

RENATO JOSÉ REIS MOLICA

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA ECOLOGIA,
TOXICOLOGIA E FILOGENIA DE *Cylindrospermopsis*
raciborskii (CIANOBACTÉRIA)**

**TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS**



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2003

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA ECOLOGIA,
TOXICOLOGIA E FILOGENIA DE *Cylindrospermopsis raciborskii*
(CIANOBACTÉRIA)

Renato José Reis Molica

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Dra.Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Rio de Janeiro
Dezembro de 2003

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA ECOLOGIA,
TOXICOLOGIA E FILOGENIA DE *Cylindrospermopsis raciborskii*
(CIANOBACTÉRIA)

Renato José Reis Molica

Orientadora: Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Tese de Doutorado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovada por:

Prof. Olaf Malm

Profa. Christina W. Castelo Branco

Profa. Vera Lúcia M. Huszar

Rio de Janeiro
Dezembro de 2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Molica, Renato José Reis

Contribuição ao conhecimento da ecologia, toxicologia e filogenia de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cianobactéria) / Renato José Reis Molica. Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2003.

xi, 69 f.

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF.

Cylindrospermopsis raciborskii. 2. Saxitoxinas. 3. Eutrofização. 4. “El Niño”. 5. *Anabaena spiroides*. 6. *Raphidiopsis* sp. 7. Cianobactérias. 8. Reservatório de abastecimento. 9. Reservatório Tapacurá. 10. Reservatório Tabocas. 11. Reservatório Ingazeira. 12. Tese.

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF

II. Título

Aos meus queridos pais, José Molica e Therezinha.

À Dani, meu amor. Sua coragem, inteligência e determinação foram incentivos à conclusão desta tese.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Sandra Azevedo, não somente pela orientação desta tese, mas por estes quase 14 anos de trabalho conjunto, pela sua amizade, generosidade, incentivo e por confiar e acreditar em mim, quando me indicou para ir para Recife.

Ao Prof. Marc Bouvy (IRD – França), co-orientador desta tese, por toda ajuda, oportunidades e amizade. Um exemplo de ética na ciência. Aprendi muito com seus ensinamentos.

Aos Prof. Philippe Dufour, Jean Francois Humbert e Christophe Leboulanger pela orientação durante o período que passei na Station d'Hydrobiologie Lacustre, Thonon les Bains, França.

Ao Prof. Nestor Lagos que me recebeu em seu laboratório na Universidade do Chile, onde aprendi a metodologia de análise de saxitoxinas.

À diretoria do ITEP, em nome de Fátima Brayner, pela autorização do meu pedido de afastamento o que possibilitou a conclusão desta tese.

Ao Prof. Jean Remy Davee Guimarães, revisor desta tese.

À atual equipe do Laboratório de Ecofisiologia de Microalgas (LEMI) (Cláudia, Maristela, Gustavo, Eryvelton e Humberto) e a tantos outros estagiários e bolsistas que por lá passaram. Um agradecimento especial à Maristela e Cláudia pela ajuda, paciência e por tantos “galhos quebrados” nesses últimos meses.

A Dani, pelo apoio e compreensão, em razão da minha ida para o Rio de Janeiro para concluir esta tese.

A Silvia, pela amizade e profissionalismo. Juntos iniciamos a implantação do LEMI, onde boa parte desta tese foi realizada.

Aos meus amigos Bitty, Marcelinho, Mauro e Milton, pela amizade.

Ao meu amigo Eduardo Alécio, pela ajuda e “discussões científicas” que além de importantes para conclusão deste trabalho, possibilitaram a melhoria da qualidade analítica de várias metodologias implantadas no LEMI.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LECT): Raquel, Aloysio, Simone, Andréia, Valéria, Marcelo e João, pelas inúmeras ajudas.

A Ana Cláudia e Patrícia Domingos, que já não mais estão no LECT, mas que muito me ajudaram e apoiaram.

A Maria Aparecida (Cida), bibliotecária do ITEP, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos amigos e amigas do ITEP (não vou citar nomes para não correr o risco de esquecer alguém) que organizaram e compareceram a festa de “despedida” e incentivo, dias antes de eu ir para o Rio de Janeiro terminar a tese.

A “Tiara”, pelo empréstimo do carro, o que facilitou meus deslocamentos entre a Barra e o Fundão na reta final da tese.

Ao meu irmão Fernando, por sempre me apoiar.

A Sandra Brito, secretária da pós-graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, pela ajuda e paciência em responder a vários “emails” com inúmeras dúvidas sobre número de créditos, disciplinas, etc.

À FACEPE, que com o financiamento do projeto APQ-1226.2 12/98 possibilitou a realização de parte desta tese.

Ao Institut de Recherche pour le Développement (IRD) pela concessão da bolsa que possibilitou a minha viagem para Thonon les Bains, França.

Ao Pronex/CNPq (proc. nº 66.1421/1996-1), pelo financiamento das passagens aéreas para o Chile.

RESUMO

Cylindrospermopsis raciborskii vem se tornando uma das espécies de cianobactérias de maior interesse pelos pesquisadores, em razão do seu potencial para produzir toxinas, formar florações e pelo aumento do número de relatos de sua ocorrência nos ecossistemas aquáticos continentais de diferentes países, inclusive do Brasil. Nesse sentido, esta tese teve por objetivos: 1) avaliar as características limnológicas de dois reservatórios de abastecimento - Tapacurá e Ingazeira, ambos localizados no Estado de Pernambuco -, onde florações de *C. raciborskii* são comuns, 2) caracterizar as saxitoxinas produzidas por uma cepa de *C. raciborskii* (ITEP-018), 3) identificar as neurotoxinas presentes durante uma floração de *C. raciborskii* e *Anabaena spiroides* no reservatório Tapacurá e 4) estudar a diversidade genética de cepas de *C. raciborskii*. Os resultados indicaram que uma maior estabilidade do ambiente, associada a uma maior concentração de nutrientes e baixa intensidade luminosa, favoreceram a formação de florações de *C. raciborskii* nos dois reservatórios. As análises mostraram que cepa ITEP-018 produz seis saxitoxinas incluindo uma nova variante. As neurotoxinas identificadas durante uma floração no reservatório Tapacurá foram saxitoxinas e um inibidor de acetilcolinesterase, provavelmente anatoxina-a(s), produzidas por *C. raciborskii* e *A. spiroides*, respectivamente. A análise filogenética mostrou uma maior homologia entre cepas de *Cylindrospermopsis* com a mesma origem geográfica, e estas puderam ser reunidas em três grupos: cepas de origem americana, européia e africana/australiana. Os resultados chamam a atenção para importância do monitoramento de florações tóxicas de cianobactérias e a criação de programas que visem a diminuição do estado trófico dos ecossistemas aquáticos.

ABSTRACT

The increasing concern about *Cylindrospermopsis raciborskii* is due to the potential of this cyanobacterium to produce toxins and form blooms and mainly due to the raise of reports on its occurrence in aquatic ecosystems of many countries, including Brazil. In this sense, the objectives of this work were: 1) to evaluate the limnological characteristics of two drinking water suppliers - Tapacurá and Ingazeira reservoirs both located in Pernambuco State -, where *C. raciborskii* blooms are frequent, 2) to characterize the saxitoxins produced by a *C. raciborskii* strain (ITEP-018), 3) to identify the neurotoxins present during *C. raciborskii* and *Anabaena spiroides* bloom in Tapacurá reservoir and 4) to examine the genetic diversity of *C. raciborskii* strains. The results have shown that an environmental stability associated with a high level of nutrients and low light availability favored *C. raciborskii* blooms in Tapacurá and Ingazeira reservoirs. The strain ITEP-018 produces six saxitoxins, including a new analogue. The neurotoxins identified during a cyanobacterial bloom in Tapacurá reservoir were saxitoxins and an acetylcholinesterase inhibitor, probably anatoxin-a(s), produced by *C. raciborskii* and *A. spiroides*, respectively. The phylogenetic analyses have shown a high homology between *Cylindrospermopsis* sp. strains from the same geographical origin and those could be assembled in three different clusters: strains of European, American and African/Australian origins. The results show the necessity of continuous monitoring of toxic cyanobacterial blooms and implementation of management plans to diminish the trophic state of aquatic ecosystems.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Considerações Gerais | 1 |
| 1.2 Cianobactérias | 1 |
| 1.3 Toxinas produzidas por cianobactérias | 3 |
| 1.4 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju | 8 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Geral | 15 |
| 2.2 Específicos | 15 |
| | |
| 3 RESUMOS DO MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS ARTIGOS QUE COMPÕEM ESTA TESE | 16 |
| 3.1 Características limnológicas do reservatório Tapacurá durante um período de seca | 16 |
| 3.1.1 Resumo do material e métodos | 16 |
| 3.1.2 Resumos dos resultados e discussão | 18 |
| | |
| 3.2 Dinâmica de floração tóxica de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> em um reservatório localizado na região semi-árida do nordeste brasileiro | 24 |
| 3.2.1 Resumo do material e métodos | 24 |
| 3.2.2 Resumo dos resultados e discussão | 25 |
| | |
| 3.3 Produção de saxitoxinas por uma cepa de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> isolada do reservatório Tabocas, Caruaru, Brasil: demonstração de uma nova variante de saxitoxina | 30 |
| 3.3.1 Resumo do material e métodos | 30 |
| 3.3.2 Resumo dos resultados e discussão | 32 |
| | |
| 3.4 Confirmação da presença de saxitoxinas e de um composto similar a anatoxina-a(s) durante uma floração de cianobactérias num reservatório de abastecimento público | 34 |
| 3.4.1 Resumo do material e métodos | 34 |
| 3.4.2 Resumo dos resultados e discussão | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.5 Diversidade genética de cepas de <i>Cylindrospermopsis</i> e <i>Raphidiopsis</i> isoladas de quatro continentes | 40 |
| 3.5.1 Resumo do material e métodos | 40 |
| 3.5.2 Resumo dos resultados e discussão | 41 |
| 4 DISCUSSÃO GERAL | 45 |
| 5 CONCLUSÕES | 49 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| ANEXO 1 Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. Marc Bouvy, Silvia Nascimento, Renato J.R. Molica, Andréa Ferreira, Vera Huszar and Sandra M. F. O. Azevedo. <i>Hydrobiologia</i> , v. 493, p. 115-130, 2003 | 64 |
| ANEXO 2 Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. Marc Bouvy, Renato Molica, Simone de Oliveira, Mauro Marinho and Beatriz Beker. <i>Aquatic Microbial Ecology</i> , v. 20, p. 285-297, 1999 | 65 |
| ANEXO 3 Toxins in the freshwater cyanobacterium <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including a demonstration of a new saxitoxin analogue. Renato Molica, Hideyuki Onodera, Carlos Garcia, Mariella Rivas, Dario Andrinolo, Silvia Nascimento, Hiroshi Meguro, Yasukatsu Oshima, Sandra Azevedo and Nestor Lagos. <i>Phycologia</i> , v. 41, n.6, p. 606-611, 2002 | 66 |
| ANEXO 4 Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like in a cyanobacterial bloom in a Brazilian drinking water supply. Renato Molica, Eduardo. J. Alécio-Oliveira, Paulo V. V. C. Carvalho, Anapaula N. S. F. Costa, Maristela C. C. Cunha, Gustavo L. Melo, Sandra M. F. O. Azevedo. Submetido para publicação na <i>Harmful Algae</i> | 67 |
| ANEXO 5 Genetic diversity of <i>Cylindrospermopsis</i> and <i>Raphidiopsis</i> strains (Cyanobacteria) isolated from four continents. Muriel Gugger, Renato Molica, Brigitte Le Berre, Philippe Dufour, Cécile Bernard e Jean-François Humbert. Submetido para publicação no <i>Journal of Phycology</i> | 68 |
| ANEXO 6 Outros textos publicados durante a realização desta tese | 69 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Esta tese é composta de cinco artigos, sendo que três já estão publicados e dois foram submetidos para publicação. No item 3 são apresentados os resumos do material e métodos, resultados e discussão desses artigos e as versões completas dos mesmos estão incluídas nos anexos.

1.2 Cianobactérias

Cianobactérias são procariotos fotossintéticos que possuem a habilidade de sintetizar clorofila-a. A água é o doador de elétrons durante o processo fotossintético, o que gera a liberação do oxigênio (O₂). As cianobactérias, até recentemente, eram também caracterizadas pela sua capacidade de formar ficobilinas, por exemplo ficocianina e ficoeritrina (Whitton & Potts, 2000). Entretanto, um grupo de microrganismos procariotos que não possuem ficobilinas, mas sintetizam clorofila-a e clorofila-b, denominados proclorófitas, passaram a integrar o grupo das cianobactérias (Lee, 1999; Whitton & Potts, 2000).

As cianobactérias representam um grupo muito antigo de procariotos fotossintéticos. Onze taxa fossilizados semelhantes às atuais Oscillatoriales, cujas datações ficaram entre 3,3 a 3,5 bilhões de anos, foram identificados em uma região do nordeste da Austrália. Esses fósseis sugerem a importância das cianobactérias no processo de surgimento da vida no nosso planeta, em razão da sua participação no início da formação da atual atmosfera rica em oxigênio (Wynn-Williams, 2000).

Esse grupo de microrganismos mostra uma considerável diversidade morfológica. A forma mais simples é a unicelular, que pode ser livre ou incorporada em um envelope mucilaginoso (colônia). A evolução dessas formas resultou na formação de uma fileira de células denominada de tricoma. Quando este tricoma é circundado por uma bainha de mucilagem, ele é chamado de filamento. Assim, é possível haver mais de um tricoma formando um filamento (Lee, 1999).

Algumas das razões do sucesso das cianobactérias nos ecossistemas atuais se deve a sua longa história evolucionária. Por isso, é possível identificar a ocorrência de cianobactérias em ambientes extremos, tais como geleiras (Vincent, 2000), solos de deserto (Wynn-Williams, 2000), fontes termais (Ward & Castenholz, 2000) ou em locais com baixa concentração de O₂ (Whitton & Potts, 2000), além da tolerância à luz ultravioleta (UV-B e UV-C) (Castenholz & Garcia-Pichel, 2000). As cianobactérias também formam associações simbióticas com animais e plantas (Adams, 2000). A maior diversidade de cianobactérias, entretanto, é registrada em ambientes marinhos e de água doce com pH neutro a alcalino (Chorus & Bartram, 1999).

O sucesso de crescimento de uma espécie depende de sua habilidade para otimizar a obtenção de recursos, utilizá-los eficientemente e evitar suas perdas. É improvável que qualquer organismo possua a flexibilidade de levar vantagem sob todas as circunstâncias de um ambiente específico, porém o surgimento de um dominante sugere que ele tem as características necessárias para maximizar seu crescimento sob a condição ambiental que estiver prevalecendo (Oliver & Ganf, 2000). Sob determinadas condições ambientais as cianobactérias podem se tornar a parcela dominante do fitoplâncton de lagos, reservatórios e rios, formando muitas vezes florações. O termo floração é vago e não define exatamente uma quantidade específica de células por unidade de volume. Normalmente, diz-se que há uma floração quando o número total de células passa a ser maior que a média do corpo d'água. Em corpos d'água utilizados para abastecimento humano, a floração é definida em termos do número de células que passa a ser incômodo e/ou perigoso para populações humanas (a partir de 10×10^3 ou 20×10^3 células mL⁻¹) (Oliver & Ganf, 2000; Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2001).

O processo de eutrofização dos corpos d'água, que é o enriquecimento com nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, é o principal fator responsável pelas florações de cianobactérias (Chorus & Bartram, 1999). O aumento das cargas de nutrientes nas águas normalmente decorre de alterações nos mananciais, como remoção de florestas, desenvolvimento agropecuário, industrial e urbanização. A eutrofização das águas interiores é considerada um dos maiores problemas ambientais em nível mundial. Ela causa grandes impactos negativos ecológicos, de saúde e economia, mediante a deterioração de

um recurso primário e finito, a água (Tundisi, 2001). De acordo com Tundisi (2003), não existe uma estimativa real da eutrofização dos corpos d'água brasileiros e a maior parte da população brasileira habita a região costeira do país ou está, no máximo, a 100 km da costa. O mesmo autor ressalta a necessidade de um esforço para se estimar a contaminação e eutrofização das águas costeiras. Por outro lado, sabe-se que 58,4% dos municípios brasileiros não possuem rede coletora de esgoto (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2000) e que a carga anual de fósforo, nitrogênio e carbono para águas residuárias não tratadas é de 196.354, 736.329 e 4.908.857 ton/ano, respectivamente (Tundisi, 2003). Portanto, esses dados sugerem que muitos ecossistemas aquáticos do país estejam eutrofizados ou em acelerado processo de eutrofização.

Há várias publicações que relacionam a ocorrência de florações de cianobactérias com o processo de eutrofização em copos d'água do país. Por exemplo, Bouvy et al. (2000), que estudaram 39 reservatórios do semi-árido Pernambuco, concluíram - baseando-se na relação clorofila-a-fósforo total como parâmetro de classificação trófica - que 90% desses sistemas estavam eutrofizados e destes, 70% apresentavam dominância de cianobactérias. Huszar & Silva (1999) fizeram um levantamento sobre os estudos realizados nas cinco últimas décadas, enfocando a ecologia do fitoplâncton continental no Brasil. Constataram que em 134 sistemas lênticos abordados nos trabalhos, as cianobactérias eram dominantes em 52%, o que segundo as autoras, pode ser considerado um indicativo da predominância de sistemas eutrofizados no Brasil.

1.3 Toxinas produzidas pelas cianobactérias

As florações de cianobactérias causam grandes problemas quando surgem em reservatórios de abastecimento público. Todavia, algumas de suas conseqüências, como entupimento dos filtros nas estações de tratamento e produção de compostos que dão sabor e odor à água, além de não serem considerados um risco para saúde pública, não são exclusivos às cianobactérias.

No entanto, a capacidade de alguns gêneros de cianobactérias formadores de florações produzirem toxinas torna esta classe de microrganismos um grupo diferenciado dentro da comunidade fitoplanctônica. Os problemas causados pelas florações tóxicas de

cianobactérias já são conhecidos desde o século retrasado (Francis, 1878 apud Carmichael, 1994; Moestrup, 1996).

As toxinas de cianobactérias vêm despertando a atenção de diversos grupos de pesquisa, companhias responsáveis pelo tratamento e distribuição de água potável e de setores ligados à saúde humana em razão: (a) do aumento do número de registros de florações tóxicas de cianobactérias em reservatórios destinados ao abastecimento público; (b) da descoberta de novas toxinas e dos riscos associados a elas e (c) do aumento dos relatos de intoxicação aguda e crônica, tanto em animais como em seres humanos.

As neurotoxinas e hepatotoxinas podem ser consideradas os principais agentes tóxicos produzidos pelas cianobactérias, pois causam sérios danos a vida animal e a saúde humana, quando presentes em águas de recreação e/ou consumo.

As neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias até agora identificadas são: anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s), e as pertencentes ao grupo das saxitoxinas (PSPs). Apesar de possuírem mecanismos de ação diferentes, todas causam um bloqueio neuromuscular, levando o animal à morte por parada respiratória (FIG. 1; TAB. 1).

Até hoje, não há nenhum registro confirmado de mortes humanas causadas por neurotoxinas produzidas por cianobactérias. Entretanto, alguns gêneros de dinoflagelados marinhos, que também produzem toxinas do grupo das saxitoxinas, já foram responsáveis por mortes de seres humanos, que consumiram mexilhões que haviam acumulado essas toxinas durante eventos de marés vermelhas (Anderson, 1994).

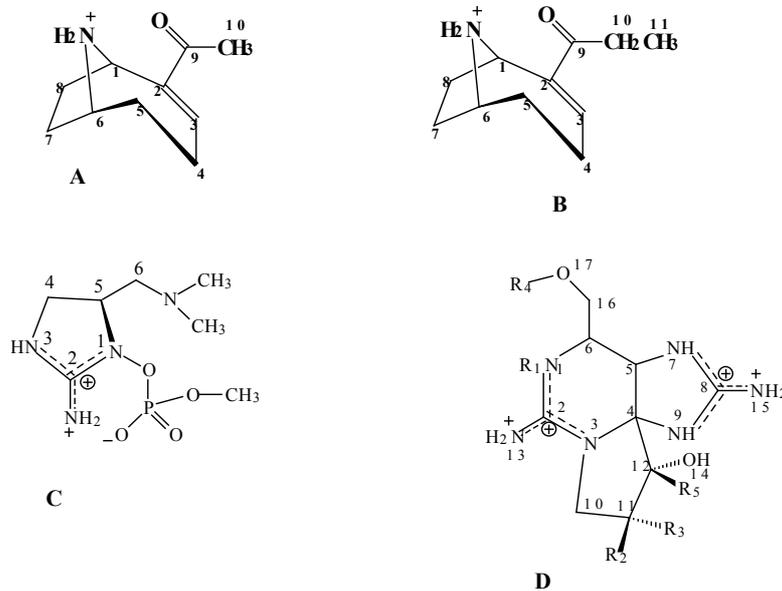


FIGURA 1 – Estrutura das neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias. (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, (C) anatoxina-a(s) e (D) saxitoxinas (alterações em R1, R2, R3, R4, R5 geram mais de 20 variantes conhecidas com diferentes toxicidades).

As hepatotoxinas são as toxinas produzidas por cianobactérias mais comumente relacionadas com casos de envenenamento animal e humano em todo o mundo. As duas principais hepatotoxinas, nodularinas e microcistinas, são de natureza peptídica, e mais recentemente, um alcalóide hepatotóxico denominado cilindrospermopsina foi isolado de quatro gêneros de cianobactérias (FIG. 2; TAB. 1).

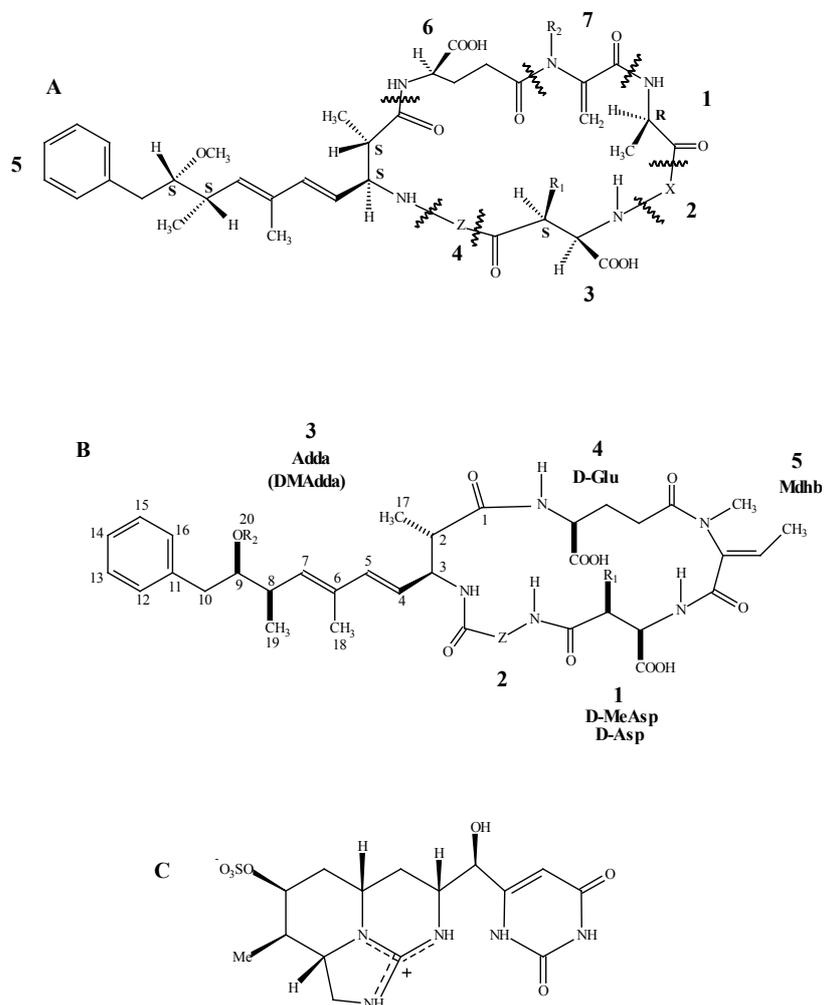


FIGURA 2 - Estrutura geral das microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina. (A) Microcistina um heptapeptídeo cíclico. X e Z representam os dois de L-aminoácidos que podem variar e R^1 e R^2 são H ou CH_3 . (B) Estrutura geral das nodularinas um pentapeptídeo cíclico, com as mesmas representações adotadas para as microcistinas. (C) Estrutura da cilindrospermopsina, que é um alcalóide.

Intoxicações de populações humanas (gastroenterites) pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países como: Austrália, Inglaterra, China, África do Sul e Suécia (Falconer, 1996; Annadotter et al., 1995). No Brasil, Teixeira et al. (1993) descreveram uma forte evidência da correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório de Itaparica e a morte de

88 pessoas dentre as 2000 intoxicadas pelo consumo da água do reservatório, em março-abril de 1988. Vale ressaltar, entretanto, que não se comprovou que a intoxicação foi em razão do consumo de água contendo cianobactérias tóxicas.

TABELA 1 - Características gerais das toxinas produzidas por cianobactérias e os gêneros em que foram encontradas.

| Toxina | Como e onde age | DL ₅₀ ¹ | Gênero |
|----------------------------------|--|-------------------------------|---|
| Microcistinas ² | Inibidora das enzimas fosfatases 1 e 2A - Fígado (hepatócitos) | 50 a 1000 | <i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix (Oscillatoria)</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapalosiphon</i> e <i>Anabaenopsis</i> |
| Nodularinas ² | Inibidora das enzimas fosfatases 1 e 2A - Fígado (hepatócitos) | 50 a 1000 | <i>Nodularia</i> |
| Cilindrospermopsina ² | Inibidora de síntese proteica - Fígado. | 200 | <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Aphanizomenon</i> e <i>Raphidiopsis</i> |
| Saxitoxinas ² | Liga-se aos canais de sódio - membrana do axônio | 10 a 1300 | <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> e <i>Cylindrospermopsis</i> |
| Anatoxina-a ² | Liga-se ao receptor da acetilcolina - sinapse nervosa | 200 | <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix (Oscillatoria)</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Raphidiopsis</i> |
| Anatoxina-a(s) | Inibidora de acetilcolinesterase - sinapse nervosa | 20 | <i>Anabaena</i> |

Fonte: Chorus, I. Toxic...,1999; Li, R. Isolation..., 2001a; Namikoshi, M. Simultaneous..., 2003

O primeiro caso confirmado no mundo de morte humana causada por uma toxina produzida por cianobactérias ocorreu na cidade de Caruaru - PE, onde mais de 70 pacientes renais vieram a falecer em decorrência de uma grave hepatotoxicose, ocasionada por uma contaminação por microcistinas na água utilizada nas sessões de hemodiálise (Jochimsen et al., 1998; Carmichael et al., 2001).

Como consequência direta desses casos de intoxicações humanas, principalmente o de Caruaru, a FUNASA incluiu na Portaria 1469/00/MS (FUNASA, 2001), a qual define o padrão de potabilidade da água para consumo humano, o monitoramento da densidade de cianobactérias na água bruta do reservatório e de algumas toxinas na água tratada.

¹ Dose letal 50%. Micrograma da toxina purificada por quilograma de peso corpóreo (µg/Kg). Injeções intraperitoniais em camundongos.

² Existem variantes estruturais com diferentes toxicidades.

1.4 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya and Subba Raju

Cylindrospermopsis raciborskii é uma cianobactéria filamentosa pertencente à ordem Nostocales e sua ocorrência está restrita a ambientes de água doce. As principais características da espécie são tricomas isopolares, solitários (não formam colônia), cilíndricos ou ligeiramente estreitos nas extremidades, células são mais longas do que largas e possuem aerótopos. Os tricomas podem ser retos, sigmóides ou espiralados (FIG. 3). Os heterocitos se formam exclusivamente a partir das células terminais, depois de uma divisão assimétrica da menor parte da célula apical e os acinetos são cilíndricos (Komárková, 1998; Sant'Anna & Azevedo, 2000).

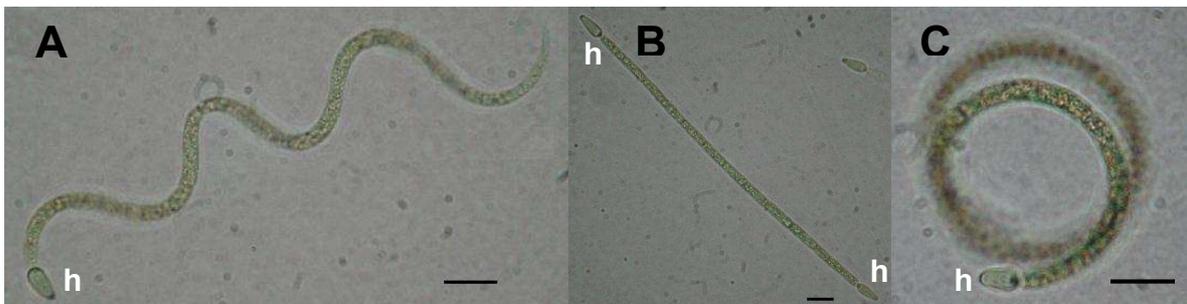


FIGURA 3 – Diferentes formas do tricoma de *C. raciborskii*. (A) sigmóide – cepa ITEP-031; (B) reto – cepa ITEP-30 e (C) espiralado – cepa ITEP-031; Escala = 10 μ m; (h indica os heterocitos).

C. raciborskii vem se tornando uma das espécies de cianobactérias de maior interesse de pesquisadores, em parte pelo seu potencial de produzir toxinas e formar florações, mas principalmente pelo aumento do número de relatos de sua ocorrência nos últimos 7 anos em ecossistemas aquáticos continentais de regiões tropicais, subtropicais, e mesmo temperadas, de diferentes países (Padisák, 1997). Esse fato é curioso, pois a espécie inicialmente foi descrita como sendo exclusivamente tropical, porém seu registro em ambientes temperados vem aumentando consideravelmente (Dokulil & Mayer, 1996; Briand et al., 2002; Saker et al., 2003)

A sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes é bastante alta, com ocorrências descritas desde reservatórios oligotróficos de regiões subtropicais, a lagos

tropicais hipereutróficos (Padisák, 1997). O gênero *Cylindrospermopsis* se desenvolve quase que exclusivamente em águas com temperatura acima de 20°C. Em regiões de clima temperado, ocorre somente durante os meses mais quentes, mesmo assim em lagos rasos, que têm um aquecimento maior de suas águas (Padisák, 1997). Entretanto, a presença de *C. raciborskii* já foi observada na lagoa do Peri (Florianópolis – SC) durante o inverno, quando a temperatura da água atingiu 15°C (Matthiensen & Barbosa 2003).

No Brasil, há registros desse gênero em vários Estados. A TAB. 2, apresenta um resumo desses registros.

TABELA 2 – Registro de florações, dominância ou ocorrência do gênero *Cylindrospermopsis* em reservatórios de vários Estados do país e no Distrito Federal.

| Localização | Referência^{3, 4} |
|---------------------|----------------------------------|
| Distrito Federal | Branco & Senna (1991) |
| Espírito Santo | Fernandes (2003) |
| Goiás | Bazza et al. (1999) |
| Minas Gerais | Jardim et al. (2001) |
| Paraíba | Mendes et al. (2003) |
| Paraná | Proença et al (2002) |
| Pernambuco | Bouvy et al. (2000) |
| Rio de Janeiro | Huszar et al. (2000) |
| Rio Grande do Norte | Panosso et al. (2003) |
| Rio Grande do Sul | Proença et al. (2002) |
| Santa Catarina | Komáková et al. (1999) |
| São Paulo | Souza et al. (1998) |
| Tocantins | Silva et al. (2003) |

O sucesso de *C. raciborskii* em todo o mundo pode ser atribuído a diversas razões, entre elas: habilidade de flutuar, o que permite explorar diferentes extratos da coluna d'água; baixo requerimento de luz; alta taxa de assimilação do amônio, possibilitando a utilização deste elemento rapidamente; capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico; alta afinidade pelo fósforo e grande capacidade de estoque deste elemento; e finalmente resistência a predação pelo zooplâncton (Padisák, 1997). A estabilidade da coluna d'água também é um fator que favorece a dominância de *C. raciborskii* (Hawkins, 1996; Saker,

³ Citou-se apenas uma referência por Estado.

1996; Ferreira, 2002). McGregor & Fabbro (2000) monitoraram 47 reservatórios australianos e concluíram que a dominância de *C. raciborskii* (a espécie foi encontrada em 70% dos reservatórios e em 50% a dominância foi sazonal) foi favorecida por vários fatores ambientais e hidrológicos, tais como: grande tempo de residência da água, alta temperatura, pH elevado e estratificação da coluna d'água.

O *El Niño* é um fenômeno atmosférico-oceânico caracterizado por um aquecimento anormal das águas superficiais no oceano Pacífico Tropical, e que pode afetar o clima regional e global, mudando os padrões de vento a nível mundial, e afetando assim, os regimes de chuva em regiões tropicais e de latitudes médias (Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC, 2003). No nordeste do Brasil, o fenômeno *El Niño* está ligado a intensificação dos períodos de estiagem. Durante os anos 1997/1998 aquele fenômeno foi bastante intenso o que casou uma redução do volume de vários reservatórios, resultando num aumento da condutividade elétrica da água, da concentração de nutrientes e numa maior estabilidade da coluna d'água (Bouvy et al., 2000). Esses fatores, associados a uma elevada temperatura média da água e altos níveis de radiação solar, parecem ter propiciado a dominância/floração do gênero *Cylindrospermopsis* nos sistemas estudados (Bouvy et al., 2000). Para Ferreira (2002), a estabilidade da coluna d'água do reservatório Tapacurá⁵, ocasionada pelas altas temperaturas observadas no período de estiagem, propiciou a passagem de um sistema mesclado (oxidante) rico em nitrato, para um sistema estratificado (reductor) rico em amônio, criando um ambiente favorável à dominância e a formação da floração de *C. raciborskii*. Outros autores também reportaram a maior afinidade de *C. raciborskii* ao amônio que ao nitrato (Présing et al., 1996). Saker et al. (1999a), trabalhando em condição de cultivo, avaliaram o crescimento de *C. raciborskii* em relação a diferentes fontes de nitrogênio: nitrato, nitrogênio atmosférico e amônio. As maiores taxas de crescimento foram registradas quando a fonte de nitrogênio do meio de cultura era o amônio.

A maioria dos trabalhos sobre ecologia e fisiologia de *C. raciborskii* foram publicados nos últimos 6 anos, como consequência direta do aumento dos registros de sua

⁴ Para mais registros, consultar Sant'Anna & Azevedo (2000).

ocorrência em todo o mundo, o que gerou um maior interesse pela espécie. Todavia, o conhecimento sobre *C. raciborskii* é ainda pequeno, e os fatores ambientais, ou um sinergismo desses, que favorecem a sua dominância no ambiente, ainda não foram totalmente compreendidos. Dessa maneira, a realização de estudos de ecologia do fitoplâncton e/ou caracterização limnológica dos ecossistemas aquáticos costeiros, nos quais *C. raciborskii* forme florações ou seja a espécie fitoplanctônica dominante, por pelo menos durante algum período do ano, é cada vez mais necessário.

Por outro lado, durante muito tempo *C. raciborskii* foi considerada como uma espécie não-tóxica. Em 1979 na Austrália, entretanto, 141 pessoas, sendo a maioria crianças, após consumirem água de um reservatório que havia sido tratado com algicida para eliminar uma floração de *C. raciborskii*, apresentaram sintomas de hepatoenterite. Este passou a ser o primeiro relato de intoxicação humana provocada por esta espécie (Hawkins et al., 1985). Análises posteriores demonstraram que o composto responsável pela intoxicação havia sido um alcalóide até então desconhecido, o qual foi denominado cilindrospermopsina (Ohtani et al., 1992) (TABELA 1). Também na Austrália, florações de *C. raciborskii* produtoras de cilindrospermopsina causaram a morte de bovinos (Thomas et al., 1998; Saker et al., 1999b). Apenas as cepas australianas e uma tailandesa de *C. raciborskii*, até hoje, demonstraram produzir cilindrospermopsina e um análogo não tóxico, denominado deoxicilindrospermopsina (Li et al., 2001b).

No Brasil, o primeiro relato de uma floração tóxica de *C. raciborskii* ocorreu em uma fazenda da cidade de Amparo – SP, onde o gado foi intoxicado após consumir a água do reservatório. Análises realizadas em cepas isoladas desta floração, e de outra que ocorreu no reservatório da Billings (SP), confirmaram a presença de neurotoxinas do grupo das saxitoxinas (Lagos et al., 1999) (TABELA 1). Todas as cepas tóxicas de *C. raciborskii* isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros, até agora, demonstraram produzir saxitoxinas (Lagos et al., 1999; Bernard et al., 2003; Pomati et al., 2003) e em nenhuma se identificou a presença de cilindrospermopsina (Proença et al. 2002) . As variantes de saxitoxinas caracterizadas a partir de amostras de cepas brasileiras de *C. raciborskii* até o

⁵ O reservatório Tapacurá está localizado na cidade de São Lourenço da Mata, PE e também sofreu os efeitos da seca nos anos de 1998/1999.

momento foram: saxitoxina, neosaxitoxina, dc-saxitoxina, GTX-2 e GTX-3. Cepas européias de *C. raciborskii* (alemãs, francesa, húngaras e portuguesas) demonstraram ter efeitos tóxicos quando testadas em bioensaios com camundongos. Dependendo da cepa, observou-se danos causados ao fígado ou efeitos neurotóxicos em neurônios de moluscos (Kiss et al., 2002; Bernard et al., 2003; Saker et al., 2003; Fastner et al., 2003). Em todos esses casos, entretanto, não se identificou a produção de cilindrospermopsina e saxitoxinas por essas cepas. Provavelmente trata-se de um novo composto, cuja estrutura química e atividade toxicológica ainda precisam ser determinadas.

Há ainda poucos estudos sobre quais toxinas as cepas de *C. raciborskii* brasileiras podem produzir. No caso específico das saxitoxinas, como já mencionado, apenas cinco variantes foram identificadas até o momento, porém mais de vinte já foram caracterizadas a partir de cepas ou florações de outras espécies de cianobactérias (Chorus & Bartram, 1999). As variantes de saxitoxinas possuem diferentes níveis de toxicidades, algumas são muito tóxicas, como saxitoxina e GTX-1, e outras pouco tóxicas, como as C-toxinas. Portanto, o conhecimento de quais variantes de saxitoxinas as cepas brasileiras podem produzir irá permitir uma melhor avaliação dos riscos, bem como o aprimoramento dos métodos analíticos quali-quantitativos. Além disso, poucos padrões de saxitoxinas estão disponíveis comercialmente, e todos são produzidos em outros países. Sabendo-se quais variantes as cepas brasileiras podem produzir, poder-se-á incentivar a produção de padrões mais específicos.

Como mencionado anteriormente, a espécie *C. raciborskii* já foi identificada em praticamente todos os continentes, exceto o Antártico. *C. raciborskii* possui uma grande plasticidade fisiológica e morfológica (Padisák, 1997), que podem ser observadas, por exemplo, nas diferentes formas dos tricomas – retos, sigmóides ou espiralados (FIGURA 3) - e na habilidade de produzir diferentes toxinas. A utilização de seqüências de DNA para uma avaliação taxonômica e filogenética de diferentes espécies de cianobactérias vem sendo amplamente utilizada (Neilan, 1995; Bittencourt-Oliveira et al., 2001; Humbert & Le Berre, 2001; Laamanen et al., 2002). No caso de *C. raciborskii*, estudos com o gene 16S rRNA mostraram que cepas de diferentes regiões do planeta são geneticamente muito semelhantes. Porém, pequenas variações em outros genes (*nifH*, *HIP1*) permitiram reunir

essas cepas em agrupamentos específicos, que coincidem com suas origens geográficas. Assim, cepas norte-americanas e brasileiras formam um grupo; as européias (húngaras, alemãs e portuguesas) um segundo grupo e as australianas formam um terceiro grupo (Dyble et al., 2002; Neilan et al., 2003). Interessante notar que os grupos reúnem cepas produtoras do mesmo tipo de toxina: as brasileiras são produtoras de saxitoxinas, as australianas de cilindropsermopsina e as européias de composto(s) tóxico(s) ainda não identificado(s). De qualquer forma, como muitas cepas ainda não foram investigadas em relação à produção de compostos tóxicos, não se pode descartar a possibilidade de resultados futuros mostrarem cepas de grupos filogenéticos diferentes produzindo a mesma toxina ou cepas de grupos iguais produzindo diferentes toxinas. Por exemplo, recentemente identificou-se cepas isoladas da Flórida que são produtoras de cilindropermopsina e anatoxina-a (Friday et al., 2002).

De acordo com hipótese de Padisák (1997), *C. raciborskii* é uma espécie nova e sua dispersão pelo planeta aconteceu recentemente. Em razão da sua preferência por temperaturas mais elevadas ($> 20^{\circ}\text{C}$) e sua baixa habilidade de se adaptar a flutuações na temperatura, essa autora sugere que *C. raciborskii* surgiu em lagos tropicais, sendo a Austrália, ou mais provavelmente a África, em razão da maior número de espécies do gênero encontradas nesse continente, como possíveis pontos de irradiação. A dispersão da espécie para outras regiões teria ocorrido através do transporte de células ou acinetos por aves migratórias ou pela ação do homem (aqüicultura, águas de lastro, etc.). Além de essas hipóteses serem de difícil comprovação, no caso de algumas regiões, como por exemplo a América do Sul, há poucos dados históricos sobre a diversidade florística do fitoplâncton, dificultando ainda mais a composição de um mapa da dispersão da espécie. Por outro lado, os estudos de filogenia de cepas de diferentes regiões do planeta, principalmente de cepas de regiões que ainda não foram analisadas, como África e Indonésia, podem auxiliar na elucidação de como ocorreu a dispersão da espécie pelo mundo.

No Brasil, florações de *C. raciborskii* em diversos ecossistemas aquáticos vêm sendo relatadas freqüentemente nos últimos anos. Especificamente no estado de Pernambuco, a maioria das florações de cianobactérias são de *C. raciborskii* e muitas são tóxicas. Tal situação, num estado em que há um déficit de água para abastecimento, é

bastante preocupante. Portanto, existe a necessidade de um maior conhecimento sobre aspectos ecofisiológicos, toxicológicos e filogenéticos da espécie afim utilizá-lo em planos que visem a diminuição e/ou eliminação dessas florações.

2 OBJETIVOS

Diante do que foi exposto, esta tese teve os seguintes objetivos:

2.1 Geral

- Contribuir para um melhor conhecimento sobre aspectos ecofisiológicos, toxicológicos e filogenéticos de *C. raciborskii*, visando auxiliar no manejo e controle das florações da espécie, bem como melhor compreender a sua dispersão.

2.2 Específicos

- Realizar uma caracterização limnológica do reservatório Tapacurá - PE durante um período de 2 anos (anexo 1);
- Estudar a dinâmica de uma floração de *C. raciborskii* no reservatório Ingazeira – PE (anexo 2);
- Caracterizar as toxinas produzidas por uma cepa de *C. raciborskii* isolada do reservatório Tabocas – PE (anexo 3);
- Caracterizar as neurotoxinas produzidas durante uma floração de *C. raciborskii* e *Anabaena spiroides* no reservatório Tapacurá - PE (anexo 4);
- Estudar a diversidade genética entre cepas de *Cylindrospermopsis* sp. isoladas de diferentes continentes (anexo 5);
- Avaliar a relação filogética entre *Cylindrospermopsis* sp. *Raphidiopsis* sp. (anexo 5).

3 RESUMOS DO MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS ARTIGOS QUE COMPÕEM ESTA TESE

3.1 Características limnológicas do reservatório Tapacurá durante um período de seca (anexo 1)

3.1.1 Resumo do material e métodos

Área de estudo

O reservatório Tapacurá está localizado na zona da mata pernambucana (FIG. 1 do anexo 1), no município de São Lourenço da Mata – PE (8° 02'S e 35° 09'W) e fornece água para aproximadamente 1,35 milhões de habitantes da Região Metropolitana de Recife. Sua bacia de drenagem possui uma área de 360 km² e é capaz de armazenar 94,2 x 10⁶ m³ de água. A precipitação anual da região da zona da mata varia de 800 a 1200 mm, com uma média de 1074 mm. O período de chuvas concentra-se entre março e julho. Entretanto, durante o ano de 1998, início do presente trabalho, a precipitação anual foi de apenas 635 mm, como consequência do fenômeno “El Niño” que atingiu a região nos anos de 1997/1998 (FIG. 2 do anexo 1).

Amostragem e análises

Amostras de água foram coletadas mensalmente em três estações entre maio de 1998 e maio de 2000. A estação 1 situava-se próximo à barragem, a estação 2 na parte central do reservatório e a estação 3 numa pequena baía, a montante da estação 2.

As profundidades máximas (Z_{max}) de cada estação em cada coleta foram medidas com um sonar portátil com 0,1 m de resolução. A temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido foram medidos em intervalos de 0,5 m, a partir da superfície até o fundo, com auxílio de uma sonda multi-parâmetro (Horiba). A condutividade e alcalinidade foram determinadas utilizando-se um condutivímetro e por titulometria (Gran, 1952), respectivamente. A transparência da coluna água foi medida com disco de Secchi. Para

determinar a profundidade de mistura (Z_{mix}), utilizou-se o perfil de oxigênio ao invés da temperatura, em razão da pequena diferença de temperatura em toda a coluna d'água. Desta maneira, Z_{mix} foi definido como sendo a profundidade em que o oxigênio dissolvido passava a ser menor que 1 mg.L^{-1} (Zohary et al., 1996). O coeficiente de atenuação vertical da intensidade luminosa foi medido ocasionalmente, utilizando-se um radiômetro Li-Cor 193 com sensor quântico esférico. A profundidade da zona eufótica (1% de luz) foi obtida a partir deste coeficiente.

As amostras de água foram coletadas em três profundidades – superfície, meio da coluna d'água e fundo - em cada estação, com auxílio de uma garrafa de Niskin de 2 L, para análise de nutrientes, material particulado e clorofila-a. Para análise de nutrientes dissolvidos ($\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$), parte das amostras foi filtrada em membrana de fibra de vidro. As amostras foram mantidas a uma temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises (Strickland & Parsons, 1972). A determinação da concentração de clorofila-a foi realizada a partir do material retido nos filtros. Para isso adicionou-se metanol as amostras e após o período de extração, as fluorescências foram determinadas em fluorímetro (Turner 450) (Yentsch & Menzel, 1963). O séston (material particulado) foi determinado em membranas previamente pesadas. Após a filtração de um volume conhecido de amostra, as membranas foram secas a peso constante a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. Amostras de água para análise de carbono, nitrogênio e fósforo particulado foram filtradas em membranas pré-calcinadas. O fósforo particulado foi determinado na forma de ortofosfato, após oxidação com persulfato de potássio em autoclave (Koroleff, 1983). O carbono orgânico particulado e nitrogênio particulado foram determinados em analisador CHN, após oxidação com ácido ortofosfórico.

Dois ciclos nictemerais foram realizados durante o estudo – 9 de setembro de 1998 e 27 de novembro de 1999. Em ambos os ciclos, as variações na temperatura da água foram medidas com termistores (ONSET, com precisão de $0,2 \text{ }^\circ\text{C}$) a cada 15 minutos em quatro profundidades nas estações 1 e 3.

3.1.2 – Resumos dos resultados e discussão

Temperatura, luz e regime de mistura

A temperatura da água foi elevada durante todo o período de estudo. Os valores médios a 0,5 e 9,0 m foram de 28,2 °C e 27,1 °C, respectivamente. O perfil da temperatura (entre maio de 1998 e maio de 2000) mostrou dois períodos de estratificação vertical (FIGURA 3 do anexo1). O reservatório ficou termicamente estratificado entre 1 e 2 m entre setembro de 1998 e abril de 1999 e entre novembro de 1999 e maio de 2000. Durante os dois ciclos nictemerais, realizados em 9 de setembro de 1998 e 27 de novembro de 1999, ocorreu uma variação na temperatura da água ao longo do dia, principalmente na estação 1. Logo após o nascer do sol, a camada superior de água do reservatório se aquecia. Uma variação máxima de 1,5 °C entre a superfície e a 2 m de profundidade foi observada entre 12h00 e 13h00 na estação 1. Ao anoitecer, rapidamente ocorreu uma perda de calor e condições isotérmicas foram observadas por volta das 21h00 (FIG. 4 do anexo 1).

A profundidade de mistura foi maior (valores entre 9 e 10 m) no início e final do estudo, enquanto que valores menores foram observados entre fevereiro de 1998 e julho de 1999 (FIGURA 5 do anexo 1; TABELA 1 do anexo 1). A transparência da água, medida pelo disco de Secchi, seguiu o mesmo padrão, sendo o menor valor observado em abril de 1999 (15 cm) (FIGURA 5 do anexo 1; TABELA 1 do anexo 1). Considerando a razão Z_{mix}/Z_{max} como um bom indicador de mistura, os valores baixos observados no reservatório entre fevereiro e julho de 1999 (0,36 e 0,06, respectivamente) indicaram uma baixa mistura da coluna d'água, ou seja, uma forte estratificação (TABELA 1 do anexo 1). A radiação fotossinteticamente ativa (PAR), medida ocasionalmente, também indicou dois períodos distintos. Em maio de 1998, a intensidade luminosa a 0,5 m foi de 830 μmol fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, com uma zona eufótica de 1,22 m. Em abril de 1999, entretanto, os valores foram bem menores: 8 μmol fótons $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 0,5 m e uma zona eufótica de 0,48 m.

Condutividade, alcalinidade, pH e oxigênio dissolvido

O volume de água do reservatório Tapacurá, em razão da baixa precipitação, gradualmente diminuiu entre maio de 1998 e abril de 1999, quando atingiu 3,9% da sua

capacidade máxima (TABELA 1 do anexo 1). A estação 3, a mais rasa, secou completamente em março de 1999. As chuvas mais intensas a partir de maio de 1999 causaram um aumento do volume de água do reservatório até setembro de 1999.

Baixos valores de condutividade foram observados no início do estudo ($115\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e os maiores em junho-julho de 1999 (1015 e $1039\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), coincidindo com o período de menor estocagem de água (FIGURA 6 do anexo 1). A alcalinidade também aumentou gradativamente até abril de 1999, quando alcançou valor de $2100\mu\text{Eq}\cdot\text{L}^{-1}$ (FIGURA 6 do anexo 1). Em seguida, os valores diminuíram em razão do período de chuvas, atingindo um valor próximo a $900\mu\text{Eq}\cdot\text{L}^{-1}$. O pH da água foi geralmente alcalino, com um valor médio de 7,65 na estação 1 (FIGURA 3 do anexo 1). Altos valores de oxigênio dissolvido (março-abril de 1999) coincidiram com o pH elevado. Os valores de oxigênio dissolvido (OD) apresentaram uma estratificação vertical bem definida durante todo o período de estudo (FIGURA 3 do anexo 1). Valores mais elevados foram medidos na superfície, por exemplo, entre março e abril de 1999, quando o OD excedeu $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Por outro lado, o fundo do reservatório manteve-se quase sempre anóxico.

Clorofila-a, matéria orgânica particulada e nutrientes dissolvidos

A concentração de clorofila-a progressivamente aumentou durante o período em que o volume de água do reservatório diminuía. O seu máximo foi observado em abril de 1999, quando alcançou $104,3\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ na superfície da estação 1 e $116,3$ e $124,4\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ na superfície e fundo da estação 2, respectivamente. Com o início do período de chuvas, a concentração de clorofila-a reduziu drasticamente, atingindo valores entre 3 e $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em setembro de 1999 (FIGURA 7A do anexo 1). O mesmo padrão foi observado para o fósforo particulado, cujos valores máximos ocorreram no mesmo período da clorofila-a (FIG. 7B do anexo 1).

O carbono e nitrogênio orgânico particulado da superfície das três estações mostraram um padrão temporal similar, indicando uma homogeneidade do ambiente, apesar dos valores mais elevados observados na estação 3. Nas três estações, as concentrações aumentaram gradualmente e atingiram seus valores máximos em março-abril de 1999,

alcançando valores próximos a 25 mg.L^{-1} e 5 mg.L^{-1} de carbono e nitrogênio orgânico particulado, respectivamente.

O amônio foi a principal forma de nitrogênio inorgânico dissolvido, com valores médios de 327, 400 e $541 \mu\text{g NH}_4\text{-N.L}^{-1}$, nas três profundidades de coleta da estação 1. Também nas três profundidades, os valores mais elevados de amônio foram observados durante o declínio da floração, entre maio e junho de 1999 ($1698, 1772, 2171 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente superfície, meio e fundo da coluna d'água da estação 1). Em seguida, as concentrações diminuíram drasticamente a partir de agosto até dezembro de 1999, quando se detectou valores menores que $100 \mu\text{g NH}_4\text{-N.L}^{-1}$ na superfície da estação 1 (FIGURA 9A do anexo 1). As concentrações de ortofosfato variaram durante todo o período de estudo, com valores médios de 17 e $32 \mu\text{g PO}_4\text{-P.L}^{-1}$, na superfície e fundo da estação 1 (FIGURA 9B do anexo 1). Valores maiores foram detectados no final do estudo, coincidindo com o período de chuvas, em razão do aporte autóctone. Durante o período da floração, especialmente entre janeiro e junho de 1999, concentrações baixas de ortofosfato foram detectadas ($< 10 \mu\text{g PO}_4\text{-P.L}^{-1}$). A razão N/P, calculada a partir do nitrogênio e fósforo inorgânico dissolvido, teve médias de 78, 49 e 47 para as três profundidades (da superfície para o fundo) da estação 1 (FIG. 9C do anexo 1). Uma grande variação deste parâmetro foi registrada, com os valores mais elevados observados entre novembro de 1998 e junho de 1999. Todavia, as razões N/P não foram maiores que 27 e 15 nas estações 2 e 3, respectivamente.

Relações negativas significativas foram observadas entre o volume do reservatório e condutividade, alcalinidade e concentrações de amônio. O estado eutrófico do reservatório foi evidenciado pela relação negativa significativa da transparência (disco de Secchi) com a maioria das variáveis abióticas, como matéria orgânica particulada e nutrientes inorgânicos. A clorofila-a mostrou uma correlação positiva significativa com o fósforo particulado, carbono e nitrogênio orgânico (TABELA 2 do anexo 1). Esta correlação positiva sugere a contribuição do fitoplâncton à matéria orgânica particulada.

O início de nosso trabalho no reservatório Tapacurá coincidiu com o final de um longo período de seca iniciado em 1997. A partir daquele ano, o fenômeno climático “El Niño” atingiu o nordeste brasileiro. Seus efeitos foram mais evidentes no índice

pluviométrico, que diminuiu drasticamente. Durante o estudo, dois períodos distintos, baseados no processo de estratificação, puderam ser diferenciados:

- Período 1: de maio de 1998 a junho de 1999. Caracterizado pela época de seca, na qual o nível do reservatório diminuiu gradativamente e pelo aumento da concentração de clorofila-a. Um período de estratificação térmica e química (oxigênio) também pôde ser distinguido.
- Período 2: julho de 1999 a maio de 2000. Início da estação chuvosa. Aumento do volume de água do reservatório e mistura da água. Uma diminuição, em razão do processo de diluição, nas concentrações de clorofila-a, matéria particulada e nutrientes.

Os perfis da temperatura durante o estudo foram determinados entre 9h00 e 10h00 e revelaram uma pequena diferença (geralmente inferior a 1 °C) entre a superfície e o fundo. Considerando que a termoclina em um sistema tropical pode ser identificada como a profundidade onde a diferença de temperatura é superior a 0,3 °C . m⁻¹ (Hambright et al., 1994), pode-se dizer que havia uma estratificação térmica entre 1 e 2 m abaixo da superfície. Durante os dois ciclos nictemerais, observou-se uma estratificação transiente que ocorria no final da manhã e desaparecia completamente a noite. Assim, pode-se dizer que o padrão de estratificação térmica do reservatório Tapacurá é característico de grandes reservatórios tropicais, onde ocorre uma mistura noturna, seguida de uma desestratificação. Este fenômeno, denominado atelomixia, é típico de ambientes tropicais (Barbosa & Padisák 2002).

Tapacurá pode ser considerado um reservatório turbido, com uma transparência média (disco de Secchi) em torno de 50 cm nas estações 1 e 2. Apesar da fraca estratificação térmica, a alta turbidez pode explicar a formação de gradientes de oxigênio. Além disso, considerando-se a sedimentação de uma grande quantidade de matéria orgânica no fundo, fica evidente uma grande demanda de oxigênio, o que propicia ainda mais a formação de condições anóxicas.

A transparência da água variou negativamente em relação à clorofila-a e à matéria orgânica particulada. A grande diferença entre Z_{\max} e Z_{mix} , observada entre fevereiro e

junho de 1999, favoreceu a formação do gradiente de oxigênio e também pode explicar as características químicas da água observadas durante este período. O início das chuvas, entre maio e julho de 1999, resultou no aumento do volume de água do reservatório (de 4,9 para 10%) e no desaparecimento da floração de cianobactérias. A condição anóxica da coluna d'água, observada em julho de 1999, provavelmente ocorreu em razão de uma rápida mineralização da matéria orgânica pela comunidade bacteriana. Essa desoxigenação coincidiu com a desestratificação térmica da coluna d'água. Portanto, a fase de enchimento, como consequência do período de chuvas, pode ser considerada como um fator crucial na dinâmica do fitoplâncton do reservatório Tapacurá durante o período estudado.

O intenso período de seca (setembro de 1998 a abril de 1999) teve um efeito indireto nas variáveis químicas, particularmente na dinâmica dos nutrientes. Em razão da alta taxa de evaporação e bombeamento da água para o abastecimento da cidade de Recife, tanto o material particulado (carbono, nitrogênio e fósforo) como os nutrientes dissolvidos aumentaram bastante durante o período 1. Altos valores de pH e alcalinidade também foram observados no final do período seco, tendo um papel importante na composição da comunidade fitoplanctônica, além de indicarem uma alta taxa fotossintética. Ao contrário, durante o período de chuvas ocorreu uma diminuição da matéria orgânica particulada.

De acordo com os nossos dados, o fitoplâncton não foi limitado pelo nitrogênio, o que pode ser demonstrado, entre outros dados, pela alta concentração do amônio. O fosfato também não foi um fator limitante para o crescimento do fitoplâncton. A baixa concentração de formas oxidadas de nitrogênio e ortofosfato durante o período de maior concentração de clorofila-a, pode ser explicado pelo consumo desses elementos pelo fitoplâncton. Embora seja aceito que cianobactérias dominem em ambientes de baixa razão N/P (< 29) (Smith, 1983), a média dessa razão foi de 78 na estação 1 do reservatório Tapacurá. De acordo com Reynolds (1999) o uso desse parâmetro para predizer e justificar dominâncias dos grupos algais é bastante questionável.

Em ecossistemas aquáticos tropicais, a caracterização trófica é mais imprecisa do que nesses mesmos ambientes situados em região de clima temperado, em razão da falta de um padrão de sazonalidade da irradiância total diária e da pequena variação da temperatura

ao longo do ano. Para Huszar et al. (1998), as associações do fitoplâncton parecem ser mais adequadas para definir o estado trófico dos lagos de ambientes tropicais.

De acordo com Ferreira (2002), que analisou o fitoplâncton durante o período estudado, as cianobactérias, especialmente dos gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*, foram as mais representativas entre os grupos fitoplanctônicos, tanto em termos de abundância como de biomassa. Estes dois gêneros representaram quase 80% da biomassa fitoplanctônica durante o período de seca (novembro de 1998 a maio de 1999). Três períodos puderam ser distinguidos considerando as mudanças do fitoplâncton: 1) dominância de *Raphidiopsis* cf. *mediterrânea* entre maio e outubro de 1998; 2) dominância de *C. raciborskii* entre novembro de 1998 e julho de 1999 (período seco) e 3) período mais rico em diversidade de espécies com criptomonas e colônias pequenas de cianobactérias, entre agosto de 1999 e maio de 2000. Vale ressaltar que os períodos 1 e 2 do fitoplâncton corresponderam ao período 1 determinado de acordo com o processo de estratificação do reservatório.

3.2 Dinâmica de floração tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii* em um reservatório localizado na região semi-árida do nordeste brasileiro (anexo 2)

3.2.1 – Resumo do material e métodos

Área de estudo

O reservatório Ingazeira está situado na cidade de Venturosa – PE (8° 34' S e 36° 52' W) e é utilizado para irrigação e abastecimento (FIG. 1 do anexo 2). Nesta região, o volume de precipitação varia entre 400 e 800 mm e a estação chuvosa ocorre entre janeiro e julho (FIGURA 2 do anexo 2). O reservatório Ingazeira foi construído em 1986 para acumular água para irrigação e abastecimento. Sua bacia de drenagem possui uma área de 326 km² e é capaz de armazenar 4,6 x 10⁶ m³ de água. Numa primeira pesquisa realizada no reservatório em setembro de 1995 (Bouvy et al., 1998), o reservatório foi caracterizado como um sistema mesotrófico.

Amostragem e análises de nutrientes

As amostras de água foram coletadas a cada dois meses no período de janeiro de 1997 a março de 1998. Entre março e dezembro de 1998 as amostras foram coletadas mensalmente, a fim de melhor avaliar uma floração de cianobactérias. O ponto de coleta escolhido ficava próximo à barragem, na parte mais profunda do reservatório.

A temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido foram medidos em toda coluna d'água em intervalos de 0,5 m, a partir da superfície até o fundo, utilizando-se eletrodos específicos. O coeficiente vertical de atenuação da intensidade luminosa (k) foi calculado a partir da análise da regressão linear do log da irradiância, medida com um radiômetro Li-Cor 193 com sensor quântico esférico.

Amostras de água para análise de nutrientes, clorofila e fitoplâncton foram coletadas na superfície e próximo ao fundo do reservatório, com auxílio de uma garrafa Niskin de 2 L. Para análise de nutrientes dissolvidos (NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N, PO₄-P), parte das amostras foi filtrada em membranas de fibra de vidro. As amostras foram mantidas a uma temperatura de -20 °C até o momento das análises (Strickland & Parsons, 1972). As

membranas filtrantes, contendo o material particulado, foram utilizadas para determinar a concentração de clorofila. Para isso, volume conhecido de metanol foi adicionado às membranas. Após o período de extração, as fluorescências foram determinadas em fluorímetro (Turner 450) (Yentsch & Menzel, 1963). A contagem do fitoplâncton foi realizada em microscópio invertido de acordo com o método descrito por Utermöhl (1958). A biomassa do fitoplâncton - calculada a partir da abundância e do biovolume específico considerando a gravidade específica como 1 - e o índice de diversidade do fitoplâncton (Shannon & Weaver 1963) também foram determinados. Importante frisar que os dados do fitoplâncton foram avaliados por Beatriz Beker, do “Centre Océanologique de Marseille”.

Bioensaios para determinação da toxicidade aguda

Amostras da floração de cianobactérias do reservatório Ingazeira foram coletadas em três períodos (abril, setembro e outubro de 1998) para realização de testes de toxicidade. Cada amostra de água, com aproximadamente 4 L, foi concentrada por centrifugação, congelada e degelada para rompimento das células, e em seguida injetada intraperitonealmente em camundongos tipo Swiss. Os animais foram observados durante 24 horas e os sintomas foram anotados. Alguns bioensaios também foram realizados com tilápias (*Oreochromis niloticus*).

3.2.2 Resumo dos resultados e discussão

Variáveis físicas, químicas e biológicas

Em razão da falta de precipitação, o volume de água do reservatório Ingazeira diminuiu continuamente de agosto de 1997 até o final de dezembro de 1998 (FIG. 3 do anexo 2). Os valores de condutividade apresentaram uma variação inversa ao do volume de água. Os maiores valores da profundidade da zona eufótica foram observados entre janeiro e agosto de 1997 (próximo a 2,5 m) e os menores entre abril e agosto de 1998, sendo que em junho registrou-se o menor valor (0,53 m) (TAB. 1 do anexo 2).

A temperatura da água foi sempre elevada durante o período de estudo, sendo os valores mínimos observados a 0,5 m em junho e agosto (24 a 25,3 °C). O perfil da temperatura, de uma maneira geral, não mostrou nenhuma estratificação térmica (FIGURA 4A do anexo 2), com exceção do período entre outubro e dezembro de 1998, quando a temperatura da água na superfície foi ligeiramente maior, provocando uma estratificação térmica da coluna d'água entre 0,5 e 1 m. O pH a 0,5 m foi sempre superior a 8,12 e chegou a alcançar 9,39 em março de 1998 (FIGURA 4B do anexo 2). Os altos valores de pH corresponderam aos altos valores de oxigênio dissolvido em março e abril de 1998. O perfil do pH em 1998 foi mais homogêneo do que o observado em 1997, e não se observou nenhuma estratificação. Ao contrário, o perfil do oxigênio apresentou uma estratificação bem definida de janeiro de 1997 a dezembro de 1998 (FIGURA 4C do anexo 2). Durante todo o estudo, altas concentrações de oxigênio foram observadas a 0,5 m, enquanto que os valores diminuía com a profundidade, chegando a condições de anoxia no fundo.

As concentrações do fosfato reativo solúvel (ortofosfato) decaíram de valores altos, observados em fevereiro de 1997 (380 a 544 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente a 0,5 e 5 m de profundidade), para valores baixos em setembro de 1998 (6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nas duas profundidades) (FIGURA 5 do anexo 2). O amônio variou entre 8 e 98 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (média de 41 $\mu\text{g.L}^{-1}$) a 0,5 m. Uma maior variação entre a superfície e fundo foi observada para este parâmetro, com registro de valores mais elevados a 5 m (aproximadamente 350 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (FIGURA 5 do anexo 2). Os valores de nitrato e nitrito variaram entre 1,3 e 80,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 0,5 m e entre 7,7 e 91,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a 5 m de profundidade. A concentração de clorofila-a em março de 1997 na superfície foi de 25,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de 135,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em junho de 1998. Os maiores valores de clorofila-a foram registrados entre maio e setembro de 1998 (FIG. 6 do anexo 2; TAB. 1 do anexo 2).

Composição de espécies e biomassa fitoplanctônica

Em 1997, as abundâncias a 0,5 m foram superiores a 5×10^7 organismos. L^{-1} e biomassa acima de 70 mg.L^{-1} . Em 1998, os valores máximos foram registrados entre março e outubro, com $2,2 \times 10^8$ organismos. L^{-1} na superfície e $3,7 \times 10^8$ organismos. L^{-1} a 5 m em

abril (TABELA 1 do anexo 2). Em termos de abundância e biomassa, as cianobactérias dominaram a comunidade fitoplanctônica (média de 90,3% e 95,5% para os dois parâmetros estudados) com uma presença permanente de *C. raciborskii* (FIGURA 6 do anexo 2). Esta espécie chegou a alcançar, em termos de biomassa, uma proporção de 96 a 100% da comunidade fitoplanctônica entre abril e novembro de 1998. *C. raciborskii* foi representada pelos morfotipos retos e espiralados, porém estes últimos prevaleceram. O tamanho dos tricomas variou entre 42 e 194 μm e apenas 12% deles apresentaram heterocitos, indicando que não havia uma limitação do crescimento pela falta de formas dissolvidas de nitrogênio. As clorofíceas estiveram presentes entre março e junho de 1997 (antes da floração) e em novembro/dezembro de 1998 (FIGURA 6 do anexo 2). Os outros grupos foram pouco significativos, tanto em número como em biomassa.

O índice de Shannon-Weaver mostrou baixos valores, com uma média de 0,33 e 0,29 bits.célula⁻¹ a 0,5 e 5 m de profundidade, respectivamente. Os maiores valores foram observados em agosto de 1997, coincidindo com um maior volume do reservatório (TABELA1 do anexo 2). Os menores valores, observados em 1998, coincidiram com a dominância de *C. raciborskii*.

A biomassa de *C. raciborskii* foi correlacionada negativamente com a profundidade da zona eufótica e positivamente com a clorofila-a. Uma correlação positiva significativa foi observada entre pH e oxigênio dissolvido (TAB. 3 do anexo 2).

Bioensaios

Os efeitos neurotóxicos em camundongos foram observados com amostras de abril de 1998. As amostras de setembro e outubro de 1998 também provocaram efeitos neurotóxicos em alevinos de tilápia. A natureza química da(s) neurotoxina(s) presente(s) nas amostras não foi investigada. Entretanto, os sintomas observados foram compatíveis àqueles provocados por saxitoxinas.

Zooplâncton

A maior concentração de rotíferos e copépodos coincidiu com a floração de *Cylindrospermopsis*, o que sugere que esses organismos podem se beneficiar desta cianobactéria.

Causas da floração

Os impactos causados pelo fenômeno climático “El Niño” em 1997 afetaram o clima da região nordeste do Brasil, causando irregularidades na precipitação ao longo do ano de 1998. Em nosso estudo, dois períodos puderam ser observados: no início de 1997, o nível da água no reservatório Ingazeira era alto e havia uma maior diversidade de espécies do fitoplâncton; a partir de 1998, em razão da seca, ocorreu uma diminuição do nível do reservatório, coincidindo com o desenvolvimento (floração) de *C. raciborskii*

A composição da associação de algas pode ser importante para a compreender a complexidade dos processos em um sistema. De acordo com Huszar et al. (1998), muitos dos índices tróficos foram desenvolvidos para regiões temperadas e podem não ser os mais corretos para sistemas tropicais, portanto, a associação do fitoplâncton parece ser mais adequada para definição do estado trófico desses ambientes.

Clorofíceas e bacilariofíceas foram identificadas no fitoplâncton do reservatório Ingazeira até outubro de 1997. A diversidade medida pelo índice de Shannon-Weaver apresentou os maiores valores nos períodos de maior precipitação e baixas concentrações de clorofila-a. Durante o período de seca, observou-se uma tendência de queda do índice de diversidade, com um concomitante aumento da densidade de *C. raciborskii*. As condições de baixa intensidade luminosa e maior estabilidade do reservatório, esta causada pelo menor volume de água, favoreceram a dominância de *C. raciborskii*.

Por outro lado, a progressiva diminuição do nível de água do reservatório, parece ter favorecido o reaparecimento de clorofíceas e bacilariofíceas. Neste caso, os ventos podem ter proporcionado, além da perda da estabilidade, a resuspensão dos sedimentos e conseqüente liberação dos nutrientes para a coluna d'água, reduzindo a vantagem competitiva de *C. raciborskii*, pois mais nutrientes passaram a ficar disponíveis para outros grupos fitoplanctônicos.

Valores elevados de temperatura ocorreram no reservatório Ingazeira durante o período estudado, com valores superiores a 24 °C. Portanto, temperatura não deve ter influenciado na dominância e crescimento de *C. raciborskii*. Os valores de condutividade variaram entre 611 e 1700 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, o que demonstra a tolerância dessa espécie a grandes diferenças na concentração de íons. Em virtude da falta de precipitação, a partir de agosto de 1997, e da alta taxa de evaporação nesta região, o tempo de retenção da água no período de estudo foi de aproximadamente 2 anos, o que favoreceu a eutrofização do reservatório, a redução da transparência e da zona eufótica.

Os nutrientes também representaram um papel importante na floração de *C. raciborskii* no reservatório Ingazeira. Os valores médios de ortofosfato foram elevados (65 e 85 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 0,5 e 5m, respectivamente) e, portanto, este elemento não foi um fator limitante. O amônio foi a principal forma de nitrogênio do reservatório e correlacionou-se positivamente com a clorofila-a, cianobactérias e *C. raciborskii*.

Florações de cianobactérias estão frequentemente ligadas a um processo de enriquecimento de nutrientes e condições ótimas de temperatura e luz. Porém, essa situação pode ser criada por fatores meteorológicos. O fenômeno “El Niño” de 1997, por exemplo, induziu a modificações climatológicas no nordeste do Brasil, que alteraram as condições ecológicas de muitos reservatórios, incluído o reservatório Ingazeira. O período de seca levou a uma maior estabilidade da coluna d’água, um maior tempo de retenção e uma maior concentração de nutrientes. Esses fatores, associados a intensidade luminosa e temperatura, criaram as condições propícias para a formação da floração de *C. raciborskii*.

3.3 Produção de saxitoxinas por uma cepa de *Cylindrospermopsis raciborskii* isolada do reservatório Tabocas, Caruaru, Brasil: demonstração de uma nova variante de saxitoxina (anexo 3)

3.3.1 Resumo do material e métodos

Local de coleta, isolamento e cultivo

O reservatório Tabocas situa-se no município de Caruaru no semi-árido pernambucano (08° 06'15'' S e 36° 13'23'' W) (FIG.1 do anexo 3). Ele foi construído em 1973 e é capaz de armazenar um volume de $13,6 \times 10^6 \text{ m}^3$.

Uma cepa de *C. raciborskii* foi isolada desse reservatório a partir de uma amostra de água coletada em março de 1998. Um único tricoma foi transferido sucessivamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur e microscópio ótico, para pequenos volumes de meio ASM-1 (Gorham et al., 1964) colocados em uma lâmina de vidro. O tricoma foi então transferido para um tubo de ensaio contendo meio ASM-1, o qual foi mantido em condições ótimas de crescimento em sala de cultivo.

Para obtenção de biomassa para análise de toxinas e testes de toxicidade, esta cepa (ITEP-018) foi cultivada em frasco de 9 L contendo 8 L de meio ASM-1. A intensidade luminosa do cultivo foi mantida em $80 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao final da fase exponencial de crescimento, a cultura foi concentrada por centrifugação, liofilizada e mantida a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análise de cilindrospermopsina

Quarenta e cinco miligramas do material liofilizado foram extraídos com ácido acético 5%. Após o período de extração, a solução foi centrifugada por 10 min a $4000 \times g$. O material em suspensão foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com o descrito por Hawkins et al. (1997).

Bioensaio com camundongos

A toxicidade da cepa foi determinada de acordo com o método da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) para saxitoxinas (Cunniff, 1995). Camundongos machos foram injetados intraperitonealmente com 1 mL do extrato do material liofilizado ressuspensão em solução salina (NaCl 0,9%). Os sintomas, bem como os tempos de morte, foram registrados. A toxicidade foi expressa em “mouse units” (MU), em que 1 MU é definida como a quantidade de toxina suficiente para matar um camundongo de 20 g em 15 minutos.

Extração e análise de saxitoxinas

Às 170 mg da amostra liofilizada, adicionou-se 6 mL de ácido acético 0,5 M. A suspensão foi centrifugada a 5000 x g por 5 minutos e o sobrenadante separado em tubo de ensaio. Todo o procedimento foi repetido mais uma vez. Aos 12 mL do extrato obtido, adicionou-se 12 mL de uma solução de clorofórmio:metanol (1:1, v/v). A nova mistura foi agitada e em seguida centrifugada. A fase aquosa, que contém as saxitoxinas, foi removida com pipeta, seca e resuspensa em ácido acético 50 mM para posterior análise (Lagos et al., 1999).

A análise de saxitoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (C8) de acordo com Oshima (1995). Utilizou-se três fases móveis, específicas para cada grupo de variantes: c-toxinas (bissulfatadas), goniautoxinas ou GTX (monosulfatadas) e saxitoxina/neosaxitoxina (não sulfatadas). Em todos os casos, o eluato da coluna foi continuamente oxidado com uma solução de ácido periódico 7 mM e tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 9,0) em um tubo de Teflon a 65 °C. Antes de passar pelo detector de fluorescência (excitação em 330 nm e emissão em 390 nm) a reação foi interrompida com ácido acético 0,5 M.

Para confirmação das variantes de saxitoxinas produzidas pela cepa de *C. raciborskii* e identificação daquelas para as quais não havia padrão, a amostra foi analisada por cromatografia líquida/espectrometria de massa (HPLC/ESIMS), de acordo com Lagos et al. (1999).

3.3.2 Resumo dos resultados e discussão

Os extratos da cepa ITEP-018 induziram sintomas neurotóxicos quando testados em bioensaios com camundongos. O tempo de morte dos animais foi de poucos minutos e todos morreram em razão de parada respiratória. A toxicidade da cepa medida de acordo com a AOAC foi de 9,30 MU.mg⁻¹ de peso seco de células. Do nosso conhecimento, esta toxicidade é a maior descrita para uma cepa de cianobactéria produtora de saxitoxinas. Como outras toxinas não foram identificadas, como cilindropsermopsina e microcistinas, a toxicidade da cepa ITEP-018 pôde ser atribuída somente as saxitoxinas.

A análise por HPLC possibilitou a identificação de cinco variantes de saxitoxinas produzidas pela cepa ITEP-018: GTX-6, saxitoxina, dc-saxitoxina, neosaxitoxina e uma nova variante, cuja estrutura química ainda não foi determinada (FIGURA 2 do anexo 3). As análises por HPLC-EISMS confirmaram a presença dessas variantes, inclusive da nova saxitoxina. Além disso, essa técnica permitiu a identificação da dc-neosaxitoxina (FIG. 4; FIG. 5; FIG. 6 do anexo 3).

O perfil de saxitoxinas produzidas pela cepa ITEP-018 é único. Primeiro em razão da presença da nova variante, segundo porque de acordo com as quantificações realizadas por HPLC, essa nova variante foi a que apareceu em maior concentração, representando 64,5 mol% do total de saxitoxinas produzidas e por último esta cepa produz seis variantes (FIGURA 3 do anexo 3). Em outras cepas de *C. raciborskii* identificou-se apenas duas (Lagos et al., 1999) ou três variantes (Lagos et al., 1999; Bernard et al., 2003).

A cepa ITEP-018 foi isolada do reservatório Tabocas, o mesmo cuja água, após tratamento inadequado, foi utilizada em sessões de hemodiálise em uma clínica na cidade de Caruaru-PE em 1996, e que resultou na morte de 76 pacientes renais, em razão de uma contaminação por microcistinas (Carmichael et al., 2001).

Como Carmichael et al. (2001) identificaram a presença de cilindropermopsina em amostras de carvão, areia e resinas da clínica de hemodiálise, é plausível supor que entre a população de cianobactérias houvesse cepas produtoras dessa toxina. Entre as espécies de cianobactérias descritas por Bressan (2001) durante um estudo realizado naquele

reservatório entre novembro de 1997 e outubro de 1998, apenas *C. raciborskii* é reconhecidamente produtora de cilindropermopsina. Até hoje no Brasil, entretanto, nenhuma cepa de *C. raciborskii* foi identificada como produtora de cilindropermopsina.

3.4 Confirmação da presença de saxitoxinas e de um composto similar a anatoxina-a(s) durante uma floração de cianobactérias num reservatório de abastecimento público (anexo 4)

3.4.1 Resumo do material e métodos

Área de estudo, amostragem, análise de nutrientes e fitoplâncton

A localização e descrição do reservatório Tapacurá podem ser consultadas no item 3.1.1. Neste trabalho as coletas de amostras de água foram realizadas semanalmente em um ponto próximo à barragem entre 19 de março e 30 de maio de 2002, exceto para o período entre 10 de abril e 8 de maio. A condutividade e pH foram registrados utilizando-se eletrodos específicos. Amostras de água foram coletadas para análise de nutrientes (NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N, PO₄-P), de acordo com as metodologias descritas em APHA (1992) e também para a análise do fitoplâncton. Apenas as cianobactérias foram identificadas e contadas em câmaras de Sedgwick-Rafter.

Amostras da floração foram coletadas em garrafas plásticas de 5 L e volumes conhecidos foram filtrados em membranas de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro para realização de bioensaios com camundongos. A concentração do material particulado (séston) foi determinada após filtração de volumes conhecidos da floração em membranas de fibra de vidro (25 mm de diâmetro) previamente pesadas. As membranas foram secas a peso constante a uma temperatura de 100 °C durante 24 h, quando então foram pesadas novamente.

Isolamento e cultivo de *Anabaena spiroides*

Três cepas de *A. spiroides* foram isoladas a partir de amostras coletadas no reservatório. Os procedimentos para o isolamento foram os mesmo descritos no item 3.3.1. Para obtenção de biomassa para análise de toxinas e bioensaios, as cepas foram cultivadas em erlenmeyers de 2 L contendo 1,5 L de meio ASM-1, sob 80 μmol fótons m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas e com aeração. Ao final da fase exponencial de crescimento, as

culturas foram centrifugadas e liofilizadas. A biomassa foi mantida a -18°C até o momento das análises.

Extração de toxinas e bioensaios com camundongos

A toxicidade da floração e das cepas foi avaliada em bioensaios com camundongos Swiss. As toxinas foram extraídas após a adição de 4 mL de solução salina pH 4,0 (NaCl 0,9%) às membranas. Para provocar o rompimento das células e conseqüente liberação das toxinas, as amostras (membranas) foram congeladas e descongeladas. A solução salina contendo as toxinas foi separada das membranas após centrifugação ($8.014 \times g$, 10 minutos). As doses injetadas intraperitonealmente em pelo menos três animais variaram de 150 a 520 mg.Kg^{-1} (mg de peso seco do séston por Kg de peso corpóreo).

Massas conhecidas do material liofilizado dos cultivos das três cepas também foram ressuspensas em solução salina pH 4,0 (NaCl 0,9%) e injetadas intraperitonealmente em camundongos Swiss (doses entre 14 e 156 mg.Kg^{-1}).

Em ambos os ensaios, os animais foram observados durante 24 horas e os sintomas e tempo de morte registrados. Animais controle foram injetados com 1 mL de solução salina.

Ensaio da inibição da acetilcolinesterase

Os extratos aquosos (solução salina) das amostras da floração foram utilizados nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase. O material liofilizado (cultivo das cepas), após extração com uma solução de etanol:ácido acético 1 M (1:4, v/v) (Henriksen et al., 1997), também foi utilizado nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase

A inibição *in vitro* da acetilcolinesterase foi determinada pelo método de Ellman (Dietz et al., 1973) utilizando o iodeto de propioniltiocolina como substrato. A capacidade de inibição da acetilcolinesterase foi determinada pela incubação da enzima em um ensaio colorimétrico de ponto final. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise de saxitoxinas

Os extratos aquosos das amostras da floração e do material liofilizado das culturas, utilizado nos bioensaios com camundongos, foram analisados por HPLC para verificação da presença de saxitoxinas. O método utilizado foi o descrito por Oshima (1995), já comentado anteriormente (item 3.3.1). As condições analíticas, de uma maneira geral, foram as mesmas descritas anteriormente (item 3.3.1), exceto a temperatura de reação, que neste caso foi de 80 °C. A identificação das toxinas e o cálculo de suas concentrações foi feita pela comparação com os tempos de retenção e com as áreas integradas dos picos dos padrões, respectivamente. Os padrões (material de referência) de saxitoxinas (saxitoxina, neosaxitoxina, GTX1/4 e GTX2/3) foram adquiridos do “Institute for Marine Bioscience” (Halifax – Canadá). Um mistura de padrões (saxitoxina, dc-saxitoxina, neosaxitoxina e C1/C2), cujas concentrações são desconhecidas, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Nestor Lagos da Universidade do Chile.

3.4.2 Resumo dos resultados e discussão

Parâmetros ambientais e análise de nutrientes

Durante o período estudado, o valor do pH do reservatório Tapacurá manteve-se alcalino, com valores variando de 7,3 a 8,9 ao longo do estudo (FIG. 1B do anexo 4). A condutividade aumentou progressivamente a partir da metade de abril até o final de maio (FIGURA 1C do anexo 4). Tanto nitrito como amônio mantiveram-se quase sempre abaixo do limite de detecção dos métodos (l.d.) (40 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente), exceto em 24 de maio, quando a concentração de amônio foi de 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e em 15 de maio, quando a concentração de nitrito foi de 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O nitrato (l.d. de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) não foi detectado durante o período estudado e o fósforo total variou entre 20 e 228 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (FIGURA 1A do anexo 4). Em um estudo anterior, realizado entre maio de 1998 e maio de 2000, Bouvy et al. (2003) (ver anexo 1) caracterizaram o reservatório Tapacurá como eutrófico. Foram observadas concentrações máximas de 124 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 2 mg.L^{-1} de clorofila-a, fósforo particulado e amônio, respectivamente.

Composição e densidade de cianobactérias durante a floração

Durante a floração de cianobactérias no reservatório Tapacurá – entre 19 de março e 30 de maio de 2002 - observou-se uma alternância de espécies (FIG. 2 do anexo 4). O monitoramento do fitoplâncton realizado apenas quantificou espécies de cianobactérias, assim dados sobre outros grupos do fitoplâncton não estão disponíveis. Em 19 de março, *A. spiroides* era a espécie dominante, representando cerca de 72% (aproximadamente $1,4 \times 10^5$ células.mL⁻¹) do total de cianobactérias. Sua densidade foi diminuindo até 3 de abril, quando *Pseudanabaena* sp. passou a ser a espécie dominante até 3 de abril, quando *C. raciborskii* dominou a comunidade fitoplanctônica até 15 de maio. No final da floração *Microcystis aeruginosa* foi a espécie dominante, representando entre 66 e 82% ($3,7$ e $2,7 \times 10^4$ células.mL⁻¹, respectivamente) do total de cianobactérias. Outras espécies de cianobactérias foram observadas durante a floração, porém suas densidades não foram representativas.

Nossos resultados mostram uma limitação de nitrogênio no reservatório Tapacurá. Como era de se esperar, as espécies que dominaram por um maior período foram *A. spiroides* e *C. raciborskii* duas espécies fixadoras de nitrogênio. *Pseudoanabena* dominou durante um curto período e *Microcystis aeruginosa* quando se observou baixas concentrações de amônio no reservatório; ambas as espécies não são fixadoras de nitrogênio. Embora a fixação do N₂ não seja considerada a principal vantagem ecológica de *C. raciborskii* (Reynolds, 2002), uma análise do fitoplâncton de Tapacurá, realizada por Ferreira (2002) entre maio de 1998 e maio de 2000, mostrou uma variação entre 0 e 77% na porcentagem de tricomas de *C. raciborskii* com heterocitos, mostrando que a capacidade de fixação de N₂ por esta espécie não deve ser desconsiderada.

Toxicidade da floração e das cepas isoladas

Os bioensaios com camundongos mostraram a presença de neurotoxinas na floração entre 19 de março e 24 de maio, exceto na amostra coletada em 3 de abril (TAB. 2 do anexo 4). Sintomas iguais aos causados pela anatoxina-a(s), um inibidor da acetilcolinesterase (AChE), tais como salivação e fasciculação, foram observados somente nos animais injetados com a amostra de 27 de março. Os ensaios de inibição da AChE,

entretanto, mostraram a presença de um inibidor dessa enzima nas amostras de 19 e 27 de março, com taxas de inibição de 100 e 88%, respectivamente (TABELA 2 do anexo 4). O período em que se observou a inibição da AChE coincidiu com a dominância de *A. spiroides* (FIG.2 do anexo 4).

Henriksen et al. (1997) reportaram que bioensaios com camundongos realizados com uma alta concentração de anatoxina-a(s) podem mascarar os sintomas típicos causados por esse inibidor de AChE. Somente doses, em que as concentrações da toxina sejam próximas à DL_{50} , permitem a visualização de tais sintomas. Dois fatos mostraram que a concentração do inibidor de AChE provavelmente era maior em 19 de março do que no dia 27, e portanto, possivelmente mascarou a visualização dos sintomas: a) a amostra de 19 de março provocou uma inibição de 100% da AChE e b) nesta data a densidade de *A. spiroides* era maior do que em 27 de março.

A confirmação de que *A. spiroides* era a espécie produtora do inibidor de AChE, provavelmente, anatoxina-(s), foi feita após o isolamento de três cepas (TAB.1 do anexo 4) e realização de bioensaios com camundongos e testes de inibição da AChE com a biomassa obtida do cultivo dessas cepas. Os bioensaios realizados com as três cepas isoladas evidenciaram efeitos neurotóxicos nos animais – os sintomas foram iguais aos causados pela anatoxina-a(s) - e o ensaio de inibição da acetilconisterase foi positivo para as três cepas, com taxa de inibição de 100% (TAB. 2 do anexo 4).

Como já mencionado, *C. raciborskii* foi dominante de 10 de abril a 24 de maio. Nesse período, os bioensaios demonstraram a presença de neurotoxinas nas amostras. As análises de saxitoxinas por cromatografia líquida, entretanto, revelaram a presença de saxitoxinas somente na amostra de 8 de maio. As variantes identificadas foram saxitoxina neosaxitoxina e dc-saxitoxina (FIGURA 3 do anexo 4). As cepas brasileiras de *C. raciborskii*, já testadas e que foram tóxicas em bioensaios com camundongos, demonstraram ser produtoras apenas de saxitoxinas (Lagos et al., 1999; Bernard et al., 2003; Pomati et al., 2003). Portanto, as razões para a não identificação de saxitoxinas nas demais amostras desse período, apesar dos resultados positivos dos bioensaios, podem estar relacionadas ao elevado tempo de estocagem das amostras (7 meses a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) e às

sucessivas alterações de temperatura para realização dos bioensaios e ensaios de inibição da AChE.

Os bioensaios com camundongos realizados com as amostras coletadas em 03 de abril e em 30 de maio apresentaram resultados negativos (TAB.2 do anexo 4). Essas duas datas coincidiram com a dominância de *Pseudanabaena* sp. e *M. aeruginosa*, respectivamente. Para *Pseudanabaena* sp. não há registros de produção de toxinas, já *M. aeruginosa*, é usualmente relatada como produtora de microcistinas. Todavia, quatro cepas de *M. aeruginosa* isoladas de Tapacurá não possuíam o marcador genético *mcyB*, que está relacionado à produção de microcistinas (Bittencourt-Oliveira, 2003).

Este trabalho é o primeiro a verificar a presença de saxitoxinas e de um inibidor de AChE, provavelmente anatoxina-a(s), em um reservatório de abastecimento público do Brasil, o que ressalta a necessidade de um contínuo monitoramento do reservatório Tapacurá, de um plano para redução do estado trófico desse sistema, bem como de soluções tecnológicas para a remoção dessas toxinas durante o tratamento da água.

3.5 Diversidade genética de cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* isoladas de quatro continentes (anexo 5)

3.5.1 Resumo do material e métodos

Esta etapa do trabalho foi realizada durante um estágio na “Station d’Hydrobiologie Lacustre”, INRA, de Thonon les Bains, França.

Isolamento e cultivo das cepas

As cepas de várias origens utilizadas neste trabalho estão relacionadas na TAB. 1 do anexo 5. As cepas se desenvolveram em meio Z8 ou ASM-1, com ou sem nitrato, a 25 °C, em erlenmeyers, sob intensidade luminosa de 25 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16:8 h (luz: escuro). Para as análises genéticas, 2 mL das culturas em fase exponencial de crescimento foram centrifugados, lavados com água estéril e as células mantidas em nitrogênio líquido.

PCR, seqüenciamento e filogenia

Para estudar a relação entre *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* e a filogeografia do primeiro gênero, realizou-se uma caracterização genética das cepas (TAB. 1 do anexo 5) baseada no seqüenciamento parcial do 16S rRNA e da região espaçadora entre 16S-23S do óperon ribossomal, além do seqüenciamento de fragmentos dos genes *rpoC1* e *nifH*.

O gene 16S rRNA foi amplificado através dos iniciadores CYA106F-CYA 781R (Nübel et al., 1997); para a região ITS1 os iniciadores 322 e 340 foram utilizados (Iteman et al., 2000). Os genes *rpoC1* e *nifH* foram amplificados utilizando os iniciadores *rpoC1f* (5' ACCATTA ACTACCGCACCCCT 3') e *rpoC1r* (5' TTGTCAATTACCC GCAGACG 3'), e *nifHf* (5' CGTAGGTTGCGACCCTAAGGCTGA 3') e *nifHr* (5' GCATACATCGCCATCATTTCCACC 3'), respectivamente.

As amplificações para todas as regiões estudadas foram realizadas em um volume de 50 μL , contendo 2 μL das culturas, 200 μM de dNTP, 20 μM de cada iniciador, 5 μL de tampão 10X. A solução foi incubada durante 10 min antes da adição de 1U de *Taq*-

polimerase. As condições dos ciclos foram as seguintes: 5 minutos de desnaturação a 97 °C, 30 ciclos de 15 segundos para desnaturação a 94 °C, 30 segundos para anelamento a 48 °C e 60 segundos para extensão a 72 °C, e por fim, 5 minutos a 72 °C. A concentração dos produtos amplificados foi verificada em gel de agarose 1%.

Os produtos dos genes 16S rDNA, *rpoC1* e *nifH* foram purificados e em seguida seqüenciados. No caso da região ITS, que pode gerar dois fragmentos, o produto foi clonado e apenas o fragmento maior foi seqüenciado. Após o seqüenciamento, tanto o alinhamento como a construção dos cladogramas foram feitos utilizando-se programas específicos.

3.5.2 Resumo dos resultados e discussão

Relação entre cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*

A morfologia das células e dos tricomas foi utilizada na identificação das cepas deste estudo. Os tricomas das cepas de *C. raciborskii* apresentaram-se solitários, sem constrições, retos ou sigmóides e as células vegetativas eram cilíndricas. Já os tricomas de *C. africana*, apresentaram constrições e os heterocitos eram em forma de elipse. As cepas de *Raphidiopsis* não apresentavam heterocitos, mesmo quando cultivadas em meio sem fonte de nitrogênio (NO₃⁻).

Um fragmento de 348 pb do gene 16S rRNA, encontrado nas duas cepas de *Raphidiopsis* e em seis cepas de *Cylindrospermopsis*, não apresentou nenhum polimorfismo, ou seja, as seqüências foram idênticas, inclusive em relação a outras cepas de *C. raciborskii* disponíveis no GenBank, o que permitiu a distinção desses dois gêneros dos outros pertencentes à ordem Nostocales (FIG.1 do anexo 5).

Resultados similares também foram obtidos pela análise dos fragmentos das regiões ITS1 e *rpoC1*.

A análise do fragmento ITS1 mostrou uma grande similaridade (> 99%) entre: 1) cepas de origem européia, 2) cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* isoladas do continente americano e 3) cepas de origem africana e australiana. Por outro lado, uma similaridade menor do que 91% foi encontrada entre todas as cepas que compõe estes três grupos.

A análise filogenética foi consistente com estes resultados identificando três grupos estatisticamente separados (FIG. 3, anexo 5). O primeiro grupo foi formado por todas as cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* de origem americana, o segundo pelas cepas de *Cylindrospermopsis* européias e o terceiro por todas as cepas de *Cylindrospermopsis* africanas e australianas.

Os resultados do seqüenciamento do fragmento *rpoC1* de nove cepas de *Cylindrospermopsis* e uma de *Raphidiopsis* geraram poucas informações, em razão do baixo polimorfismo apresentado. De qualquer forma, observou-se uma maior homologia entre as cepas com a mesma origem geográfica, exceto no caso das cepas européias, que agruparam-se com as cepas africanas e australianas (FIG. 4 do anexo 5).

A análise desses três loci, (16S rRNA, ITS1 e *rpoC1*) não permitiu a separação dos gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis*. Há ainda dúvidas se *Raphidiopsis* deve ou não estar incluído na ordem Nostocales, em razão desse gênero não apresentar heterocitos. Porém, esses resultados mostram que *Raphidiopsis* provavelmente pertence àquela ordem (FIG. 1 do anexo 5).

Os resultados da análise dos loci ITS1 e *rpoC1* mostraram haver uma maior similaridade entre as cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* do continente americano do que entre cepas de *Cylindrospermopsis* com origens em outros continentes.

Um fragmento de 297 pb do gene *nifH*, que faz parte do complexo da nitrogenase, foi seqüenciado e revelou uma grande similaridade entre as diferentes cepas de *Cylindrospermopsis*. E, novamente, cepas com a mesma origem geográfica tiveram uma maior similaridade e formaram três grupos: cepas americanas, européias e africanas/australianas. Nenhuma amplificação, entretanto, foi obtida a partir das cepas de *Raphidiopsis*. Desta maneira, o fragmento *nifH* foi o único capaz de separar os dois gêneros. A ausência de um produto de amplificação do fragmento *nifH* é condizente com a incapacidade de *Raphidiopsis* de fixar nitrogênio atmosférico, apesar de existirem cepas de espécies de cianobactérias que não fixam N₂ mas que possuem o *nifH* (Zehr, et al., 1997). Por outro lado, a separação dos dois gêneros, baseada apenas na formação de heterocitos e no gene *nifH*, não parece ser suficiente. Desta maneira, mais estudos com

Cylindrospermopsis e *Raphidiopsis* são necessários para uma melhor definição das características taxonômicas que separam estes dois gêneros.

Marcadores genéticos para cepas de *Cylindrospermopsis* isoladas de quatro continentes

O gênero *Cylindrospermopsis* possui uma considerável plasticidade morfológica (Branco & Senna 1991; Kormárková et al., 1999), o que torna difícil o emprego dessas características na taxonomia. Por exemplo, no presente trabalho não se observou nenhuma diferença entre os fragmentos de 16S rRNA de *C. raciborskii* e *C. africana*, bem como entre cepas com características morfológicas distintas (FIGURA 1 do anexo 5). Por outro lado, os outros marcadores estudados (ITS1, *nifH* e *rpoC1*) puderam diferenciar grupos entre as cepas estudadas. As seqüências ITS1 e *nifH* distinguiram três grupos (cepas americanas, européias e africanas/australianas) e *rpoC1* apenas dois grupos (cepas americanas e européias/africanas/australianas). Porém, destes marcadores genéticos, o ITS1 foi o que melhor mostrou estatisticamente a separação dos três grupos (FIG. 3 do anexo 5).

Origem e dispersão das cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii*

O alto grau de conservação do gene 16S rRNA entre as cepas de *C. raciborskii* de diferentes continentes sugere uma origem comum. A existência de grupos separados, evidenciados por outros marcadores, leva a crer que estes grupos tenham se separado há muito tempo (milhares de anos). Por outro lado, como dentro de cada grupo a similaridade é muito grande, pode-se dizer que a dispersão dessa espécie em cada continente é mais recente.

Uma hipótese para tentar explicar esses resultados foi o período de glaciação que o planeta passou. Durante aquele período, pode ter ocorrido a extinção de *Cylindrospermopsis* em diversas regiões e em apenas poucas áreas mais quentes o gênero pôde sobreviver. A separação dessas áreas gerou grupos com características genéticas distintas, conforme os resultados desse trabalho mostraram. Essa hipótese contraria a de Padisák (1997), para quem a dispersão de *Cylindrospermopsis* para mundo foi recente e

ocorreu a partir da África, visto que naquele continente encontra-se um maior número de espécies do gênero.

O clima da Austrália foi bastante influenciado pelo período de glaciação, o que teria levado a extinção de *C. raciborskii*. No entanto, no continente africano, algumas áreas sempre mantiveram o clima tropical. Os nossos resultados, que mostram uma grande similaridade entre cepas africanas e australianas, permitem propor que, provavelmente, a Austrália foi colonizada por cepas africanas num evento mais recente.

4 DISCUSSÃO GERAL

O estudo realizado no reservatório Tapacurá mostrou que a principal característica física e química deste sistema é uma pequena variação vertical na temperatura da água e na concentração de nutrientes ao longo do ano, respectivamente, mesmo havendo um gradiente na concentração do oxigênio. Características similares também foram observadas no reservatório Ingazeira. Nos dois ciclos nictemerais realizados no reservatório Tapacurá, constatou-se que a estratificação térmica começava a partir da segunda metade do período de luz (entre 11h00 e 12h00) e logo após o pôr-do-sol ocorria uma homogeneização da temperatura da coluna d'água (isotermia). Essas características são típicas de ambientes tropicais, onde não há grandes diferenças na irradiância e temperatura ao longo do ano. No caso do reservatório Ingazeira, não se observou nenhuma estratificação térmica, provavelmente em razão da menor profundidade do reservatório e, principalmente, por não ter sido levado em consideração na época que a estratificação térmica em ambientes tropicais ocorre a partir de um gradiente de termoclina média $> 0,3 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{m}^{-1}$ (Hambricht et al., 1994).

Tanto em Tapacurá como em Ingazeira, o período de intensa seca criado pelo “El Niño” de 1997/1998 gerou as condições adequadas para a formação de florações de cianobactérias. Essas condições, de maneira geral, foram um maior tempo de retenção da água, concentrações adequadas de nutrientes, baixa intensidade luminosa e, principalmente, uma maior estabilidade da coluna d'água.

De acordo com Paerl (1988), os fatores físicos e químicos têm um papel importante no crescimento das cianobactérias, as quais, apesar de terem uma capacidade de adaptação a diferentes ecossistemas, preferem ambientes com maior estabilidade (Padisák & Reynolds, 1998). Nos dois reservatórios, *C. raciborskii* foi a espécie que melhor aproveitou tais condições. Na verdade, de acordo com Bouvy et al. (2000), entre setembro e novembro de 1998, florações de *C. raciborskii* foram observadas em outros 31 reservatórios estudados em todo estado de Pernambuco (de um total de 39), sendo que em 17, essa espécie representou 50% da densidade do fitoplâncton total.

No reservatório Ingazeira, *C. raciborskii* foi dominante durante praticamente todo o estudo e no período da floração (de abril a novembro de 1998) chegou a representar entre 96 e 100% da biomassa fitoplanctônica total. De acordo com Ferreira (2002), *C. raciborskii* esteve presente no reservatório Tapacurá entre maio de 1998 e julho de 1999. Porém, entre novembro de 1998 e julho 1999, coincidindo com o período de menor pluviosidade, esta espécie foi dominante, chegando a representar em média 60,9% da biomassa fitoplanctônica total.

As florações observadas nos dois reservatórios terminaram após o fim da estabilidade dos ambientes. Em Tapacurá, logo após o início do período de chuvas, que elevou o volume do reservatório de 4,9% para 10% do da capacidade total, a densidade de cianobactérias caiu drasticamente. Já em Ingazeira, a diminuição acentuada da profundidade máxima - em razão do longo período de estiagem - e o aumento da profundidade da zona de mistura proporcionaram a ressuspensão do sedimento, criando condições mais propícias para o reaparecimento de outros grupos de microalgas.

Apesar do fenômeno climático “El Niño” ter favorecido a formação de florações de *C. raciborskii*, não apenas este fenômeno cria as condições necessárias para o surgimento das florações desta espécie. Huszar et al. (2000) relataram a dominância de *C. raciborskii* em reservatórios pernambucanos, inclusive no de Ingazeira, em uma época sem influência do “El Niño”. Além disso, no item 3.4 e anexo 4 desta tese, é relatada uma curta dominância de *C. raciborskii* em Tapacurá, num período (entre abril e maio de 2002) em que este reservatório não apresentava déficit de água. Portanto, a dominância e a formação de florações de *C. raciborskii*, e provavelmente de outras cianobactérias, parecem estar mais ligadas à estabilidade do ecossistema aquático, independente das causas que a criou. Tucci & Sant’Anna (2003) concluíram que uma floração de *C. raciborskii*, observada no Lago das Garças, no município de São Paulo, foi favorecida, entre outros fatores, pela estratificação térmica e baixo valor da profundidade da zona de mistura, que podem ser interpretados como uma estabilidade do sistema.

Desta maneira, o fenômeno “El Niño”, no caso dos ecossistemas aquáticos estudados, parece apenas ter proporcionado uma constância ambiental por um período mais

longo e, portanto, favorecido a ocorrência de florações mais intensas (concentração de clorofila-a > 100 µg.L⁻¹) e duradouras (de até 8 meses) de *C. raciborskii*.

As florações com uma elevada biomassa de *C. raciborskii* são preocupantes, principalmente do ponto de vista de gerenciamento de recursos hídricos voltado para o abastecimento público, em razão da ocorrência freqüente desses eventos em diversos reservatórios de abastecimento do país e também pelo fato de ainda haver uma escassez de conhecimento sobre métodos eficientes para remoção de saxitoxinas durante o tratamento da água.

É muito importante que se conheça quais as variantes de saxitoxinas as cepas brasileiras de *C. raciborskii* produzem, pois isso permitirá: a) direcionar a produção de padrões específicos, o que irá facilitar a análise quali-quantitativa dessas toxinas; b) calcular com uma melhor margem de segurança as doses seguras para ingestão (“tolerable daily intake” - TDI) e c) avaliar se todas as variantes respondem da mesma maneira aos diferentes tratamentos para sua remoção da água que será utilizada no abastecimento. A cepa ITEP-018 de *C. raciborskii* demonstrou produzir cinco saxitoxinas conhecidas e uma nova variante. Das cinco conhecidas, GTX6, dc-saxitoxinas e dc-neosaxitoxina ainda não haviam sido relatadas em cepas brasileiras. Além disso, esta cepa é a mais tóxica, entre as cepas de espécies de cianobactérias produtoras de saxitoxinas já estudadas.

A identificação de saxitoxinas (saxitoxina, neosaxitoxina e dc-saxitoxina) e de uma toxina inibidora da AChE, provavelmente anatoxina-a(s), no reservatório Tapacurá, além de neurotoxinas no reservatório Ingazeira, alerta para a necessidade de um monitoramento contínuo da presença de cianobactérias e suas toxinas nos reservatórios de abastecimento e a criação de programas que visem a diminuição do estado trófico desses ecossistemas aquáticos.

Como mencionado, o número de registros da ocorrência de *C. raciborskii* vem aumentando em todo o mundo. Antes considerada uma espécie de clima tropical, nos últimos anos vem sendo freqüentemente identificada em ecossistemas aquáticos de países de clima temperado. Esse fato, vem despertando o interesse de se conhecer melhor a dispersão dessa espécie pelo planeta e atualmente isso vem sendo possível, principalmente, através da utilização de técnicas de biologia molecular.

Os resultados da análise dos loci ITS1 e *rpoCl* mostraram haver uma maior similaridade entre as cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* do continente americano do que entre cepas de *Cylindrospermopsis* com origens em outros continentes. Apenas um fragmento do gene *nifH* permitiu a separação dos dois gêneros. Mostrou-se também haver uma maior homologia entre cepas de *Cylindrospermopsis* com as mesmas origens geográficas, sendo que essas cepas puderam ser reunidas em três grupos: cepas de origem americana, européia e africana/australiana. A semelhança entre as cepas de cada grupo permite especular que, apesar de uma origem comum, um processo de extinção causado pela última era glacial e um longo período isolamento entre as regiões que compreendem aqueles três grupos, possibilitou que cada um adquirisse características genéticas distintas, que permitem sua distinção. Esses resultados contrariam a hipótese de Padišák (1997) para quem a dispersão da espécie *C. raciborskii* ocorreu da África para o mundo e que isso foi um evento recente. Na verdade, os resultados mostram que provavelmente apenas a Austrália foi colonizada por cepas africanas.

5 CONCLUSÕES

1. A principal característica física e química do reservatório Tapacurá foi uma pequena variação vertical na temperatura da água e na concentração de nutrientes, respectivamente, mesmo havendo um gradiente na concentração do oxigênio.
2. O fenômeno climático “El Niño” causou alterações químicas e físicas nos reservatórios Tapacurá e Ingazeira, induzindo a uma maior estabilidade ambiental por um período mais longo, favorecendo a ocorrência de florações de *C. raciborskii* mais intensas e duradouras.
3. Uma maior estabilidade da coluna d’água, um maior tempo de retenção, um aumento da concentração de nutrientes (nitrogênio e fosfato) e uma baixa intensidade luminosa foram os fatores principais que favoreceram a formação de florações de *C. raciborskii* nos reservatórios Tapacurá e Ingazeira.
4. A identificação da ocorrência de florações de *C. raciborskii* e *A. spiroides*, com cepas respectivamente produtoras de saxitoxinas e de uma toxina inibidora da acetilcolinesterase, em reservatórios de abastecimento do estado de Pernambuco, demonstra um risco para população que recebe a água desses sistemas e, portanto, ressalta a importância para a realização de programas de monitoramento e gerenciamento, não somente nesses, mas em todos os reservatórios sujeitos a ocorrência de florações de cianobactérias.
5. A seqüência do gene 16S rRNA foi idêntica em todas as cepas de *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* estudadas e permitiu distingui-los de outros gêneros que também pertencem à ordem Nostocales.
6. A avaliação molecular realizada com quatro marcadores genéticos não confirmou a separação taxonômica dos gêneros *Cylindrospermopsis* e *Raphidiopsis* – baseada

inicialmente nas suas morfologias -, ressaltando a necessidade de mais estudos para melhor definir as características taxonômicas que separam estes dois gêneros.

7. A análise dos loci ITS1 e *nifH* reuniu todas as cepas de *Cylindrospermopsis* em três grupos. Um grupo foi composto por todas as cepas de origem americana, um segundo por aquelas de origem européia e o último por cepas de origem africana e australiana. A distinção genética entre esses grupos sugere um isolamento longo entre essas áreas. Por outro lado, a menor distinção genética entre as cepas que compõem cada grupo sugere que a dispersão em cada continente foi recente, além de indicar que a Austrália foi recentemente colonizada por cepas africanas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. G. Symbiotic interactions. In: WHITTON, B. A. POTTS, M. (Ed). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 523-561.

ANDERSON, D. Red tides. **Scientific American**, v. 270, n. 8, p. 52-58, 1994.

ANNADOTTER, H. et al. An outbreak of gastro-enteritis associated with consumption of cyanobacteria. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON TOXIC CYANOBACTERIA, 1., 1995, Rønne, Denmark. **Abstract...** Rønne, Denmark, 1995. p. 2

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: American Public Health Association, 1992.

BAZZA, E. L.; TRAIN, S.; THOMAZ, S. M. Flutuações na estrutura da comunidade fitoplanctônica durante o período de enchimento do reservatório de Corumbá (GO). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 7., 1999, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: 1999, p. 502.

BARBOSA, F. A. R.; PADISÁK, J. The forgotten lake stratification pattern: atelomix, and its ecological importance. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 28, p. 1-11, 2002.

BERNARD, C. et al. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, v. 18, p. 176-186, 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA. M.; OLIVEIRA, M. C; BOLCH, C. J. S. Genetic variability of Brazilian strains of *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae)

using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). **Journal of Phycology**, v. 37, p. 810-818, 2001.

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

BOUVY, M.; BARROS FRANCA, L.; CARMOUZE, JP. Compartimento microbiano no meio pelágico de sete açudes do estado de Pernambuco (Brasil). **Acta Limnológica Brasileira**, v. 10, p.: 93-101, 1998.

BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, p. 13-27, 2000.

BRANCO, C. W. C.; SENNA, P. A. C. The taxonomic elucidation of the Paranoá Lake (Brasília, Brazil) problem: *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique**, v. 61, p. 85-91, 1991.

BRESSAN, F. A. **Fatores reguladores da dominância de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba-Raju no reservatório Tabocas, Caruaru, PE.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2001. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

BRIAND, J. F. et al. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. **Water Research**, v. 36, p. 3183-3192, 2002.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, n.1, p. 64-72, 1994.

CARMICHAEL, W.W. et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CASTENHOLZ, R. W.; GARCIA-PICHEL, F. Cyanobacterial responses to UV-radiation. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 591-611.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999, 416 p. cap. 1, p.1-14; cap. 2, p. 15-40; cap. 3, p. 41-111.

CPTEC. Disponível em: <<http://www.cptec.inpe.br/enos/>>. Acesso em: 15 set. 2003.

CUNNIFF, P. Paralytic shellfish poison. In: CUNNIF, P. (Ed.). **Official methods of AOAC international**. 16. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 1995. p. 46-48.

DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterases and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clinical Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1309-1313, 1973.

DOKULIL, M. T.; MAYER, J. Population dynamics and photosynthetic rates of a *Cylindrospermopsis-Limnothrix* association in a highly eutrophic urban lake, Alte Donau, Vienna. **Algological Studies**, v. 83, p. 179-195, 1996.

DYBLE, J.; PAERL, H. W.; NEILAN, B. A. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins

based on *nifH* and *cpcBa*-IGS nucleotide sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2567-2571, 2002.

FALCONER, I. R. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. **Phycologia**, v. 35, n. 6, p. 6-11, 1996.

FASTNER, J. et al. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, v. 42, 313-321, 2003.

FERNANDES, V. O. Ecossistemas aquáticos continentais do Espírito Santo: “berços” de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas ? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 9., 2003, Juiz de Fora. **Resumo...** Juiz de Fora: UFJF, 2003. 1 CD-ROM.

FERREIRA, A. C. S. **Dinâmica do fitoplâncton de um reservatório hipereutrófico (reservatório Tapacurá, Recife, PE), com ênfase em *Cylindrospermopsis raciborskii* e seus morfotipos.** Rio de Janeiro: UFRJ, 2002. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

FRIDAY, C.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHART, K.L. Analyses of cyanotoxins in the filamentous waterbloom forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 10., 2002, St. Pete Beach, Florida, USA. **Abstract...** St. Pete Beach: Tradewinds Island Grand Resort and Conference Center, 2002.

FUNASA. **Portaria nº 1469/2000, de 29 de dezembro de 2000.** Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 32 p.

GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 15, p.796-804, 1964.

GRAN, G. Determinations of the equivalent point in potentiometric titrations. **Part II Analyst**, v.77, p. 661-671, 1952.

HAMBRIGHT, K. D.; GOPHEN, M.; SERRUYA, S. Influence of long term climatic changes on the stratification of a tropical, warm monomitic lake. **Limnology and Oceanography**, v. 39, p. 1233-1242, 1994.

HAWKINS, P. R. Factors which influence the development of blooms of *Cylindrospermopsis*? In: *Cylindrospermopsis – A NEW TOXIC ALGAL BLOOM CHALLENGE FOR AUSTRÁLIA*, 1996, Brisbane, Austrálie. **Abstract...** Brisbane: CSIRO, 1996.

HAWKINS, P. R. et al. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.

HAWKINS, P. R. et al. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, v. 35, p. 341-346, 1997.

HENRIKSEN, P. et al.. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. **Toxicon**, v. 35, n. 6. p. 901-913, 1997.

HUMBERT, J. F.; LE BERRE, B. Genetic diversity in two species of freshwater cyanobacteria, *Planktothrix* (Oscillatoria) *rubescens* and *P. agardhii*. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 150, n. 2, p. 197-206, 2001.

HUSZAR, V. L. M. et al. Phytoplankton species composition is more sensitive than OECD criteria to their trophic status of three Brazilian tropical lakes. **Hydrobiologia**, v. 369/370, p. 59-71, 1998.

HUSZAR, V. L. M. et al. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. **Hydrobiologia**, v. 424, p. 67-77, 2000.

HUSZAR, V.L.M.; SILVA, L.H.S. Cinco décadas de estudos sobre a ecologia do fitoplâncton no Brasil. **Limnotemas**, Rio de Janeiro, v.2, p. 1-22, 1999. Disponível em: <<http://www.iph.ufrgs.br/sbl/livraria/#limnotemas>>. Acesso em: 10 set. 2003.

IBGE, 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 21 out. 2003.

ITEMAN, I. et al. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23 rRNA spacer sequences of *cyanobacteria*. **Microbiology**, v.146, p. 1275-1286, 2000.

JARDIM, F. A. et al. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA – Minas Gerais – Brasil. **BIOS**, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas, v. 9, n. 9, p. 83-91, 2001.

JOCHIMSEN, E. M. et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

KISS, T. et al. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neuorenes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 167-176, 2002.

KOMÁRKOVÁ, J. The tropical planktonic genus *Cylindrospermopsis* (Cyanophytes, Cyanobacteria). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO, 4., 1996, Caxambu. **Anais...** São Paulo: Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe, 1998. p. 327-340.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P. A. C. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. **Algological Studies**, v. 94, p. 207-222, 1999.

KOROLEFF, F. Determination of phosphorus. In: GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M; KREMLING, K. (Ed.) **Methodos of seawater analysis**. 2 ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. p. 125-139,1983.

LAAMANEN, M. J.; FORSSTRÖM, L.; SIVONEN, K. Diversity of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) populations along a Baltic Sea Salinity Gradient. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5296-5303, 2002.

LAGOS, N. et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

LEE, R. D. **Phycology**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1999. 614 p. cap. 2, Cyanobacteria.

LI, R. et al. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, v. 37, p. 1121-1126, 2001a.

LI, R. et al. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon**, v. 39, p. 973-980, 2001b.

MATTHIENSEN, A; BARBOSA, T. C. P. Fitoplâncton potencialmente nocivo em corpos d'água costeiros utilizados para o consumo humano: dados preliminares da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 9., 2003, Juiz de Fora. **Resumo...** Juiz de Fora: UFJF, 2003. 1 CD-ROM.

McGREGOR, G. B.; FABBRO, L. D. Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: implications for monitoring and management. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v. 5, p. 195-205, 2000.

MENDES, J. S.; BARBOSA, J. E. L.; WATANABE, T. Dinâmica da composição e biomassa fitoplanctônica durante a fase de enchimento da Barragem de Acauã, Itatuba – Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 9., 2003, Juiz de Fora. **Resumo...** Juiz de Fora: UFJF, 2003. 1 CD-ROM.

MOESTRUP, O. Toxic blue-green algae in 1833. **Phycologia**, v. 35, n. 6, p. 5, 1996.

NAMIKOSHI, M. et al. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. **Toxicon**, v.42, p. 533-538, 2003.

NEILAN, B. A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2286-2291, 1995.

NEILAN, B. A. et al. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 133-140, 2003.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3327-3332, 1997.

OHTANI, I.; MOORE, R. E.; RUNNEGAR, M. T. C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 7941-7942, 1992.

OLIVER, R. L.; GANF, G. G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 149-194.

OSHIMA, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 528-532, 1995.

PADISÁK J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 107, n. 4, p. 563-593, 1997.

PADISÁK, J.; REYNOLDS, C.S. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. **Hydrobiologia**, v. 384, p. 41-53, 1998.

PANOSSO, R. et al. Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas e cianotoxinas em ambientes aquáticos do estado do Rio Grande do Norte In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 9., 2003, Juiz de Fora. **Resumo...** Juiz de Fora: UFJF, 2003. 1 CD-ROM.

PAERL, H. W. Nuisance phytoplankton blooms in coastal estuarine and inland waters. **Limnology and Oceanography**, v.33, p. 823-847, 1988.

POMATI, F. et al. Enhancement of intracellular saxitoxin accumulation by lidocaine hydrochloride in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Nostocales). **Journal of Phycology**, v. 39, p. 535-542, 2003.

PRÉSING, M. et al. Nitrogen fixation, ammonium and nitrate uptake during a bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii* in lake Balaton. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 136, n. 4, p. 553-562, 1996.

PROENÇA, L. A. O.; CUNHA, N. T.; YUNES, J. S. Análise da cianotoxina cilindrospermopsina em amostras de reservatórios. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 1., 2002, Itajaí. **Anais eletrônicos...** Itajaí, 2002. Disponível em: <<http://www.cttmar.univali.br/algas/publicacoes/ciano16.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2003.

REYNOLDS, C. S. Non-determinism to probability, or N:P in the community ecology of phytoplankton, **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 146, n. 1, p. 23-35, 1999.

REYNOLDS, C. S. et al. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of plankton research**, v. 24, n.5, p. 417-428, 2002.

SAKER, M. L. Blooms of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Julius. In: *Cylindrospermopsis – A NEW TOXIC ALGAL BLOOM CHALLENGE FOR AUSTRÁLIA*, 1996, Brisbane, Austrália. **Abstract...** Brisbane: CSIRO, 1996.

SAKER, M. L.; NEILAN, B. A.; GRIFFITHS, D. J. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 599-606, 1999a.

SAKER, M. L.; THOMAS, A. D.; NORTON, J. H. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in na outback region of North Queensland. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 179-183,1999b.

SAKER, M.L. et al. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 243-250, 2003.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 71, n. 3-4, p. 359-385, 2000.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: Illinios university press, 1963.

SMITH, V. H. Low nitrogen to phosphorous ratio favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. **Science**, v. 221, p. 669-670.

SILVA, J.R.L. et al. 2003. Diagnóstico preliminar da ocorrência de cianobactérias tóxicas ou potencialmente tóxicas em captações de estações de tratamento de água e na praia da Graciosa em Palmas-TO. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 55., 2003, Recife. **Resumo...** Recife: SBPC, 2003. p. 61.

SOUZA, R. C. R.; CARVALHO, M. C.; TRUZZI, A. C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings Reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p. 73-81, 1998.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSON, T. R. **The practical handbook of seawater analysis**. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1972. 310 p.

TEIXEIRA, M. G. L. C. et al. Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 114, n. 6, p. 502-511, 1993.

THOMAS, A. D.; SAKER, M. L.; NORTON, J. H. et al. Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 9, p. 592-594, 1998.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: RiMa, 2003, 256 p. cap. 5, p. 67-81; cap. 6, p. 83-104.

_____. **Planejamento e gerenciamento de lagos e represas: uma abordagem integrada ao problema da eutrofização**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2001. 385 p. cap. 1, p. 13-50.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba-Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relação com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 97-112, 2003.

UTERMÖHL, H. Zur vervollkomnung der quantitativen phytoplankton: methodic. **Mitteilungen internationale vereinigung fur theoretische und angewandte limnologie**, v. 9, p. 1-38, 1958.

VINCENT, W. F. Cyanobacterial dominance in the Polar Regions. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 321-340.

WARD, D.M.; CASTENHOLZ, R.W. Cyanobacteria in geothermal habitats. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 37-59.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 1-11.

WYNN-WILLIAMS, D.D. Cyanobacteria in deserts – life at the limit? In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space.** Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 341-366.

YENTSCH, C. S.; MENZEL, D. W. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. **Deep sea research**, v. 10, p. 221-231, 1963

ZEHR, J. P.; MELLON, M. T.; HIORNS, W. D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. **Microbiology**, v. 143, p. 1143-1450, 1997.

ZOHARY, T. et al. Interannual phytoplankton dynamics of a hypereutrophic African lake. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 136, p. 105-126, 1996.

Obs: No site você encontra os anexos na íntegra em Publicações

ANEXO 1

Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought

Artigo publicado na Hydrobiologia, v. 493, p. 115-130, 2003.

Autores: Marc Bouvy, Silvia Nascimento, Renato J.R. Molica, Andréa Ferreira, Vera Huszar e Sandra M. F. O. Azevedo

ANEXO 2

Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil

Artigo publicado na Aquatic Microbial Ecology, v. 20, p. 285-297, 1999.

Autores: Marc Bouvy, Renato Molica, Simone de Oliveira, Mauro Marinho e Beatriz Beker

ANEXO 3

Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including a demonstration of a new saxitoxin analogue

Artigo publicado na Phycologia, v. 41, n.6, p. 606-611, 2002

Autores: Renato Molica, Hideyuki Onodera, Carlos Garcia, Mariella Rivas, Dario Andrinolo, Silvia Nascimento, Hiroshi Meguro, Yasukatsu Oshima, Sandra Azevedo e Nestor Lagos.

ANEXO 4

Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like in a cyanobacterial bloom in a Brazilian drinking water supply

Artigo a ser submetido para publicação na Harmful Algae

Autores: Renato Molica, Eduardo. J. Alécio-Oliveira, Paulo V. V. C. Carvalho, Anapaula N. S. F. Costa, Maristela C. C. Cunha, Gustavo L. Melo e Sandra M. F. O. Azevedo

ANEXO 5

Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* and *Raphidiopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four continents.

Artigo submetido para publicação no Journal of Phycology

Autores: Muriel Gugger, Renato Molica, Brigitte Le Berre, Philippe Dufour, Cécile Bernard e Jean-François Humbert

ANEXO 6

Outros artigos publicados durante a realização desta tese

Cianobactérias: Risco em águas de abastecimento.

Ciência Hoje, v.26, n. 154, p.67-69, 2003.

Autores: Marc Bouvy, Renato Molica e Silvia Nascimento

Approche écologique de la qualité de l'eau des réservoir dans la région semi-aride de l'État du Pernambouc (Nordeste brésilien)

Secheresse, v. 14, n.2, p. 85-93, 2003.

Autores: Marc Bouvy, Silvia Nascimento, Renato J. r. Molica, Vera Huszar e Sandra M. F. O. Azevedo