.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO, D.A.; FILHO, T.M.; LYRA, V.S.T. BARRETO, AZEVEDO S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death following exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, **New Engl. J. Med**. v. 338 (13), p.873–878, 1998.

KAEBERNICK, M.; DITTMANN, E.; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. Multiple alternative transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.449-455, 2002.

KOMÁREK, J. Problems in cyanobacterial taxonomy: implication for most common toxin producing species. In MELCHIORRE, S.; VIAGGIU, E.; BRUNO, M. **WORKSHOP LE FIORITURE DI ALGHE TOSSICHE NELLE ACQUE DOLCI: EMERGENZA SANITARIA E MISURE DI CONTROLLO**, 2000. Roma, p.6-43, 2000.

KOMÁREK, J. Problem of the taxonomy category "species" in cyanobacteria. **Algological Studies**. v.109, p.281-297, 2003.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. **Archiv für Hydrobiologie**, v.56, p.247-354, 1989. Supplement, 823.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil Chroococcales. In: H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer (eds.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**, Band 19/1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. p. 548. 1999.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil Oscillatoriales. In: B. Büdel, G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl (eds.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**, Band 19/2. Elsevier GmbH, Munique. p. 759. 2005.

KOMÁREK J., AZEVEDO S. M. F. O., DOMINGOS P., KOMÁREKOVÁ J., TICHÝ M.: Background of the Caruaru tragedy: a case taxonomic study of toxic cyanobacteria.. **Arch. Hydrobiol.-Algolog. Studies** (papers Cyanobact. Res. 2) v.103. p.9-29, 2001.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D. AZEVEDO, S.M.F.O.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater

cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373. 1999.

LAWTON, L.A. & COOD, G.A. Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins and their Significance in UK and European Waters. **J. Inst. Wat. Environ. Management**, v.5, p.460-465, 1991.

LORENZI, A.S. **Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil**. 2004. f. 92. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

LUDWIG, W.; STRUNK, O; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, v.19, p.554-568, 1998.

MAGALHÃES V.F., SOARES RM, AZEVEDO S.M.F.O. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. **Toxicon**. v.39, p.1077-85, 2001

MAGALHÃES, V.F., MARINHO, M.M., DOMINGOS, P., OLIVEIRA, A.C., COSTA, S.M., AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M.F.O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay, Brasil, RJ. **Toxicon** v.42, p. 289-295, 2003.

MAIDAK, B. L., COLE, J.R., PARKER, C.T., GARRITY, G.M., LARSEN, N., LI, B., LILBURN, T.G.,MCCAUGHEY, M.J., OLSEN, G. J., OVERBEEK, R., S. PRAMANIK, SCHMIDT, T.M., TIEDJE, J.M.; WOESE, C.R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Res.** v. 27, p.171-173, 1999.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, v.97, p.2651-2673, 1997.

MARINO, L.; RIVELINO V. K. O.; SZAJUBOK, A. L.; SAWADA, C. E.; MELCHER, S. S. Ocorrência de *Microcystis sp* e microcistina na represa Rio Grande, São Paulo, Brasil. In: SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO SOBRE CIANOACTÉRIAS TÓXICAS, QUALIDADE DA ÁGUA E SAÚDE PÚBLICA, 1., 2001, Rio de Janeiro. **Resumos**. Brasília: MS/FUNASA, 2001. p. 16.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J.S.; CODD, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 361-376, 1999.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. **FEMS Microbiology Letters**, v.196, p.207-214, 2001.

MOFFITT M.C., NEILAN B.A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70(11), p.6353–6362, 2004.

MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.M.F.O. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v. 41, p. 606-611, 2002.

MORENO, I; REPETTO, G.; CARBALLA, E.; GAGO, A; CAMEÁN, A.M. Cyanobacteria and microcystins occurrence in the Guadiana River (SW Spain). **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v.85, n° 7, p.461-474, 2005.

MURAKAMI, E. A.; AZEVEDO, S. M. F. O.; CIESLINSK, A. H.; BRANDÃO, C. S. S.; SILVER, L. D. Prevalência de cianobactéria em água bruta de abastecimento em 17 estados brasileiros. In: SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO SOBRE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS, QUALIDADE DA ÁGUA E SAÚDE PÚBLICA, 1., 2001, Rio de Janeiro. **Resumos**. Brasília: MS/FUNASA, 2001. p. 10.

NEILAN, B.A.; DITTMANN, E.; ROUHIAINEN, L.; BASS, R. A., SCHAUB, V.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxigenicity of Cyanobacteria. **J. Bacteriol.**, v.181, p. 4089-4097, 1999.

NELISSEN, B.; BAERE, R.; WILMOTTE, A.; WACHTER, R. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *Journal of Molecular Evolution*. v. 42. p. 327-398. 1999.

NISHIZAWA, T.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; SHIRAI, M. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v126, p.520-529, 1999.

NONNEMAN, D.; ZIMBA, P.V. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. **Journal of Phycology**, v.38, p.230-233, 2002.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll-a and phaeopigments determination. **Arch. für Hydrobiol.**, v.14, p.14-36, 1980.

ODEBRECHT, C.; AZEVEDO, S.M.F.O.; GARCIA, V.M.T.; HUSZAR, V.L.M.; MAGALHÃES, V.F.; MENEZES, M.; PROENÇA, L.A.O.; RÖRIG, L.R.; TENENBAUM, D.R.; VILLAC, M.C.; YUNES, J.S. **Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos em curso**. In **Floraciones algales nocivas en el cono sur americano**. SAR, E.A.; FERRARIO, M.E.; REGUERA, B. EDS. Madrid: Instituto Español de Oceanografía., 2002. p. 219-233.

OLIVER, R.L. & GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.149-194.

OUTSUKA, S.; SUDA, S.; SHIBATA, S.; OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M.M. A proposal for the unification of five species of cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.873-879. 2001.

OUAHID, Y.; PEREZ-SILVA, G.; del CAMPO, F.F. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. **Environmental Toxicology**, v.20, p. 235-42, 2005.

PALINSKA, K. A .& GOLUBIC, S. Molecular and morphological approaches to study natural populations of cyanobacteria. (2007) In: 17th SYMPOSIUM OF INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CYANOPHYTE RESEARCH. SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO., 2007, Mérida. **Resumos**. Mérida: México , IAC.2007.p. 32.

PAN, H.; SONG, L.; LIU, Y.; BÖRNER, T. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. **Archives of Microbiology**, v.178, p.421-427, 2002.

PILOTTO LS, DOUGLAS RM, BURCH MD, CAMERON S, BEERS M, ROUCH GR. Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) due to recreational water-related activities. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, v.21, p.562–566, 1997.

PILOTTO L, HOBSON P, BURCH MD, RANMUTHUGALA G, ATTEWELL R, WEIGHTMAN W. Acute skin irritant effects of cyanobacteria (blue-green algae) in healthy volunteers. **Aust N Z J Public Health**., v.28(3), p.220-4, .2004

POINTING, S.B.; WARREN-RHODES, K.A.; LACAP, D.C.; RHODES, K.L.; MCKAY, C.P. Hypolithic community shifts occur as result of liquid water availability along

environmental gradients in China's hot and cold hyperarid deserts. **Environ. Microbiol.** v.9, p.414-424, 2007.

QUEENSLAND GOVERNMENT. Cyanobacteria in Recreational and Drinking Waters. 2001. Disponível em: <<http://www.health.qld.gov.au/phs/Documents/ehu/11870.pdf>>. Acesso em: 03 de outubro de 2006.

RANTALA, A.; FEWER, D.P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VAITOMAA, J. BÖRNER, T.; SIVONEN, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.568-573, 2004.

RINTA-KANTO, J.; WILHELM, S.W. Diversity of microcystin-producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.5083-5085, 2006.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.686-692, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F & MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**. v.71, p. 359-385, 2000.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P; SENNA, P.A.C.; KOMÁREK, J; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasil. Biol.**, v.27, n.2, p.213-227, 2003.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUIARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Plancônicas de Águas Continentais Brasileiras**. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2006. 58p.

SANT'ANNA, C.L.; MELCHER, S.S.; CARVALHO, M.C.; GEMELGO, M.P.; AZEVEDO, M.T.P. Planktic Cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v.3, n.1, p.1-17, 2007.

SCHATZ, D.; KEREN, Y.; VARDI, A.; SUKENIK, A.; CARMELI, S.; BÖRNER, T.; DITTMAN, E. KAPLAN, A. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. **Environmental Microbiology**, v.9(4), p. 965-970, 2007.

SCOTTISH EXECUTIVE. Blue-Green Algae (Cyanobacteria) in Inland Waters Assessment and Control of Risks to Public Health. 2002 Disponível em: <<http://www.scotland.gov.uk/Publications/2002/05/14852/5339>>. 2006. Acesso em: 03 de outubro de 2006.

SHEPERD, G.J. FITOPAC 1.6, Campinas, UNICAMP. Departamento de Botânica, 2006.

SILVA, L.M. Monitoramento de Cianobactérias no Estuário e Costa Adjacente à Lagoa dos Patos - Rio Grande RS: avaliação preliminar dos riscos à balneabilidade. 2005. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Biológica - Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 116p. 2005.

SILVA, C .S. P. Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais. (Dissertação de Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, Universidade de São Paulo, 2006.

SILVA-ESTÊNICO, M.E.; CANTÚSIO NETO, R. Otimização da Extração de microcistinas. 12º ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDOS NO CENA/USP. **Resumos**. 2006

SIHVONEN, L.M.; LYRA, C.; FEWER D.P.; RAJANIEMI-WACKLIN, P.; LEHTIMÄKI J.M.; WAHLSTEN, M. SIVONEN, K. Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.61, p.74-84, 2007.

SIVONEN, K.; NIEMELA, S.I.; NIEMI, R.M.; LEPISTO, L.; LUOMA, T.H. & RASAMEN, L.A. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. **Hydrobiologia**, v.190, p.267-275, 1990.

SIVONEN, K. & JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health. Consequences, Monitoring and Management**. 1. ed. Londres: E&FN Spon, 1999. cap. 3, p. 370-405.

SOARES, R.M.; MAGALHÃES, V.D.; AZEVEDO, S.M.F.O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**. v.70, p. 1-10, 2004.

SOUZA, R.C. R. **Dinâmica espaço-temporal da comunidade fitoplanctônica de um reservatório hipereutrófico: Salto Grande, Americana, São Paulo**. 2000. 159f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2000.

SPERANDIO, A.M.G. **Gestão ambiental: estratégias para o desenvolvimento saudável e sustentável de um município**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. v. 2.

STACKBRANDT, P.H.A.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.

International. **Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.846-849, 1994.

STEWART, I. **Recreational exposure to freshwater cyanobacteria:epidemiology, dermal toxicity and biological activity of cyanobacterial lypopolysaccharides**. 2004. 418f. Tese (Doctor of Philosophy). University of Queensland, Australia, 2004.

STEWART, I.; WEBB, P.M.; SCHLUTER, P.J.; SHAW, G. **Recreational and occupational field exposure to freshwater cyanobacteria – review of anecdotal and case reports, epidemiological studies and the challenges for epidemiological assessment**. Environmental HEALTH: a Global Access Science Source v.5, 13p. 2006 Disponível em: <<http://www.ehjournal.net/content/5/1/6>>. Acesso em: 03 de outubro de 2006.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA,M.C.; CARVALHO, V.L.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bull Pan AM Health Organ.**, v.27 (93), p. 244-53, 1993.

THURET, G. Essai de classification des Nostochiness. **Annales des Sciences Naturelles – Botanique**, Paris, v.6, p.372-382, 1875.

TILLET , D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; von DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, B. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chem. Biol.**, v.7, p. 753-764, 2000.

TILLET, D. PARKER, D. I.; NEILAN, B. A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (mcyA) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p. 2810-2818, 2001.

TONISSI, R.M.T.; LIMA, R.T; NISHIKAWA, D; ESPINDOLA, E.L.G.; OLIVEIRA, H.T.Percepção Ambiental da População Usuária do Reservatório de Salto Grande (Americana,

SP). In: ESPINDOLA, E.G.; LEITE, A ., M.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo): caracterização, impactos e propostas de manejo**. São Carlos: RIMA. p.359-377, 2004.

TUCCI, A.; DEBERDT, G.L.B.; DEBERDT, A . J. Análise da Comunidade de Fitoplâncton do Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): uma revisão dos estudos desenvolvidos em um sistema eutrófico. In: ESPINDOLA, E.G.; LEITE, A ., M.; DORNFELD, C.B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo): caracterização, impactos e propostas de manejo**. São Carlos: RIMA. p.107-153, 2004.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.M.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, p.327-338, 1999.

VAITOMAA, J.; RANTALA, A.; HALINEN, K.; ROUHIAINEN, L.; TALLBERG, P.; MOKELKE, L.; SIVONEN, K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.7289-7297, 2003.

VASCONCELOS, V.M. Toxicity of cyanobacteria (blue-green algae) in portuguese freshwater. **Arch. Hidrobiol.**, v.130, p.439-451, 1994.

VIEIRA, J. M. S. **Toxicidade de cianobactérias e concentração de microcistinas em uma represa de abastecimento público da região amazônica do Brasil**. 2002. 147f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

VIEIRA, J. M. S., AZEVEDO, M. T. P., AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v.42, p.709–713, 2003.

VON DÖHREN, H., KELLER, U., VATER, J. & ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chem. Rev.**, v. 97, 2675–2705, 1997.

YUNES, J. S., SALOMON, P. S., MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K. A., RAGGETT, S. L. & CODD, G. A. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. **J. Aq. Ecos. Healt.**, v. 5, p. 223-229, 1996.

YUNES, J. S.; CUNHA, N. T.; BARROS, L. P.; PROENÇA, L. A. O.; MONSERRAT, J. M. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazil freshwaters. **Comments on Toxicology**, v.9, p.103-115, 2003.

WATZIN, M. C.; MILLER, E. B.; SHAMBAUGH, A. D.; KREIDER, M. A. Application of the WHO Alert Level Framework to Cyanobacterial Monitoring of Lake Champlain, Vermont. **Environ. Toxicol.**, v.21, p.278-288, 2006.

WERNER, V.R. **Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagunas da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2002. 363f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

WHITE, S.H.; FABBRO, L.D.; DUIVENVOORDEN, L.J. Changes in cyanoprokaryote populations, *Microcystis* morphology, and microcystin concentrations in Lake Elphinstone (Central Queensland, Australia). **Environmental Toxicology**, v.18(6), p.403-412, 2003.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. 416 p.

WHO. **Guidelines for Drinking Water Quality**. 2 ed. Addendum to Volume 2. Health criteria and other supporting information World Health Organization, Geneva, 1998.

WHO. **Guidelines for Safe Recreational Water Environments. 1. Coastal and Freshwaters.**: World Health Organization, Geneva, 2003. 219 p.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, N. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences, p. 487-493. In: D. R. Boone and R. W. Castenholz (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2nd ed., vol 1: The *Archaea* and deeply branching and phototrophic *Bacteria*. Springer-Verlag, New York, N.Y. 2001

WOSIACK, A.C. Dinâmica da comunidade de cianobactérias da praia artificial Entre Rios do Oeste, Reservatório de Itaipu, PR. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 5p. 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 FOTOS DOS PONTOS DE COLETA



Ponto de Coleta Iate Clube -
vista da margem



Ponto de Coleta Iate Clube



Ponto de coleta Praia dos Namorados



“Escuma” de cianobactérias na Praia
dos Namorados

ANEXO 2 PONTOS DE COLETA, CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E USOS RECREACIONAIS

DATA	HORA	PONTO	LOCAL	CLIMA	OBSERVAÇÕES DE CAMPO
17/04/05	10:50	PN1704051	Praia dos Namorados –R1	sol	água com "escuma", pescador pescando piranha
17/04/05		PN1704052	Praia dos Namorados –R2		
17/04/05	11:50	IC1704051	Iate Clube – R1	sol	vários dias sem chuva, bastante material em suspensão
17/04/05		IC1704052	Iate Clube – R2		
22/05/05	10:30	PN2205051	Praia dos Namorados –R1	tempo nublado	muita macrófita e óleo, pessoas pescando
22/05/05		PN2205052	Praia dos Namorados –R2		
22/05/05	11:00	IC2205051	Iate Clube – R1	tempo nublado	sem macrófitas
22/05/05		IC2205052	Iate Clube – R2		
26/06/05	12:45	PN2606051	Praia dos Namorados –R1	sol	com muita macrófita
26/06/05		PN2606052	Praia dos Namorados –R2		
26/06/05	12:32	IC2606051	Iate Clube – R1	sol	sem macrófita, pesca esportiva
26/06/05		IC2606052	Iate Clube – R2		
24/07/05	11:40	PN2407051	Praia dos Namorados –R1	sem vento	jetski, pessoas entrando na água até a cintura
24/07/05		PN2407052	Praia dos Namorados –R2		
24/07/05	11:20	IC2407051	Iate Clube – R1	sem vento	muitas macrófitas em frente ao ponto
24/07/05		IC2407052	Iate Clube – R2		
21/08/05	10:34	PN2108051	Praia dos Namorados –R1	sem vento	barreira de macrófitas intensa, espuma, veleiros e lanchas
21/08/05	10:35	PN2108052	Praia dos Namorados –R2		
21/08/05	11:40	IC2108051	Iate Clube – R1	sem vento	barreira de macrófitas média, espuma, jet ski, veleiros
21/08/05	11:41	IC2108052	Iate Clube – R2		

DATA	HORA	PONTO	LOCAL	CLIMA	OBSERVAÇÕES DE CAMPO
25/09/05	10:50	PN2509051	Praia dos Namorados –R1	chuvas fracas	barco
25/09/05		PN2509052	Praia dos Namorados –R2		
25/09/05	11:10	IC2509051	Iate Clube – R1	chuvas fracas	sem uso recreativo
25/09/05		IC2509052	Iate Clube – R2		
23/10/05	11:30	PN2310051	Praia dos Namorados –R1	chuvas	muita macrófita fechando o local, sem uso recreacional
23/10/05	11:30	PN2310052	Praia dos Namorados –R2		
23/10/05	12:00	IC2310051	Iate Clube – R1	chuvas	muita espuma, sem macrófitas, com pesca
23/10/05	12:00	IC2310052	Iate Clube – R2		
20/11/05	15:00	PN2011051	Praia dos Namorados –R1	sol	muitas macrófitas, sem uso recreacional
20/11/05	15:00	PN2011052	Praia dos Namorados –R2		
20/11/05	15:30	IC2011051	Iate Clube – R1	sol	mortandade de peixes, “escuma”, muito odor, veleiro e jet ski
20/11/05	15:30	IC2011052	Iate Clube – R2		
18/12/05	14:00	PN1812051	Praia dos Namorados –R1	sol, vento	uso recreacional lancha
18/12/05		PN1812052	Praia dos Namorados –R2		
18/12/05	14:45	IC1812051	Iate Clube – R1	sol, vento	uso recreacional lancha/barco e trabalhadores do clube
18/12/05		IC1812052	Iate Clube – R2		
29/01/06	10:50	PN2901061	Praia dos Namorados –R1	chuva	“escuma”, sem macrófitas e sem uso da água, mês sem chuva.
29/01/06		PN2901062	Praia dos Namorados –R2		
29/01/06	11:20	IC2901061	Iate Clube – R1	chuva	“escuma”, sem macrófitas e sem uso da água, mês sem chuva,
29/01/06		IC2901062	Iate Clube – R2		
19/02/06	15:30	PN1902061	Praia dos Namorados –R1	sol	muito material em suspensão, uso recreacional, jetski e barco
19/02/06		PN1902062	Praia dos Namorados –R2		
19/02/06	16:10	IC1902061	Iate Clube – R1	sol	muito material em suspensão, uso recreacional, jetski e pesca
19/02/06		IC1902062	Iate Clube – R2		

PN - Praia dos Namorados

IC -Iate Clube

R1 = réplica 1

R2 = réplica 2

ANEXO 3 LISTA GERAL DOS TÁXONS DE CIANOBACTÉRIAS RELATADAS PARA O RESERVATÓRIO SALTO GRANDE.

TÁXONS	DEBERDT (2002)	TUCCI . (2004)	PRESENTE ESTUDO
<i>Anabaena circinalis</i> Rabenh. ex Born. et Flah. 1888	x	x	x
<i>A. crassa</i> (Lemmerm.) Kom. – Leg. et Cronb. 1992	x	x	x
<i>A cf smithii</i> (Komárek) Watanabe 1992		x	
<i>A. planctonica</i> Brunthaler 1903		x	
<i>Anabaena</i> sp Bory ex Bornet & Flahault 1886	x		
<i>Anabaenopsis</i> sp (Woloszynska) Mill. 1923	x		
<i>Aphanizomenon gracile</i> (Lemmerm.) Lemmerm. 1907			x
<i>A.issatchenkoi</i> (Ussat.) Pr. – Lavrenko 1962			x
<i>A tropicalis</i> Horecká et Komárek 1979		x	
<i>Aphanocapsa delicatissima</i> W. et G.S. West 1912		x	x
<i>A. elachista</i> W. & G.S. West 1912		x	
<i>A. cf. koordesii</i> Strom, Nyt Mag. 1923	x	x	
<i>A. incerta</i> (Lemm.) Cronb. et Kom. 1994			x
<i>Aphanocapsa</i> sp Nägeli 1849		x	
<i>Aphanothece</i> spp Nägeli 1849	x	x	
<i>Borzia</i> sp Cohn ex Gom. 1892	x		
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmerm 1898	x	x	
<i>C. minor</i> (Kützing) Nägeli 1849		x	x
<i>C. minutus</i> (Kützing) Nägeli 1849		x	
<i>C. turgidus</i> (Kützing) Nägeli 1849		x	
<i>Chroococcus</i> spp		x	

TÁXONS	DEBERDT (2002)	TUCCI . (2004)	PRESENTE ESTUDO
<i>Coelosphaerium evidenter-marginatum</i> Azev. et Sant'Anna 1999.		x	x
<i>C. kuetzingianum</i> Nägeli 1849		x	
<i>Cyanodictium planctonicum</i> Meyer 1994		x	
<i>Cyanosarcina</i> sp Kováčik 1988	x	x	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya et S. Raju. 1972	x	x	
<i>Geitlerinema acutissimum</i> (Kuffer) Anagn. et Kom 1989	x		
<i>G. unigranulatum</i> (R.N. Singh) Komárek et Azevedo			x
<i>Gloecapsa</i> sp Kützing 1843		x	
<i>Jaagnema quadripunctulatum</i> (Brühl & Biswas) Anag. & Kom. 1988		x	
<i>J. subtilissimum</i> (Kützing ex De Toni) Anag. et Kom. 1988			x
<i>Limnothrix planctonica</i> (Woloz.) Meffert 1988		x	x
<i>Limnothrix</i> sp Meffert 1988		x	
<i>Lyngbya hieronymusii</i> Lemmerm 1905		x	
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing 1845	x	x	
<i>M. insignis</i> Skorbatov 1923		x	
<i>M. tenuissima</i> Lemmermann 1898		x	x
<i>M. trolleri</i> Bachmann 1920			x
<i>Merismopedia</i> spp		x	
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846	x	x	x
<i>M. botrys</i> Teil. 1942			x
<i>M. cf. lamelliformis</i> Holsinger 1954	x	x	
<i>M. lamelliformis</i> Holsinger 1954		x	
<i>M. panniformis</i> Kom. et al. 2002			x
<i>M. protocystis</i> Crow 1923		x	x

TÁXONS	DEBERDT (2002)	TUCCI . (2004)	PRESENTE ESTUDO
<i>M. wesenberghii</i> (Kom.) Kom. In Kondrateva 1968			x
<i>Microcystis</i> sp Kützing ex Lemmerm 1907		x	
<i>Oscillatoria lacustris</i> (Klebahn) Geitler 1925		x	
<i>Oscillatoria</i> spp		x	
<i>Planktolyngbya</i> sp Anag. et Kom. 1988			x
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988			x
<i>P. mougeotii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988	x	x	
<i>Planktothrix</i> sp Anag. et Kom. 1988		x	
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterb 1916	x	x	
<i>P. mucicola</i> (Naumann & Hüber-Pestalozzi) Bourrelly 1970	x	x	x
<i>Pseudanabaena</i> spp		x	
<i>Radiocystis</i> sp Skuja 1948	x		
<i>R. fernandoi</i> Komárek et Komárkova-Legnerová 1993		x	x
<i>R. geminata</i> Skuja 1948		x	
<i>Rhabdogloea ellipsoidea</i> Schröder 1917	x	x	
<i>R. smithii</i> (R. et. F Chodat) Komárek 1983		x	
<i>Romeria okensis</i> (Meyer) Hindák 1975		x	x
<i>Romeria victoriae</i> Kom. & Cronb.			x
<i>Snowella lacustris</i> (Chodat) Komárek et Hindák 1988		x	
<i>Sphaerocavum brasiliense</i> Azev. et Sant' Anna 2003			x
<i>Spirulina</i> sp Turpin ex Gomont 1892		x	
<i>Synechocystis</i> sp Sauvageau 1892		x	
<i>Synechococcus elongatus</i> (Nägeli) Nägeli 1849		x	x
<i>Synechococcus</i> sp Nägeli		x	
<i>Tychonema</i> cf. <i>bourrelly</i> (Lund) Anagnostidis & Komárek 1988		x	

ANEXO 4 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS CIANOBACTÉRIAS ENCONTRADAS NO RESERVATÓRIO SALTO GRANDE. AS DESCRIÇÕES DOS MORFOTIPOS FORAM BASEADAS EM KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989, 1999, 2005); CRONBERG & ANNADOTERR (2007); SANT'ÁNNA et al. (2000, 2003, 2007)

CIANOBACTÉRIA	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS E CONTEÚDO CELULAR	TOXICIDADE	OCORRÊNCIA, COMENTÁRIOS
<i>Anabaena circinalis</i> Rabenhorst ex Bornet et Flahault 1888. (Prancha 22)	Tricoma livre nadante, regular a irregularmente espiralado; espiras amplas; mucilagem estreita Altura das espiras = 50,0-60,0 µm Distância entre espiras = 20,0-58,0 µm	Esféricas a em forma de barril; Ø = 5,0-6,2 µm, aerótopos; Heterócito: Esférico, Ø = 5,0-6,2 µm Acineto: Elíptico, C=15,4 µm; L=11,0 µm	+	Cosmopolita, ambientes eutróficos, planctônica, formadora de florações
<i>A. crassa</i> (Lemmermann) Komárková – Legnerová et Cronberg 1992. (Prancha 25)	Tricoma livre nadante, regularmente espiralado; espiras curtas; mucilagem ampla Altura das espiras = 30,0-52,0 µm Distância entre espiras = 15,0-26,0 µm	Esféricas a em forma de barril Ø = 8,5-10 µm, aerótopos Heterócito: Esférico, Ø = 15,0 µm Acineto: Elíptico alargado C= 19,5-25,3 µm, L =14,0-17,5 µm	+(para o gênero)	Cosmopolita, ambientes eutróficos, planctônica, formadora de florações
<i>Aphanizomenon. gracile</i> (Lemmermann) Lemmermann 1907 (Prancha 23)	Tricoma livre nadante, reto ou ligeiramente curvado,	células em forma de barril, C= (2,2)3,0-6,5 µm, L= 4,0-4,5 µm ; Heterócito: nd Acineto: C=7,0 µm; L=2,2 µm	+	Região temperada, (pode ocorrer em climas subtropicais)
<i>A. issatchenkoi</i> (Usačev) Proška – Lavrenko 1962 (Prancha 24)	Tricoma livre nadante, reto ou ligeiramente curvado	Células cilíndricas arredondadas, ligeiramente constritas; C= (2,2)3,0-6,5 µm , L= 4,0-4,5 µm; célula terminal afilada Heterócito: Cilíndrico; C= 5,5µm; L = 4,5 µm Acineto: cilíndrico; C=11,0µ; L=5,5 µm	+(para o gênero)	Ambientes eutróficos

CIANOBACTÉRIA	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS E CONTEÚDO CELULAR	TOXICIDADE	OCORRÊNCIA, COMENTÁRIOS
<i>Aphanocapsa delicatissima</i> W. et G.S. West 1912 (Prancha 27)	Colônias arredondadas, alongadas ou irregulares, mucilagem hialina, difluente	Esféricas, $\varnothing = 0,8-1,0 \mu\text{m}$	Sem informação	Planctônica, cosmopolita
<i>A. incerta</i> (Lemmermann) Cronberg et Komárek 1994 (Prancha 26, 28)	Colônias arredondadas ou alongadas, bainha hialina, difluente	Esféricas, $\varnothing = 2,0 \mu\text{m}$	+	Planctônica, ambientes eutróficos, cosmopolita
<i>Chroococcus minor</i> (Kützinger) Nägeli 1849 (Prancha. 29)	Colônias pequenas, 4-16 céls, mucilagem fina, hialina, difusa, envelope mucilaginoso acompanhando as células	Esféricas, $\varnothing = 4,0-4,5 \mu\text{m}$	Sem informação	Metafítica, pode ocorrer em regiões tropicais.
<i>Coelosphaerium evidenter-marginatum</i> M.T.P. Azevedo & C.L. Sant'Anna 1999 (Prancha 30)	Colônias arredondadas, mucilagem hialina, inconspícua, células distribuídas regularmente na superfície da colônia	Esféricas, $\varnothing = 2,0-2,5 \mu\text{m}$	-	Planctônica, regiões tropicais
<i>Geitlerinema unigranulatum</i> (R.N. Singh) Komárek et Azevedo (Prancha 31)	Tricoma flexuoso, solitário, não constrito, célula apical cilíndrica –arredondada	Cilíndricas; com 1-2 grânulos $C=6,0-7,0 \mu\text{m}$; $L=2,0 \mu\text{m}$	Sem informação	Planctônica em ambientes eutróficos, pantropicais
<i>Jaaginema subtilissimum</i> (Kützinger ex De Toni) Anagnostidis et Komárek 1988 (Prancha 32)	Tricoma reto a flexuoso solitário, não constrito, não atenuado, imóvel	Cilíndricas, $C=1,5-3,5 \mu\text{m}$ $L=1,5-2,0 \mu\text{m}$	Sem informação	Abundante no material bentônico ou entre detritos vegetais de regiões temperadas, podendo ocorrer nos trópicos
<i>Limnothrix planctonica</i> (Woloszyńska) Meffert 1988 (Prancha 33)	Tricomas solitários, retos, não constritos	Cilíndricas, aerótopos $C=4,0 \mu\text{m}$, Largura: $=2,0 \mu\text{m}$	+(para o gênero)	Planctônica de zonas temperadas (trópicos ?)

CIANOBACTÉRIA	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS E CONTEÚDO CELULAR	TOXICIDADE	OCORRÊNCIA, COMENTÁRIOS
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann 1898 (Prancha 34)	Colônias achatadas, quadráticas, formadas por 8-16-32 células, mucilagem hialina, difluente	Esférica a sub-esférica $\varnothing = 2,0 \mu\text{m}$	sem informação	Planctônica, ambientes eutróficos
<i>M. trolleri</i> Bachmann 1920 (Prancha 35)	colônias achatadas, quadráticas, células densamente arranjadas,	Esférica a sub-esférica, aerótopos $\varnothing = 2,0-3,0 \mu\text{m}$	sem informação	Planctônica , regiões temperadas, não muito comum, regiões tropicais (?)
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846 (Prancha 36)	Colônias esféricas a oblongas quando jovens ou com células pouco agrupadas e bainha estreita, mais velhas lobadas a irregulares, clatradas ou não; bainha incolor, inconspícua, margem ampla, difluente; colônias jovens com poucas células	Esférica , aerótopos $\varnothing = 5,3-6,5 \mu\text{m}$, densamente agrupadas;	+	Ambientes eutróficos, regiões tropicais
<i>M. botrys</i> Teiling 1942 (Prancha 39)	Colônias arredondadas, células densamente arranjadas em pacotes esféricos, bainha difluente, hialina	Esférica, aerótopos $\varnothing = 4,0 - 5,0 \mu\text{m}$;	+	Não foram observadas as protuberâncias de mucilagem típicas da espécie
<i>M. panniformis</i> Komárek et al. 2002 (Prancha 37)	Colônias esféricas quando jovens, podendo ser mais alongadas quando adultas, não clatradas; bainha incolor, inconspícua, margem estreita, difluente	Esférica, aerótopos, $\varnothing = 2,5-3,5 \mu\text{m}$, densamente agrupadas; ;	+	Espécie descrita com material brasileiro, encontrada em diversos corpos d' água no Brasil e Austrália,
<i>M. protocystis</i> Crow 1923 (Prancha 38)	Colônias irregulares com células dispersas a superfície da mucilagem hialina, difluente	Esféricas, aerótopos $\varnothing = 5,0 \mu\text{m}$	+ para o gênero	Planctônica, pantropical

CIANOBACTÉRIA	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS E CONTEÚDO CELULAR	TOXICIDADE	OCORRÊNCIA, COMENTÁRIOS
<i>M. wesenbergii</i> (Komárek) Komárek in <i>Kondrateva</i> . Crow 1968 (Prancha 40)	Colônias esféricas quando jovens, alongadas, lobadas e clatradas quando adultas, bainha incolor, margem ampla, conspícua, refrativa	células esféricas, aerótopos $\varnothing = 3,5-6,6 \mu\text{m}$.	+	Comum em águas eutróficas de reservatórios, raramente dominantes, cosmopolita
<i>Planktolyngbya</i> sp.	Filamentos isolados, retos a ligeiramente curvados, não constritos, não atenuados, bainha hialina, fina	cilíndricas, C = 2,2 μm ; L = 4,5 μm	Sem informação	--
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988 (Prancha 41)	Tricomas retos, solitários, não constritos, atenuado em direção ao ápice.	Quadráticas, aerótopos, conteúdo granular C = 5,0-5,1 μm ; L= 5,6 μm - 6,8 μm	+	Planctônica, regiões temperadas, registros em regiões tropicais
<i>Pseudanabaena mucicola</i> (Naumann et Hüber-Pestalozzi) Bourrelly 1973 (Prancha 44)	Tricomas retos, solitários, constritos, na mucilagem de <i>Microcystis</i> –3-6 células	Cilíndricas C = 2,5-4,0 μm ; L= 1,5-1,8 μm	+(para o gênero)	endogleica, cosmopolita
<i>Radiocystis fernandoi</i> Komárek et Komárkova-Legnerová 1993 (Prancha 42)	colônias arredondadas ou irregulares, achatadas, células dispostas em fileiras radiais, mucilagem hialina	$\varnothing = 7,0 \mu\text{m}$	+	planctônica, tropical
<i>Romeria okensis</i> (Meyer) Hindák 1975 (Prancha 43)	Tricomas espiralados, solitários, constritos, com bainha mucilagínosa	Cilíndricas C = 5,0-6,0 μm ; L= 2,5-3,0 μm	sem infomação	planctônica, ambientes eutróficos, descrita para a Europa
<i>Romeria victoriae</i> Komárek et Cronberg 2001 (Prancha 44)	Filamentos solitários, retos ou com “quebras” formando ângulos retos, constritos, número de células =2-32	Cilíndricas C = 1,3-5,8 μm ; L= 1,3-1,8 μm	sem informação	Planctônica

CIANOBACTÉRIA	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS E CONTEÚDO CELULAR	TOXICIDADE	OCORRÊNCIA, COMENTÁRIOS
<i>Sphaerocavum brasiliense</i> Azevedo et Sant' Anna 2003 (Prancha 45)	Colônias esféricas a alongadas, esburacadas, ocas	Esféricas, Ø = 2,5-35 µm	-	Ambientes eutróficos, tropicais
<i>Synechococcus elongatus</i> (Nägeli) Nägeli 1849	células solitárias ou em agrupamentos irregulares	Reta a levemente curvada ou sigmóide, em forma de bastonete C =20,0-36,0 µm; L = 0,9-1,0 µm	+ (para o gênero)	Subaerofítica,, supralitoral de lagos e reservatórios, regiões temperadas (trópicos ?)

C: comprimento; L: largura, ø: diâmetro;nd: não detectada; +: ocorrência de toxina ou efeito tóxico; -: ausência de toxina ou efeito tóxico

ANEXO 5 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS ENCONTRADOS NO RESERVATÓRIO SALTO GRANDE. AS DESCRIÇÕES DOS MORFOTIPOS FOI BASEADA EM KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989, 1999, 2005).

ISOLADO	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA CELULAR	CONTEÚDO CELULAR	TAMANHO DA COLÔNIA (µm)	TAMANHO DA CÉLULA (µm)		
					Comprimento	Largura	Ocorrência
<i>Aphanothece</i> sp1. CENA118 (Prancha 1, 2)	Células densamente arranjadas em uma mucilagem comum e amórfica; colônias pequenas	Retas, alongadas, ligeiramente curvas ou sigmóides, bastonetes,	Verde	58-82 x 45-54	1,0-2,0 (9,8 - 17,0)	0,6-0,8	Somente em cultura
<i>Microcystis</i> sp.1 CENA121 (Prancha 3)	Células esparsamente arranjadas em colônias mucilaginosas (condições de cultura)	Esféricas	Verde, aerótopos	-	-	3,5-4,5 de diâmetro	-
<i>Microcystis</i> <i>panniformis</i> CENA121 (Prancha 4)	Células densamente arranjadas em colônias esféricas mucilaginosas	Esféricas	aerótopos	78,0-266,0	-	3,5-4,4 de diâmetro	Na amostra ambiental
<i>Aphanothece</i> sp2. CENA122 (Prancha 5, 6)	Células densas e irregularmente arranjadas, em uma mucilagem comum e amorfa, formando aglomerados esféricos	Retas ou arqueadas, bastonetes	-verde azulado forte	80-300(700) x 50-200	1,9-5,7	0,8-1,2	Somente em cultura
<i>Romeria victoricae</i> Kom. & Cronb. – CENA 123 – (Prancha 7, 8)	Tricomas “quebrados”, constritos no septo celular; número celulas = 2-32	Cilíndrica	Azul esverdeado pálido	-	1,3-5,8	1,3-1,8	Na amostra ambiental

ISOLADO	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA CELULAR	CONTEÚDO CELULAR	TAMANHO DA COLÔNIA (µm)	TAMANHO DA CÉLULA (µm)		
					Comprimento	Largura	Ocorrência
<i>Chroococcidiopsis</i> sp –CENA 124 – (Prancha 9, 10)	Células solitárias ou em agregados irregulares	De esféricas a esferóides irregulares, envelopadas por grossas bainhas, firmes e sem cor; reprodução por baeócitos	Verde	-	-	2,1-5,1 (8,7) de diâmetro	Somente em cultura
<i>Synechococcus nidulans</i> CENA 125 (Prancha 11)	Células solitárias	Bastonetes	-	-	(1,2)2,7-4,5(8,8)	0,8 -1,7	No plâncton
<i>Synechococcus elongatus</i> – CENA 126 – (Prancha 12)	Cálulas solitárias ou em aglomerados irregulares	Retas, alongadas, levemente curvadas ou sigmóides, bastonetes, “involution formations”	Azul esverdeado	-	2,9-47,0 (58,0)	1,2-1,3	Somente em cultura
<i>Calothrix</i> sp – CENA 127 – (Prancha 13,15)	Tricomas levemente constritos, envolvidos por bainha hialina, homogênea, acabando em um pequeno “pêlo” hialino	Células em forma de barril ou cilíndricas; heterócito terminal, redondo ou cônico-arredondado		-	4,0-7,5	Células intermediárias: 4,4-7,0 (13,8); Células basais: 6,0-8,0; Célula apical: 2,0; Heterócito: 4,5-5,0 de diâmetro	Somente em cultura

ISOLADO	ORGANIZAÇÃO CELULAR	MORFOLOGIA CELULAR	CONTEÚDO CELULAR	TAMANHO DA COLÔNIA (µm)	TAMANHO DA CÉLULA (µm)		
					Comprimento	Largura	Ocorrência
<i>Lyngbya</i> sp – CENA 128 – (Prancha 14, 16)	Filamentos retos a curvados, embainhados, tricomas não-constritos no septo celular, bainhas sem cor	Células muito curtas, célula apical com caliptra	Grânulos pequenos	-	10,0-12,6 (14,0)	2,0-3,3	Somente em cultura
<i>Leptolyngbya</i> sp1 – CENA 129 – (Prancha 17)	Tricomas frouxamente arranjados, embainhados, bainhas sem cor (condições de cultura)	Células mais longas que largas, cilíndricas	Levemente granular	-	1,0-3,0	1,0	Somente em cultura
<i>Leptolyngbya</i> sp2 – CENA 131 – (Prancha 20)	Tricomas frouxamente arranjados, enredados, bainhas sem cor (condições de cultura)	Células mais longas que largas, cilíndricas	Azul esverdeado pálido; levemente granular	-.	2,0-3,5	1,6-2,0	Somente em cultura
<i>Synechococcus nidulans</i> – CENA 132 – (Prancha 18, 21)	Células solitárias ou em aglomerados irregulares	Bastonetes	Azul esverdeado pálido	-.	1,5 – 2.0	1,0	Somente em cultura
<i>Microcystis</i> sp.2 – CENA 133 – (Prancha 19)	Células densamente arranjadas dentro de colônias mucilaginosas amorfas (condições de cultura)	Esféricas	Com aerótopos	-	-	3,0-3,5 de diâmetro	Nas amostras ambientais

C: comprimento; L: largura, ø: diâmetro; nd: não detectada; +: ocorrência de toxina ou efeito tóxico; -: ausência de toxina ou efeito tóxico

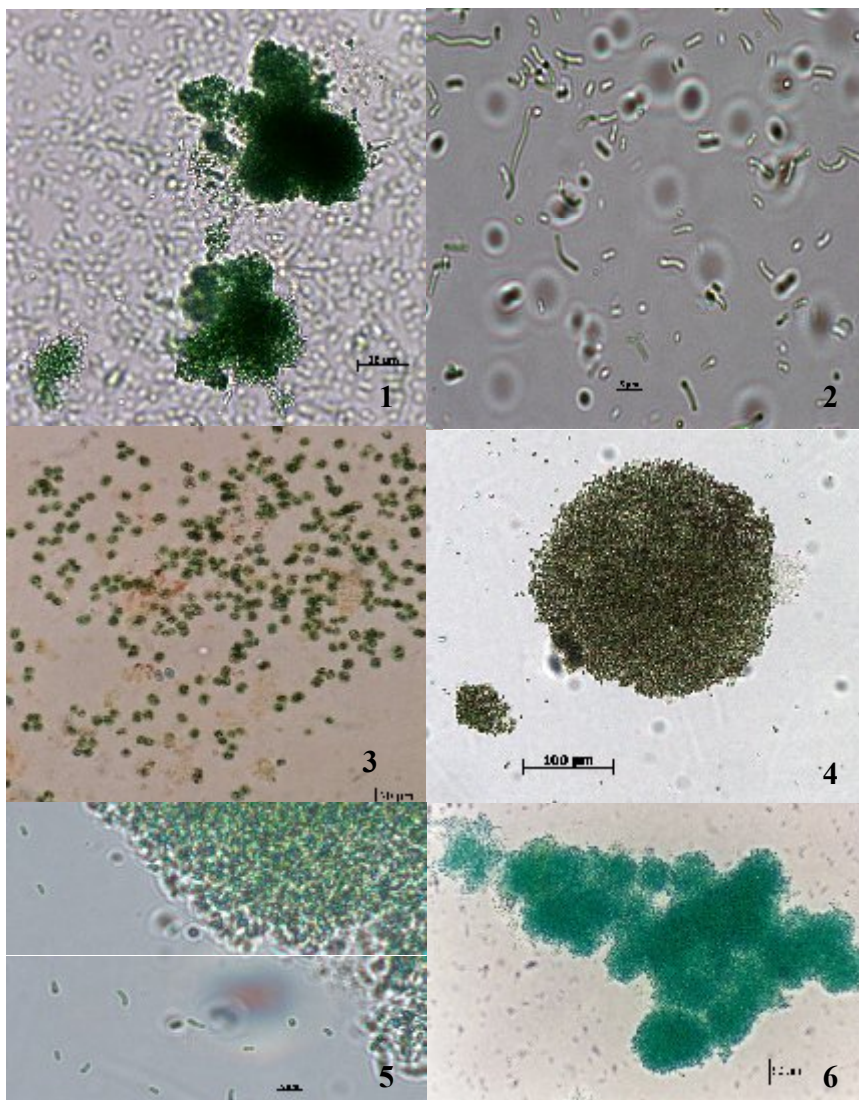
ANEXO 6 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA (ORG./ML) E CONSTÂNCIA DE OCORRÊNCIA DAS CIANOBACTÉRIAS PRAIA DOS NAMORADOS

	SOMAT MEDIA Constância(%)													
	abr-05	mai-05	jun-05	jul-05	ago-05	set-05	out-05	nov-05	dez-05	jan-06	fev-06			
<i>Anabaena circinalis</i>	45	291	35	15	358	4	35	70	34	358	18	1263	115	100
<i>A. crassa</i>			5	5	3455	26	30	358	26			3905	558	64
<i>Aphanizomenon issatchenkoi</i>								12				12	12	9
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>		120	5			7	18		9			159	32	46
<i>A. incerta</i>	45										6	51	26	18
<i>Chroococcus minor</i>											6	6	6	9
<i>Coelosphaerium evidenter-marginatum</i>									1			1	1	9
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	15	238		15	119	15	66		1	75		544	68	73
<i>Jaagnema cf subtilissimum</i>						15			11			26	13	18
<i>Limnothrix planctonica</i>									6			6	6	9
<i>Merismopedia tenuissima</i>									1			1	1	9
<i>M. cf trolleri</i>										45		45	45	9
<i>Microcystis aeruginosa</i>	120	305	390	169	923	145	252	40	10	5815	78	8247	750	100
<i>M. panniformis</i>	6329	164	358	65	1221	86	524	144	46	17315	1549	27801	2527	100
<i>M. protocystis</i>					209				3	224		436	145	27
<i>M. botrys</i>						15		3	3	678		699	175	36
<i>M. wesenbergii</i>					209							209	209	9
<i>Oscillatoria cf lacustris</i>										15		15	15	9
<i>Planktothrix agardhii</i>							6	86	2	15	6	115	23	46
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	2234	537	231	462	3038	26	2805	584	237	3865	1751	15770	1434	100
<i>Romeria okensis</i>		8										8	8	9
<i>R. victoriae</i>			5	5								10	5	18
<i>Sphaerocavum brasiliensis</i>						11		3	17	708	42	781	156	46
<i>Synechococcus cf elongatus</i>									48	45		93	47	18
Total	8788	1663	1029	736	9532	350	3736	1300	455	29158	3456	60296		
Média	1465	238	147	105	1192	35	467	144	28	2430	432	608	266	
	6	7	7	7	8	10	8	9	16	12	8			
acessórias	espécies abundantes = as que ocorreram em densidade igual ou superior à média da amostra por mês de coleta													
acidentais	espécies abundantes = as que ocorreram em densidade igual ou superior à média total do período de coleta													
constantes	espécies dominantes = as que ocorreram em densidade igual ou superior a 50% da amostra por mês de coleta)													

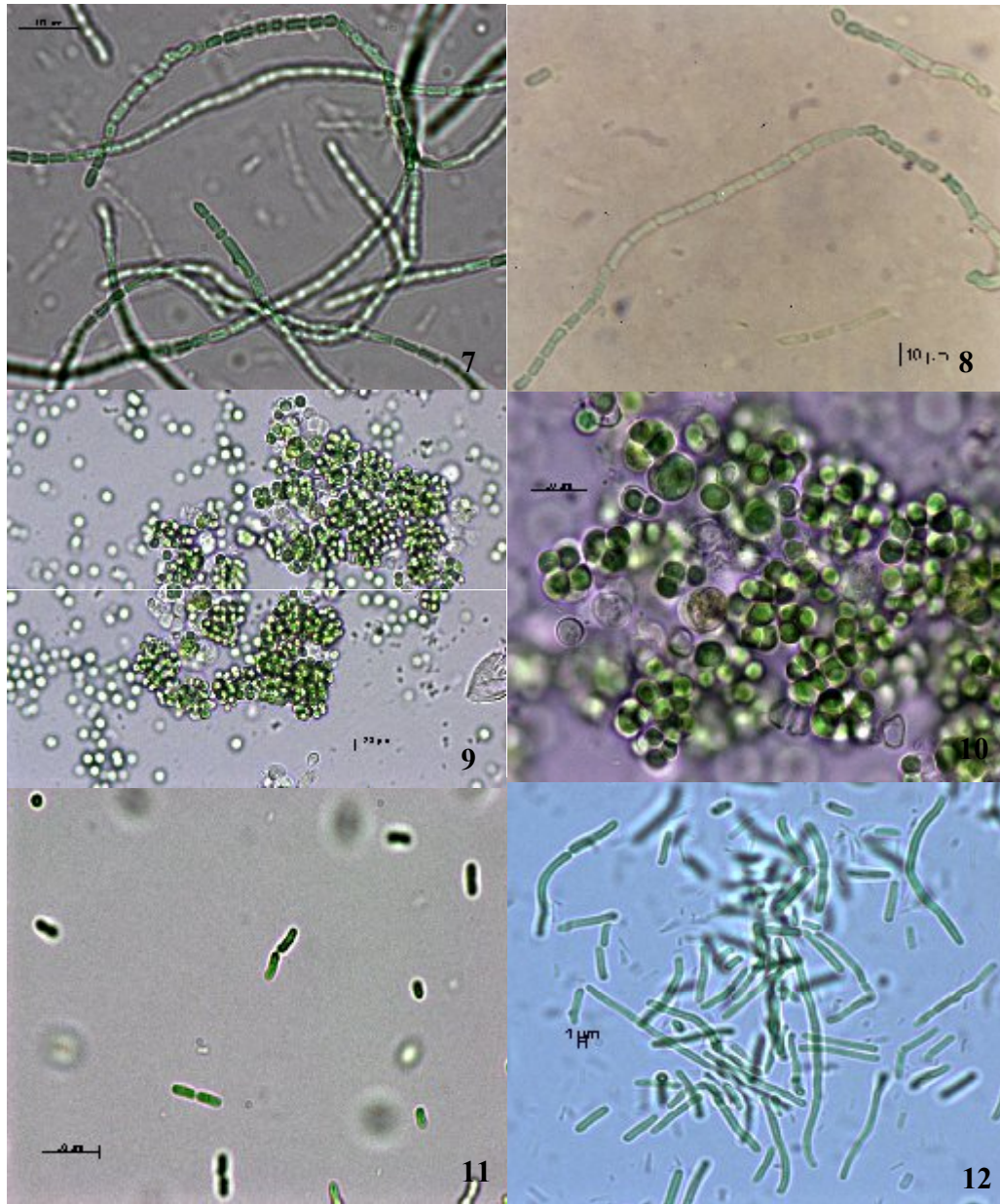
ANEXO 7 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA (ORG./ML) E CONSTÂNCIA DE OCORRÊNCIA DAS CIANOBACTÉRIAS - IATE CLUBE

	abr-05	mai-05	jun-05	jul-05	ago-05	set-05	out-05	nov-05	dez-05	jan-06	fev-06	SOMA	CONSTÂNCIA(%)
<i>Anabaena circinalis</i>	99	31	4	39	268	45	56	96	23	268		929	91
<i>A . crassa</i>					2889	90	99	274	36			3388	46
<i>A . gracile</i>	5											5	9
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>		65	15						15			95	27
<i>A . elachista</i>				12								12	9
<i>A . incerta</i>	40											40	9
<i>Geitlerinema unigranulatum</i>	15	78	13		30		40	24	7	119	11	337	82
<i>Jaagnema cf subtilissimum</i>									18			18	9
<i>Limnothrix planctonica</i>									1			1	9
<i>Merismopedia tenuissima</i>	10											10	9
<i>M. marssonii</i>											7	7	9
<i>Microcystis aeruginosa</i>	70	55	114	456	328	343	266	334	6	3678	66	5716	100
<i>M. panniformis</i>	894	14	136	441	1221	283	353	132	44	2353	497	6368	100
<i>M. protocystis</i>	60				179					15	4	258	36
<i>M. botrys</i>	25			84		45				45	10	209	46
<i>M. wesenberghii</i>					179							179	9
<i>Planktolyngbya sp</i>		1							1			2	18
<i>Planktothrix agardhii</i>		3						274	2	45		324	36
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	834	14	43	4888	387	477	953	1589	193	5416	93	14887	100
<i>Pseudoanabaenaceae</i>											8	8	9
<i>Radiocystis fernandoi</i>				286								286	9
<i>R. victoriae</i>		1							17			18	18
<i>Sphaerocavum brasiliensis</i>					90					45	3	138	27
<i>Synechococcus cf elongatus</i>									25			25	9
Total	2052	262	325	6206	5571	1283	1767	2723	388	11984	699	33260	
Média	205	29	54	887	619	214	295	389	30	1332	78	375	
riqueza (n° de táxons em cada amostra)	10	9	6	7	9	6	6	7	13	9	9		
Acessórias	espécies abundantes = as que ocorreram em densidade igual ou superior à média da amostra por mês de coleta												
Acidentais	espécies abundantes = as que ocorreram em densidade igual ou superior à média total do período de coleta												
Constantes	espécies dominantes= as que ocorreram em densidade igual ou superior a 50% da amostra por mês de coleta)												

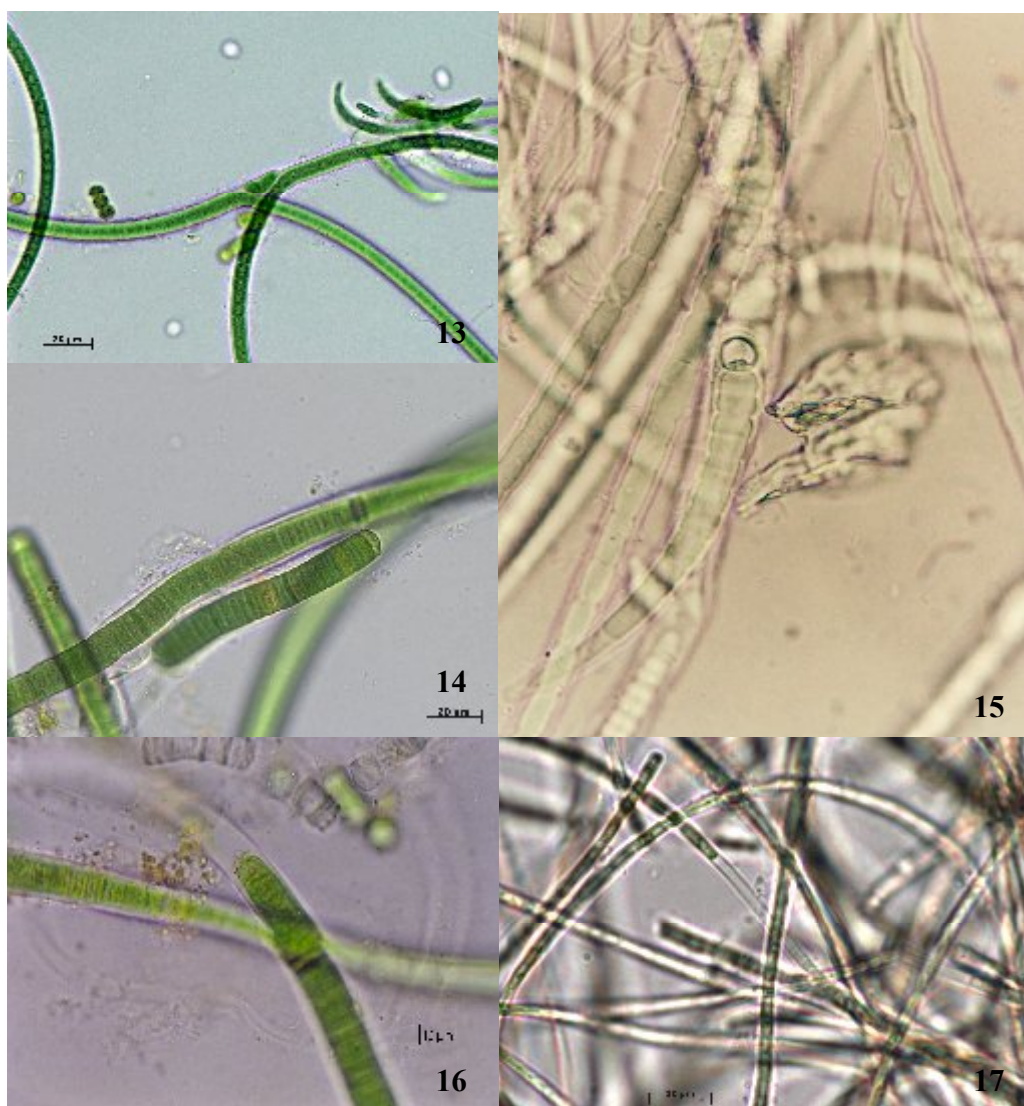
ANEXO 8 FOTOS DAS CIANOBACTÉRIAS DOS ISOLADOS E DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS



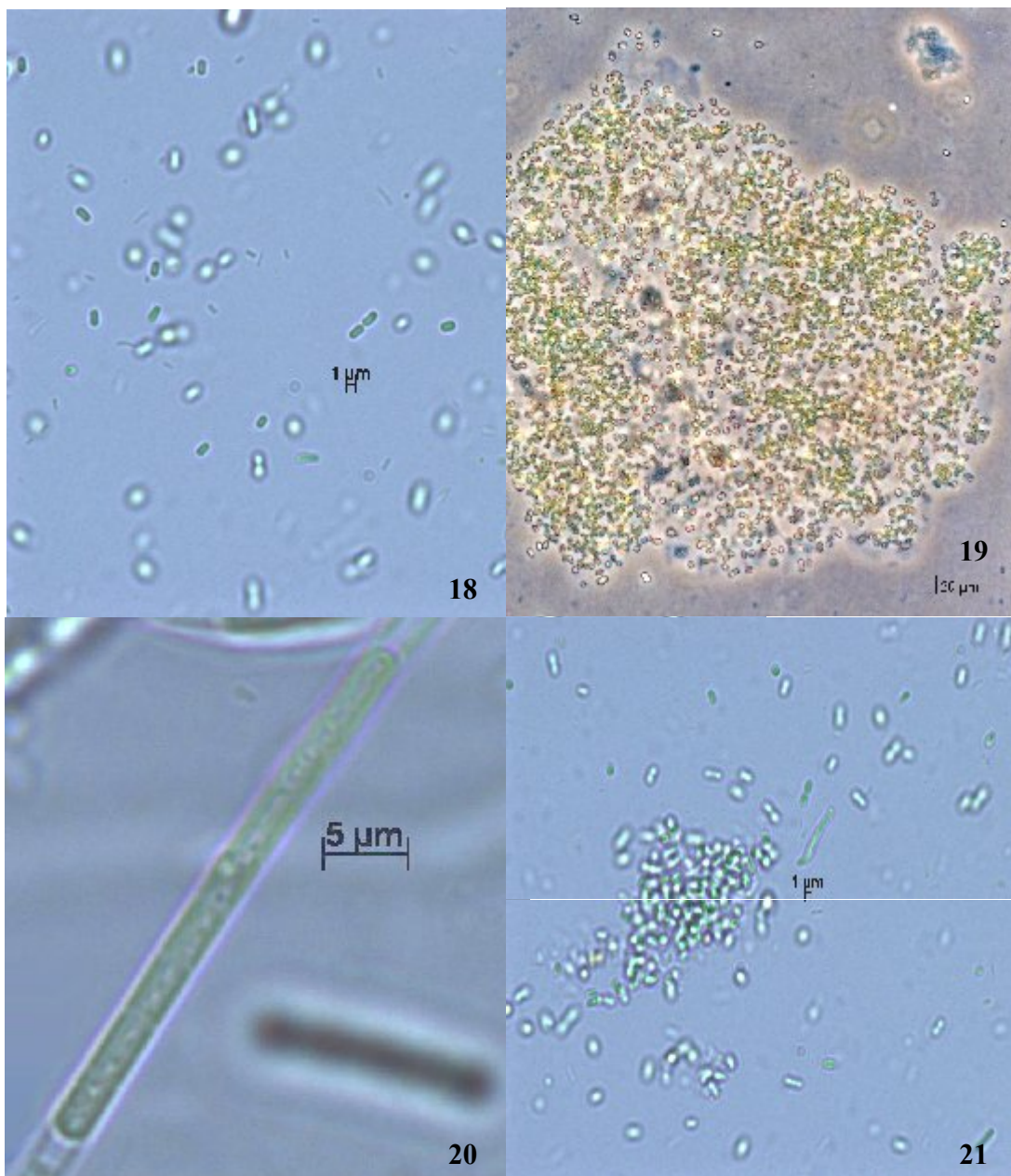
1 – *Aphanothece* sp.1 400x – CENA 118 2 – *Aphanothece* sp.1 1000x – CENA 118 3 – *Microcystis* sp1. – 400x – CENA 120 4– *Microcystis panniformis* 100x – CENA 121 5 – *Aphanothece* sp. 2 1000x – CENA 122 6 – *Aphanothece* sp. 2 400x – CENA 122.



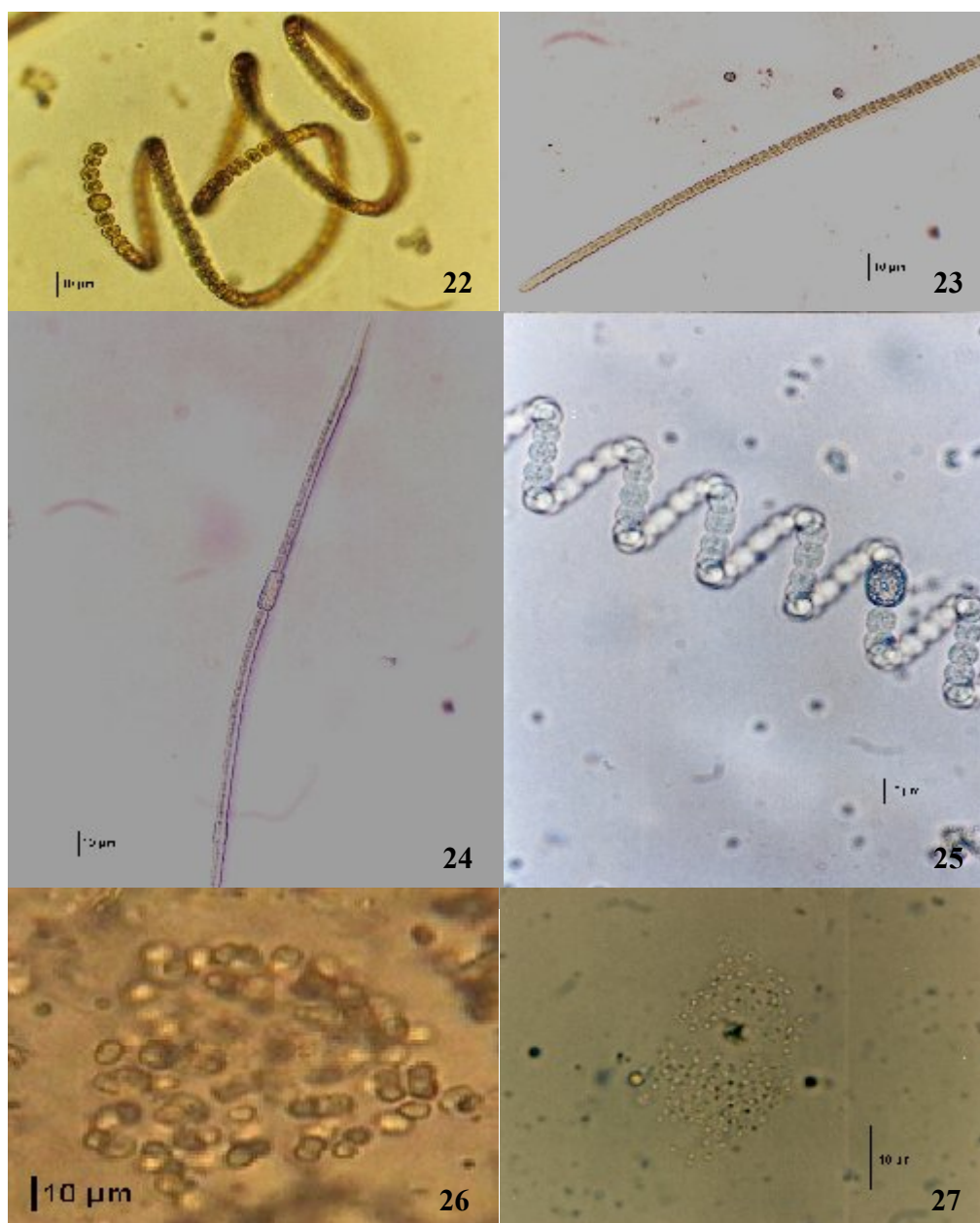
7 – *Romeria victoriae* 1000x – CENA 123 8 – *Romeria victoriae* 630x – CENA 123 9 – *Chroococcidiopsis* sp – 400x – CENA 124 10 – *Chroococcidiopsis* sp. – 1000x – CENA 124 11 – *Synechococcus nidulans* 1000x – CENA 125 12 – *Synechococcus* sp. 1000x – CENA 129



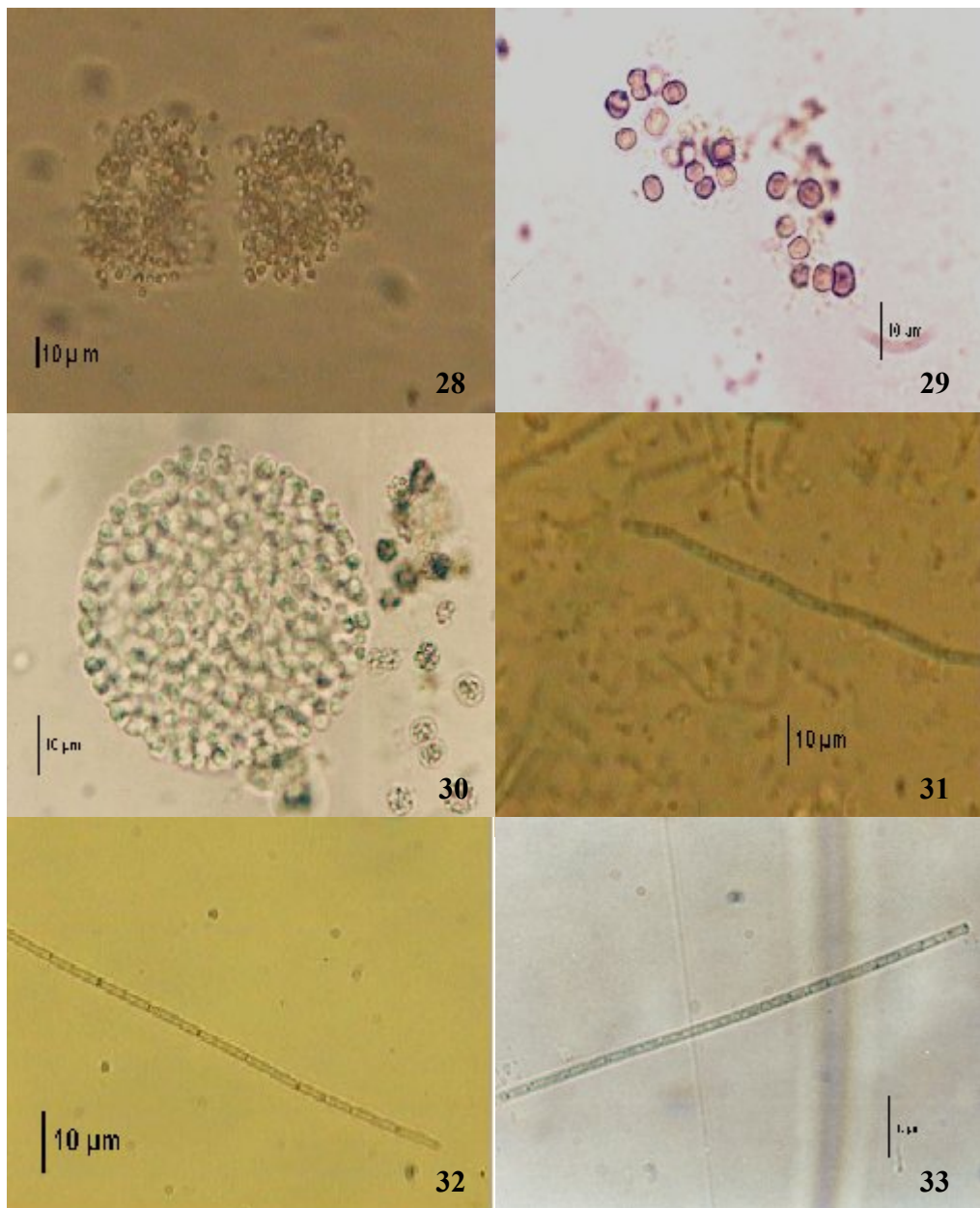
13- *Calotrix* – falsa ramificação 400x – CENA 127 **14** – *Lyngbya* sp. 400x – CENA 128 **15** – *Calotrix* – heterócito 1000x – CENA 127 **16** – *Lyngbya* sp – 630x – CENA 128 **17** – *Leptolyngbya* sp.1 – 1000x – CENA 129



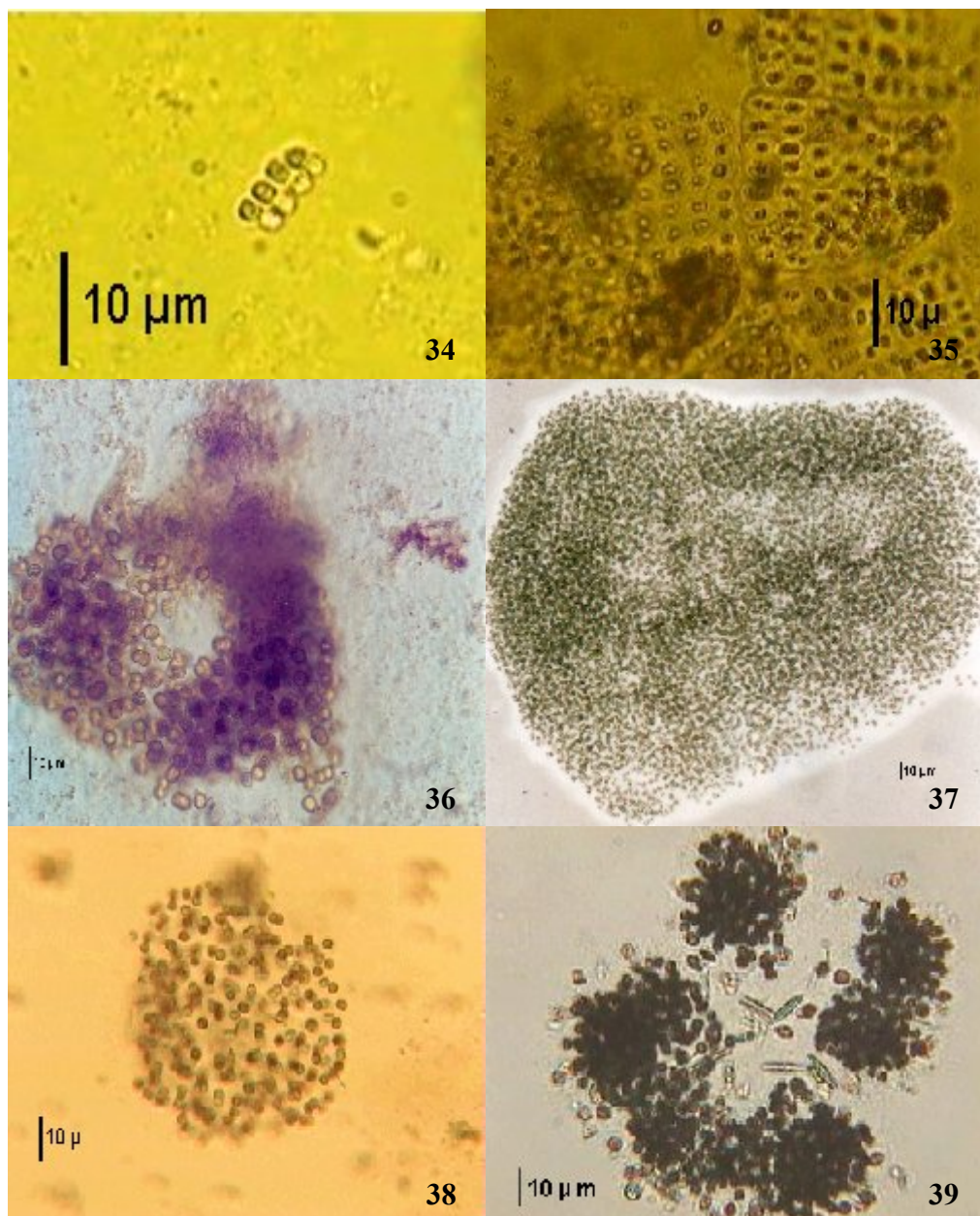
18 – *Synechococcus nidulans* – 1000x – CENA 132 **19** – *Microcystis* sp.2 - 200x – CENA 133
20 – *Leptolyngbya* sp.2 1000x – CENA 131 **21** – *Synechococcus nidulans* – 1000x – CENA 132.



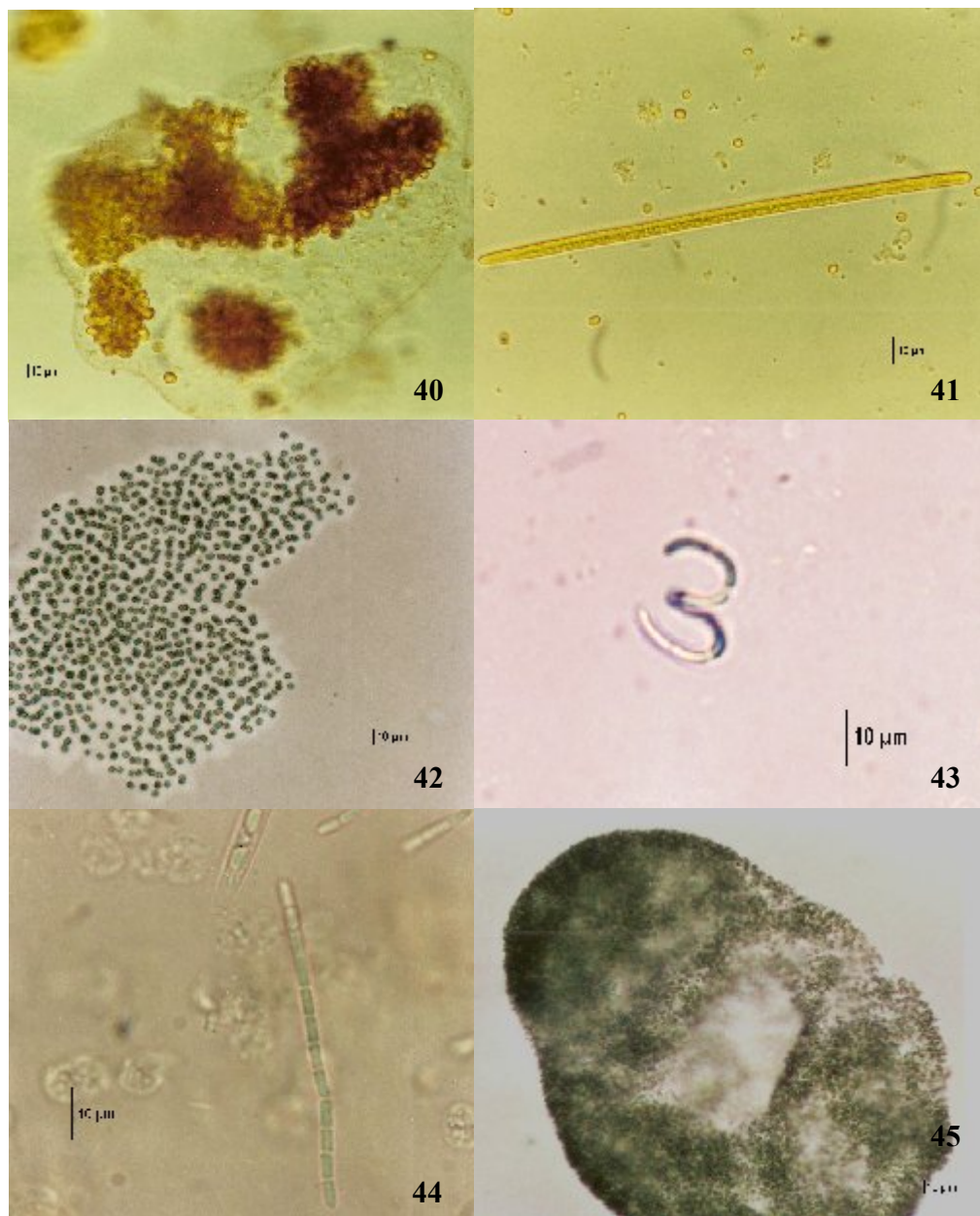
22 – *Anabaena circinalis* **23** – *Aphanizomenon gracile* **24** – *Aphanizomenon issatchenkoi* **25** – *Anabaena crassa* **26** – *Aphanocapsa incerta* **27** – *Aphanocapsa delicatissima*



28 – *Aphanocapsa incerta* 29 – *Chroococcus minor* 30 – *Coelosphaerium evidenter-marginatum* 31 – *Geitlerinema unigranulatum* 32 – *Jaagnema subtilissimum*. 33 – *Limnothrix planctonica*

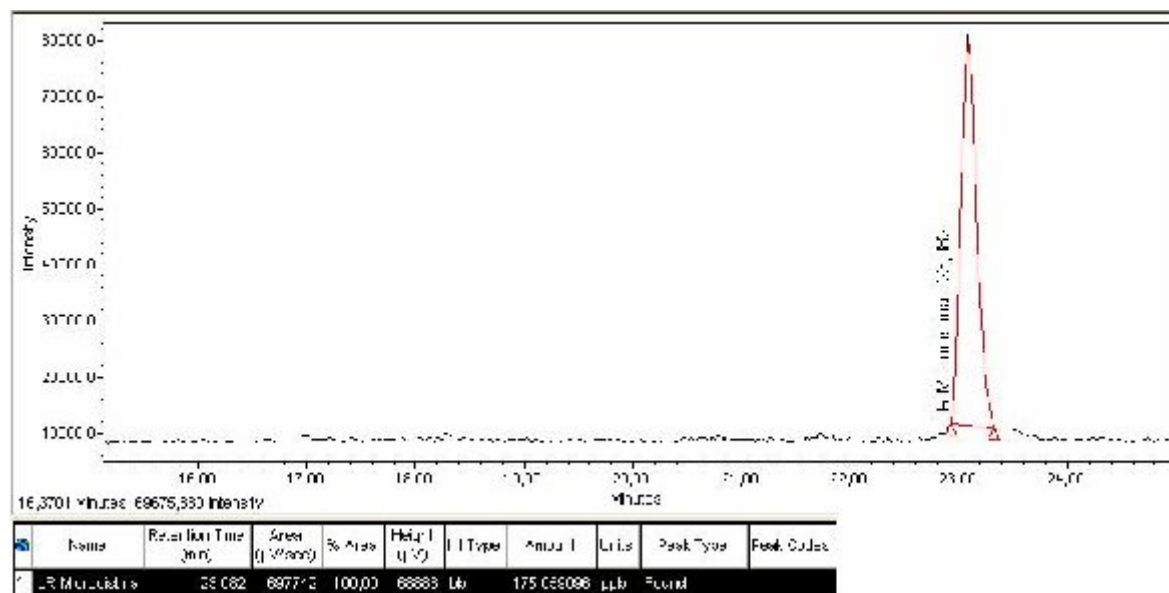
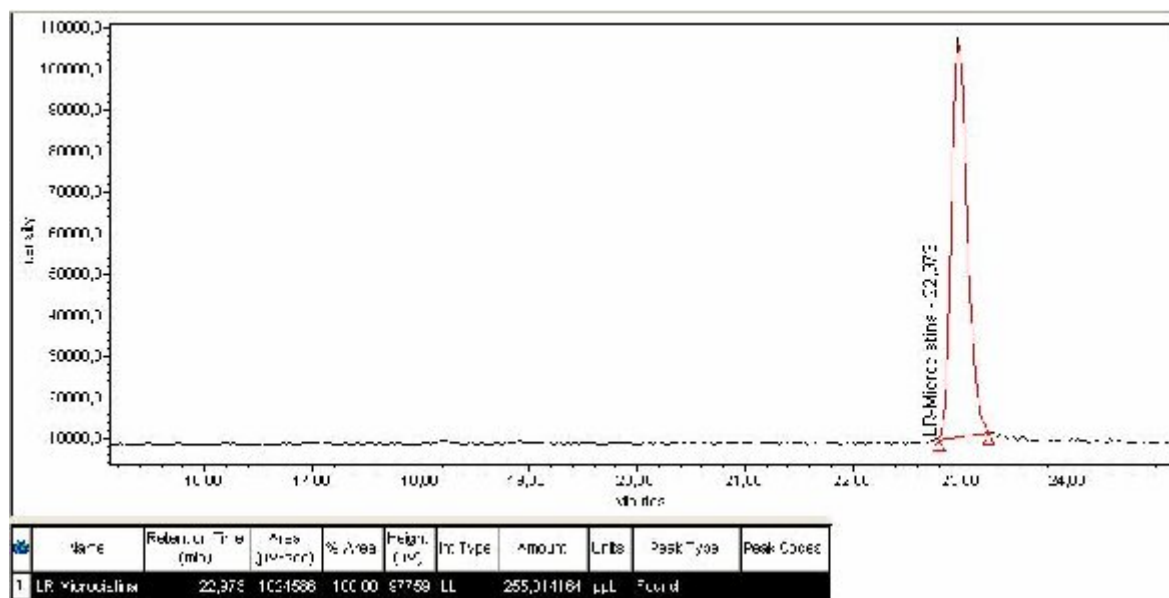


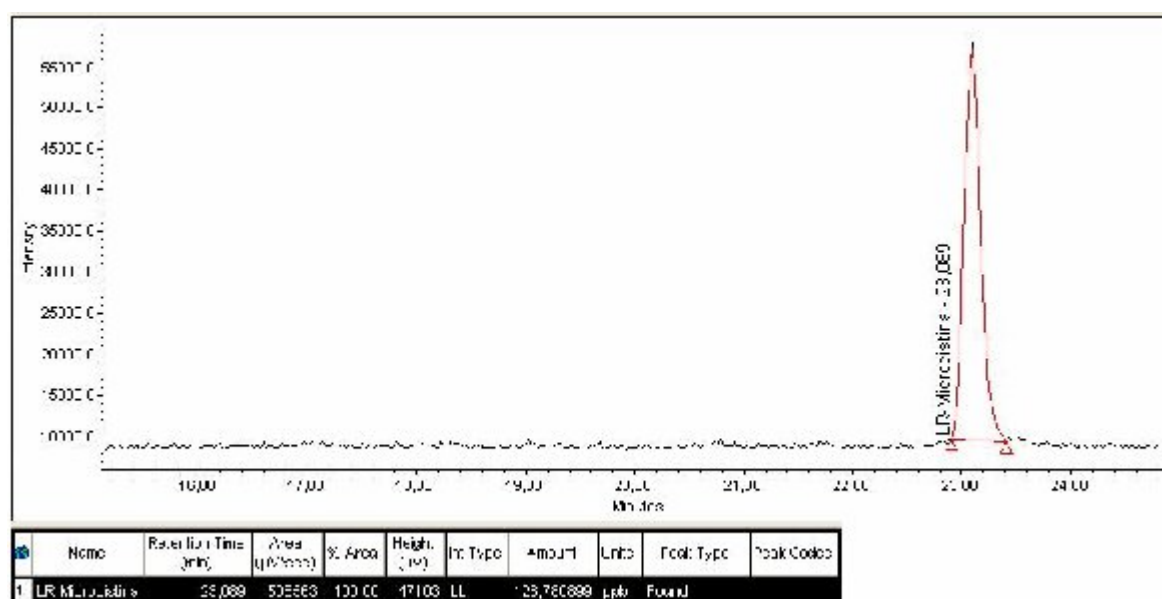
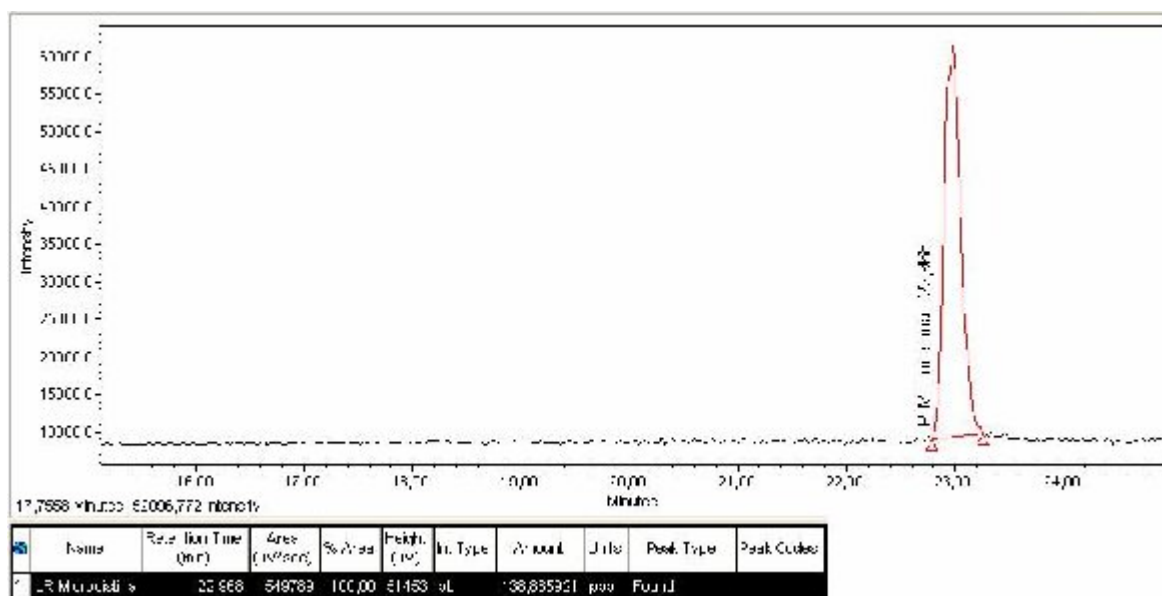
34 – *Merismopedia tenuissima* 35 – *Merismopedia trolleri* 36 – *Microcystis aeruginosa* 37 – *Microcystis panniformis* 38 – *Microcystis protocystis* 39 – *Microcystis botrys*



40- *Microcystis wesenbergii* 41 – *Planktotrix agardhii* 42 – *Radiocystis fernandoii* 43 – *Romeria okensis* 44 – *Romeria victoriae* e *Pseudanabaena mucicola* 45 - *Sphaerocavum brasiliensis*

ANEXO 9 CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DE MICROCISTINA-LR DA PRAIA DOS NAMORADOS E DO IATE CLUBE DE JANEIRO DE 2006





ANEXO 10 SEQUÊNCIAS DOS GENES rDNA 16S DAS LINHAGENS ISOLADAS DO RESERVATÓRIO SALTO GRANDE

Aphanothece sp. CENA118 (1409 bp)

GATGAACGCTGGCGGGTGCCTTAACACATGCAAGTGAACGAGCCTTCGGGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGAG
GGGGATAACGGCCGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAATGAATTTTCGCTGAGGATGAGCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGT
GTGGTAATGGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAG
AAGACATGACGCTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGAAGCGTTATCCGGAATTAATGGGCG
TAAAGCGTCCGACGGCGCCTTGTAAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACCTCCATTTAAGCGATGGAAGCTACAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGG
CAGAGGGAATTTCCGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGAC
GAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTGCTA
GCTAACCGCTTAAGTGTTCGCCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAATATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGGAACGAGGGAGTGCCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGC
ATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAG
AGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGTACACACGTACTACAATGCTACGGAC
AAAGGGTTGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCTAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTA
GTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCCAAGTCGTTACT
CCAACCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Aphanothece sp. CENA122 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCGGGTGCCTTAACACATGCAAGTGAACGAGCCTTCGGGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGAG
GGGGATAACGGCCGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAATGAATTTTCGCTGAGGATGAGCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGT
GTGGTAATGGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAG
AAGACATGACGCTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGCTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGAAGCGTTATCCGGAATTAATGGGCG
TAAAGCGTCCGACGGCGCCTTGTAAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACCTCCATTTAAGCGATGGAAGCTACAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGG
CAGAGGGAATTTCCGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGAC
GAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGGTACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTGCTA
GCTAACCGCTTAAGTGTTCGCCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGGAACGAGGGAGTGCCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGC
ATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAG
AGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGTACACACGTACTACAATGCTACGGAC
AAAGGGTTGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCTAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTA
GTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCCAAGTCGTTACT
CCAACCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Calothrix sp. CENA127 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAAGTCTGTCTTTAGG
TCGGGGACAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGGATGCGCCTTTGGGTGAAAGATTAATTGCCTGAAGAAGAGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTAG
GTGGTGTAAAGGACTACCTAGGCGACGATCTGTAGCTGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCTGAGGGACGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGA
AGATAATGACGCTACTTGAGGAATAAGCATCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCG
TAAAGCGTCCGACGGTGGTTTTGTAAAGTCTGCTGTTAAAGCGTTAGGCTCAACCTAATAAGGGCAGTGGAAGCTATGAGACTAGAGTATGTTAGGGG
TAGAGGGAATTTCCAGCTTACCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGCGCTCTGCTAGGACAATCTGACACTGAGGGAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATAGTAGGCGTTGCCCGTATCGACCCGGGCATTGTGCTA
GCTAACCGCTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAATATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGACTTGACATGTGCGAATCTTGTGAAAGGTGAGAGTGCCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGC
ATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAG
AGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCCTGGGTACACACGTACTACAATGCTACGAAC
AAAGGGCAGCTAGTACGCAATGACATGCAAAATCTCAGAAATCGTAGCTCAGTTTCAGATTGAAGGCTGCAACTCGCCTTATGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATGTCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCCAAGTAGTTATC
CTAACTGTTTCGAGGGGAGATTCCGAAGGTAGGGCTGGTACTGGGGTGAA

Chroococcidiopsis sp. CENA124 (1416 pb)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTGAACGGAGCTTTTCGGAGCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAAGTCTGCCTTTT
GGACCGGGACAACCTGCTGGAACGGCAGCTAAGACCGGATGTGCCCTTGGGTGAAATATTATAGCCAAAAGAGGAGCTCGCGACCGATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAGAGCTACCAAGGCTGCGATCGGTAGCCGGTTTGAGAGGACGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAGG
GAAGACGAATTCAGCTTACCGGTGAGGAATACGATCGGCTAAGTCCGACAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTG
GGCGTAAAGCTCCGACGGTGGCACATCAAGTCTGCTGTCAAAGCCCCAGCTTAACGGGAAGAGGCGGTGGAAGCTGGTAGCTAGAGAGCAATA
GGGGTAGAGGGAATTTCCGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTACTAGGTTGCAACTGACACTGAG
GGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATAGTAGGCGTTTCTCGTATCGACCCGAGGAGTGC
CGAGGCAACCGGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGTATGTG
GTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAACCCGTGGGAAGCTATGGGGTCCGAAAGGAGCCAGAACACAGGTG
GTGCTAGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTGTGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACT
CTAGACAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTACGATGCCCTTACGTCCTGGGCGACACAGTACTACAATGCTAC
GGACAACGGGAAGCCAACACGATGGGGAGCAAAGCCAGCAAACCGTAGCTCAGTTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGCGGAAT

CGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCATACGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTC
ATTACTCTAACCATTTCGTGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Leptolyngbya sp.1 CENA129 (1415 pb)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGCTTTTCGGAGCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTTT
GGTCGGGGACACAGCTGGAACGGCTGCTAATACCCGATGTGCCTTAGGGTGAAAGCTTTAGTGCCAGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGT
TGGTAGTGTAAATGGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCCGCTGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGTAACCTCTTTTGATAGG
GAAGAACAATGACGGTACCTATCGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTAGTCAAGTCAGTTGTAAAGCGTGGAGCTTAACCTCCATAAGGGCAATTGAACTGATTAGCTAGAGTGCGAT
AGGGGCAAGGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGA
GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGGTACTAGGCGTTGCCGTATCGACCCGGGCAGTG
CCGTAGCTAACCGGTTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGT
GGTTTAATTCGATGCACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATGTCGCGAATCTCTGTGAAAGCGGAGAGTGCCATACGGGAGCGCAACACAGGT
GGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCAC
TCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTTACATCCTGGGGTACACACGTAACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCATAAACCCTGGCTCAGTTCAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAATCGCAGTACGATACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCG
TTACTCCAACCGTTTCGCGGAGGAGACGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Leptolyngbya sp. CENA131 (1415 pb)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGGTCTTCGGACCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGTGTGAGAATCTGCCCTTT
GGATGGGGATAACGACTGGAACGGTCGCTAATACCCAATATGCCGAGAGGTGAAACTTATATGGCCAGGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGT
TGGAGTGGTAACGGCACACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCCGCTGAGGGAGGAAGGCCTACTGGTTGTAACCTCTTTTGATAGG
GAAGAAGAAAGTGACGGTACCTATCGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTATTCAAGTCAGCTGTCAAAGGATGGAGCTTAACCTCCATAAAGGCAGTTGAACTGGATAGCTAGAGTGCGAT
AGGGGCAAGGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGA
GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGGATACCTAGGCGTTGCCGTATCGACCCGGGCAGTG
CCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGT
GGTTTAATTCGATGCACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCTTGATGAAAGTCGAGAGTGCCCTCGGGAGCGCAACACAGGT
GGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTCTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCAC
TTTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTAACAATGCTA
CGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGCAAGCTAATCCATAAACCCTGGCTCAGTTCAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAATCGCAGTACGATACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCG
TTACTCCAACCCGCGAGGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Lyngbya sp. CENA128 (1412 pb)

GATGAACGCTGGCGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGG
TTGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCCAATGTGCCGAGAGGTGAAAGGTTTACTGCCTAGGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGA
AGAAGTACTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGTCCGCGAGCGGTTTAAAGTCTGTTGTCAAAGGTCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAACTGAGAGACTGAGTGTGGTAGG
GGTAGAGGGAATTTCCCGGTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACGACGCTGAGGG
ACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGCCGTATCGACCCGTGACGTACCG
TAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGGATGTGGT
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCCAGAACTCCCTTAGAGATGAGGGAGTGCCCTCGGGAGCTGGAACACAGGTGGT
GCATGGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCT
AGAGAGACTGCCGTGGACAACACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTACGG
ACAGAGGGCAGCGAGCGTGCGAGCGCAAGCAATCCATAAACCCTGGCTCAGTTAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGC
TAGTAATCGCAGGTACGATACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCAGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTA
CTCTAACCGTTTCGCGGGGAGGGCGCGCAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Microcystis sp. CENA120 (1420 pb)

GATGAACGCTGGCGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAACTTAACCTTCA
GGACGGGGACACAGTTGGAACGACTGCTAATACCCGATATGCCGCAAGGTGAAACCTAATTTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCCTCTGATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAG
GAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGTCCGCGAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTA
GGGGTAGCAGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAG
GGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTACGCCGTAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGATCGACCCGAGCCGTGC
CGAAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGTG
GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGGAACCCCTGGTGAAGCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTG
TGTCATGGCTGTGTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTTAGTTGCCACGATTAAGTTGGGGACT
CTAAGGAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACAGCTACTACAATGGTCG
GGACAAAGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGACAGTC
ATTACCTCAACCGCAAGGAGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAATCGAAT

Microcystis sp. CENA133 (1413 bp)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAACTTCA
GGACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAGAGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAG
GAAGAAGTTCTGACGCTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATTG
GGCGTAAAGCGTCCGCAAGTGGTACGCCAAGTCTGCTGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTA
GGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAATCAGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAG
GGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGC
CGAAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGTG
GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGCAACCCTGGTGAAAGCTAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTG
GTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACT
CTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTACTACAATGGTTCG
GGACAAAGGGCAGCGAACTCCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAATCGCCGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCCGAAGTCA
TTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAA

Microcystis panniformis CENA121 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAACTTCA
GGACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATATGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAGAGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAACCTCTTTTCTCAAG
GAAGAAGTTCTGACGCTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATTG
GGCGTAAAGCGTCCGCAAGTGGTACGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTA
GGGCTAGTCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAGAACATCAGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAG
GGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGC
CGAAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGTG
GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCCGCAACCCTGGTGAAAGCTGGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTG
GTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACT
CTAAGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTACTACAATGGTTCG
GGACAAAGGGCAGCGAACTCCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAAT
CGCTAGTAATCGCCGTCAGCATACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCCGAAGTCA
TTACCTCAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAA

Synechococcus sp. CENA126 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCAACGGGCTCTTCGGAGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTACAGG
ACGGGGACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCCGATGTGCCGAGAGGTGAAACATTTATGGCCTGTAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAGGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGGAGGAAGGTTTTGGACTGTAAACCCCTTTTCTCAGGGA
AGAAGAAAGTGACGGTACCTGAGGAATAAGCCTCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGAGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATTG
GCGTAAAGCGTCCGCAAGCGGTTAATCAAGTCTGTTGTCAAAGCGTGGGGCTCAACCTCATAAAGGCAATGGAACTGATTGACTAGAGTATGGTAG
GGGTAGCGGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAAGAACACCAGCGGCCGAAAGCGCGTACTGGGCCATAACTGACGCTCATG
GACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTGCGTGAATCGACCCCGCGCAGTGCC
GTAGCCAAAGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCCCGAATCTCTTGGAAACGAGAGAGTGCCTTCGGGAGCGGGGAGACAGGTGG
TGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTGTAGTTGCCATATTAGTTGGGCACCTC
TAGAGAACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGACGAGTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTCCG
GACAGCGAGACGCAAGCCGCGAGGTGAAGCAAACTCCCAACCCGGGCTCAGTTTCAGATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCG
CTAGTAATCGCAGGTACGATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTT
ACCCTAACCGTTTCGCGGAGGGGGCGCCGAAGGTAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Synechococcus nidulans CENA132 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCAACGAGCCTTCGGGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGAATCTGCCCTCAGGAG
GGGGTAACGGCCGGAACAGGCCGCTAATACCCCATGTGCCGAGAGGTGAAATGAAATTCGCTGAGGATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGT
GTGGTAACGGCGCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGATGGCA
GCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAG
AAGACATGACGCTACTTGAGGAATAAGCCAGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAAATTATTGGCG
TAAAGCGTCCGCAAGCGGCCCTTGTAGTCTGTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACCTCCATTTGAGCGATGGAACACTACAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGG
CAGAGGGAATTCGCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGAC
GAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCGTA
GCTAACCGGTTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGTATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCTCGCAATCCCTTGGAAACGAGGAGCGCCTTCGGGAGCGCAGACAGGTGGTGC
ATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGCTTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAG
AGAGACCGCCGTTGATAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGAC
AAAGGGTTGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCTAATCCATAAACCCTGGCTCGGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTA
GTAATCGCAGTTCAGCATCTCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACT
CCAACCCTTGTGGAGGAGACGCGGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

Romeria victoriae Kom. & Cronb. CENA123 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCAACGGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTACCTACAGA
CTCGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATATGCCCTCGGGTGAAAGATTTATCATCTGTAGATGAGCTTGCGTCCGATTAGCTAGATG

GAGTGGTAAAGGCACACCATGGCGACGATCGGTAAGTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGTCTGTGGATTGTAACCTCTTTTGTAGGGA
AGATAATGACGGTACCTAACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGTACGTAGGCGGTTTTATAAGTCTGTTGTCAAAGCCCCGAGGCTTAACCTTGAAAGGCAATGGAACTGTAAGACTAAAGAGAGATAGGGG
CAGGAGGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGTCCTGCTGGATCTCAACTGACGCTGAAGTAC
GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGGTACTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGGTCAGTGCCGTA
GCTAACCGGTTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCCTCCTGAAAGGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTATTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAG
ATAGACTGCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGCCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTGGGAC
AAAGAGTCGCGAGCATGCGAATGCAAGCTAATCTCGTAAACCCAGTCTTAGTTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCGGAATCGCTA
GTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCGTCACGCCATGGAAGCTGGTCACGCCCCAAGTCGTTATC
TCAACCCGCAAGGGAGGGAGTTCGCTAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAA