

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**

**QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS  
PRODUTORAS DE MICROCISTINA NO  
RESERVATORIO DE FURNAS (MG), ATRAVÉS DA  
PCR EM TEMPO REAL, E SUA RELAÇÃO COM  
FATORES AMBIENTAIS**

**Juliana da Silva Martins Pimentel**

**Belo Horizonte**

**2009**

**Juliana da Silva Martins Pimentel**

**QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS  
PRODUTORAS DE MICROCISTINA NO  
RESERVATORIO DE FURNAS (MG), ATRAVÉS DA  
PCR EM TEMPO REAL, E SUA RELAÇÃO COM  
FATORES AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Alessandra Giani

**Belo Horizonte**

**2009**

**A meus Pais, Juan e Ana (*in memoriam*),  
pelos exemplos de força, união e amor.**

**A meu querido Guto, pelo companheirismo e  
amor de sempre!**

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus pela força e inspiração, que me ajudaram muito durante todo este percurso;**

**À toda minha família, especialmente ao meu pai, meus irmãos e meu marido, que são meu alicerce precioso;**

**À minha querida orientadora Alessandra Giani pela amizade, confiança, incentivo e oportunidade;**

**Aos meus amigos do Laboratório de Ficologia, Ana, Bina, Bruneca, Camilinha, Cláudia, Cleber, Daniel, Felipe, Gabi, Lele, Lenora e Rafa, pela preciosa troca de experiências, auxílio, carinho e pelas distrações em campo, lab e congressos;**

**À Bruna e a Camila pelas trocas de experiências de bancada de biologia molecular;**

**Ao Cleber e a Gabi pelas dicas e auxílios preciosos para construção desta dissertação;**

**À Elenice pelo apoio técnico e amizade;**

**Ao Rainer Kurmayer e ao Guntran Christiansen pelo auxílio principalmente no desenho dos oligonucleotídeos iniciadores;**

**À todo departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade;**

**À todos meus amigos da vida, que tornaram possível a realização deste sonho, pela força e incentivo;**

**À Furnas Centrais Elétricas pelo apoio nos trabalhos de Campo, especialmente ao Dirceu, Paulo, Das Neves, Marquinhos, Tiba e Toninho;**

**À Capes pela bolsa concedida;**

**E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho,**

**Meu muito obrigada!!!**

## RESUMO

As cianobactérias são organismos procariontes, fotossintetizantes e podem ser encontradas em vários ambientes diferentes. Um dos sérios problemas relatados em águas eutrofizadas é a ocorrência freqüente de florações formadas por cianobactérias produtoras de toxinas. Devido à impossibilidade de se diferenciarem cepas tóxicas e não tóxicas morfologicamente, marcadores moleculares foram desenvolvidos como possível instrumento de detecção de toxicidade. As cianobactérias produtoras de microcistina possuem um operon policistrônico denominado *mcy*, que tem sido usado como marcador molecular para detecção da toxicidade. No presente trabalho, amostras foram coletadas periodicamente no final de 2006, 2007 e início de 2008, em várias estações do reservatório de Furnas (MG), um grande reservatório do Sudeste do Brasil. Ele é formado por dois rios principais (Rio Grande e Rio Sapucaí) e uma série de pequenos tributários. Novos iniciadores foram desenhados para a técnica da PCR convencional e da PCR quantitativa, objetivando a detecção dos genes *mcyD* em populações naturais. Foram realizadas análises físico-químicas e biológicas e análises moleculares para estudar quantitativamente as relações entre a existência de cepas tóxicas e os fatores ambientais. Os braços do Grande e do Sapucaí apresentam diferentes níveis tróficos. No braço do Sapucaí, mais eutrófico, foi freqüentemente observada uma quantidade maior de cianobactérias. Os dados mostraram uma tendência sazonal. Alguns dados ambientais como clorofila, fósforo e ZE mostraram correlação com a quantidade de genótipos tóxicos no ambiente. Também a presença de genes *mcyD* pôde ser correlacionada positivamente com a presença de microcistina, mas nem sempre foram encontradas relações quantitativas diretas entre essas duas medidas. Com relação ao aspecto metodológico, podemos dizer que o método da q-PCR mostrou-se sensível para quantificação e identificação da microcistina e, portanto poderia ser utilizado no monitoramento de cianobactérias. No entanto, mais estudos são necessários para verificar a existência da influência dos fatores ambientais na quantidade de cianobactérias produtoras de microcistina no ambiente, pois nosso estudo não foi conclusivo sobre este aspecto.

**Palavras chave: Cianobactérias, microcistina, *mcyD*, PCR quantitativa**

## ABSTRAT

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes found in different aquatic environments. A serious problem in eutrophic waters is the frequent occurrence of blooms of potential toxic cyanobacteria. Since species are sometimes difficult to identify and morphological features are not enough to separate toxic from non-toxic strains, molecular markers have been developed as an instrument to detect toxicity. Microcystin-producing cyanobacteria have a polycistronic operon called *mcy* that has been used as a genetic tool for toxicity detection. In the present work, samples were collected between September 2006 and April 2008 at several stations in Furnas Reservoir (MG), a large reservoir in Southeastern Brazil. This reservoir is formed by two main rivers, Grande and Sapucaí, and a series of small tributaries. New primers were designed for the conventional PCR and for the quantitative PCR techniques, aiming the detection of *mcyD* genes in natural populations. Physical-chemical, biological and molecular analyses were performed on the same sample to study the relationship among the existence of toxic strains and of the environmental factors. The Grande and Sapucaí branches showed different trophic levels. In the Sapucaí, which is more eutrophic, a large number of cyanobacteria was frequently observed. Some tendency of sazonality was detected in the entire reservoir. It was possible to find some relationship between chlorophyll a, phosphorus and ZE and the amount of toxic genotypes in the environment. The presence of *mcyD* genes was also positively correlated with the presence of microcystin, but directly quantitative relationships between these two items were not always found. The methodology used for microcystin quantification and identification was very sensitive and it could be used in cyanobacteria monitoring programs. However, more studies are necessary to investigate the influence of environmental factors on the amount of microcystin-producing cyanobacteria in the environment.

**Key words:** Cyanobacteria, microcystin, *mcyD*, quantitative PCR

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Floração de Cianobactéria em Boa Esperança (MG).....	13
Fig. 2 - Molécula da Microcistina .....	17
Fig. 3 - Síntese não ribossomal da microcistina .....	19
Fig. 4 - Conjunto de genes ( <i>myc</i> ) .....	19
Fig. 5 - Modelo para formação da molécula microcistina.....	20
Fig. 6 - Reservatório de Furnas e os pontos amostrados .....	32
Fig. 7 - Medida da ZE no Reservatório da UHE de Furnas.....	42
Fig. 8 - Medidas do Sólidos Totais no Reservatório da UHE de Furnas .....	42
Fig. 9 - Medida da T°C no Reservatório da UHE de Furnas .....	42
Fig. 10 - Medida dos nutrientes no Reservatório da UHE de Furnas.....	43
Fig. 11 - Medida da Clorofila no Reservatório da UHE de Furnas .....	44
Fig. 12 - Medida de quantidade de células (microscopia) em Furnas.....	47
Fig. 13 - Concentração de microcistina nos dois diferentes braços do Reservatório .....	49
Fig. 14 - PCR das mostras de Furnas (PC-IGS e <i>mycD</i> ) .....	51
Fig. 15 - Curva de dissociação para os iniciadores <i>mcyD</i> e <i>cpcB</i> .....	52
Fig. 16 - Teste de Eficiência do oligonucleotídeo iniciador <i>mcyD</i> .....	53
Fig. 17 - Teste de Eficiência do oligonucleotídeo iniciador <i>cpcB</i> .....	54
Fig. 18 - Curvas de amplificação dos genes <i>cpcB</i> e <i>mcyD</i> de amostras Liofilizadas .....	56
Fig. 19 – Q-PCR dos genes <i>mcyD</i> e <i>cpcB</i> das amostras liofilizadas .....	57
Fig. 20 – Relação dos dados de Q-PCR e do microscópio .....	57
Fig. 21 - Quantificação do <i>mcyD</i> na UHE de Furnas .....	60
Fig. 22 - Relação do <i>mcyD</i> com as células potencialmente produtoras de microcistina .....	62
Fig. 23 - Relação dos dados encontrados pelo método ELISA e Q-PCR .....	64
Fig. 24 - Comparação da q-PCR e PCR convencional .....	65
Fig. 25 - Plano de Monitoramento de Cianobactéria .....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores moleculares disponíveis na literatura .....	26
Tabela 2 - Datas das coletas .....	34
Tabela 3 - Iniciadores desenhados para ficocianina (PC) e microcistina (mcy) .....	37
Tabela 4 - Iniciadores desenhados para q-PCR para PC e mcy.....	40
Tabela 5 - Lista de espécies encontradas no reservatório de Furnas .....	46



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP – proteína carregadora de peptídeo

A – adenilação aminoacil

AMT – aminotransferase

AT – acetiltransferase

C – condensação

Chl a – Clorofila a

CM - C-metiltransferase

cpcBA-IGS – Espaço intergênico do operon da ficocianina

cpcB – Região gênica B do conjunto de genes da ficocianina

Ct – “threshold cycle”

DH - Deidratase

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DNTP – Desoxinucleotídeo

Ef% - Eficiência

ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” - Ensaio Imunoenzimático

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

g – Gramas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LPS – Lipopolissacarídeo

LC/MS - Cromatografia líquida/espectrometria de massa

KS -  $\beta$  ketoacil redutase

KR – Ketoacil redutase

LUX – “Ligth Upon Extension”

*mcy* – Operon evoluído na síntese de microcistina

*mcyA, B, C, D, E, F, G, H, I, J* – Genes envolvidos na síntese de microcistina

MG – Minas Gerais

mg – miligramas

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

mL – Mililitros

mM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucleíco mensageiro

NCBI - National Center for Biotechnology Information  
ng – Nanogramas  
nm – Nanômetros  
NM – N-metiltransferase  
OM – o-metiltransferase  
ORF – Janela aberta de leitura  
pb – Pares de bases  
PC – Ficocianina  
PC-IGS – Região intergênica do conjunto de genes da Ficocianina  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PE - Pernambuco  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PKS – Sintase de policetônicos  
PS – Sintetase de peptídeos  
q-PCR – Reação em cadeia da polimerase – quantitativa (PCR em tempo real)  
RC – racemase  
Rho – Correlação de Spearman  
RFLP – “Restriction fragment length polymorphism”  
TM – Temperatura de dissociação (melting)  
TNA – Ensaio da Taq-nuclease  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UHE – Usina Hidrelétrica  
UV – Ultra-violeta  
VMP – Valor máximo permitido  
 $\mu\text{L}$  – Microlitros  
 $\mu\text{m}$  – Micrômetro  
ZE – Zona Eufótica

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 As Cianobactérias .....	12
1.2 Cianobactérias Tóxicas .....	14
1.3 Monitoramento Ambiental de Cianobactérias .....	15
1.4 Identificação das Toxinas .....	16
1.5 Microcistina .....	16
1.6 Biossíntese da Microcistina e os Genes <i>mcy</i> .....	18
1.7 Regulação da Produção da Microcistina .....	21
1.8 Detecção de Cianobactérias e dos Genes Envolvidos na Produção da Microcistina .....	22
1.9 PCR (reação em cadeia da polimerase) – Análise Qualitativa do Ambiente .....	23
1.10 PCR em Tempo Real – Análise Quantitativa do Ambiente .....	27
<b>2.0 OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3.0 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1 Área de Estudo .....	32
3.2 Coleta de Água .....	33
3.3 Análises Biológicas .....	34
3.4 Análise Molecular .....	36
3.5 Análises Estatísticas .....	40
<b>4.0 RESULTADOS</b> .....	41
4.1 Avaliação Físico-Química da Água .....	41
4.2 Variáveis Biológicas .....	44
4.3 Análises Moleculares .....	50
<b>5.0 DISCUSSÃO</b> .....	66
5.1 Os Parâmetros Físico-Químicos e Biológicos e a Sazonalidade do Reservatório .....	66
5.2 Relação dos Parâmetros Estudados com Genótipos <i>mcyD</i> .....	67

5.3 Composição Específica e Produção de Toxina.....	69
5.4 Análises Moleculares.....	70
5.5 Sensibilidade da q-PCR.....	74
5.6 Porcentagem de Genes Tóxicos em Furnas.....	76
5.7 Sensibilidade dos Métodos e Viabilidade no Monitoramento Ambiental.....	78
<b>6.0 CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 As Cianobactérias

As cianobactérias são organismos primitivos e muito diversos com algumas características de bactérias e outras de algas. São similares as algas no tamanho e também são pigmentadas e realizam fotossíntese. No entanto, elas são organismos procariontes e, portanto constituem um grande grupo dentro do reino *Bacteria* capazes de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio (CASTENHOLZ & WATERBURY, 1989).

O aparato fotossintético das cianobactérias possui clorofila *a* e vários carotenóides como pigmentos da antena coletora de luz. Os principais pigmentos da antena coletora de luz são as ficobiliproteínas, que são organizadas em estruturas chamadas ficobilissomas, as quais, por sua vez, são compostas de ficoeritrina (pigmento vermelho ausente em algumas cianobactérias), ficocianina (PC - pigmento azul), aloficocianina e aloficocianina B (STANIER & COHEN-BAZIRE, 1977). Dentro do domínio *Bacteria*, os genes de PC (ficocianina) são encontrados exclusivamente em cianobactérias (BRYANT, 1982), e tem proporcionado uma maneira rápida e segura de identificação e estudo destes microrganismos (NEILAN *et al.*, 1995; LORENZI, 2004).

Estes microrganismos são encontrados na forma unicelular, colonial ou filamentosa com células variando de tamanho, desde células menores que 1µm até maiores que 40µm. As cianobactérias também exibem uma grande quantidade de arranjos, de cocos unicelulares à bacilos e mesmo filamentos ramificados multicelulares. Não possuem flagelos, porém as espécies filamentosas podem apresentar um movimento deslizante e podem migrar através de superfícies úmidas (KOMÁREK *et al.*, 1999).

Um terço das espécies de cianobactérias é capaz de fixar o nitrogênio molecular e muitas delas possuem uma estrutura especial, o heterocito, que é uma célula diferenciada e adaptada para este processo (OBERHOLSTER *et al.*, 2003). Elas podem ser tolerantes a altas temperaturas, altas irradiações de UV, dessecação, sulfeto livre e também possuem habilidades de usar baixas intensidades luminosas (RAPALA & SIVONEN, 1997) podendo habitar os ambientes mais diversos possíveis.

As cianobactérias são comuns em muitos sistemas aquáticos, incluindo lagos temperados e tropicais, rios e estuários. No entanto, a densidade celular, composição das espécies, distribuição vertical e longevidade diferem entre os grupos e regiões habitadas. Essas diferenças podem ser explicadas por condições climáticas e meteorológicas que influenciam o grau de estratificação e mistura da água, bem como disponibilidade de luz e nutrientes (OLIVER & GANF, 2000).

Muitas características específicas podem influenciar no comportamento e distribuição das espécies de cianobactérias. Algumas cianobactérias, por exemplo, possuem aerótopos (vesículas de gás) e podem formar escumas ou florações, caracterizada pelo crescimento excessivo destes organismos, com formação de uma massa algal na superfície de águas de mananciais, represas ou lagos (Fig. 1). No entanto, alguns outros grupos de cianobactérias podem formar florações na coluna d'água em diferentes profundidades (RAPALA, 1997). As cianobactérias em geral crescem rapidamente na presença de altas concentrações de fósforo e nitrogênio, e a maioria das florações contém cianobactérias produtoras de toxinas (ROSET *et al.*, 2001).

As cianobactérias produzem uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos (ROUHIAINEN *et al.*, 2000). Destes compostos, de acordo com Salomon *et al.* (1996), os mais estudados tem sido as cianotoxinas que podem ser incluídas em três categorias: neurotoxinas (alcalóides e organofosforados); hepatotoxinas (peptídeos); e dermatotoxinas (lipopolissacarídeos - LPS).



Foto: Juliana S.M.Pimentel

**Fig 1.** Floração de Cianobactéria nas proximidades do reservatório de Furnas, em Boa Esperança (MG).

## 1.2 Cianobactérias Tóxicas

As cianobactérias tóxicas são encontradas no mundo inteiro, em ambientes aquáticos costeiros ou continentais. Alguns dos gêneros e espécies mais comuns em água doce, conhecidos por produzirem toxinas são *Microcystis* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii*, *Gloeotrichia* spp., *Anabaena* spp., *Lyngbya* spp., *Aphanizomenon* spp., *Nostoc* spp., *Oscillatoria* spp., *Schizothrix* spp. e *Synechocystis* spp (WHO, 2003). No entanto, o potencial de toxicidade não pode ser excluído de outras espécies e gêneros de cianobactérias. Pesquisas em várias regiões do globo têm revelado a existência de outras espécies tóxicas. No Brasil, por exemplo, Sant'Anna *et al.* (2004) encontraram que as espécies *Aphanocapsa incerta* e *Radiocystis fernandoi* também são potencialmente produtoras de toxinas. *Radiocystis fernandoi* foi primeiramente descrita como tóxica por Vieira *et al.* (2003).

A ocorrência de florações de cianobactérias em ambientes aquáticos tem sido registrada em todo mundo, e de acordo com WHO (2003), cerca de 60% das amostras investigadas continha toxinas. A presença de cianotoxinas na água pode trazer como consequência principal, a morte de peixes, crustáceos, aves e outros animais domésticos (SALOMOM *et al.*, 1996). De acordo com Sivonen e Jones (1999), 46 espécies de cianobactérias causaram efeitos tóxicos em vertebrados.

Demonstrações de toxicidade de populações de cianobactérias em um dado lago não sugerem necessariamente um perigo para o ambiente ou saúde humana, pois elas podem estar presentes em pequena quantidade. O desenvolvimento massivo e especialmente a formação de escumas superficiais oferecem os verdadeiros riscos (WHO, 2003).

Segundo Wilson *et al.* (2000) a enorme ocorrência de cianobactérias está atribuída ao acelerado processo de eutrofização dos lagos pela ação antrópica (lançamento de efluentes de esgoto, agricultura, etc.). A agricultura, por exemplo, possui, na maioria das vezes, inadequado tratamento do solo e utilização excessiva de fertilizantes. Estes excessos podem ser lixiviados para os corpos d'água que estejam ao seu redor, levando ao processo de eutrofização. Isso pode provocar a proliferação excessiva de algas e cianobactérias na água e consideráveis impactos na sua qualidade. Em climas temperados, a proliferação de cianobactérias é mais comum no verão, que coincide com os períodos onde a procura pela recreação é maior (WHO, 2003).

Os resultados encontrados por Rantala *et al.* (2006) sugerem que o risco de desenvolvimento de florações tóxicas aumentam em lagos eutróficos. Isso aumenta a importância da proteção das águas contra o processo de eutrofização e redução dos nutrientes em corpos d'água que precisam ser restaurados.

### **1.3 Monitoramento Ambiental de Cianobactérias**

As intoxicações de populações humanas através do consumo de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactéria, já foram descritas em grande parte do mundo e vem se tornando um problema de saúde pública. No Brasil, por exemplo, o caso de Caruaru (PE - Brasil) em 1996 foi o primeiro a confirmar a presença de cianotoxinas, como causa de morte de mais de 60 pacientes (CARMICHAEL *et al.*, 1996; AZEVEDO, 1996). Esta intoxicação alertou estudiosos e agentes de saúde para o problema das cianotoxinas no Brasil e no mundo.

Para atendimento ao padrão de potabilidade da água para consumo humano, a Portaria 518 de 25 de março 2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) exige a análise das microcistinas, tanto na água bruta dos mananciais de captação de água, quanto na água tratada para o consumo humano, com o VMP (valor máximo permitido) de 1,0 µg/L para a água tratada. Esta portaria também recomenda testes de toxicidade e análises de algumas outras cianotoxinas, como a saxitoxina e a cilindrospermopsina com o VMP de 3µg/L e 15µg/L respectivamente. Essas outras toxinas também representam sério risco para a saúde humana.

O monitoramento da qualidade de água destinada ao público é feito seguindo-se as metodologias propostas pela Organização Mundial de Saúde (BRASIL, 2004), através da identificação do potencial tóxico da cianobactéria (testes de toxicidade) e do acompanhamento da densidade populacional (contagem de células). No Brasil, o ensaio em camundongos ainda é usado para determinar a toxicidade das florações de cianobactérias (SALOMOM *et al.*, 1996). A cromatografia líquida (HPLC) ou a análise imunoenzimática (ELISA) também são técnicas recomendadas e bastante utilizadas (OLIVEIRA, 2002). Porém nenhuma destas técnicas é preditiva, ou seja, elas somente são efetuadas quando a floração tóxica já se estabeleceu.



Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos e utilizados em todo o mundo para auxiliar no monitoramento e controle de cianobactérias tóxicas e serão descritos detalhadamente mais adiante.

#### 1.4 Identificação das Toxinas

A estrutura de muitas cianotoxinas já é bastante conhecida e, portanto foi possível o desenvolvimento de análises sensíveis para sua identificação em amostras ambientais. Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), ensaios com inibidor de fosfatase (PP1A e PP2A), cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) e cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC/MS) são os mais utilizados para as análises de cianotoxinas (SIVONEN, 2008). A técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Essay) já pode ser utilizada para todas as hepatoxinas e saxitoxinas, enquanto que PP1A ou PP2A são usados para detecção somente de microcistinas e nodularinas, pois são enzimas inibidas somente por elas. Ambos os métodos estão avaliados como sensíveis e rápidos (HARADA *et al.*, 1999; RAPALA *et al.*, 2002; HILBORN *et al.*, 2005) e permitem a quantificação da concentração da toxina na amostra, porém não diferenciam as diversas variedades. A identificação individual das variedades de toxinas só pode ser feita através de análises por HPLC ou LC/MS.

#### 1.5 Microcistina

A cianotoxina mais comum e mais bem estudada é uma hepatotoxina, encontrada freqüentemente em água doce, conhecida como microcistina (VEZIE *et al.*, 2002). As microcistinas são pequenos peptídeos contendo aminoácidos incomuns, com estrutura cíclica (D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha), onde X e Z são L aminoácidos variáveis (Fig. 2).

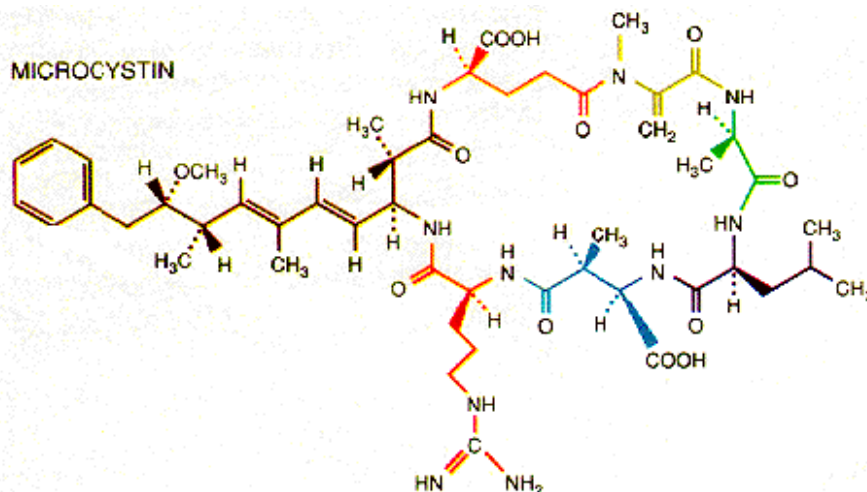
Como as posições L-X e L-Z da cadeia podem ser ocupados por diferentes aminoácidos, há formação de uma série de variantes da molécula microcistina (SIVONEN *et al.*, 1990; CHRISTIANSEN *et al.*, 2003). Existem mais de 60 isoformas de microcistina com diferentes níveis de toxicidade e segundo Salomom *et al.* (1996), a microcistina-LR tem se mostrado uma potente inibidora das enzimas fosfatase 1 e 2A em mamíferos e plantas

superiores, e seus efeitos são similares às substâncias conhecidas como promotoras de tumores ou carcinogênicas.

As microcistinas são produzidas por uma alta diversidade de cianobactérias, incluindo as formas unicelulares, coloniais, filamentosas com ou sem heterocito, que incluem as cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc* (CARMICHAEL, 1994) *Lyngbia*, *Phormidium* (IZAGUIRRE *et al.*, 2007) e *Planktothrix* (HISBERGUES *et al.*, 2003). Recentemente no Brasil foram encontradas espécies produtoras de microcistina dos gêneros *Aphanocapsa* e *Radiocystis* (SANT'ANNA *et al.*, 2004).

No entanto, *Microcystis* é um dos principais gêneros encontrados nas florações contendo cianobactérias produtoras de microcistina (CHRISTIANSEN *et al.*, 2003), porém cepas não tóxicas deste gênero também ocorrem e são bastante comuns. Geralmente, a toxicidade não é um traço específico das espécies; sendo assim, muitas espécies contêm cepas tóxicas e não tóxicas. Para microcistina, tem sido mostrado que a toxicidade da cepa depende da existência ou não de genes relacionados com a produção da microcistina (ROUHIAINEN *et al.*, 1995; DITTMANN *et al.*, 1996) e em populações naturais estão misturados ambos os genótipos (KURMAYER *et al.*, 2002).

Análises realizadas por Rantala *et al.* (2004) mostraram que genes *mcy* são ancestrais e a distribuição esporádica entre cepas e gêneros produtoras de microcistina, está provavelmente ligado ao resultado de uma herança vertical do agrupamento gênico *mcy* de uma cianobactéria ancestral, combinado com perdas de genes recorrentes, em algumas das linhagens de cianobactérias. Por essa razão, é possível que alguns gêneros previamente relatados como não tóxicos, possam reter genes *mcy* e se tornarem aptos a produzirem microcistina



**Fig 2.** Molécula da Microcistina. X e Z são L aminoácidos variáveis, Adda é 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimetil-10-phenil-4,6-decadi-enoic acid, D-MeAsp é 3-methyl-aspartic acid, e Mdha é N-methyldehydroalanine (CARMICHAEL *et al.*, 1988 *apud* KURMAYER *et al.*, 2003).

## 1.6 Biossíntese da Microcistina e os Genes *mcy*

A microcistina é um heptapeptídeo incomum, pois é sintetizada sem a participação do ribossomo, através de uma série de reações catalizadas por enzimas multifuncionais chamadas de sintetase de peptídeos (NRPS) e sintase de policetônicos (PKS) (ARMENT & CARMICHAEL, 1995; DITTMANN *et al.*, 1997) (Fig. 3).

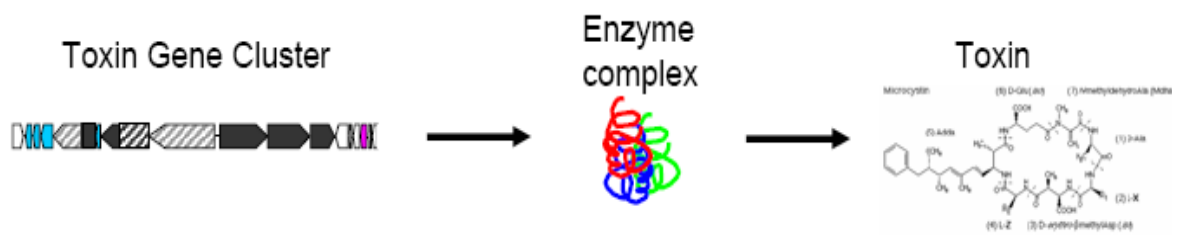
Há algum tempo atrás, os genes envolvidos na biossíntese da microcistina-LR da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* PCC7806 foram isolados e seqüenciados (TILLET *et al.*, 2000), facilitando os estudos de identificação de cepas tóxicas. O agrupamento dos genes que participam da biossíntese da microcistina, denominado *mcy*, contém 55 kb de DNA codificando dez ORFS (janela aberta de leitura), de *mcyA* a *mcyJ* (TILLET *et al.*, 2000) (Fig. 4). A transcrição dos genes *mcy* ocorre via dois operons policistrônicos, *mcyABC* e *mcyDEFGHIJ*, de um promotor central bidirecional entre *mcyA* e *mcyD* (KAEBERNICK *et al.*, 2002).

De acordo com Tanabe *et al.* (2004), esse agrupamento de genes está localizado no cromossomo e estes genes codificam módulos de PKS/NRPS, envolvidos no alongamento da cadeia de policetônicos e polipeptídios e domínios acessórios adicionais catalisando a modificação das cadeias de polipeptídios e policetônicos.

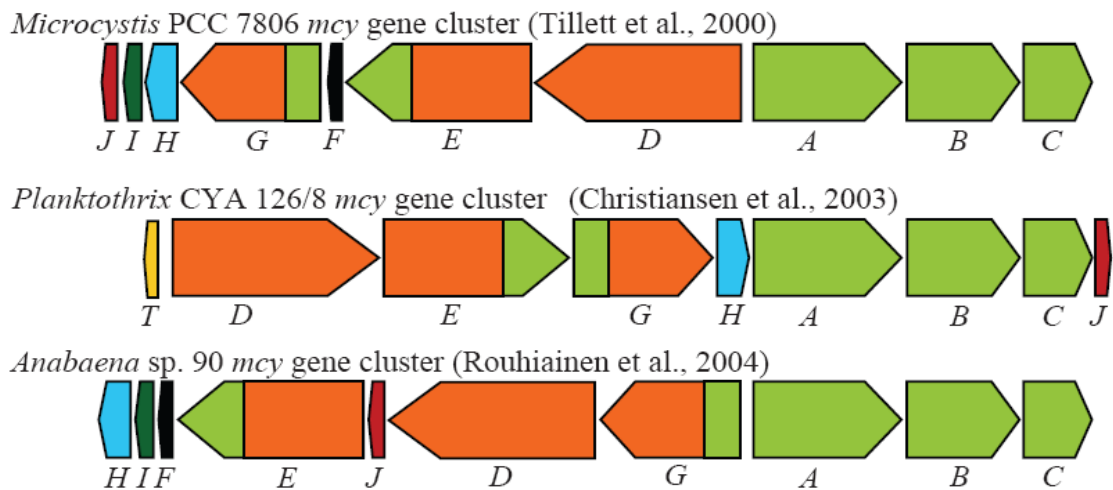
A biossíntese de microcistina envolve 48 reações catalíticas iniciais, sendo que 45 são catalisadas por domínios dentro de seis grandes grupos enzimáticos (McyA-E e G) (TILLET *et al.*, 2000). A Fig. 5 mostra a representação esquemática do sistema de funcionamento dos componentes protéicos do complexo *mcy* para os passos individuais de biossíntese de microcistina.

De acordo com Dittmann *et al.* (2001), McyG, D e E são os maiores componentes formadores do precursor do Adda-D-ácido glutâmico. McyA, B e C são responsáveis pela incorporação de outros cinco aminoácidos dentro da estrutura da microcistina. A proteína McyA é uma sintetase de peptídeos bimodular, que é responsável pela ativação do L-serina e L-alanina, McyB é o segundo sintetase de peptídeo bimodular, responsável pela ativação de L-serina e D- $\beta$ -metil-aspartato. McyC está mais ligado ao domínio tioesterase, necessariamente para a realização do produto final de peptídeo da enzima, bem como para a ciclização da molécula. Enzimas costureiras codificadas pelo conjunto de genes *mcy* incluem McyE, um aminoácido racemase, que está envolvido na fonte de D-glutamato (NISHIZAWA

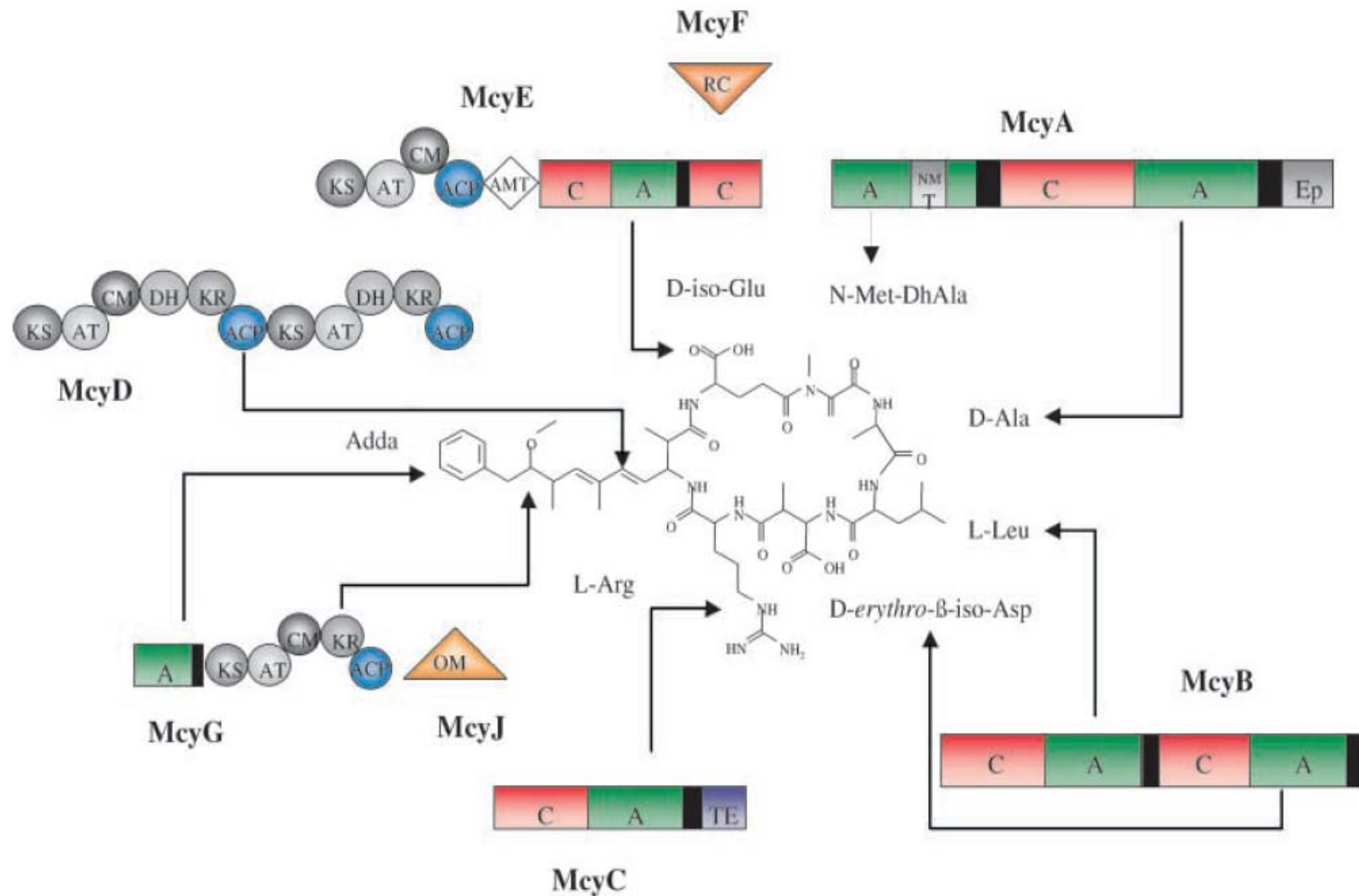
*et al.*, 2001), McyH, uma ABC transportador potencialmente envolvido no transporte da microcistina, McyI, com similaridades para D-3-fosfoglicerato desidrogenases e McyJ, que faz a O-metilação do precursor do Adda (TILLET *et al.*, 1999).



**Fig. 3** - Síntese não ribossômica da microcistina, realizada pelo complexo enzimático sintetase de peptídeos (NRPS) em conjunto com o sintase de policetônicos



**Fig. 4** – Organização do conjunto gênico *mcy*, encontrado em Cianobactérias produtoras de microcistina.



**Fig. 5** - Modelo para formação da microcistina e previsão das estruturas dos domínios de *mcyA-G* e *mcyI* e *mcyJ*. KS -  $\beta$  ketoacyl redutase; AT - acetiltransferase; ACP - proteína carregadora de peptídeo; KR - Keto acil redutase; DH-Deidratase; CM - C-metiltransferase; OM - o-metiltransferase; A - adenilação aminoacyl; C - condensação; NM - N-metiltransferase; AMT - aminotransferase; RC - racemase. Em preto é mostrado a modificação de thiolação (Dittman *et al.*, 2001).

## 1.7 Regulação da produção de microcistina

Acredita-se que a produção de microcistina seja regulada por diferentes parâmetros físicos e ambientais, incluindo nitrogênio, fósforo, temperatura, luz, pH e traços metálicos (principalmente ferro) (SIVONEN, 1990; LUKAC e AEGERTER, 1993; VAN DER WESTHUIZEN & ELOFF, 1985; SONG *et al.*, 1998). No entanto, estes trabalhos realizados com medidas diretas de toxina na água ou no conteúdo celular, geraram muitas controvérsias a respeito disso. A descrição do conjunto gênico *mcy* por Tillet *et al.* (1999) possibilitou um exame mais preciso da regulação da microcistina a nível molecular.

Vários estudos utilizando métodos moleculares relataram o aumento do conteúdo intracelular de microcistina depois da exposição das culturas a altas condições de luminosidade (RAPALA *et al.*, 1997; KAEBERNICK *et al.*, 2000; WIEDNER *et al.*, 2003). Wiedner *et al.* (2003) encontrou que em média, as concentrações de microcistina extracelular foram 20 vezes maiores quando as células foram cultivadas a  $40 \mu\text{mol}$  de fótons  $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  do que quando cresceram a  $10 \mu\text{mol}$  de fótons  $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kaebernick *et al.* (2000) usou um ensaio de proteção a ribonucleases (RPA) para medir a transcrição dos genes *mcyB* e *mcyD* em diferentes condições de luz. Neste trabalho, a alta intensidade luminosa e a luz vermelha causaram um aumento na transcrição dos genes estudados, enquanto que pouca luz e luz azul conduziram a um decréscimo no nível de transcrição. Kaebernick *et al.* (2001) propuseram que a microcistina pode ser produzida constitutivamente em baixas ou médias intensidades luminosas. Essa molécula geralmente vai para os tilacóides e é exportada para fora da célula quando o mais alto ponto de intensidade luminosa é alcançado. De acordo com Neilan *et al.* (2008), o recentemente identificado ABC transportador *McyH*, pode ser responsável por essa exportação aparente da microcistina, embora o aumento da lise celular e a “fuga” das toxinas em altas irradiações não pode ser excluída.

Em trabalhos recentes de regulação de produção da microcistina, Martin-Luna *et al.* (2006) mostraram que a proteína Fur, uma ligante de DNA e reguladora da captação de ferro, reconhece e se liga a regiões promotoras do conjunto gênico *mcy*, sugerindo então que ferro pode regular a síntese de microcistina. Seguindo então está idéia, Sevilla *et al.* (2008) em seu estudos, observaram o efeito negativo do ferro, usando a resposta transcricional do gene *mcyD*, na produção da microcistina.

## 1.8 Detecção de Cianobactérias e dos Genes Envolvidos na Produção da Microcistina

A identificação de cianobactérias baseando-se apenas em características morfológicas, apesar de amplamente usada e recomendada (CHORUS & BARTRAM., 1999), é problemática devido à alta plasticidade fenotípica dos diversos grupos de cianobactérias e pelo fato de que a produção de toxina é uma característica intrapopulacional, não característica de um gênero ou espécie. Por isso, as cianobactérias produtoras de microcistina podiam se apenas identificadas através do isolamento e cultivo do organismo e avaliação de sua capacidade de produzir toxinas (SIVONEN & JONES, 1999).

Uma alternativa são as técnicas moleculares que detectam seqüências gênicas, requeridas para a síntese da toxina (LORENZI, 2004; OBERHOLSTER *et al.*, 2003). A utilização destas técnicas somente foi possível recentemente, após a identificação e seqüenciamento dos genes, envolvidos na biossíntese das toxinas (DITTMANN *et al.*, 1997; NISHIZAWA *et al.*, 1999, 2000; TILLET *et al.*, 1999; CHRISTIANSEN *et al.*, 2003), como já foi descrito anteriormente. Também foi demonstrado que a ocorrência de genes *mcy* nas células de cianobactérias está correlacionada com sua habilidade para sintetizar microcistina e vice versa, e que células sem microcistina usualmente não contém genes *mcy* (KURMAYER *et al.*, 2002). Essa informação auxilia muito quando se utiliza esta região do genoma como alvo para identificação de genótipos tóxicos no ambiente.

O entendimento e compreensão dos genes *mcy* proporcionaram o aprimoramento das técnicas moleculares possibilitando, portanto a utilização destes como marcadores moleculares para identificação de cepas tóxicas no ambiente. Muitos desses genes já vêm sendo utilizados por estudiosos do mundo inteiro, principalmente em ambientes temperados, como alvo de uma rápida e sensível detecção e diferenciação de cianobactérias tóxicas e não tóxicas (NISHIZAWA *et al.*, 1999 e 2000; NEILAN *et al.*, 1999; TILLET *et al.*, 2001; NONNEMAN & ZIMBA, 2002; PAN *et al.*, 2002; BACKER *et al.*, 2002; KURMAYER *et al.*, 2002; FOULDS *et al.*, 2002; MIKALSEN *et al.*, 2003; HISBERGUES *et al.*, 2003; KURMAYER & KUTZENBERGER, 2003; VAITOMAA *et al.*, 2003; KURMAYER *et al.*, 2004; RANTALA *et al.*, 2004; VIA-ORDORIKA *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2005; OUAHID *et al.*, 2005; HOTTOO *et al.*, 2005; MBEDI *et al.*, 2005; RINTA-KANTO *et al.*, 2005; SAKER *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2005; OULLETTE *et al.*, 2006; BOARU *et al.*, 2006; FURUKAWA *et al.*, 2006; MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2006; JUNGBLUT &

NEILAN, 2006; RINTA-KANTO E WILHELM, 2006; RANTALA *et al.*, 2006; YOSHIDA *et al.*, 2007; SAKER *et al.*, 2007; GOBLER *et al.*, 2007; SHOBER *et al.*, 2007; HOTTO *et al.*, 2007; RANTALA *et al.*, 2008). No entanto, no Brasil temos alguns poucos trabalhos moleculares com cianobactérias tóxicas (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2001; BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2003; LORENZI, 2004; BRANT, 2006; ANJOS *et al.*, 2006; BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2008; LORENZI, 2008). Visto a importância destes estudos no ambiente, torna-se necessário aumentarmos os esforços para os estudos moleculares com cianobactérias em nosso país.

Ultimamente, os principais métodos utilizados para a identificação de cianobactérias produtoras de microcistina são a PCR convencional e a PCR em tempo real (q-PCR), e serão descritas a seguir. A metodologia de DNA-Chip utilizada por Rantala *et al.* (2008) também se mostrou bastante eficiente para estudos e diferenciação de genótipos tóxicos, porém não será detalhada e discutida neste trabalho.

### **1.9 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) – Análise qualitativa do ambiente**

A técnica molecular mais utilizada em estudos ambientais com cianobactérias tem sido a PCR (“Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase), que utiliza oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar o DNA de interesse. De acordo com Sivonen (2008) a PCR convencional é um método simples, rápido e está se tornando bastante viável para detectar cepas potencialmente produtoras de microcistina em amostras de água.

A PCR substituiu muitos métodos de hibridização e está sendo muito utilizada para detecção do potencial de produção de toxina das cianobactérias. A detecção e identificação podem ser realizadas na PCR com o uso de iniciadores gênero-específicos ou ainda iniciadores mais universais, para detectar vários gêneros simultaneamente, e ainda complementados por análises pós-PCR, como seqüenciamento ou RFLP, para diferenciar os produtos amplificados (RANTALA *et al.*, 2008). Hoje em dia, existem vários iniciadores disponíveis na literatura tendo como alvo seqüências específicas dos genes *mcy* (Tab. 1).

Ultimamente, o número de publicações utilizando métodos moleculares para estudo de cianobactérias aumentou muito (OULLETTE *et al.*, 2003), e tem proporcionado um grande avanço no estudo e entendimento destes organismos. Tillett *et al.* (2001) foram os pioneiros a



utilizar a seqüência de DNA que codifica para o domínio único de N-metiltransferase (NMT) presente no gene da enzima NRPS, *mcyA*, para desenhar oligonucleotídeos iniciadores que possibilitassem a identificação de *Microcystis* toxigênicas. Baker *et al.* (2002) estudaram a determinação direta de cianobactérias potencialmente tóxicas na represa de Malpas, na região de Nova Inglaterra, Austrália. Em seus estudos, Hisbergues *et al.* (2003) desenharam um par de oligonucleotídeo iniciador para uma região conservada do *mcyA*, que alcança vários gêneros diferentes de cianobactérias, principalmente *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*, conseguindo com isso identificar um número maior de organismos produtores de microcistina no ambiente, ao mesmo tempo.

A maioria dos oligonucleotídeos iniciadores existentes foram desenhados para detectar *Microcystis* produtoras de microcistina e a presença dos genes *mcyA* e *mcyB*. A detecção desses genes em cepas isoladas de *Microcystis* tem sido usada para explorar o quanto a presença desses genes pode estar correlacionada com a habilidade de produzir microcistina (TILLET *et al.*, 2001; VIA-ORDORIKA *et al.*, 2004; SAKER *et al.*, 2005a; YOSHIDA *et al.*, 2005), para revelar a ocorrência de cepas com e sem esses genes biossintéticos (WILSON *et al.*, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2005) ou para mostrar que a proporção de genótipos produtores de microcistina variam em diferentes morfoespécies de *Microcystis* (KURMAYER *et al.*, 2002; VIA-ODORIKA *et al.*, 2004).

Iniciadores com alvos em *mcyA* e *mcyB* foram utilizados para detectar *Microcystis* tóxicas em amostras ambientais, provenientes de tanques produtores de peixes (NONNEMAN e ZIMBA, 2002) ou amostras de lagos utilizados para recreação ou abastecimento público (BAKER *et al.*, 2002; PAN *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2005; OUELLETTE *et al.*, 2006).

Somente um par de iniciadores foi desenhado para detectar especificamente cepas de *Anabaena*. Indicadores para *mcyE* de *Anabaena* mostraram alta eficiência quando testados em cepas tóxicas e não tóxicas de *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix* e *Nostoc* (VAITOMAA *et al.*, 2003). O nível de especificidade observada habilita a identificação de potenciais produtores de microcistina, sem a necessidade do seqüenciamento dos produtos amplificados. Paralelamente, dois pares de iniciadores foram usados para determinar quais gêneros foram produtores de microcistina no lago Agawam (New York, US) (GOBLER *et al.*, 2007). Iniciadores específicos para *Anabaena* e *Microcystis* desenhados por Vaitomaa *et al.* (2003) e específico para *Planktothrix* para o gene *mcyE* desenhados por Rantala *et al.* (2008), foram usados para confirmar *Microcystis* como sendo dominante na produção de microcistina em amostras do lago Ontario (New York, US) (HOTTO *et al.*, 2007).

Iniciadores desenhados para detectar cepas de *Planktothrix* produtoras de microcistina foram usados para determinar o quão abundante genótipos inativos (que estão presentes, mas não estão sendo expressos) estão entre cepas de *P. agardhii* e *P. rubescens*, e em populações de *Planktothrix* nos lagos Irrsee e Mondsee, na Áustria (KURMAYER *et al.*, 2004). Também trabalhando com cepas de *Planktothrix*, Mbedi *et al.* (2005) avaliaram quatro genes *mcy* e quatro regiões intergênicas para uso como marcadores moleculares para identificação destas cepas. Uma detecção específica foi observada em cepas isoladas e amostras de lagos com iniciadores *mcyE*, que foram os melhores marcadores moleculares para *Planktothrix* produtoras de microcistina.

Poucos pares de iniciadores têm sido desenhados para detectar simultaneamente genes biossintéticos, envolvidos na produção de microcistina, de diferentes gêneros de cianobactéria. No entanto, resultados conflitantes obtidos utilizando-se iniciadores para detectar *mcyB* e *mcyD*, específicos para *Microcystis*, no lago Oneida (New York, US) (HOTTO *et al.*, 2005) e a falta de detecção destes mesmos genes em amostras do lago Erie (New York, US), que continham microcistina (RINTA-KANTO *et al.*, 2005), sugerem a necessidade de utilização de oligonucleotídeos mais universais, que abranjam um maior número de gêneros ao mesmo tempo. Em ambos os casos, a análise microscópica revelou a presença, nos lagos estudados, de outros gêneros (*Anabaena* e *Planktothrix*) potencialmente capazes de produzir microcistina e isso poderia explicar os problemas obtidos.

O uso de iniciadores universais é extremamente importante para estudos em amostras ambientais, que podem conter vários gêneros produtores de microcistina. Um par de iniciador desenhado por Jungblut e Neilan (2006) para *mcyE* por exemplo, é capaz de detectar cepas produtoras de hepatotoxina nos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Nodularia*. No entanto, se for necessário a identificação final dos organismos produtores de microcistina na amostra, clonagem e seqüenciamento do produto de PCR são requeridos juntamente com outras técnicas moleculares.

**Tabela 1** – Principais marcadores moleculares descritos na literatura, para identificação e estudo das cianobactérias produtoras de microcistina.

<b>Organismo alvo</b>	<b>Genes</b>	<b>Referência</b>
<i>Microcystis</i>	<i>mcyB</i>	Neilan <i>et al.</i> , 1999
<i>Microcystis</i>	<i>mcyA</i> e <i>mcyB</i>	Nishizawa <i>et al.</i> , 1999
<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> ( <i>Planktothrix</i> )	<i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> , <i>mcyF</i> e <i>mcyG</i>	Nishizawa <i>et al.</i> , 2000
<i>Microcystis</i>	<i>mcyA</i>	Tillett <i>et al.</i> , 2001
<i>Microcystis</i>	<i>mcyB</i>	Nonneman e Zimba, 2002
<i>Microcystis</i>	<i>mcyB</i>	Pan <i>et al.</i> , 2002
<i>Microcystis</i>	<i>mcyB</i>	Kurmayer <i>et al.</i> , 2002
<i>Microcystis</i>	<i>mcyA</i> e <i>mcyB</i>	Foulds <i>et al.</i> , 2002
<i>Microcystis</i>	<i>mcyABC</i>	Mikalsen <i>et al.</i> , 2003
<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> e <i>Planktothrix</i>	<i>mcyA</i>	Hisbergues <i>et al.</i> , 2003
<i>Microcystis</i>	<i>mcyB</i>	Kurmayer e Kutzenberger, 2003
<i>Anabaena</i> e <i>Microcystis</i>	<i>mcyE</i>	Vaitomaa <i>et al.</i> , 2003
<i>Planktothrix</i>	<i>mcyA</i>	Kurmayer <i>et al.</i> , 2004
<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nodularia</i>	<i>mcyD</i> e <i>mcyE</i>	Rantala <i>et al.</i> , 2004
<i>Microcystis</i>	<i>mcyA</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 2005
<i>Microcystis</i>	<i>mcyC</i> , <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> , <i>mcyG</i>	Ouahid <i>et al.</i> , 2005
<i>Planktothrix</i>	<i>mcyT</i> , <i>mcyE</i> , <i>mcyA</i> , <i>mcyB</i> e <i>mcyTD</i> , <i>mcyEG</i> , <i>mcyHA</i> e <i>mcyCJ</i>	Mbedi <i>et al.</i> , 2005
<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Phormidium</i>	<i>mcyE/ndaF</i>	Jungblut e Neilan, 2006
<i>Microcystis</i>	<i>mcyA</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 2007

Hisbergues *et al.* (2003) determinaram a origem do produto de PCR do iniciador universal *mcyA*, usando a técnica de RFLP, que diferenciou os produtores de microcistina em *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix*. A PCR do *mcyA* e subsequente seqüenciamento ou análise por RFLP tem sido usada para identificar o responsável pela produção de microcistina em amostras de lagos e rios (HISBERGUES *et al.*, 2003; RINTA-KANTO e WILHELM, 2006; HOTTO *et al.*, 2007; SAKER *et al.*, 2007a). Além disso, seqüenciamento dos produtos dos iniciadores gerais *mcyA* (HISBERGUES *et al.*, 2003) e PCR do *mcyE* (JUNGLET e NEILAN, 2006) foram usados para detectar e identificar *Microcystis* tóxicas em vários suplementos alimentares (SAKER *et al.*, 2005b; 2007b). Entretanto, se a identificação de organismos produtores não é necessária, o uso de iniciadores universais é um método simples e sensível para o monitoramento de água, para a presença de organismos potencialmente produtores de microcistina (ANJOS *et al.*, 2006; MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2006).

A PCR convencional pode ser usada principalmente como uma ferramenta para análise qualitativa do ambiente. Porém, o método não permite uma apuração quantitativa da comunidade de cianobactérias, especialmente em locais com baixa quantidade celular (FOLDS *et al.*, 2002). Porém, existem muitas variações da técnica de PCR, como a PCR em tempo real, por exemplo, que além de amplificar o DNA alvo também quantifica o DNA inicial presente na amostra, nos auxiliando em estudos mais complexos.

### **1.10 PCR em tempo Real – Análise quantitativa do ambiente**

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica relativamente recente com a qual é possível obter uma quantificação relativa ou absoluta de fragmentos gênicos específicos das amostras a serem analisadas. A quantificação absoluta é uma análise caracterizada pela determinação do número exato de moléculas de DNA. Essa quantificação será obtida através da comparação com uma curva padrão, com valores de DNA (ng ou moléculas) pré-estabelecidos. É uma análise que permite uma fácil compreensão dos dados, porém o estabelecimento de uma curva padrão é mais trabalhoso. Já a quantificação relativa é uma abordagem mais simples, e indica variações quantitativas de uma seqüência alvo quando comparada a um gene de referência. É a mais utilizada para estudos de expressão gênica (mRNA).

O sistema de PCR em tempo real é baseado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, e a taxa de acumulação exponencial do “amplicon” é monitorada pela emissão de um sinal de fluorescência gerado durante o processo de amplificação. O ciclo inicial (Ct) é o número de ciclos da PCR em que o nível de fluorescência se torna perceptível, indicando o início do acúmulo exponencial do DNA, baseado em uma curva padrão (a partir de amostras com concentrações conhecidas). Duas grandes metodologias, SYBR Green e Taq-Man estão disponíveis e são as mais utilizadas para estudos com cianobactéria. Ambos os métodos quantificam o número de cópias de gene da amostra por comparação deste Ct com diluições de uma curva padrão com quantidades de DNA conhecidas.

SYBR Green I é um corante que se liga a fita dupla de DNA, emitindo uma fluorescência muito maior, cerca de 1000 vezes, do que quando livre na solução. Portanto, quanto maior a quantidade de DNA de fita dupla presente na reação maior o sinal de fluorescência do SYBR Green I. Assim, a quantidade de DNA presente no tubo pode ser medida. Para auxiliar na especificidade deste corante, já que se liga a qualquer fita dupla de DNA, a curva de dissociação do produto amplificado pode ser analisada para determinar o ponto de “melting”, que é a temperatura capaz de separar totalmente a fita dupla de DNA. Todos os produtos amplificados quando possuírem o mesmo tamanho e conteúdo de pares de base terão um único ponto de “melting” (VALASEK & REPA, 2005).

Já a metodologia Taq-Man PCR ou Ensaio da Taq Nuclease (TNA) utiliza um oligonucleotídeo com seqüência específica marcada com fluorocromo tanto na região 5' quanto na região 3', para quantificar o nível de DNA molde inicialmente presente na amostra (Fig. 6B). A taxa de acumulação exponencial do produto amplificado é monitorada pela quebra do fluorocromo gerando fluorescência, durante o processo de amplificação (PCR) (JUNG *et al.*, 2000). Recentemente, essa metodologia foi introduzida para quantificar genótipos de cianobactérias produtoras de microcistina no ambiente (BECKER *et al.* 2000; FOULDS *et al.*, 2002).

Diferenças na eficiência de amplificação entre a curva padrão e as amostras, que podem conter inibidores de PCR, podem comprometer a qualidade da amplificação. Também, a sensibilidade da detecção pode ser influenciada pelo tamanho do produto da PCR, já que quanto menor o produto gerado (em tamanhos de pares de base) maior a eficiência da reação (RANTALA *et al.*, 2008).

A principal vantagem da q-PCR com relação a PCR convencional é sua capacidade de quantificação do número de cópias do gene alvo. Aplicações rápidas e sensíveis de q-PCR detectando genes biossintéticos de microcistina tem sido desenvolvido para *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (RANTALA, 2007). No entanto, atualmente somente poucas aplicações deste método em estudos ambientais para detecção de cianobactérias produtoras de microcistina são encontrados na literatura (FOULDS *et al.*, 2002; KURMAYER & KUTZENBERGER, 2003; VAITOMAA *et al.*, 2003; RINTA-KANTO *et al.*, 2005; FURUKAWA *et al.*, 2006; YOSHIDA *et al.*, 2007; SHOBER *et al.*, 2007; RANTALA *et al.*, 2008; LORENZI, 2008).

Uma análise quantitativa para caracterização da composição genotípica em populações no ambiente foi desenvolvida por Kurmayer *et al.* (2003). Para a quantificação da proporção do genótipo produtor de microcistina, esta técnica incluiu diluições em série do DNA extraído de amostras do ambiente e cada passo da diluição foi analisado por q-PCR, para quantificação do gene *mcyB*.

Ensaio com SYBR Green foram utilizados para determinar variações sazonais na proporção do genótipo *mcyA* de *Microcystis* em lagos do Japão (YOSHIDA *et al.*, 2007). Também utilizando o método SYBER Green, o número de cópias e proporções relativas de ambos os gêneros produtores de microcistina, *Anabaena* e *Microcystis*, em dois lagos da Finlândia, foram estimados com iniciadores gêneros específicos *mcyE* (VAITOMAA *et al.*, 2003).

Já ensaios com Taq-man foram utilizados para estimar variações na proporção de genótipos de *Microcystis* contendo *mcyB* de um total de cepas do gênero *Microcystis*, presentes em lagos da Alemanha (KURMAYER & KUTZENBERGER, 2003). Utilizando este mesma idéia, Foulds *et al.* (2002) diferenciaram e quantificaram cepas de *Microcystis* tóxicas e não tóxicas, utilizando o gene *mcyA*, em amostras ambientais. A habilidade deste método para realizar estimativas quantitativas foi ainda confirmada pelos resultados altamente consistentes obtidos em três diferentes laboratórios, usando diferentes instrumentos de detecção (diferentes máquinas de PCR em tempo real) (SCHOBER *et al.*, 2007).

No Brasil, um ensaio utilizando um método quantitativo diferente dos citados anteriormente (LUX-Ligth Upon Extension) foi realizado por Lorenzi (2008). Este método é bem parecido com o da Taq-Man, porém os oligonucleotídeos contém apenas uma marcação (“reporter”). Em seus estudos, Lorenzi (2008) desenvolveu dois conjuntos de oligonucleotídeos LUX para amplificar simultaneamente por q-PCR fragmentos da região

cpc-IGS (PC) e do *mcyA* em cianobactérias do gênero *Microcystis*. Também neste estudo foi avaliada a viabilidade econômica desta metodologia.

Contudo, apesar dos avanços e aprimoramentos desta técnica para estudos quantitativos ambientais, vemos que no Brasil e também no mundo ainda poucos pesquisadores fazem uso desta técnica para estudos ambientais. Essa metodologia poderá auxiliar na compreensão do comportamento das cianobactérias tóxicas no ambiente aquático e também ajudar no seu monitoramento e controle por companhias de saneamento.

## **2.0 OBJETIVOS:**

### **2.1 Objetivo Geral**

Utilizar métodos moleculares, juntamente com métodos tradicionais, para estudar o comportamento e distribuição de cianobactérias produtoras de microcistina no ambiente natural e ainda analisar a influência de fatores ambientais no aparecimento da toxidez no ambiente. Além disso, o uso destas técnicas também será avaliado para sua aplicação no monitoramento ambiental.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Estudar a variação espacial e temporal de cianobactérias produtoras de microcistina e a influência de fatores ambientais nesta distribuição;

Verificar a presença qualitativa e quantitativamente de genótipos *mcyD*, através de técnicas de PCR;

Avaliar e comparar os métodos de quantificação de cianobactérias tóxicas através das análises de microscopia e moleculares;

Avaliar a utilização das técnicas utilizadas no monitoramento ambiental.



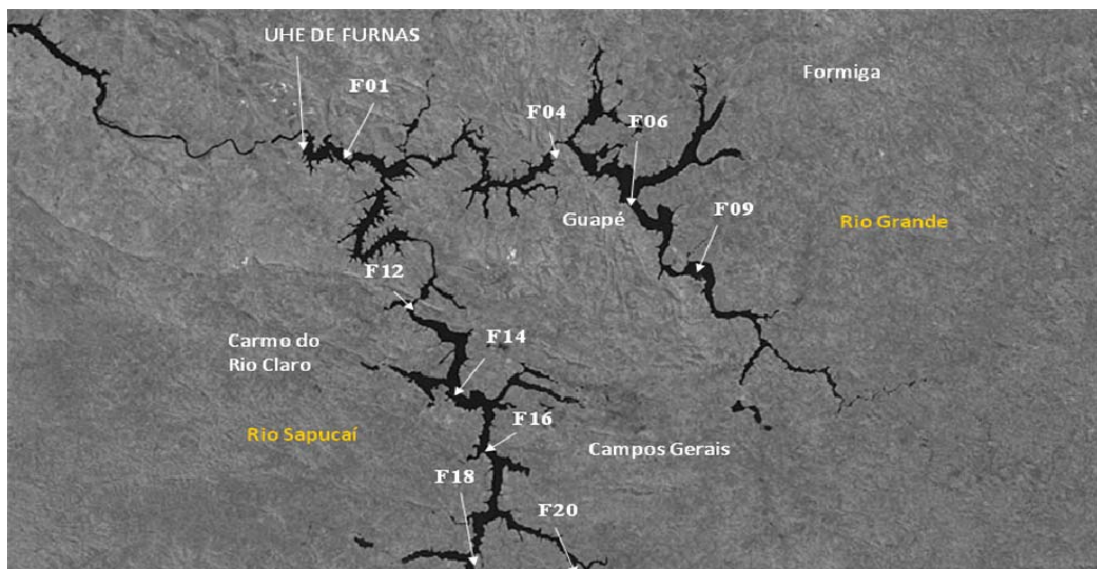
### 3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho fez parte de um projeto realizado pela equipe do Laboratório de Ficologia do ICB - UFMG em colaboração com Furnas Centrais Elétricas SA. As coletas e as análises físico-químicas e biológicas foram, portanto realizadas por diversos membros da equipe e os dados obtidos fazem parte de um banco de dados do laboratório. As análises moleculares aqui apresentadas, porém, foram exclusivas deste trabalho.

#### 3.1 Área de Estudo

As coletas de água foram realizadas no reservatório de Furnas (MG), administrado por Furnas Centrais Elétricas S.A, e que se destina à geração de energia elétrica. O reservatório e os pontos amostrados estão representados na Fig. 6.

O reservatório de Furnas situa-se no alto Rio Grande e com seus 1.440 km<sup>2</sup> de área inundada, trata-se do maior reservatório da região sudeste do Brasil. É formado por dois grandes "braços" que correspondem ao Rio Grande e ao Rio Sapucaí, medindo cada um deles aproximadamente 250 km de extensão. A profundidade máxima na altura da barragem é de 90 metros e a profundidade média é de 13 metros. O barramento se dá alguns quilômetros a jusante da junção dos braços do Rio Grande e do Rio Sapucaí, entre os municípios de São José da Barra e São João Batista.



**Fig. 6** – Imagem de Satélite demonstrando o Reservatório de Furnas e os pontos a serem estudados (F01, F04, F06, F09, F12, F14, F16, F18, F20 (www.flashearth.com))

### 3.2 Coleta de água

Foram realizadas dez coletas de amostras de água em nove pontos distintos no reservatório de Furnas, referentes a diferentes estações do ano, nos anos de 2006, 2007 e 2008 (Tab. 2). Foram avaliados diretamente no campo: zona eufótica, através da medida de transparência da água obtida com o disco de Secchi, e posteriormente multiplicando este valor por 2,5 para obtenção da ZE; e temperatura da água, utilizando-se uma sonda multiparâmetros (YSI 556), realizadas em intervalos de 0,5 m em 0,5m até a profundidade de 2 m, e com intervalos de 1m até o fundo.

Foram coletados 20L de água, na profundidade de Secchi com auxílio de uma garrafa coletora de Van Dorn, para obtenção de amostras para as análises de nutrientes, fitoplâncton, clorofila, sólidos, DNA e toxinas. Em caso de estratificação térmica foi feita uma coleta no hipolímnio, a 2 metros do fundo.

As amostras para nutrientes foram colocadas em garrafas de 500 mL e congeladas até o momento da análise e as de fitoplâncton foram colocadas em garrafas de 250 mL e fixadas com lugol acético para posterior análise no laboratório. Para as análises moleculares, clorofila e sólidos em suspensão, as amostras foram filtradas em duplicata (em média 2L de água para DNA e toxinas e 1L para clorofila e sólidos) em filtros de membrana de fibra de vidro (GF microfiltro 47 mm) e estocadas no freezer, na temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento das análises.

Amostras de água foram também coletadas com o auxílio de uma rede de plâncton, com malha de 30  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro, através de um arraste vertical e horizontal. Deste material concentrado pequenas alíquotas foram colocadas em meio de cultura, para posterior isolamento e cultivo de cianobactérias no laboratório. O restante deste material concentrado foi liofilizado e conservado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises de toxinas.

As análises de nutrientes foram realizadas por métodos espectrofotométricos, como descrito em APHA (1995), pela equipe técnica do laboratório de química da Estação de Piscicultura e Hidrobiologia de Furnas.

**Tabela 2** - Dados referentes às datas de coletas.

Coleta	Data	Ano
1	12 a 15 de Setembro	2006
2	17 a 20 de Dezembro	2006
3	8 a 10 de Março	2007
4	24 a 27 de Abril	2007
5	27 a 30 de Junho	2007
6	02 a 04 de Setembro	2007
7	17 a 19 de Outubro	2007
8	07 a 09 de Dezembro	2007
9	21 a 23 de Fevereiro	2008
10	24 a 26 de Abril	2008

### 3.3 Análises biológicas

#### *Contagem e cultivo*

As contagens de fitoplâncton foram realizadas em câmara de sedimentação no microscópio invertido Olympus IX50, no aumento de 1000x através da técnica de Uthermöhl (1958), com o objetivo de se determinar a quantidade de células de cianobactérias presentes no ambiente e a diversidade de espécies presentes na comunidade fitoplanctônica. Foram contados até 100 indivíduos da espécie dominante ou sub-dominante, permitindo trabalhar com intervalos de confiança de +/- 20% da média, a um nível de significância de 95% (LUND *et al.*, 1958).

### ***Análise de clorofila a***

A análise de clorofila foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Nush (1980). A extração da clorofila presente no filtro foi realizada em local com baixa luminosidade utilizando-se etanol 90%, a 80°C em banho maria durante 10 minutos. Após este procedimento, os tubos envoltos por papel alumínio foram guardados na geladeira por 24 horas para completar o processo de extração. A quantificação de clorofila *a* foi feita por espectrofotometria, no comprimento de onda de 665nm com leituras para correção da turbidez no comprimento de 750nm.

### ***Análise da Toxina***

As análises de microcistina foram realizadas pelo método ELISA (Enzyme Linked Immuno-Assay), através de um kit (Abraxis, ADDA Elisa) utilizado para quantificação da toxina. A metodologia seguiu as recomendações do fabricante. Os anticorpos específicos fixados nas paredes de placas com vários poços (multwells) se ligam a microcistina presente na amostra, e após sucessivas etapas ocorre uma reação colorida e a concentração de microcistina é inversamente proporcional à intensidade da cor desenvolvida na reação com o substrato. A leitura das amostras foi realizada em um leitor ELISA, e os resultados obtidos foram comparados com as análises moleculares.

### 3.4 Análise Molecular

#### → Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras contidas nos filtros, foi utilizado o procedimento de extração com fenol/ clorofórmio, descrito por Kurmayer *et al.* (2003), com algumas modificações. Neste procedimento foi utilizada uma solução tampão contendo sacarose, proteinase K e lisozima na etapa de lise celular, e fenol clorofórmio álcool isoamílico na etapa de extração do DNA. Para ressuspensão e limpeza do DNA foram utilizados etanol absoluto e etanol 70%, respectivamente.

O extrato de DNA foi quantificado através de espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280nm que correspondem a DNA e proteína respectivamente. Os resultados foram expressos em ng/ $\mu$ L e a razão DNA/proteína foi utilizada para avaliação da qualidade do DNA.

Para a visualização do DNA extraído, 5  $\mu$ L deste DNA foram analisados em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo. O gel foi submetido a eletroforese (100V) utilizando-se tampão TBE 0,5X (0,089M TRIS-borato, 0,089M ácido bórico, 0,002M EDTA) e o DNA avaliado quanto a sua qualidade e quantidade, através da fotodocumentação do gel realizada em um aparelho Muti doc-it (UVP) .

#### → PCR (Reação em cadeia da Polimerase) Qualitativa

##### **Iniciadores para a PCR qualitativa**

Para verificação da presença de DNA de cianobactérias nas amostras, foi utilizado um iniciador para a região intergênica do operon da ficocianina, conhecido como PC-IGS (cpcBA-IGS), descrito por Neilan *et al.* (1995). Para o estudo da presença dos genes relacionados com a produção da microcistina, foram desenhados três pares de iniciadores para diferentes regiões do *mcy* (Tab. 3).

O desenho dos iniciadores foi realizado com base nas seqüências disponíveis no GenBank para três gêneros de cianobactérias: *Planktothrix* (AJ441056), *Anabaena* (AJ536156) e *Microcystis* (AF183408), utilizando-se o programa de agrupamento de seqüências “*Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*”. Este programa nos permitiu fazer o alinhamento destas três cepas de cianobactérias e buscar regiões de alta similaridade para a construção dos iniciadores. Posteriormente, foi verificado juntamente ao banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), a sensibilidade destes iniciadores ao grupo das cianobactérias.

Para verificação do funcionamento e sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores, tanto o da literatura (PC-IGS) quanto os desenhados no laboratório (*mcy*), foram realizados vários testes com culturas de cianobactérias provenientes do banco de culturas do laboratório de Ficologia e também com amostras ambientais.

**Tabela 3.** Iniciadores para ficocianina (PC) e microcistina (*mcy*) (desenhados neste trabalho) que serão utilizados para teste e avaliação neste estudo. A substituição da base por X foi feita porque estes iniciadores ainda não foram publicados.

PC-IGS F	GGCTGCTTGTTTACGCGACA	<i>cpcBA</i> (685pb) Neilan <i>et al.</i> 1995
PC-IGS R	CCAGTACCACCAGCAACTAA	
<i>mcyD</i> F	GGAXXXGAAAXXXATGAXXTAC	<i>mcyD</i> (370pb)
<i>mcyD</i> R	TATCCCCAAXXXGCCATAATTT	
<i>mcyE</i> F	GGCAAAXXXXXXXXXXXXXXTGGCTCAATT	<i>mcyE</i> (550pb)
<i>mcyE</i> R	GTXXXXTTTTTTGGGCATXXXXXXXXTTT	
<i>mcyG</i> F	TGGGXXXXTTTAGAAAACGXXXX	<i>mcyG</i> (390pb)
<i>mcyG</i> R	CXXXXXXTTGGTTAXXXATATCAAGAAXX	

Foram realizados testes para os iniciadores com algumas cepas do banco de culturas do laboratório de Ficologia que compreendem os gêneros *Microcystis*, *Radiocystis*, *Sphaerocavum*, *Anabaena* e *Planktothrix*. Depois destes testes, *mcyD* foi o iniciador escolhido

devido a sua alta sensibilidade e eficácia, já que gerou somente uma banda de amplificação e também conseguiu amplificar todas as amostras testadas. Este iniciador foi utilizado para avaliação de todas as amostras coletadas no reservatório de Furnas.

Posteriormente à escolha dos iniciadores, foram realizados PCRs de todas as amostras ambientais. Para cada reação foram utilizados 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM do Mix de DNTP, 1.0 U de Taq polimerase, 0.5 µL (10 pmol/µL) de cada iniciador. Diluições do DNA ambiental (20X) foram utilizadas para PCR das amostras ambientais com o objetivo de diminuir problemas relacionados a inibidores de PCR presentes na água.

O termociclador My Cycler (Biorad) foi utilizado com as seguintes condições: 94°C por 3 min, 35 vezes de 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg (*mcyD*) e 50°C por 30 seg (gene PC), 72°C por 40 seg, e extensão final de 72°C por 2 min. A verificação do tamanho dos produtos resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho molecular de 100pb (Fermentas), após submissão a corrida eletroforética em tampão (TBE 0,5%) em gel de agarose 1,2%. A fotodocumentação do gel foi realizada na máquina Multi Doc-It UVP, através de software próprio do aparelho.

### → PCR quantitativa (q-PCR)

O método escolhido para a PCR em tempo real neste trabalho foi a quantificação absoluta, que utiliza uma curva de calibração ou curva padrão que contém quantidades de DNAs conhecidos e que servirão de base para o cálculo da quantidade de DNA das amostras a serem estudadas.

A curva padrão foi baseada na predeterminação de concentrações celulares da cultura *Radiocystis fernandoi* (cepa 75, isolada do reservatório de Furnas e mantida no banco de cultura do laboratório de Ficologia da UFMG), com toxicidade conhecida. Foi realizada extração de DNA desta cultura e posteriormente várias diluições com este DNA na amplitude de 10X (4 diluições). A curva padrão foi então estabelecida pela relação da concentração de DNA conhecida (concentração celular) com o valor do Ct das amostras diluídas. O número de células de cianobactérias produtoras de microcistina nas amostras foi determinado pelo Ct obtido com equações de regressão a partir da curva padrão.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado utilizando-se o fluorocromo SYBR green, presente no Kit Power SYBR Green I (Applied Biosystems) que contém também os reagentes MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerase, DNTPs e referência passiva-ROX. Foram utilizados 5µL do reagente Power Sybr Green, 0,3 µL (10pmol/µL) de cada primer,, 1 µL de DNA diluído (20X) e água miliQ estéril, ajustando-se para um volume final de 10 µL. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata.

Para todas as amostras estudadas, tanto de cultura quanto ambientais, foi realizado uma curva de dissociação para verificarmos a existência de possíveis amplificados inespecíficos que pudessem atrapalhar nossas análises. Para determinar a temperatura de desnaturação (“Temperature Melting” - TM) dos produtos amplificados das amostras e dos padrões, uma análise de fluorescência da curva de dissociação foi realizada depois da PCR pelo aumento gradual da temperatura de 70°C a 95°C, a uma taxa de 0,1°C. s<sup>-1</sup>. A Intensidade da fluorescência encontrada foi coletada continuamente e convertida em picos (TM) pelo software utilizado.

Para a q-PCR foi utilizado a máquina StepOne (Applied Biosystems) e as condições envolvidas no ciclo desta PCR seguiram as orientações do fabricante. Para análises dos dados foi utilizado o programa StepOne Software, version 2.0.

### **Iniciadores para q-PCR**

Para a q-PCR (PCR quantitativa) foi necessário realizar a busca de novos iniciadores, com tamanhos reduzidos, pois isso permite uma quantificação mais eficiente. O desenho dos novos iniciadores foi realizado com o auxílio de seqüências disponíveis no GenBank repetindo-se o procedimento descrito anteriormente para a PCR convencional.

Para o iniciador do gene *mcyD*, foram alinhadas seqüências de diferentes gêneros de cianobactérias (*Planktothrix*, *Microcystis* e *Anabaena*), as mesmas seqüências utilizadas anteriormente. Para o iniciador para o gene PC (*cpcB*) foram alinhadas seqüências de vários importantes gêneros de cianobactérias ocorrentes no Brasil: *Microcystis* (AM778951), *Anabaena* (ATCC 29413), *Nostoc* (NC\_003272), *Planktothrix* (AF212923), *Aphanocapsa* (DQ010411), *Lyngbya* (AJ401187) e *Synechococcus* (CC9605). Os iniciadores desenhados geraram fragmentos de tamanhos de 103pb para *mcyD* e 73pb para PC (Tab. 4).



**Tabela 4.** Iniciadores para ficocianina (PC) e microcistina (mcy) (desenhados neste trabalho) que foram nas análises de Q-PCR. A substituição da base por X foi feita pois estes iniciadores ainda não foram publicados.

PC-B F	GGXXXCACCXCCGGCGXXXG	<i>cpcB</i> (73pb)
PC-B R	TXXXXCGATCGCGXXGCTGXXXC	
<i>mcyDQ</i> F	GCAXXXXXXXXXAAGAAAXXXCTCC	<i>mcyD</i> (103pb)
<i>mcyDQ</i> R	TATTCCTCCCAAXXXGCCATAATT	

### 3.5 Análises Estatísticas

Todos os dados (análises físico-químicas e biológicas) foram correlacionados com a quantidade de genes *mcyD* no ambiente. Foi realizada a análise de correlação de Spearman já que os dados não apresentaram normalidade. Para avaliação da significância dos dados foi considerado  $\alpha < 0,05$ .

## 4.0 RESULTADOS

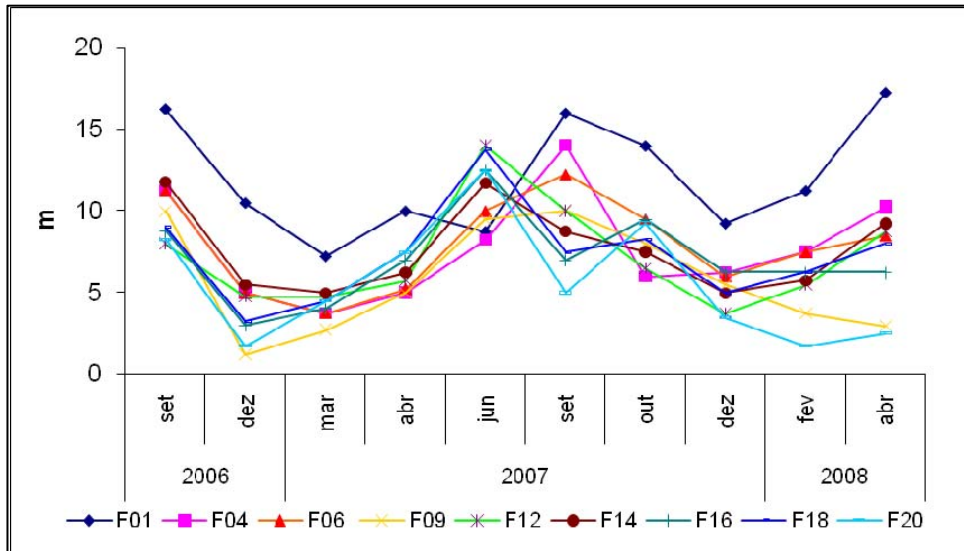
### *4.1 Avaliação físico-química da água*

A transparência da água, medida com disco de secchi, variou bastante ao longo do período estudado e entre os locais de coleta (Fig. 7), tendo valores maiores no período de seca e menores no período de chuva. O braço do Rio Grande apresentou valores médios, entre os pontos amostrados, variando de 4 m em março de 2007 e 13 m em setembro de 2007. O braço do Sapucaí apresentou valores médios levemente menores, variando de 3,7 m em dezembro de 2006 a 12,9 m em junho de 2007. O ponto de amostragem F01 teve sempre valores de transparência maiores e os pontos F09 e F20 foram sempre caracterizados pelos menores valores.

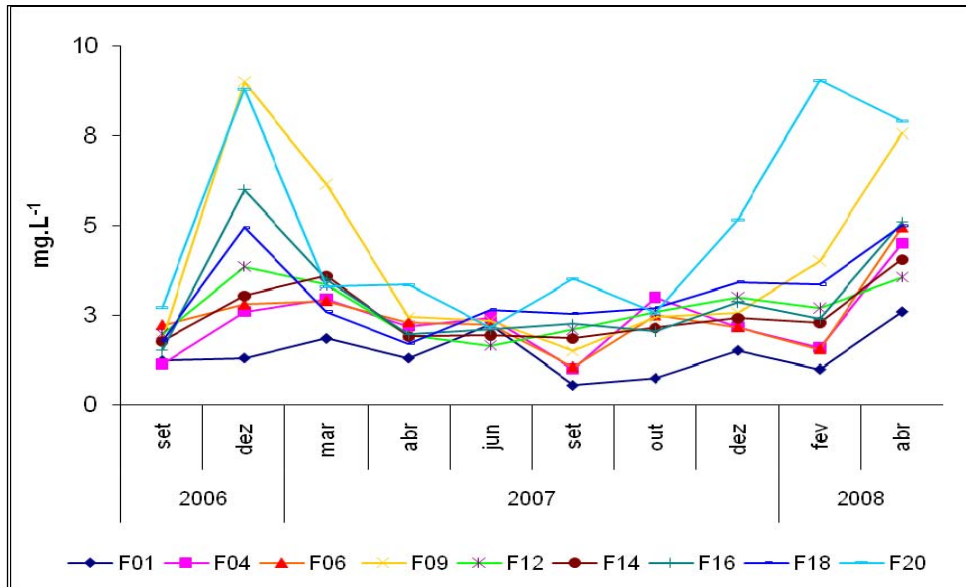
As concentrações de sólidos totais em suspensão foram maiores em dezembro de 2006, chegando a  $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$  no ponto F09 e  $8,8 \text{ mg.L}^{-1}$  no ponto F20, e valores um pouco menores no período de seca de 2007, variando de 1,05 a  $1,65 \text{ mg.L}^{-1}$ . As maiores concentrações de sólidos em suspensão foram encontradas nos pontos F09 e F20, que estão localizados mais próximos a entrada de rios. Também, os pontos localizados no Rio Sapucaí de uma maneira geral, apresentaram concentrações mais altas de sólidos totais, como pode ser observado na Fig. 8.

A temperatura na profundidade do disco de secchi variou pouco entre os diversos pontos coletados e também entre as várias estações do ano. Sazonalmente, variou entre uma mínima de  $20^{\circ}\text{C}$  nos períodos mais frios e uma temperatura máxima de  $27^{\circ}\text{C}$  no verão (Fig. 9).

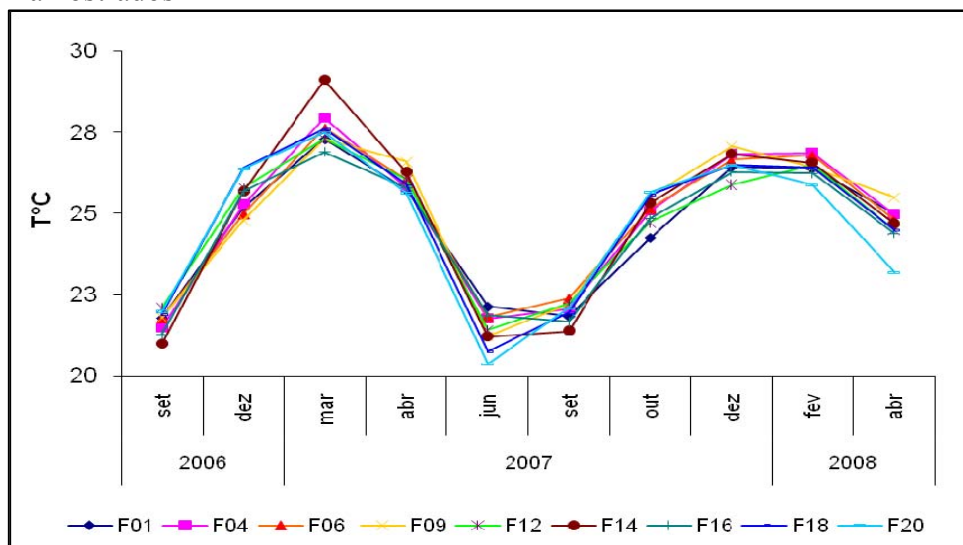
Os resultados das análises de nutrientes também mostraram a existência de uma tendência sazonal no reservatório de Furnas. Durante os períodos de seca (principalmente os meses de abril, junho e setembro de 2007) as concentrações de nitrogênio e fósforo, nutrientes extremamente importantes para o fitoplâncton, foram menores (Fig. 10).



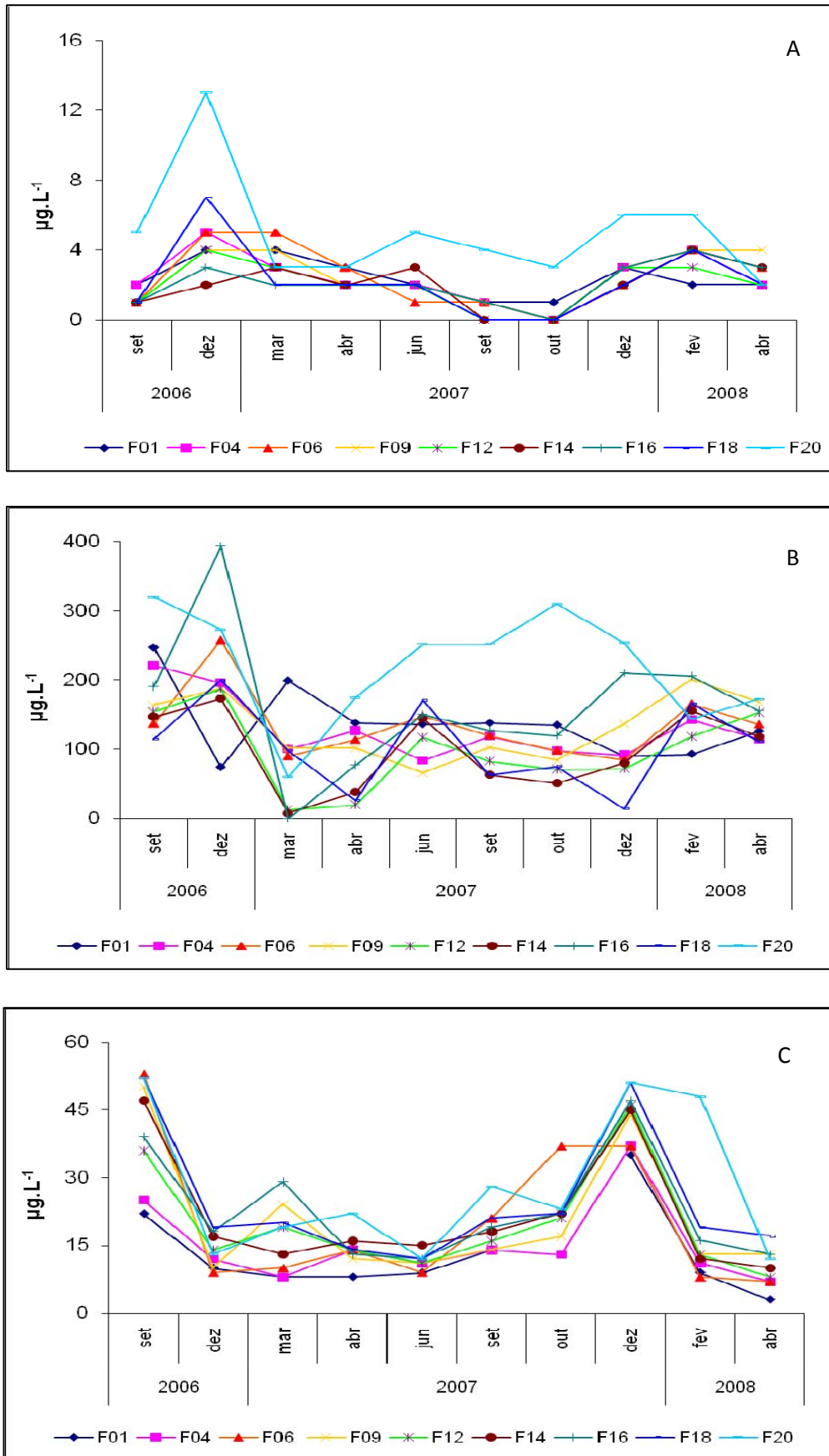
**Fig. 7** - Medida da Zona Eufótica no reservatório da UHE de Furnas nos períodos amostrados.



**Fig. 8** - Sólidos Totais no reservatório da UHE de Furnas nos períodos amostrados



**Fig. 9** - Medida da temperatura no reservatório da UHE de Furnas nos períodos amostrados.

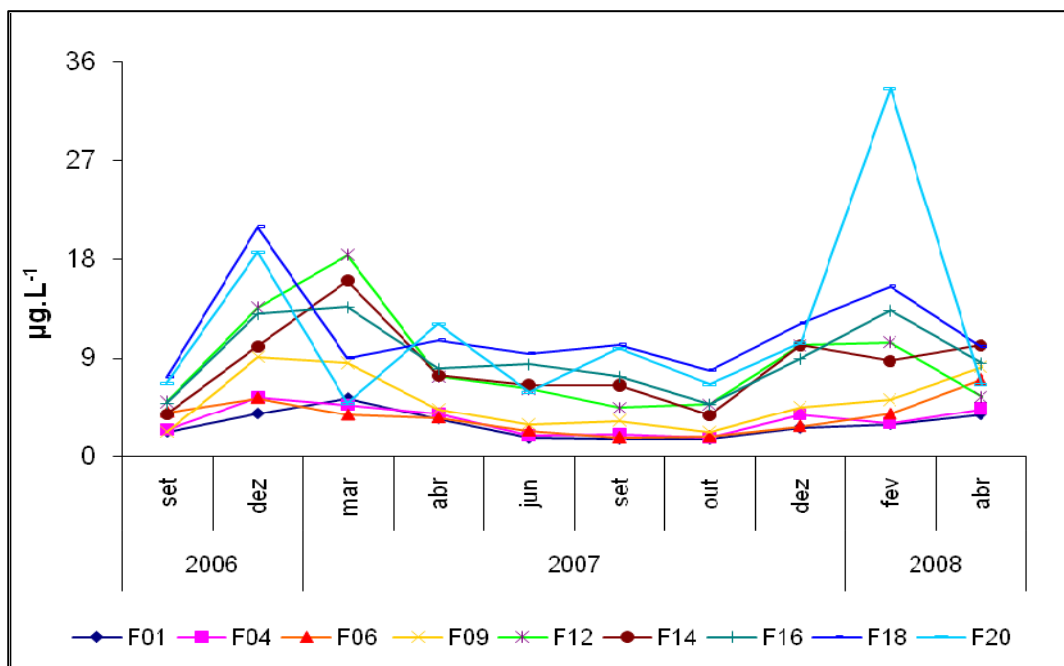


**Fig. 10** - Nutrientes no reservatório da UHE de Furnas nos períodos amostrados. A – Nitrito, B – Nitrato e C – Fósforo Total.

## 4.2 Variáveis Biológicas

### Clorofila a

Os resultados das análises de clorofila estão representados na Fig. 11. Esta variável também mostrou a existência de diferenças sazonais no reservatório, sendo que as maiores concentrações de clorofila foram registradas nas estações mais chuvosas do ano, chegando aos valores máximos de  $20,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $33,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  nos meses de Dezembro de 2006 e Fevereiro de 2008, respectivamente. Os pontos de coleta localizados no Rio Sapucaí apresentaram maiores concentrações de clorofila, com valores médios variando de  $5,56$  a  $16,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Fig. 11** - Clorofila no reservatório da UHE de Furnas nos períodos amostrados.

### ***Cianobactéria total - Contagem Microscópico***

A concentração celular de cianobactérias no reservatório não revelou uma tendência sazonal clara de aumento ou diminuição ao longo do período estudado, apesar de observarmos uma menor concentração média de células em setembro de 2006 (5.948 cel.mL<sup>-1</sup>) e em Junho de 2007 (3.559 cel.mL<sup>-1</sup>), períodos mais secos e frios. Os meses de Dezembro de 2007 e Fevereiro e Abril de 2008, períodos mais chuvosos, apresentaram os maiores valores médios de abundância de células, sendo estes 68.480, 152.340 e 36.862 cel.mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 12A).

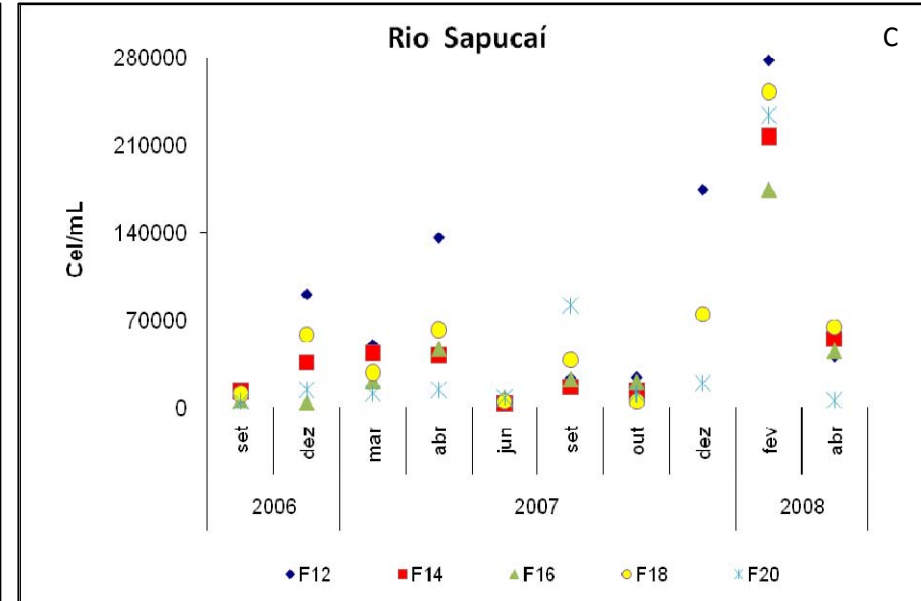
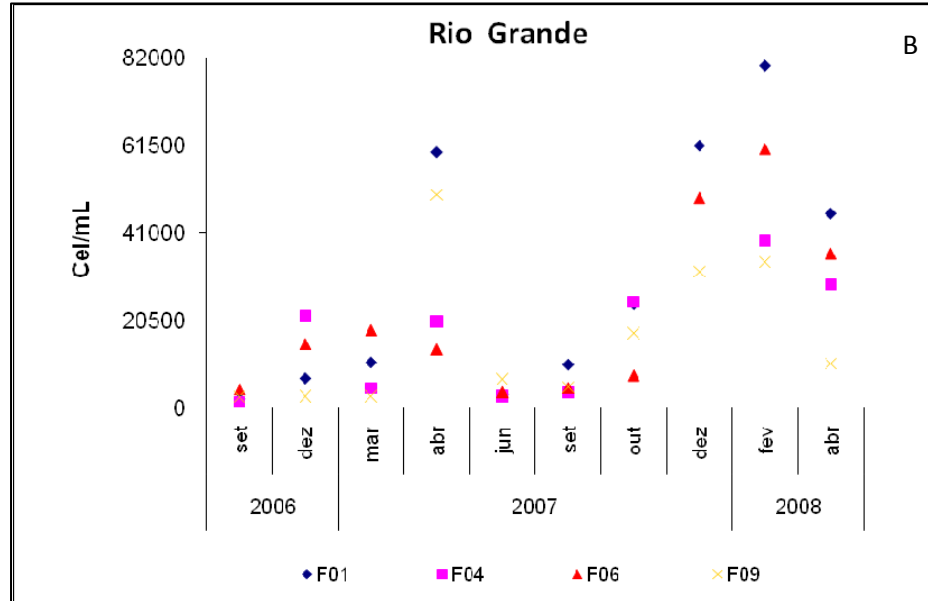
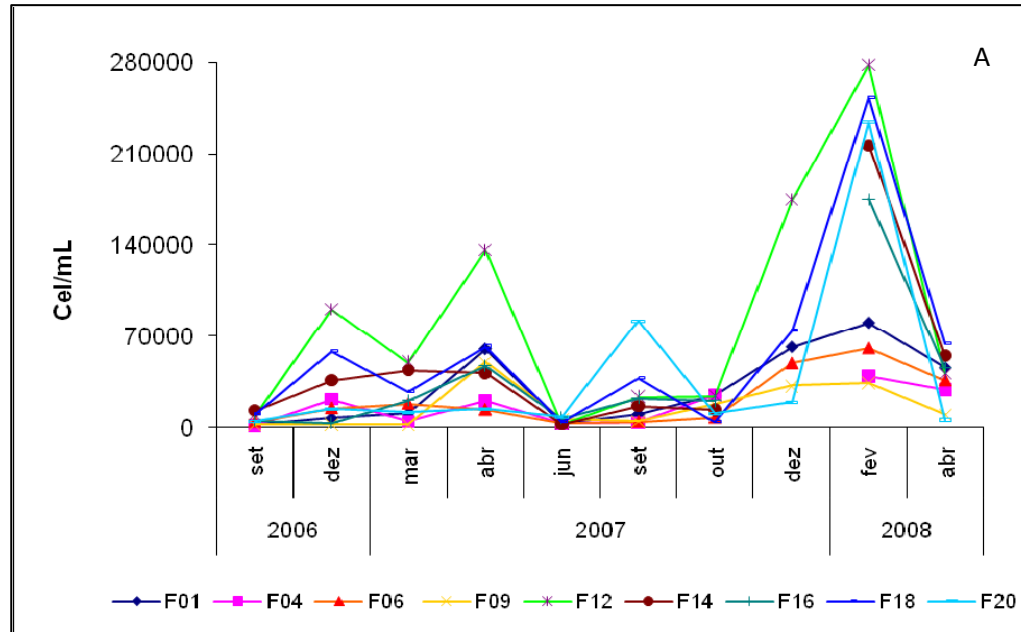
Na maioria das coletas, as maiores concentrações celulares foram observadas nos pontos amostrados no braço do Rio Sapucaí (Fig. 12C). O Ponto F12 apresentou os maiores valores em quase todos os períodos estudados. O mês de fevereiro de 2008 apresentou a maior densidade de células neste braço do reservatório, variando de 174.000 cel.mL<sup>-1</sup> no F16 a 278.000 cel.mL<sup>-1</sup> no F12. Os gêneros encontrados com mais frequência neste braço foram *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Radiocystis*, *Aphanocapsa*, *Merismopedia* e *Cyanodictyon* (Tab. 5).

Na região da barragem da UHF, o ponto F01 foi caracterizado pelos valores quantitativos mais elevados de células de cianobactérias do que os pontos localizados no braço do Rio Grande, em cinco das dez coletas realizadas (Fig. 12B). Os valores nestas regiões do reservatório (Barragem e Rio Grande) variaram de 1.400 cel.mL<sup>-1</sup> no ponto F04 em setembro de 2006 a 80.000 cel.mL<sup>-1</sup> no ponto F01 em Fevereiro de 2008. Nessa região do reservatório, que possui águas mais límpidas e transparentes, encontramos uma concentração maior de espécies de cianobactérias picoplanctônicas, principalmente dos gêneros *Cyanodictyon*, *Aphanocapsa*, *Epigloeosphaera*, *Merismopedia* e *Aphanotece*, que possuem raros relatos na literatura da presença e produção de toxinas.

Os gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de microcistina, segundo a literatura, e que estão presentes no reservatório são os seguintes: *Anabaena*, *Aphanocapsa*, *Coelosphaerium*, *Microcystis*, *Planktothrix* e *Radiocystis*.

**Tabela 5:** Lista de espécies encontradas no reservatório de Furnas e suas ocorrências no reservatório.

<b>Espécies de Cianobactérias encontradas no reservatório de Furnas</b>			
<b>Espécies</b>	<b>Ocorrência</b>	<b>Espécies</b>	<b>Ocorrência</b>
<i>Anabaena</i> sp	Sapucaí	<i>Merismopedia minima</i>	Grande e Sapucaí
<i>Anabaena circinalis</i>	Sapucaí	<i>Merismopedia tenuissima</i>	Grande e Sapucaí
<i>Anabaena planctônica</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanocapsa conferta</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis novasekii</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis panniformis</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanocapsa elachista</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis protocystis</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanocapsa CF planctônica</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis wesenbergii</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanocapsa grevillei</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis</i> sp1	Sapucaí
<i>Aphanocapsa holsatica</i>	Grande e Sapucaí	<i>Microcystis</i> sp2	Sapucaí
<i>Aphanocapsa incerta</i>	Grande e Sapucaí	<i>Planctonema</i> sp	Sapucaí
<i>Aphanotece bachmannii</i>	Grande e Sapucaí	<i>Planktothrix agardhii</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanotece minutíssima</i>	Grande e Sapucaí	<i>Planktothrix suspensa</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanotece nidulans</i>	Grande e Sapucaí	<i>Planktolyngbya brevicelular</i>	Grande e Sapucaí
<i>Aphanotece stagnina</i>	Grande e Sapucaí	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	Grande
<i>células isoladas de Chroococcales</i>	Grande e Sapucaí	<i>Pseudanabaena catenata</i>	Sapucaí
<i>Chroococcus aphanacapsoides</i>	Grande e Sapucaí	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Grande e Sapucaí
<i>Chroococcus dispersus</i>	Grande e Sapucaí	<i>Pseudanabaena</i> sp	Sapucaí
<i>Coelosphaerium minutissimum</i>	Grande e Sapucaí	<i>Radiocystis fernandoi</i>	Sapucaí
<i>Cyanodictyon imperfectum</i>	Grande e Sapucaí	<i>Radiocystis geminata</i>	Grande e Sapucaí
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Grande e Sapucaí	<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	Sapucaí
<i>Epigloesphaera brasílica</i>	Grande e Sapucaí	<i>Synechocystis</i> sp.	Sapucaí
<i>Lyngbya hieronymusii</i>	Grande e Sapucaí	<i>Synechococcus</i> sp	Grande e Sapucaí
<i>Merismopedia glauca</i>	Grande e Sapucaí		



**Fig. 12** - Abundância de cianobactérias (quantificação por microscopia) no reservatório da UHE de Furnas nos períodos e pontos amostrados. A Representação geral de todos os pontos estudados; B e C Quantificação nos pontos do braço do Rio Grande e Sapucaí, respectivamente.

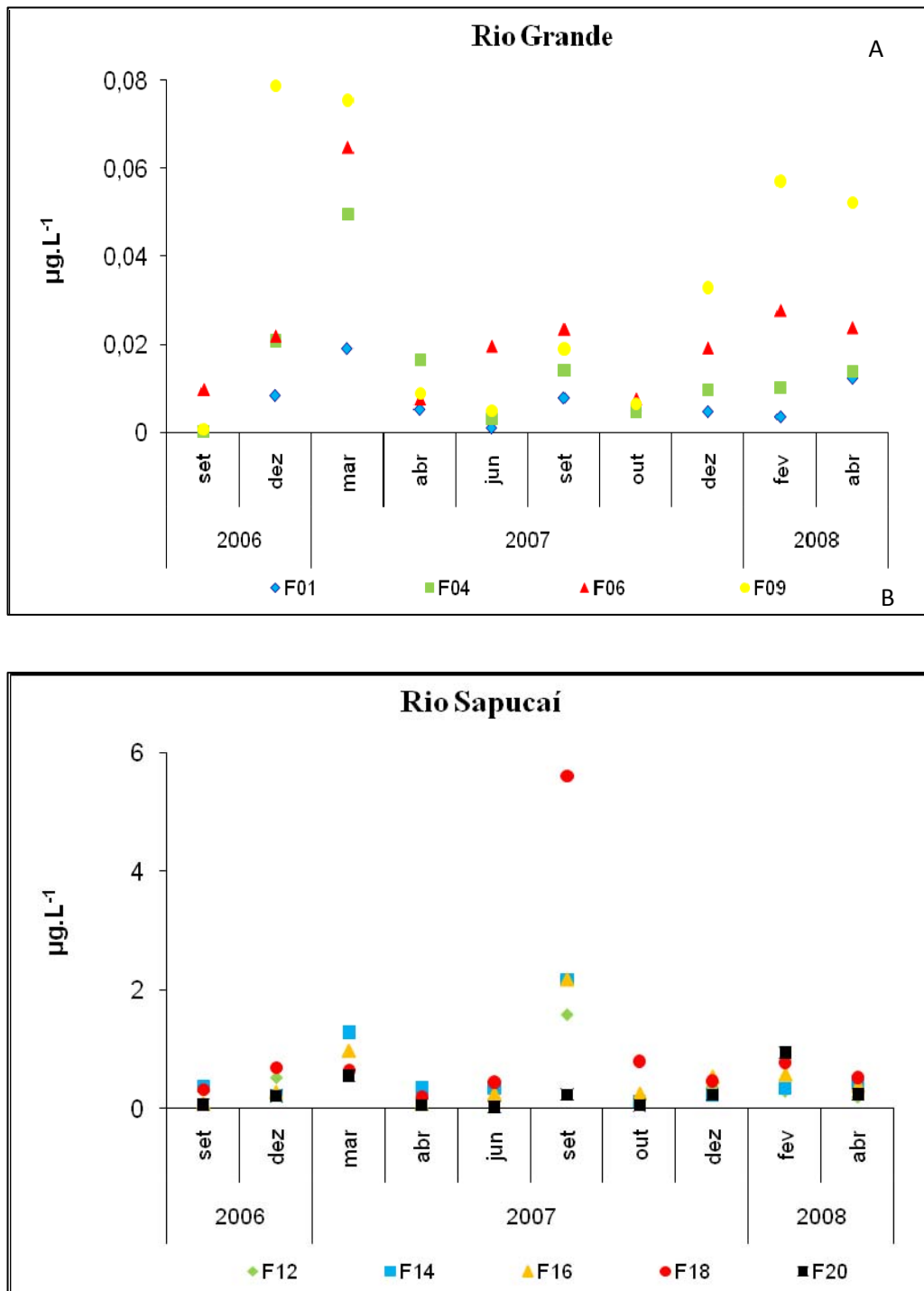


### **Análise de Toxina – Teste Elisa**

Com o teste ELISA, foi possível registrar a presença de microcistina na água em todos os pontos e épocas estudadas, com exceção do ponto F01 em Setembro de 2006.

No braço do Rio Grande, as maiores concentrações de microcistina foram encontradas nos meses de dezembro de 2006, março de 2007 e fevereiro e abril de 2008, todas no ponto F09. Já no Rio Sapucaí, os períodos com maiores valores desta toxina foram março e setembro de 2007 e fevereiro de 2008, sendo os maiores valores encontrados no mês de setembro (Fig. 13B).

Já no Rio Sapucaí, foram registrados as maiores quantidades de microcistina, com médias variando de  $0,17 \mu\text{g.L}^{-1}$  em abril de 2007 e  $2,36 \mu\text{g.L}^{-1}$  em setembro de 2007. Foi registrado uma concentração mais elevada desta toxina no ponto F18 de Setembro de 2007, chegando a  $5,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Por outro lado, no braço do Rio Grande, os valores médios variaram de zero no mês de Setembro de 2006, a um valor médio máximo de  $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$  no mês de março de 2007, valores estes bem menores que os encontrados no Sapucaí (Fig. 13 A).



**Fig. 13** - Concentração de microcistina (ELISA) ) no reservatório da UHE de Furnas nos períodos e pontos amostrados nos dois diferentes braços do reservatório.

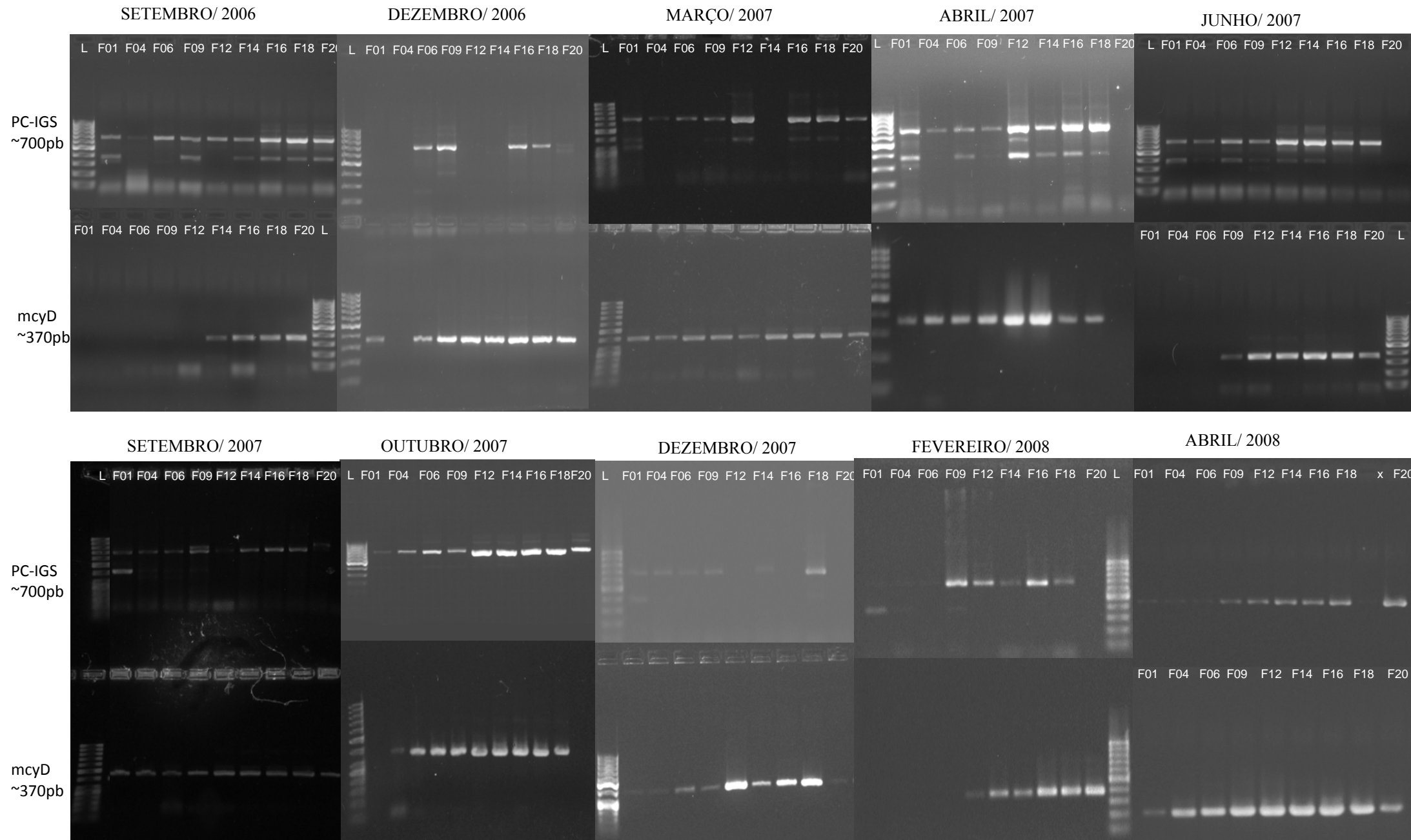
### 4.3 Análises Moleculares

#### PCR Convencional

O oligonucleotídeo iniciador mais específico, que gerou melhores bandas e amplificou todas as culturas estudadas foi o *mcyD*, que, portanto, foi escolhido para o trabalho com as amostras ambientais.

Os resultados da PCR das amostras ambientais podem ser visualizados na Fig. 14. O iniciador PC-IGS nem sempre gerou produtos de amplificação, principalmente no ponto F20. No entanto, produtos de *mcyD* podem ser visualizados em quase todas os pontos amostrados, quase sempre com bandas menos visíveis nos pontos do Rio Grande. Nos meses de março, setembro e outubro de 2007 e abril de 2008 foi possível visualizar produtos de amplificação em todos os pontos amostrados, mas uma quantidade maior de produtos pode ser visualizada nos meses de dezembro de 2006, abril e outubro de 2007 e abril de 2008.

Os resultados obtidos com este método indicaram a presença de cepas potencialmente produtoras de microcistina em quase todo o reservatório.



**Fig. 14** - Produtos de amplificação para os iniciadores PC-IGS e mycD nas estações de coletas e em todos os períodos amostrados no Reservatório da UHE de Furnas. Gel de Agarose 1,2%, corado com brometo de etídeo.

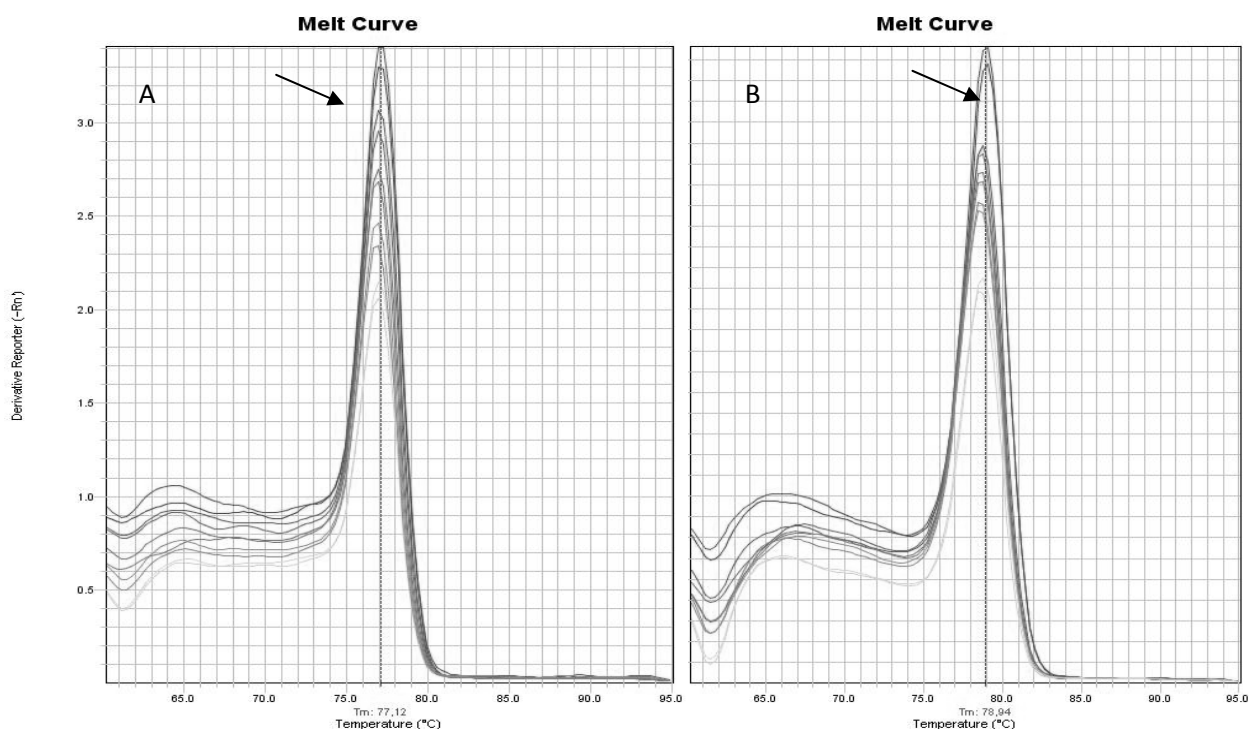
## PCR quantitativa

### Eficiência dos Iniciadores e Curva Padrão

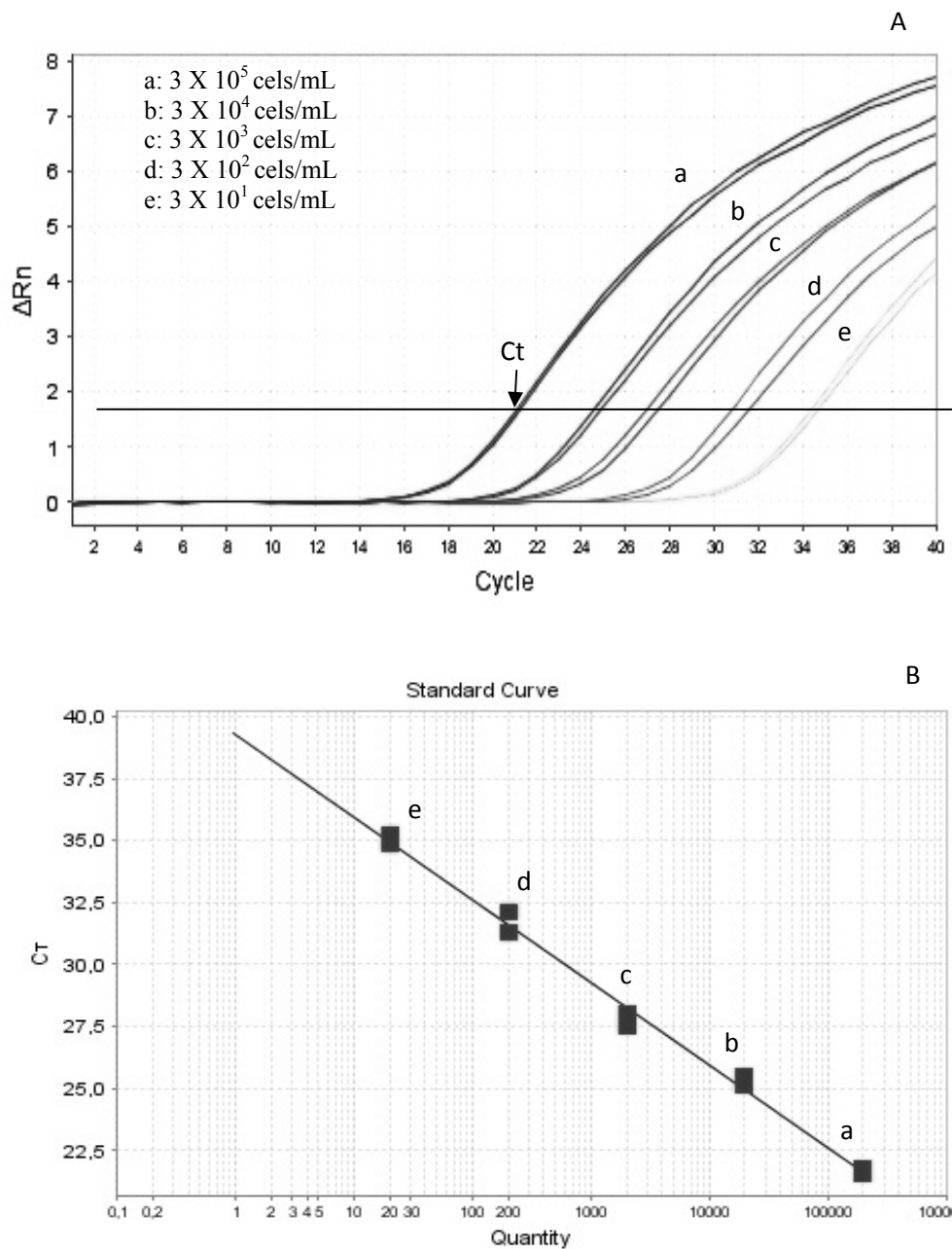
A curva padrão foi obtida utilizando-se cinco diluições do DNA extraído da cultura de *Radiocystis fernandoi* e variou de  $3 \times 10^5$  células a 30 células por reação. Os iniciadores *cpcB* e *mcyD* foram utilizados para desenvolver a curva padrão. Ambos os iniciadores tiveram Cts bem parecidos para as várias diluições utilizadas, com um Ct variando entre mínimo de 16 e máximo de 30.

O teste de eficiência com esta cultura para ambos os iniciadores revelou uma eficiência em torno de 100% demonstrando a confiabilidade e eficiência destes oligonucleotídeos iniciadores, tornando assim possível sua utilização em estudos ambientais (Fig. 16 e 17).

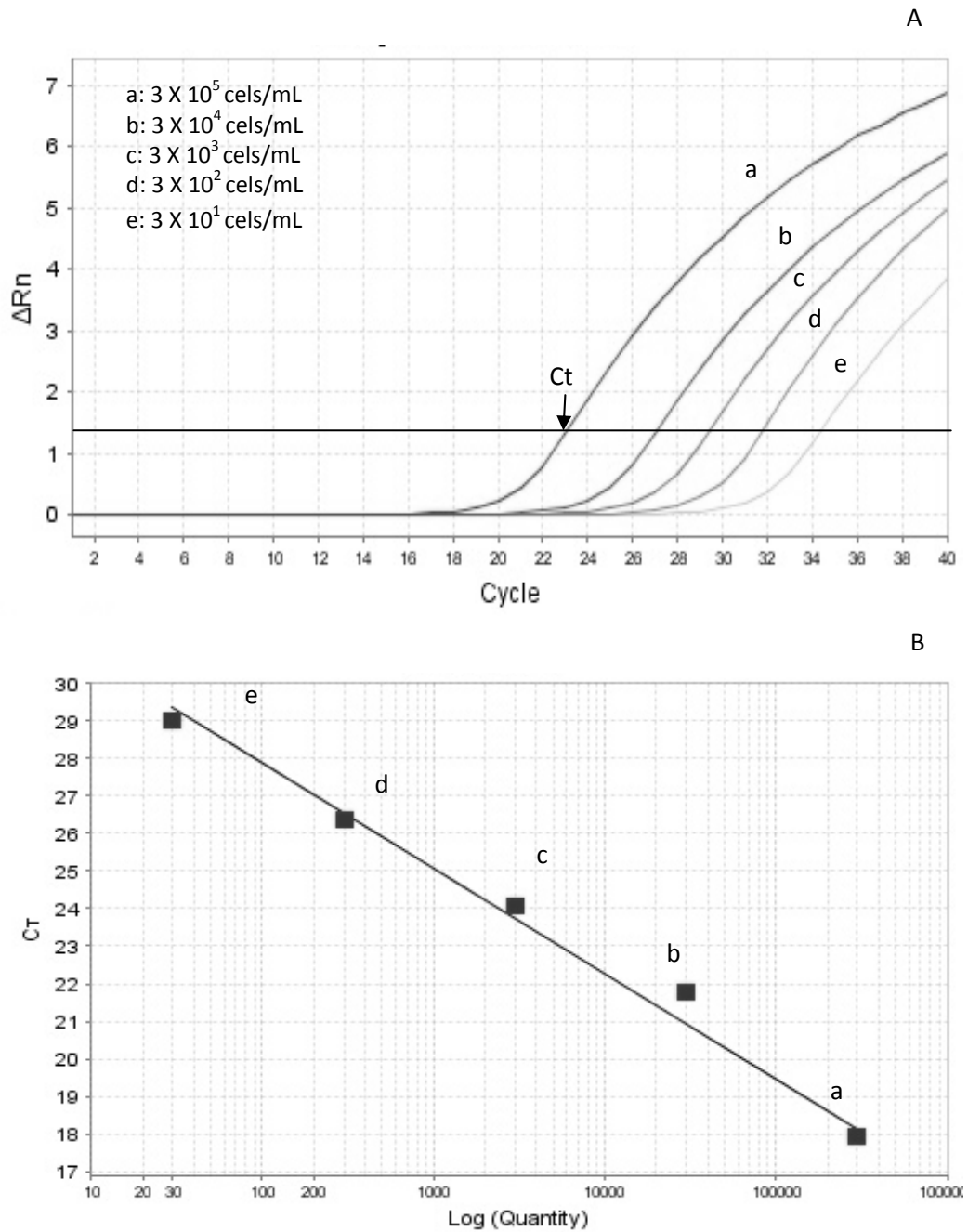
Para o gene *mcyD*, a análise do pico de dissociação (“melting”) mostrou que não houve formação de dímeros de primers e todos os picos foram encontrados na temperatura de 77,1°C (Fig. 15A). Porém, para o iniciador *cpcB* os picos foram encontrados na temperatura de 78,8°C para os padrões e algumas amostras, e na temperatura de 81,5°C para outras amostras ambientais (Fig. 15B).



**Fig. 15** - Curva de dissociação dos iniciadores *mcyD* (Figura A) e *cpcB* (Figura B) para *Radiocystis fernandoi* (75). A seta indica a presença de um único pico para ambos iniciadores.



**Fig. 16** - Teste de Eficiência do oligonucleotideo iniciador *mcyD* para quantificação do gene *mcyD* da *Radiocystis fernandoi* 75, demonstrando o “threshold cycle” (Ct) para as cinco diferentes diluições utilizadas. A Gráfico de amplificação; B Curva padrão com as seguintes características: Inclinação: -3,314  $r^2$ : 0,994 Ef%: 100,353.



**Fig.17-** Teste de Eficiência do oligonucleotídeo iniciador *cpcB* para quantificação da *Radiocystis fernandoi* (cepa 75), demonstrando o “threshold cycle” (Ct) para as cinco diferentes diluições utilizadas. A Gráfico de amplificação; B Curva padrão com as seguintes características: Inclinação: -2,814  $r^2$ : 0,99 Ef%: 126,682.

## q-PCR e o Picoplâncton

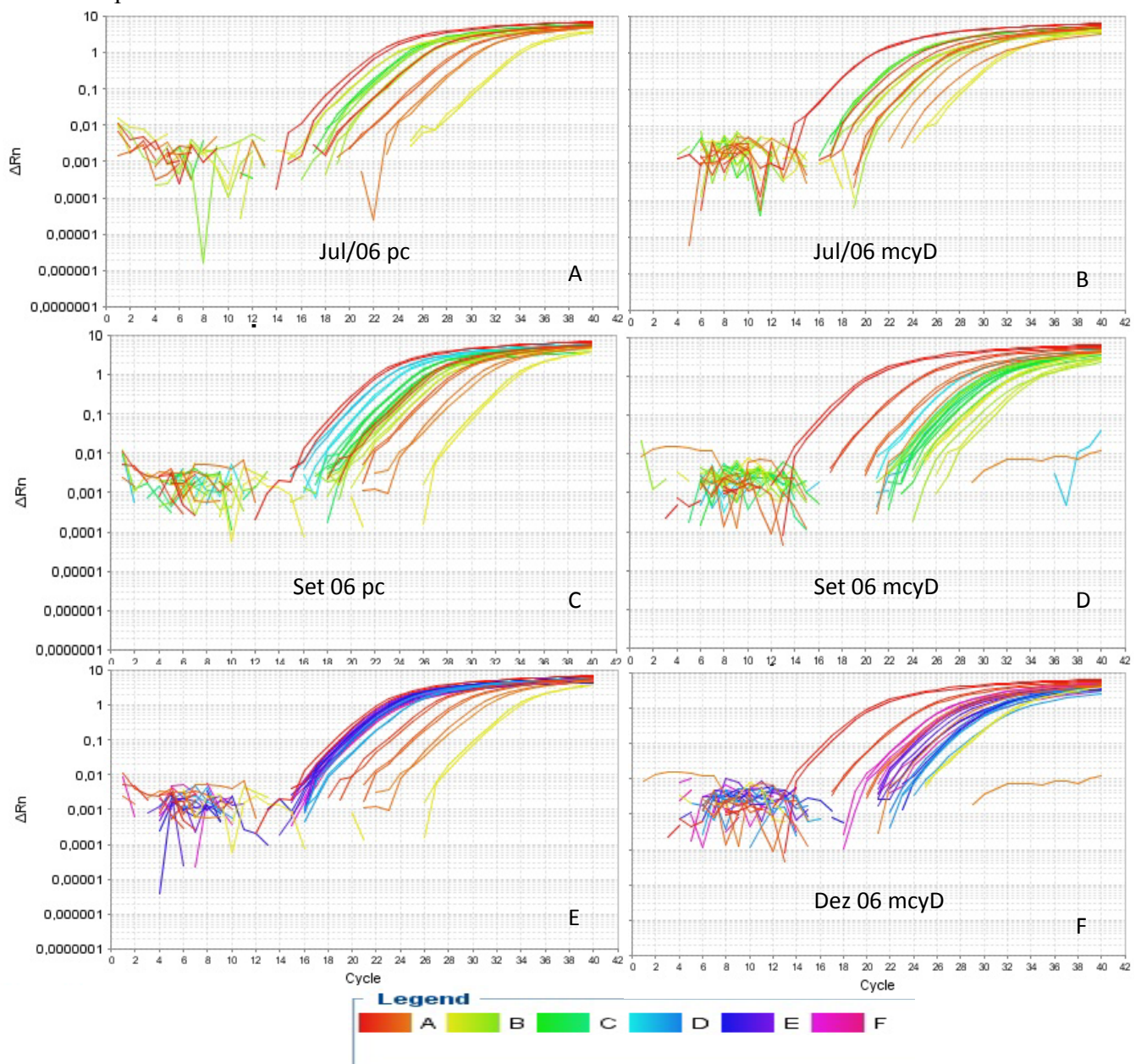
Os primeiros resultados da PCR quantitativa para o gene *cpcB* e *mcyD*, com amostras ambientais, mostraram números bastante elevados para o gene *cpcB* e proporcionalmente muito baixos para o gene *mcyD* (Fig. 18 C a F). Comparando estes resultados quantitativos com os dados obtidos através da contagem microscópica de células de cianobactérias, podemos observar a existência de uma grande diferença quantitativa entre as duas metodologias (q-PCR do gene *cpcB* e contagem de células de cianobactérias no microscópio), sendo os dados obtidos por microscopia sempre muito inferiores. Além disso, o valor de *cpcB* com relação a *mcyD* foi muito mais elevado, em ambas as amostras analisadas.

As análises realizadas foram efetuadas em amostras coletadas em filtros (ver metodologia para detalhes). No entanto, decidimos realizar um teste, repetindo as análises em algumas amostras coletadas com uma rede de plâncton e liofilizadas. A coleta com rede é uma coleta seletiva, no sentido que células pequenas não serão retidas. A comunidade fitoplanctônica coletada com este método difere, portanto, da comunidade coletada com filtros, que, ao contrário, retém todas as partículas  $<0,7 \mu\text{m}$  (ou até menores após a saturação). O objetivo do uso das amostras de rede para as análises, foi de eliminar células menores, e possivelmente não tóxicas, mantendo a comunidade de espécies nanoplanctônicas, conhecidas por serem as potenciais produtoras de toxinas.

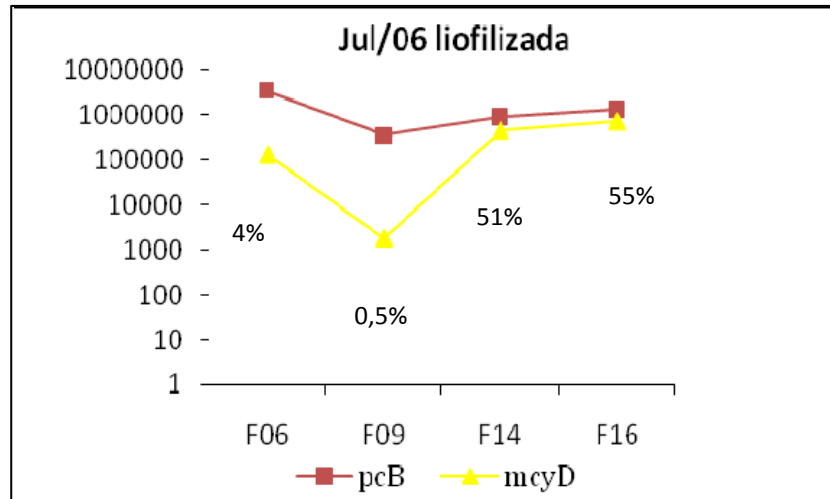
Os resultados mostraram que existem diferenças muito grandes quando utilizamos o material proveniente da coleta com rede ou o material coletado em filtros. Esta diferença entre a quantificação de cianobactérias através da Q-PCR do *cpcB* e da contagem no microscópio pode chegar a valores de até 10 vezes ou mais em alguns pontos estudados. A Fig. 20 A e B, mostraram que a proporção entre o gene *cpcB* presente em toda comunidade de cianobactérias e o gene *mcyD*, nas coletas realizadas em setembro e dezembro de 2006 originaram valores de proporção de genótipos tóxicos muito baixos, variando de 0,06 a 1,62% da presença de *mcyD* em toda a comunidade de cianobactéria. Este resultado aponta para uma grande porção da comunidade que não produz toxinas. Quando as análises foram realizadas com as amostras liofilizadas de julho de 2006 (Fig. 18 A e B e Fig. 19), esta proporção aumentou para valores entre 0,5 a 55%, evidenciando, com este método de coleta, a seleção de espécies maiores, que, confirmando os dados de literatura, são as principais responsáveis potenciais pela produção de toxinas.



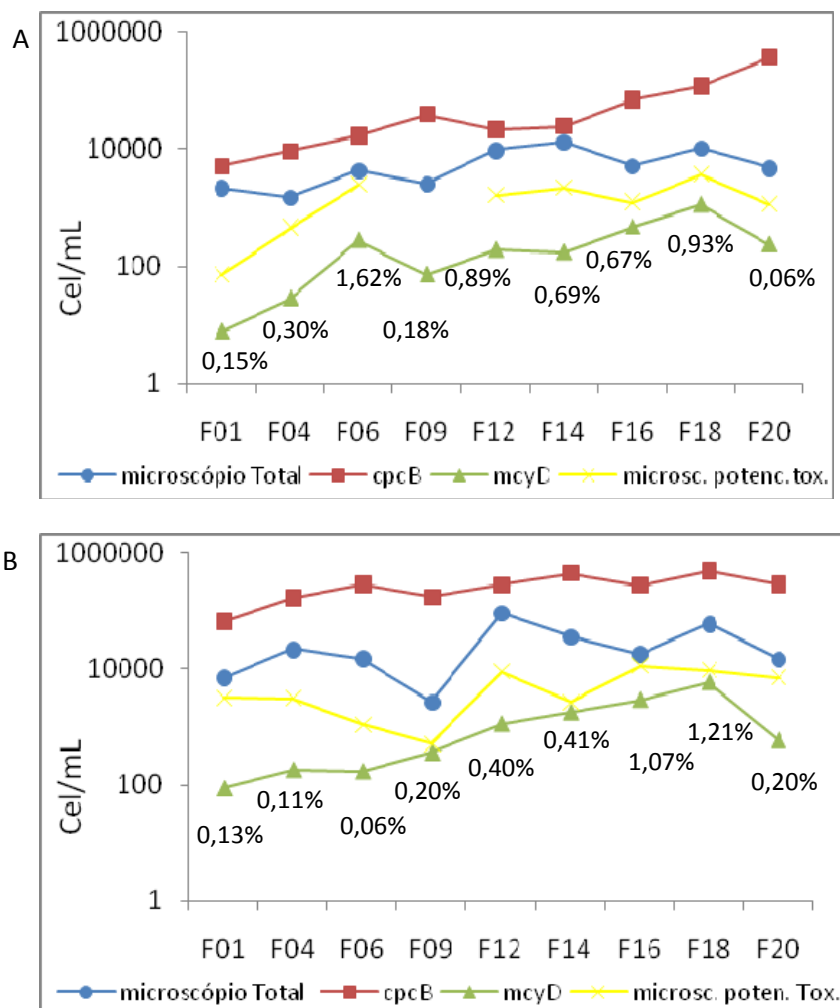
A partir destes resultados, decidimos não utilizar mais o gene *cpcB* como estimativa para determinar a porcentagem de cianobactérias no ambiente, pois, para o reservatório de Furnas, os valores encontrados incluiriam uma grande quantidade de células de organismos pequenos (picoplâncton), os quais mostraram não ter grande influencia na toxidez potencial deste grupo. Para estudarmos as mudanças que ocorrem naturalmente na porção potencialmente tóxica da comunidade de cianobactérias, optamos, portanto por utilizar a contagem no microscópio de todas as espécies consideradas capazes de produzir microcistina. Estas espécies foram escolhidas através de revisão da literatura científica disponível.



**Fig. 18** - Curvas de amplificação dos genes *cpcB* (A) e *mcyD* (B) de amostras Liofilizadas; *cpcB* (C) e *mcyD* (D) de amostras de Set/06; e *cpcB* (E) e *mcyD* (F) de amostras de Set/06. As curvas das cores vermelha e amarela representam a curva padrão e as demais cores representam as amostras. Quanto menor o Ct maior a quantidade de genes encontrados.



**Fig. 19** – Q-PCR dos genes mcyD e cpcB das amostras liofilizadas coletadas com rede de Fitoplâncton no mês de Jul de 2006. As porcentagens apresentadas para cada ponto são referentes à proporção do gene mcyD com relação ao cpcB total.



**Fig. 20** – Relação dos dados de Q-PCR dos genes mcyD e cpcB e do microscópio (Cianobactérias totais e Cianobactérias potencialmente produtoras de microcistina). As porcentagens apresentadas para cada ponto são referentes à proporção do gene mcyD com relação ao cpcB total. A Setembro de 2006; B Dezembro de 2006.

## Quantificação do *mcyD* em amostras ambientais

A análise da curva de dissociação revelou a existência de um único produto de amplificação em todas as amostras analisadas. Os iniciadores utilizados foram bastante sensíveis e conseguiram detectar valores abaixo de 10 cels por reação nas amostras ambientais.

Esta análise registrou a existência do gene *mcyD* em todas as amostras analisadas, e em alguns casos foram encontrados valores bastante baixos. Por exemplo, as amostras F04 e F09 de junho de 2007, F06 de setembro de 2007, F04 e F09 de outubro de 2007, F01, F04, F06 e F09 de fevereiro de 2008 apresentaram valores muito altos de Ct, e portanto uma quantificação do gene muito baixa. Estes valores tão baixos não devem ser analisados em termos absolutos, mas sim devem ser interpretados como indicativos da existência de populações tóxicas em densidades muito baixas. As amostras nas quais a presença do *mcyD* foi quantificada, mostraram que não existe uma tendência sazonal de aumento ou diminuição deste gene no ambiente.

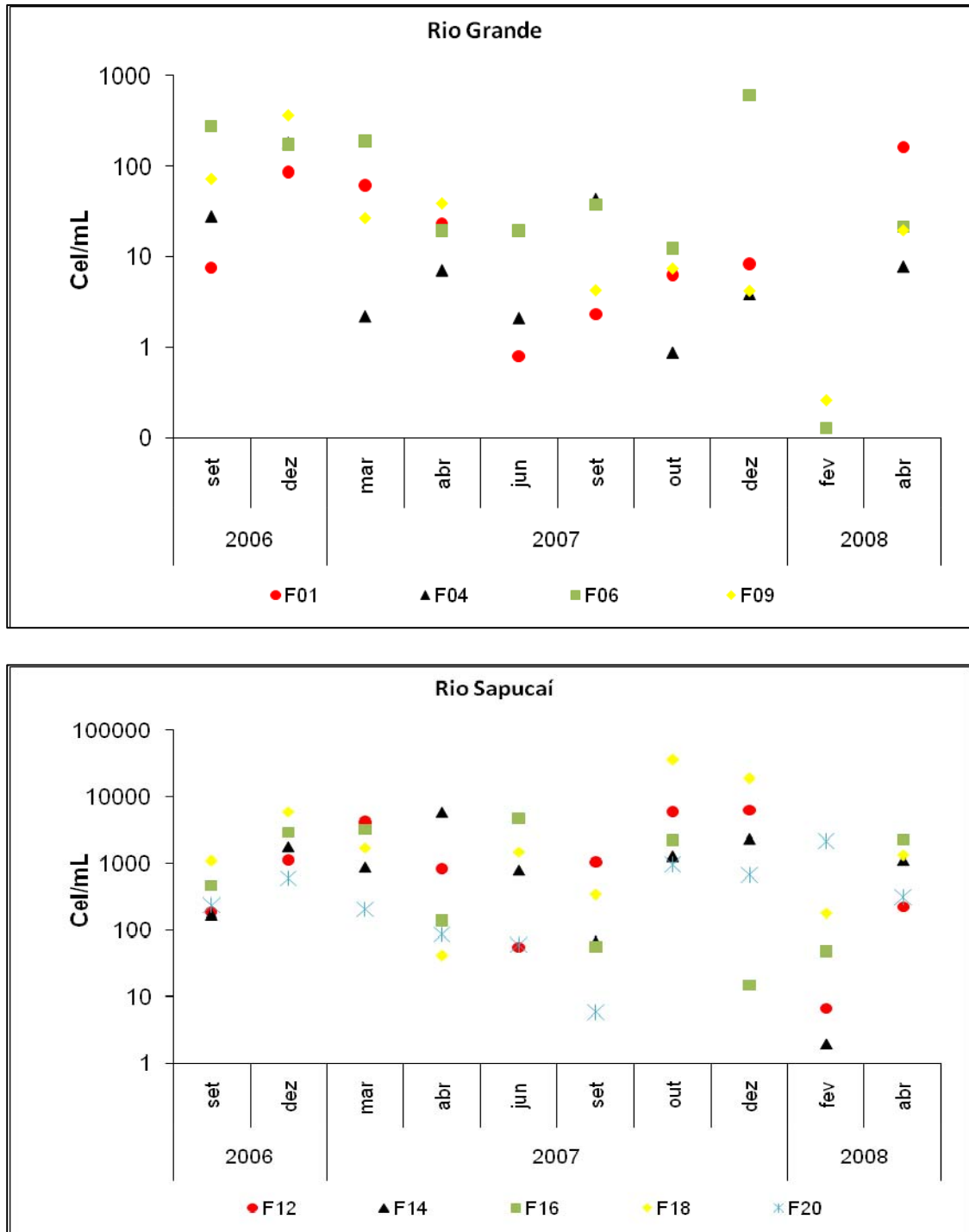
Entretanto, foi verificado uma quantidade maior do *mcyD* no braço do Rio Sapucaí, onde sempre foi maior a densidade de células de cianobactérias da ordem Chroococales, grupo conhecido por conter vários gêneros relacionados com a produção de microcistina. No braço do Rio Grande, onde a comunidade de cianobactérias é muitas vezes dominada por espécies picoplanctônicas, a presença de genes tóxicos poderia estar relacionada principalmente ao gênero *Aphanocapsa*, que foi observado em grande quantidade neste local.

No Rio Sapucaí, o ponto F18 apresentou as maiores quantidades celulares com a presença do gene *mcyD* na maioria dos meses analisados, com menores valores em abril de 2007 (42 cel.mL<sup>-1</sup>) e os maiores em outubro de 2007 (36.000 cel.mL<sup>-1</sup>) (Fig. 21B). O ponto F20 apresentou os menores valores para este braço, com valores variando entre 6 cels.mL<sup>-1</sup> em setembro de 2007 e 2.000 cels.mL<sup>-1</sup> em fevereiro de 2008. Já no Rio Grande (Fig. 21A), o F06 teve maiores valores de células com presença do *mcyD* na maioria das coletas, variando de 0,13 cel.mL<sup>-1</sup> em fevereiro de 2008 a 600 cels.mL<sup>-1</sup> em dezembro de 2007, enquanto que no F01 em geral temos os menores valores encontrados para todo o reservatório, variando entre 0,07 cels.mL<sup>-1</sup> (fevereiro de 2008) e 163 cels.mL<sup>-1</sup> (abril de 2008).

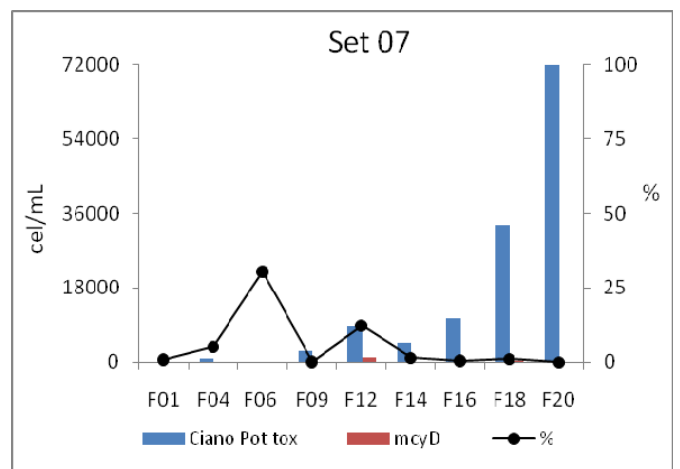
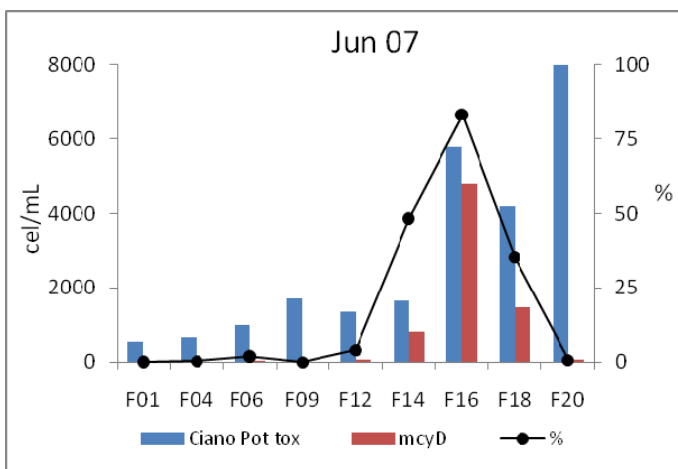
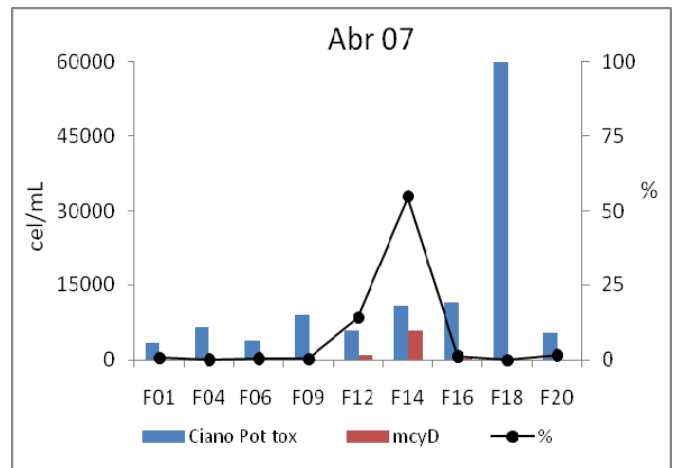
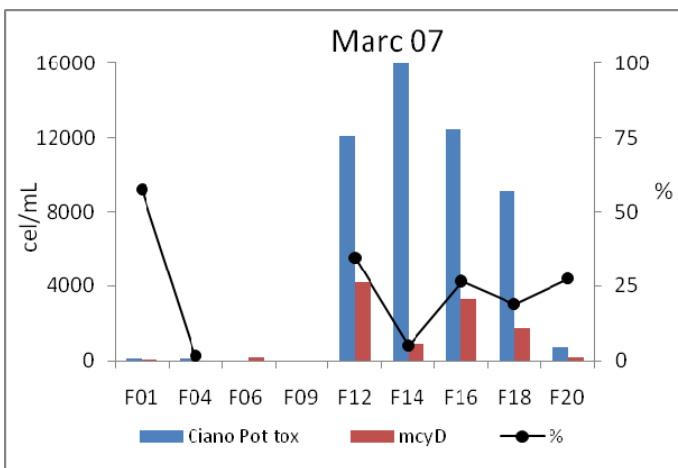
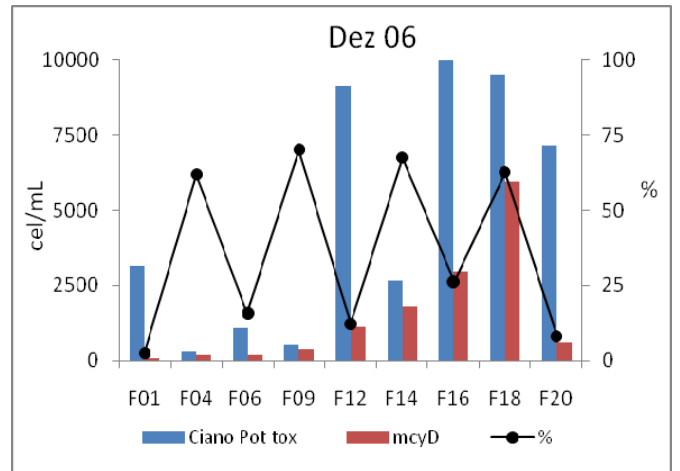
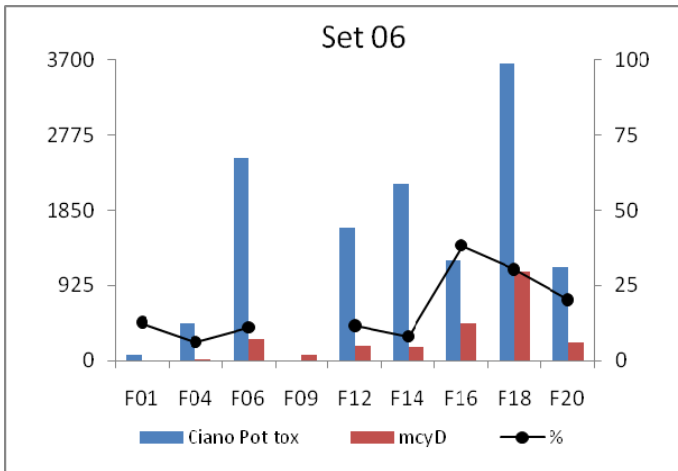
Na Fig. 22 podemos observar as relações entre a concentração do gene no ambiente relativa a densidade de células de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. Essas relações foram muito variáveis e também não mostraram correlações com os fatores ambientais estudados. O Rio Grande apresentou as menores porcentagens. O ponto F01 apresenta porcentagens pequenas de *mcyD*, com exceção do mês de março, onde mais da metade da população tóxica continha o gene *mcyD*. Os demais pontos do Rio Grande mostraram uma variação muito grande desta relação ao longo do período estudado.

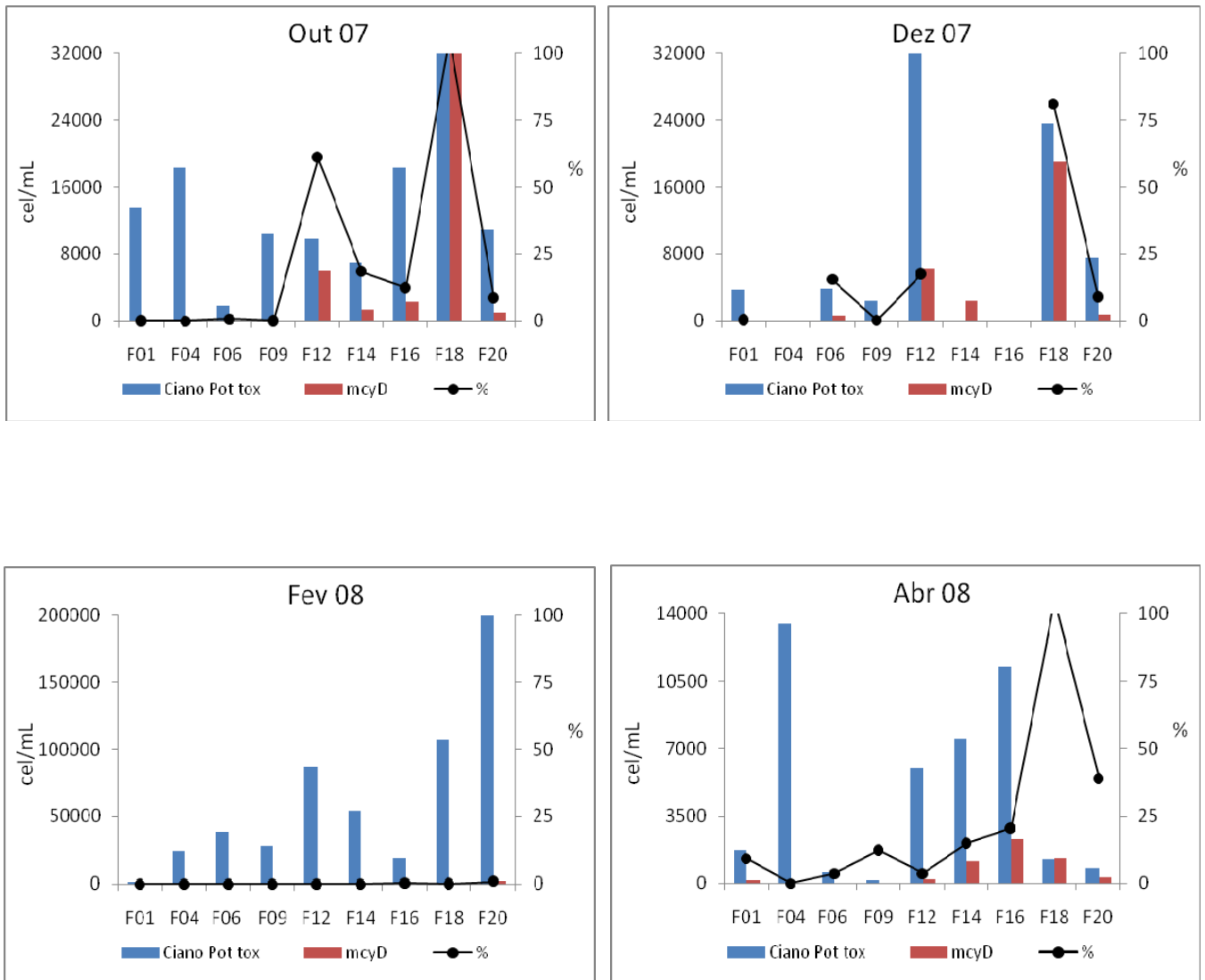
No Rio Sapucaí a variação também foi muito grande entre os cinco pontos estudados. No F18, por exemplo, temos valores muito pequenos no mês de setembro de 2007 e fevereiro de 2008 e valores extremamente altos nos meses de outubro de 2007 e abril de 2008, quando a comunidade tóxica apresentando o *mcyD* chegou a ser 100% do total de células de cianobactérias.

A comparação dos métodos q-PCR vs ELISA e q-PCR vs PCR qualitativa podem ser visualizadas nas Figs 23 e 24, respectivamente. Para a primeira relação descrita aqui, no geral há uma correlação positiva ( $Rho\ 0.65$ ,  $p < 0.0001$ ) entre os dados encontrados. No entanto, em alguns pontos essa relação se mostra contrária. Com relação as duas PCRs realizadas, a quantitativa foi mais sensível do que a qualitativa, já que foi detectada a presença de *mcyD* em todas as análises quantitativas, e o mesmo não ocorreu com a PCR convencional.

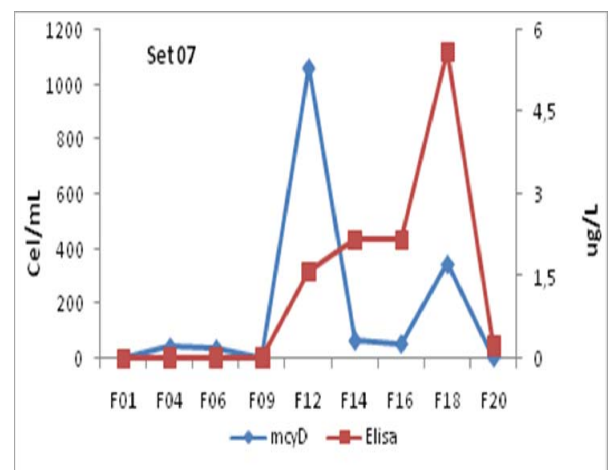
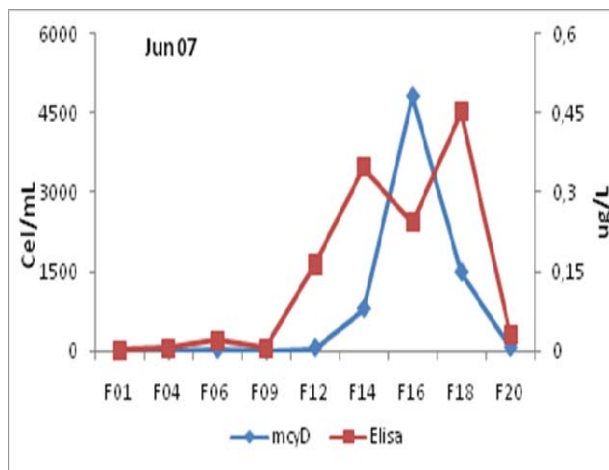
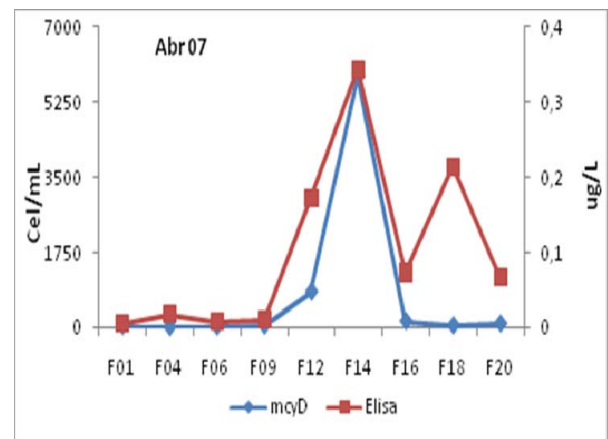
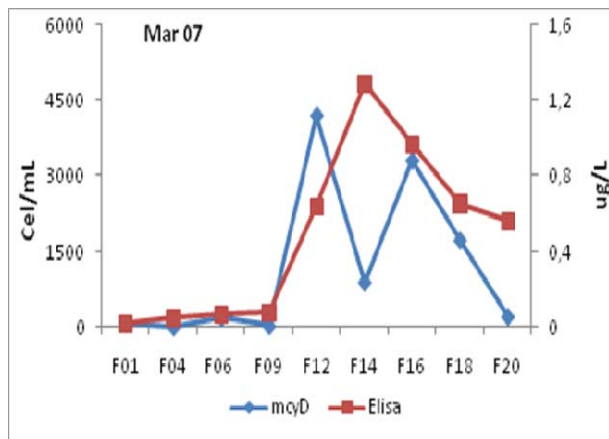
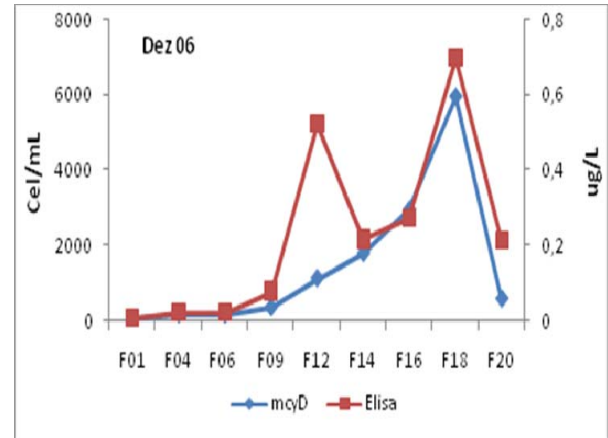
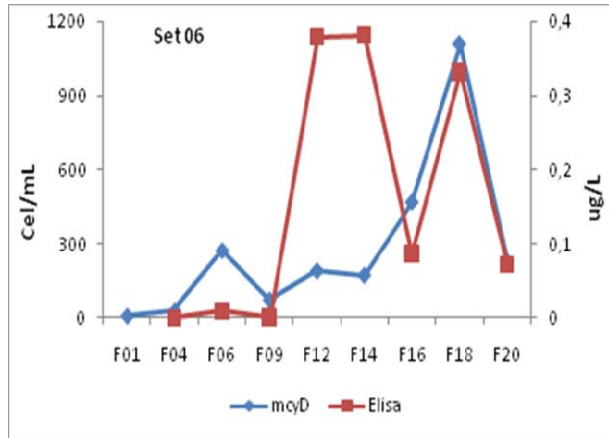


**Fig. 21** - Quantificação do mycD na UHE de Furnas nos períodos e locais amostrados, separados nos dois braços estudados (Rio grande e Sapucaí)

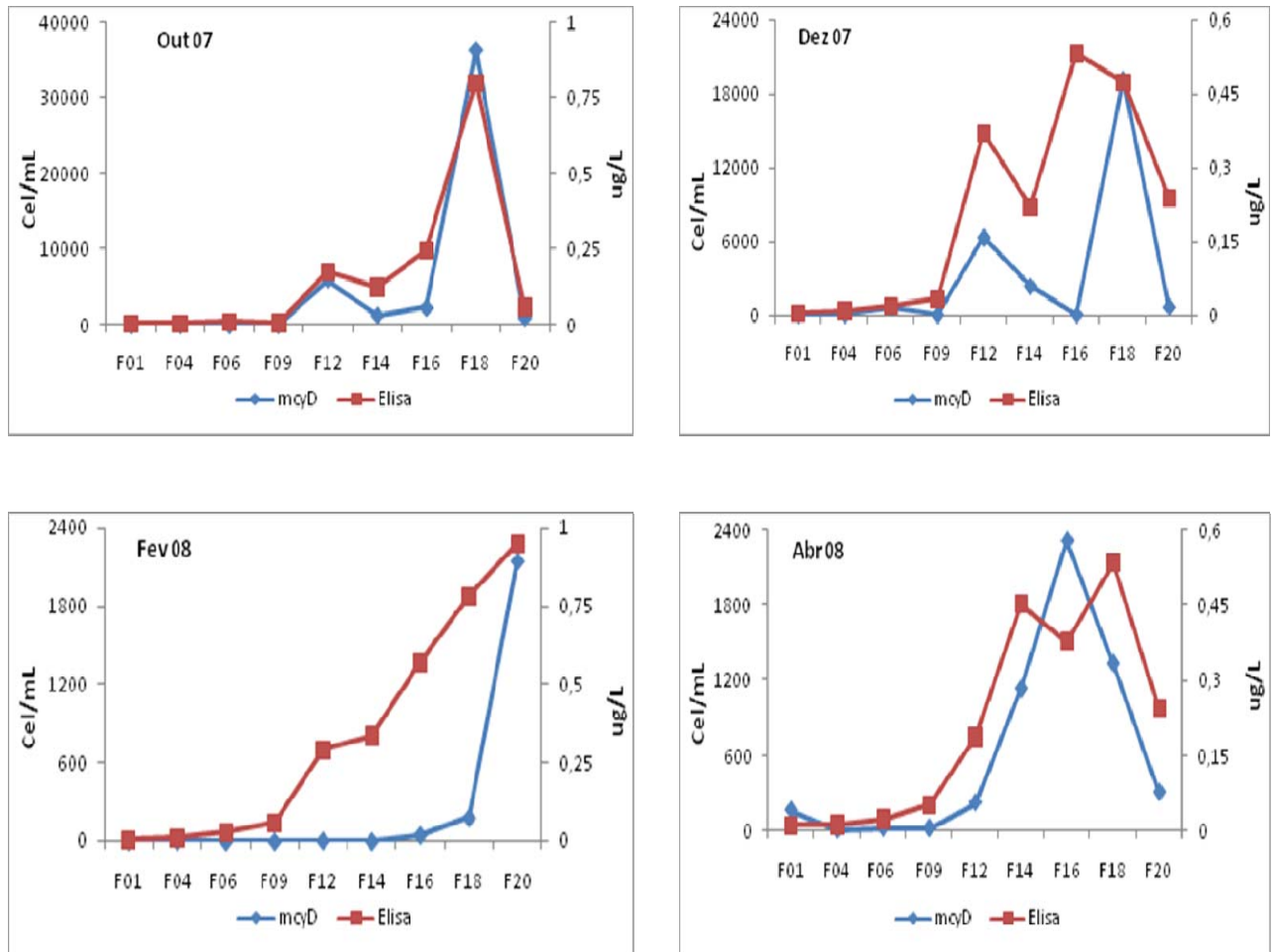




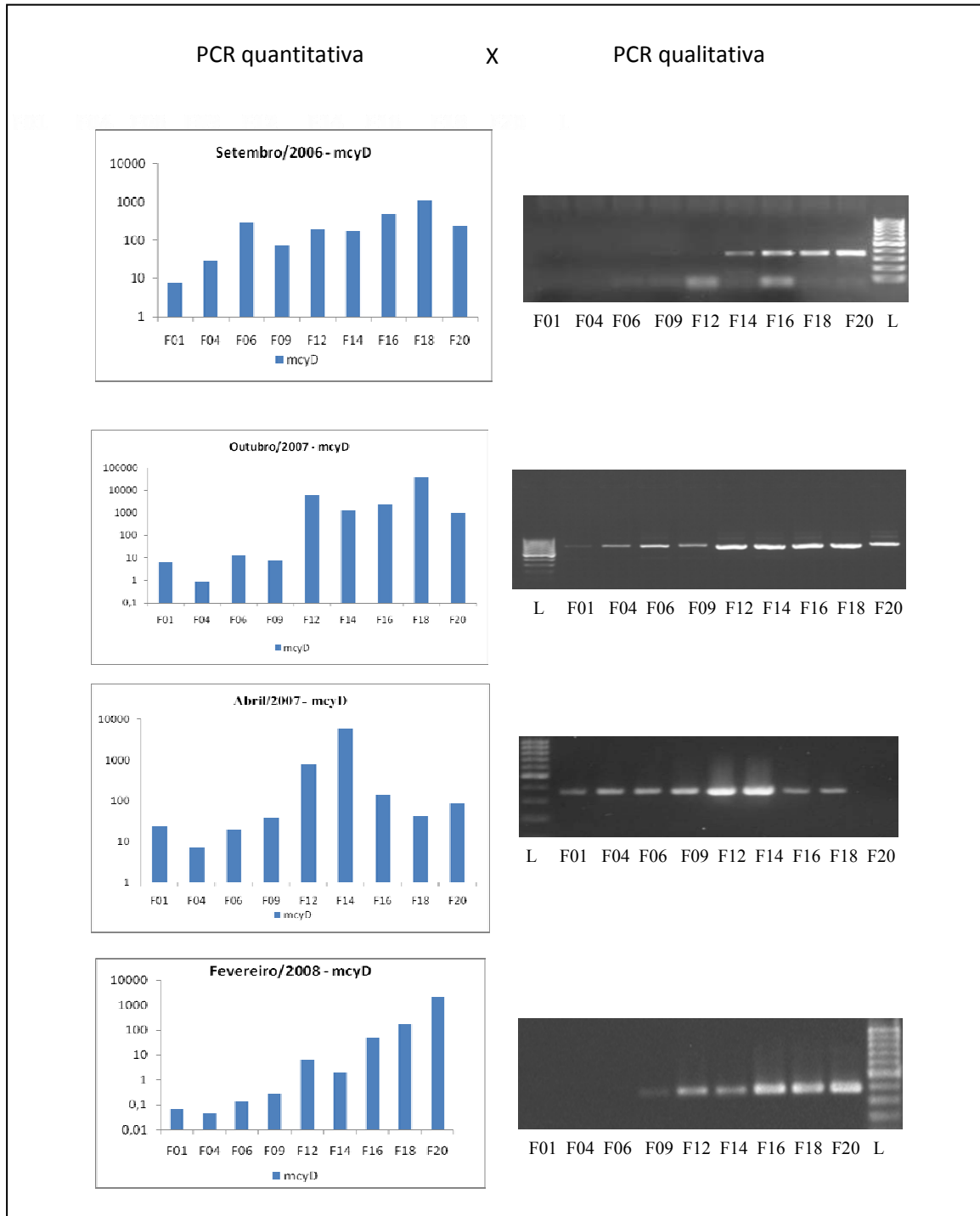
**Fig. 22** - Relação de mcyD e células potencialmente produtoras de microcistina (microscópio) na UHE de Furnas nos períodos e locais amostrados. Eixo secundário representando a porcentagem de mcyD na população potencialmente tóxica.







**Fig. 23** - Relação dos dados encontrados pelo método ELISA e Q-PCR na UHE de Furnas nos períodos e locais amostrados de todas as amostras estudadas.



**Fig. 24** - Comparação da q-PCR e PCR convencional de algumas amostras ambientais. PCR quantitativa (a esquerda) em cels.mL<sup>-1</sup>. PCR convencional (a direita), Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo.

## 5.0 DISCUSSÃO

### 5.1 Os Parâmetros Físico-Químicos e Biológicos e a Sazonalidade do Reservatório

Nossos estudos revelaram a existência de sazonalidade para algumas variáveis estudadas. No período seco e de inverno, foram registradas as menores temperaturas, e menores concentrações de nitrogênio e fósforo, assim como menores concentrações de clorofila. Figueredo & Giani (2001) e Giani *et al.* (1988) também encontraram diferenças sazonais, estudando estas mesmas variáveis na Lagoa da Pampulha (MG). Assim como ambientes temperados, os tropicais também sofrem mudanças climáticas sazonais (especialmente relacionadas a precipitação), que induzem modificações das características físico-químicas da água (HOOKER & HERNANDEZ, 1991; COSTA & SILVA, 1995).

A temperatura da água encontrada em nosso estudo não apresentou grandes oscilações. De acordo com Figueredo & Gani (2001), oscilações na temperatura em ambientes aquáticos tropicais não são muito altas. Também, trabalhos realizados em ambientes aquáticos tropicais geralmente encontraram uma variação sazonal de pequena amplitude na temperatura da água (GIANI *et al.*, 1988; GUNKEL *et al.*, 2000; MAIA-BARBOSA *et al.*, 2008).

A transparência da água foi maior na estação seca como consequência de um período de chuvas reduzidas e baixa densidade de fitoplâncton. Chuvas normalmente carregam partículas para os corpos d'água, diminuindo a transparência da água neste período. Também, a quantidade de nutrientes na água é influenciada pela chuva, que carregam principalmente nitrogênio e fósforo para o ambiente. Essa diferença sazonal também foi encontrada nos trabalhos de Maia-Barbosa *et al.* (2008).

Com relação à quantidade de cianobactérias, altos valores de número de células foram detectados no final da estação chuvosa. De acordo com Margalef (1994), regiões com oscilações climáticas sazonais mostram uma diversidade do ecossistema governada por modificações cíclicas. A chuva é possivelmente a principal razão para as variações sazonais (HUSZAR & REYNOLDS, 1997) observadas aqui, para todos os aspectos estudados.

Os pontos do rio Sapucaí, que apresentaram valores mais elevados de nutrientes e clorofila *a*, estão próximos a cidades maiores da região, e recebem grande parte da descarga de esgoto delas. Em Boa Esperança, por exemplo, cidade próxima a represa, florações de cianobactérias são observadas freqüentemente, provavelmente devido ao enriquecimento da água pelo esgoto da cidade, lançado no ambiente (Fig. 1). Além do mais, durante as coletas foi possível observar muitas atividades agropecuárias no entorno da represa, contribuindo com o processo de eutrofização da represa. A região do braço do Sapucaí é caracterizada como mesotrófica (CAMPOS, 2007). Em outros Reservatórios do Brasil como Barra Bonita, por exemplo, também vem sendo registrado um aumento de nutrientes, acelerando o processo de eutrofização destes sistemas (CALIJURI & DOS SANTOS, 1996; CALIJURI, 1999). O aumento da concentração de fósforo e nitrogênio na água é resultado principal das atividades humanas como indústrias, rejeitos domésticos, áreas de agricultura e pecuária (CALIJURI & DOS SANTOS, 2001).

Embora nossos dados mostrem que a ocorrência de florações densas seja um evento raro no Reservatório de Furnas, os valores de clorofila e a presença de cianotoxinas apontam para um risco potencial para os animais que vivem ou se alimentam neste ambiente e também para os seres humanos que utilizam este reservatório para recreação e alimentação.

## **5.2 Relação dos Parâmetros Estudados com Genótipos *mcyD***

Muitos estudos fazem uma relação entre a dinâmica e ecologia de cianobactérias com as mudanças nos fatores físico-químicos (nutrientes, luz e temperatura), que poderiam então influenciar o crescimento de cianobactérias no ambiente aquático (WHITTON & POTTS, 2000). Porém, enquanto que as condições para proliferação de cianobactérias são bem entendidas, os fatores de dominância das cepas tóxicas em relação as não tóxicas não são (WHO, 2003). Neste estudo algumas variáveis físico-químicas e biológicas (Clorofila *a*, fósforo total, e microcistina) parecem influenciar significativamente a quantidade de genes *mcyD* no ambiente, mas nenhum deles pareceu afetar a composição genotípica (porcentagem de cepas tóxicas e de não tóxicas).

Giani *et al.* (2005) observaram que com o aumento de fósforo no ambiente, a porcentagem de cianobactérias no total de biomassa fitoplanctônica aumentava e que

proporcionalmente aumentava também a possibilidade de se encontrarem espécies tóxicas, significando que em ambientes eutróficos é maior a chance de existirem florações e delas serem tóxicas. Isso pode nos auxiliar na compreensão da correlação positiva de fósforo com genes *mcyD*, apesar de não ter sido uma correlação forte ( $\rho$  0.26).

Alguns estudos utilizando a q-PCR para verificar a influência dos fatores ambientais nas mudanças temporais das populações tóxicas e não tóxicas de cianobactérias, observaram uma correlação positiva significativa entre nitrogênio (nitrogênio total ou nitrato) com a porcentagem de genótipos tóxicos no ambiente (YOSHIDA *et al.*, 2006; RANTALA *et al.* 2006). Rantala *et al.* (2006) também encontraram que pH e aumento da área da superfície do lago estão relacionados positivamente com genótipos tóxicos no ambiente. No entanto, Yoshida *et al.* (2006) não encontraram essa correlação para os fatores temperatura e fósforo. VEZIE *et al.* (2002) demonstraram que concentrações baixas de nutrientes favoreceram o crescimento de duas cepas de *M. aeruginosa* não produtoras de microcistina com relação a duas outras cepas produtoras. Rantala *et al.* (2006), porém, observaram que um aumento na concentração de fósforo estava relacionado com maior produção de microcistina, mas aparentemente não com o aumento de genótipos tóxicos. Em nosso estudo porém essas relações não puderam ser confirmadas e mais pesquisas são necessárias para verificar e comprovar a existência destas relações no nosso ambiente.

Chorus (2001) encontrou que a concentração de microcistina na água é determinada primariamente pela biomassa de cianobactérias produtoras de microcistina, embora a influência de fatores ambientais não possa ser descartada. Entretanto, embora o conteúdo celular de microcistina seja quase constante ao longo do seu crescimento (ORR & JONES, 1998), fatores como temperatura, intensidade luminosa, concentrações de nutrientes, pH e traços metálicos são encontrados influenciando a produção de microcistina em condições de laboratório (SIVONEN & JONES, 1999; DUY *et al.*, 2000; CHORUS, 2001). Em nosso trabalho, a quantidade de microcistina encontrada foi correlacionada positivamente com as quantidades de cianobactéria total ( $\rho$  = 0.39), gene *mcyD* ( $\rho$  0.65), clorofila *a* ( $\rho$  0.79) e fósforo total ( $\rho$  0.25). Portanto, podemos afirmar que a quantidade de cianobactérias influencia a quantidade de microcistina produzida, e por outro lado o fósforo deve estar influenciando o maior aparecimento de cianobactérias tóxicas.

Outras variáveis, que não foram estudadas aqui, também podem influenciar a composição genotípica e toxidez do ambiente. Alguns estudos sugerem que cianófagos (vírus

que atacam cianobactérias) são responsáveis pelo controle de cianobactérias, principalmente do gênero *Microcystis*. Yoshida *et al.* (2008) utilizaram a q-PCR para estudar a dinâmica de populações de *Microcystis aeruginosa* tóxicas (*mcyA*) e não tóxicas (PC-IGS), de abril a dezembro de 2006, e sua relação com cianofagos presentes em lagos Japoneses. A abundância de cianofagos foi negativamente correlacionada com a abundância de *M. aeruginosa*. Essas observações sugerem que cianofagos são importantes fatores determinando as mudanças sazonais das cepas tóxicas de *Microcystis* no ambiente.

Mais estudos isolados são requeridos para avaliar as diferenças ecológicas reais de ambas as populações tóxicas e não tóxicas e os fatores que influenciam a produção da microcistina.

### 5.3 Composição Específica e Produção de Toxina

As cianobactérias picoplânctônicas apareceram com muita frequência nas amostras estudadas e principalmente dominam a região do rio Grande. Apesar disso, a quantidade de espécies tóxicas, geralmente não associadas ao picoplâncton, também foi bastante significativa, principalmente na região do rio Sapucaí. Neste trabalho, a produção de toxina foi associada aos gêneros geralmente citados pela literatura como tal. Existem poucos relatos de produção de microcistina por *Aphanocapsa incerta* (DOMINGOS *et al.*, 1999; SANT'ANNA *et al.*, 2004). Porém, como esse gênero aparece muito nas nossas amostras e muitas vezes em amostras com alta quantidade de genótipos tóxicos e toxina, e não aparece nenhuma outra espécie potencialmente produtora, nos consideramos neste trabalho o gênero *Aphanocapsa* entre os potenciais produtores de microcistina. Os gêneros potencialmente produtores mais comuns no reservatório de Furnas são *Aphanocapsa*, *Microcystis* e *Radiocystis*. No estudo de Rantala *et al.* (2006), em lagos oligotróficos e mesotróficos, *Microcystis* e *Planktothrix* prevaleceram, e apareceram juntas em vários destes lagos. Estes mesmos autores, não encontraram cepas tóxicas em alguns lagos oligo e mesotróficos. No entanto, em lagos eutróficos e hipereutróficos, cepas tóxicas sempre foram registradas e na maioria deles os três gêneros (*Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix*) foram encontrados juntos (Rantala *et al.*, 2006). Em nossos estudos estes três gêneros de cianobactérias nunca apareceram na mesma amostra, mas em algumas ocasiões dois deles apareceram.

Os métodos utilizados aqui para detecção de toxinas revelaram uma quantidade maior de microcistina no braço do Sapucaí. Foi encontrada uma correlação positiva significativa entre a quantificação realizada pelo ELISA e pela q-PCR ( $\rho$  0,65), nas amostras analisadas, evidenciando que a existência do gene no ambiente indica a existência também da toxina. Esta correlação também foi encontrada por Yoshida *et al.* (2008) no lago Mikata, onde a concentração de microcistina teve uma relação positiva estatisticamente significativa com o número de cópias de *mcyA*, e também por Oberholster *et al.* (2008) que utilizou os genes *mcyB* e *mcyD* para estudos com culturas. Furukawa *et al.* (2006) mediu a concentração de toxina na água e a quantidade de genes tóxicos e também encontrou uma correlação bastante significativa entre estas duas medidas, indicando que a PCR quantitativa pode ser usada para uma estimativa aproximada da toxicidade em amostras de lagos. No entanto, foi observado também que os resultados obtidos usando PCR em tempo real nem sempre refletem a concentração de toxinas na água porque a quantidade de produtos transcritos variam com o estado fisiológico da célula (FURUKAWA *et al.*, 2006).

#### 5.4 Análises Moleculares

Inicialmente, em muitas de nossas amostras não obtivemos sucesso na amplificação por PCR. Quando aumentamos a diluição do DNA destas amostras, a amplificação aconteceu e, portanto atribuímos o problema a inibidores presentes no ambiente e/ou resíduos da extração de DNA. Rantala *et al.* (2008) sugeriu que a fraca amplificação pela q-PCR em algumas de suas amostras era devido a sensibilidade da polimerase a inibidores presentes na água. Impurezas como ácido húmico estão comumente presentes em amostras ambientais e podem decrescer a sensibilidade da PCR (RANTALA *et al.*, 2008). Substâncias húmicas são uma mistura de complexos polifenólicos produzidos durante a decomposição de matéria orgânica e podem estar presentes em amostras provenientes do ambiente aquático ou do solo. Também substâncias que inibem atividade enzimática estão presentes em muitos materiais de interesse e podem prejudicar a PCR (KREADER, 1996). Uma possível fonte de contaminação dos DNAs deste estudo é o método de extração de DNA das amostras, já que foi utilizado proteinase K, e proteases adicionais e endógenas são possíveis fontes de inibidores da PCR (KREADER, 1996). Em muitos casos, no entanto, as substâncias inibidoras são desconhecidas.

O nosso trabalho é o primeiro a utilizar um iniciador para a região *mcyD* para análises quantitativas. Os iniciadores desenhados aqui, tanto para PCR qualitativa quanto para a quantitativa, se mostraram bastante eficientes. Eles foram capazes de gerar fragmentos de um único tamanho e também conseguiram abranger uma grande quantidade de espécies diferentes presentes no banco de cultivo do laboratório. Vários autores também conseguiram sucesso utilizando oligonucleotídeos para várias regiões do *mcyD*, conseguindo separar genótipos tóxicos dos não tóxicos em amostras ambientais (NISHIZAWA *et al.*, 2000; KAEBERNICK *et al.*, 2000; BAKER *et al.*, 2001; RANTALA *et al.*, 2004; RINTA e KANTO *et al.*, 2005; HOTTO *et al.*, 2005; OUAHID *et al.*, 2005; OUELLETTE *et al.*, 2006). No entanto, poucos iniciadores *mcyD* são desenhados para alcançar toda a comunidade tóxica (MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2006; RANTALA *et al.*, 2004) e abordagens como essas são necessárias, já que a co-ocorrência de vários produtores de microcistina, especialmente em água doce, é bastante freqüente (VEZIE *et al.*, 1998; VAITOMAA *et al.*, 2003; RINTA-KANTO *et al.*, 2006; RANTALA, 2007).

Em geral, cepas não tóxicas não contêm genes *mcy* (NEILAN *et al.* 1999; TILLET *et al.*, 2001). No entanto, algumas cepas podem ter fragmentos de genes sintetase de microcistina ou mutações dentro desses genes (NEILAN *et al.* 1999; KAEBERNICK *et al.*, 2001; TILLET *et al.*, 2001). Essas cepas podem ser amplificadas com iniciadores *mcy*, embora não estejam aptos a produzir toxinas. No entanto, uma correlação positiva significativa entre a soma de número de cópias do *mcyE* de *Microcystis* e *Anabaena* e a concentração de microcistina, indicou que cepas não tóxicas dos lagos Tuusulanjärvi e Hiidenvesi não são numerosas e não apresentam genes *mcy*. Em nosso trabalho falso-positivos também não foram registrados.

O *mcyD* é responsável pela codificação dos domínios sintase de  $\beta$ -Ketoacyl e acetiltransferase da microcistina. Uma região deste gene mais conservada foi escolhida para o estudo dos genótipos tóxicos no Reservatório de Furnas, já que queríamos abranger a grande maioria das espécies produtoras de microcistina presentes. A construção deste iniciador foi realizada com base nas seqüências de vários gêneros (citados anteriormente) relatados na literatura como produtores de microcistina, objetivando o alcance da maioria da população produtora de microcistina. Rantala *et al.* (2004) também desenhou oligonucleotídeos iniciadores para esta região com este mesmo objetivo.

Com o uso de iniciadores *mcy* mais gerais não é possível identificar quais organismos (gêneros) são os responsáveis pela produção de toxina no ambiente trabalhado. No caso do



monitoramento, quantificar as cianobactérias produtoras de microcistina, de uma forma geral seria interessante já que fornece informações valiosas sobre determinado ambiente. No entanto, muitos métodos de monitoramento precisam ser gênero-específico, já que a diversidade de formas (unicelular, colonial ou filamentosa) e adaptações (aerótopos) das cianobactérias são enormes e essa identificação pode facilitar o monitoramento e controle destes organismos. Entretanto, algumas técnicas moleculares como DNA-Chip (RANTALA *et al.*, 2008), clonagem e seqüenciamento (JUNGBLUT & NEILAN, 2006) e RFLP (HISBERGUES *et al.*, 2003) ajudam nesta identificação, e podem auxiliar bastante se o objetivo do trabalho for esse.

Para o controle da presença de cianobactérias na água, ampliações da região gênica PC-IGS, foram realizadas. O operon PC possui uma região de espaço intergênico entre dois genes, *cpcB* e *cpcA*, que é uma região hipervariada e auxilia na identificação de diferentes linhagens de cianobactérias (BOLCH *et al.*, 1996; NEILAN *et al.*, 1995). O iniciador utilizado neste trabalho amplifica esta região gênica e foi descrito por Neilan *et al.* (1995). No entanto, não obtivemos amplificação em todas as amostras para esse gene apesar de encontrarmos cianobactérias em todas as amostras. Este iniciador é bastante utilizado por pesquisadores do mundo inteiro (NEILAN *et al.*, 1995; BARKER *et al.*, 1999; TILLET *et al.*, 2001; SILVA, 2006; ANJOS *et al.*, 2006; YOSHIDA *et al.* 2007, SAKER *et al.*, 2007; SHOBER *et al.* 2007), e problemas como os encontrados aqui já foram relatados em outros estudos também (SILVA, 2006). Este problema pode estar relacionado com o fato de que estes iniciadores foram construídos a partir de seqüências disponíveis no Genbank em 1995, cujo número era limitado e não incluía nenhuma linhagem de cepas brasileiras (SILVA, 2006).

O iniciador *cpc-B* desenhado neste trabalho para a PCR quantitativa, alcança uma região genômica do gene PC muito conservada e portanto atinge grande parte das cianobactérias presentes nas amostras. Entretanto, devido à dominância do picoplâncton no reservatório de Furnas, utilizamos este iniciador somente para algumas amostras e estes dados não foram levados em consideração na porcentagem da população tóxica do ambiente, já que os dados de *cpc-B* ficaram muito distantes dos dados do microscópio e a proporção de genótipos tóxicos no ambiente ficaram muito baixas.

Em nossos resultados quantitativos com o gene PC não encontramos correlação positiva com a contagem microscópica. Entretanto, Yoshida *et al.* (2008), em seu trabalho

com o gênero *Microcystis* encontraram essa correlação. Estes mesmos autores relataram, no entanto que os valores quantitativos do gene PC foram de 3 a 200 vezes maiores que os observados no microscópio. Em nossos resultados encontramos que a quantidade do gene PC foram de 2 a 90 vezes maiores que as quantidades de cianobactérias encontradas na contagem celular. Em um único caso encontramos essa contagem com uma amplitude 700 vezes maior. Isso pode estar ligado à metodologia de contagem do microscópio, que depende de características morfológicas e algumas células de cianobactérias coloniais podem se encontrar soltas das colônias (YOSHIDA *et al.*, 2008) ou mesmo as cianobactérias picoplancônicas podem não ter sido incluídas nas contagens, já que o método utilizado não é sensível para a contagem deste grupo. Outra possível explicação é que o alto número de cópias de gene PC detectados por q-PCR resultou de múltiplas cópias do genoma dentro da célula. De fato, análises fisiológicas já revelaram que células de *M. aeruginosa* têm várias cópias do gene durante a transição da fase logarítmica para a fase estacionária (KURMAYER & KUTZEMBERGER, 2003). Isso foi observado também para outras cianobactérias do gênero *Synechococcus* (BINDER & CHISHOLM, 1995).

Em nossas análises, os dados do número total de células de cianobactérias potencialmente tóxicas, apresentaram correlação positiva significativa ( $r = 0,22$ ) com a quantidade de genótipos *mcyD*. No entanto, a quantidade de gene *mcyD* encontrados foram quase sempre menores que a quantidade de células potencialmente tóxicas contadas no microscópio. Isso de certa forma já era esperado, já que a q-PCR quantifica somente as células produtoras de microcistina da população e sabe-se que essa é uma característica restrita a alguns indivíduos dentro da mesma população. Na represa de Furnas entretanto, não conseguimos encontrar um padrão para a relação de dominância de genótipos tóxicos com os não tóxicos, já que temos uma variação muito grande entre todas as amostras estudadas. Furukawa *et al.* (2006), entretanto, encontrou essa diferença em uma ou duas ordens de magnitude e verificou com isso que as cianobactérias não produtoras são dominantes nos lagos estudados por ele. Porém, Furukawa *et al.* (2006) admitiram a possibilidade de perda de material genético no procedimento de extração e também a existência de cepas tóxicas que não são detectadas pelo iniciador utilizado por ele. Estas possibilidades também existem no nosso trabalho. Também Lorenzi (2008) encontrou em sua comparação dos dados do microscópio e da q-PCR para *Microcystis* uma diferença significativa de ao menos 10 x entre ambas as quantificações.

Diferentemente do encontrado em nosso trabalho, o número de cópias de *mcyE* encontrados por Vaitomaa *et al.* (2003) foi de 2 a 200 vezes maior que o número de células encontrados no microscópio. Vaitomaa *et al.* (2003) explicaram estas diferenças através de possíveis erros de contagem, subestimando os valores reais totais ou então pela presença de múltiplos genomas em uma única célula, como já citado anteriormente. Esta quantificação maior de genótipos também foi relatada por Kumayer e Kutzenberger (2003), porém com amostras de cultura, com superestimação dos dados (10 vezes) por q-PCR verificada na transição entre a fase logarítmica e estacionária para genótipos *mcyB*.

### 5.5 Sensibilidade da q-PCR

Os iniciadores para utilização na PCR quantitativa (q-PCR) precisam ser pequenos (50-200pb) para serem mais eficientes. Geralmente a eficiência de amplificação decresce quando o tamanho do produto de amplificação aumenta (product instructions for lightCycler FastStart DNA master SYBR Green I Kit, Roche Diagnostics). Furukawa *et al.* (2006) encontraram um limite de detecção dez vezes menor, usando um amplicon de 190pb quando comparado com um de 1369pb. Os iniciadores, utilizados neste trabalho, são pequenos e, portanto confiáveis para a utilização na q-PCR.

Para o gene *mcyD*, foi utilizado o iniciador anti-senso (reverse) construído anteriormente para a PCR qualitativa e somente o iniciador senso (forward) foi substituído, reduzindo o amplicon em torno de 200pb. Para o gene *PC*, foi necessário desenharmos o par de iniciadores para a região *cpcB*, já que é uma região mais conservada e origina um produto de aproximadamente 80pb. No entanto, este iniciador foi utilizado somente no início do experimento, como explicado anteriormente, possivelmente devido à abundância do picoplâncton no reservatório.

A eficiência (Ef%) ideal para as curvas padrões construídas é de 100%, quando se assume a duplicação do produto em cada ciclo da PCR. Os iniciadores *mcyD* e o *cpcB*, utilizados aqui, se mostraram bastante eficientes, já que tiveram seu valor Ef% próximo a 100%, que é um pré-requisito para a correta determinação do *mcyD* nas amostras da represa de Furnas. Esta eficiência indica também que conseguimos contornar o problema de inibidores da PCR presentes nas amostras, verificados anteriormente através da PCR

convencional. Vaitomaa *et al.* (2003) conseguiram uma eficiência de 78 a 99% para iniciadores *mcyE* gênero-específicos para *Microcystis* e 86 a 94% para *mcyE* gênero-específicos para *Anabaena*, nos lagos estudados por eles. Já Lorenzi (2008) encontrou uma Ef% de 79% para o gene PC e 76% para o gene *mcyA*. Schober *et al.* (2007) mostraram em um estudo envolvendo vários laboratórios, que a Ef% da PCR depende do equipamento utilizado. Neste estudo eles encontraram uma variação de 76 a 81% de Ef% para o gene *mcyB* analisado e de 93 a 94% para o gene *cpcB*, em três diferentes equipamentos testados por eles. O aparelho Step One utilizado em nosso trabalho quantitativo é uma tecnologia recente e pode ter nos auxiliado na obtenção destes bons resultados, além dos reagentes e iniciadores de boa qualidade.

Kurmayer & Kutzenberger (2003) mostraram que cianobactérias produtoras de microcistina foram quantificadas com sucesso na faixa de 10 a 10<sup>4</sup> células por reação pela q-PCR, utilizando o *mcyB* para o gênero *Microcystis*. Essa faixa de quantificação é comparável ao encontrado no trabalho de Furukawa *et al.* (2006) e também ao trabalho desenvolvido aqui. Nos estudos de Yoshida *et al.* (2006), o limite de detecção encontrado para os genes *pc* e *mcyA* foram de 11 e 25 cópias/mL, respectivamente. Foulds *et al.* (2002) encontrou uma sensibilidade de detecção de 1 cel/mL para o gene *mcy* em amostras contendo *M. aeruginosa* e Lorenzi (2008) encontrou um limite de detecção de 100 cel/mL tanto para o gene *pc* quanto para o gene *mcyA*.

A análise de PCR em tempo real com Syber Green e a análise da curva de dissociação é uma técnica simples e confiável para a identificação de vários organismos (VARGAS & JAMES, 2005). O SYBR Green é uma molécula que se liga a qualquer fita dupla de DNA e a especificidade deste método pode ser melhorada pela análise da curva de dissociação. Geralmente esta análise confirma produtos únicos, sem variantes e/ ou formação de dímeros. Para ambos iniciadores utilizados, a verificação da curva de dissociação para as amostras padrões, nos revelou uma alta eficiência dos nossos iniciadores, já que apenas um tamanho de produto de amplificação e também a ausência de dímeros foram observados. Este resultado torna nossa análise quantitativa bastante confiável. Em estudos de Yoshida *et al.* (2008), a curva de dissociação para PC e *mcyA* mostraram-se também bastante eficientes, com picos de desnaturação de aproximadamente 89 e 86°C, respectivamente. Lorenzi (2008) também encontrou resultados bastante satisfatórios como seus iniciadores, pela análise da curva de dissociação.

A análise da curva de dissociação pode se tornar uma abordagem bem ampla e tem sido usada também para identificação em nível de espécies (NICOLAS *et al.*, 2002) e em outros casos para identificação a nível cepas de patógenos virais (VARGAS & JAMES, 2005). Em geral, a temperatura de desnaturação (TM) de cada amostra pode diferir pela concentração de GC e pelo comprimento das seqüências de nucleotídeos que apresentam, e a identificação do TM do produto pode ser muito importante. Em nosso trabalho quantitativo, utilizando *cpcB* em algumas amostras ambientais, obtivemos duas faixas de TM. Estes resultados podem indicar uma variação específica, já que nas amostras analisadas foram encontradas várias espécies e gêneros bem distintos de cianobactéria e o conteúdo de GC e também o tamanho do “amplicon” gerado pelo *cpcB* podem ser diferentes. O uso da curva de dissociação também seria uma abordagem futura bem interessante para trabalhos com identificação específica de cianobactérias tóxicas.

Algumas vantagens do uso do SYBR Green na q-PCR incluem fácil identificação de contaminantes ou fragmentos não específicos, custo e tempo reduzido para as análises (PAPIN *et al.*, 2004; VARGAS & JAMES, 2005). PCR em tempo real é uma forte ferramenta diagnóstica capaz de gerar rapidamente resultados confiáveis e reproduzíveis com reduzido risco de contaminação (MACKAY, 2004).

## **5.6 Porcentagem de Genes Tóxicos em Furnas**

Em Furnas todas as amostras foram encontradas contendo genótipos tóxicos, pela q-PCR e em 99% foram encontradas com microcistina. No entanto, a porcentagem destes genótipos em cada local da represa varia muito, e a quantidade de cepas tóxicas pode estar associada a um certo grau de trofia do reservatório, que poderia favorecer o crescimento de cianobactérias tóxicas ou não. Rantala *et al.* (2006), encontraram em seus estudos nos lagos da Finlândia, que 84% (usando iniciadores gerais) e 91% (usando iniciadores gêneros específicos) das amostras dos lagos continham genótipos produtores de microcistina. Também relataram que em lagos oligo e mesotróficos nem sempre foram encontrados genótipos tóxicos e que em lagos eutróficos e hipereutróficos estes organismos sempre eram encontrados.

A proporção dos genótipos *mcyD* foi determinada, em nosso trabalho, pelo quociente estabelecido entre o número total de células potencialmente produtoras de microcistina, obtidas na contagem microscópica e a quantidade total de *mcyD*, obtido através da q-PCR. Nesta abordagem, a porcentagem de genes tóxicos no reservatório de Furnas variou muito, desde valores abaixo de 1% até 100%. Todos os estudos encontrados na literatura utilizaram este quociente comparando o gene PC ao invés da contagem microscópica. Nossa intenção inicial também foi a de usar o PC, porém como nossa pretensão era abranger toda a comunidade produtora de microcistina, o uso do PC se tornou inviável, como já foi esclarecido anteriormente. Yoshida *et al.* (2008) encontraram que a taxa do número de cópias do genótipo *mcy* para o total da população foi de 0,5 a 7,7% no ano 2004 e 0,8 a 35% no ano de 2005. Em estudos anteriores, a PCR quantitativa competitiva com o *mcyA* mostrou que a proporção de genótipos de microcistina do total de *Microcystis* variou consideravelmente (YOSHIDA *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2005); Kurmayer & Kutzenberger (2003) mostraram uma dinâmica temporal de 1 a 38% para a ocorrência do gene *mcyB*, em populações naturais de *Microcystis* no lago Wannsee. Nos estudos de Yoshida *et al.* (2008), a taxa de *mcyA* na população total de *M. aeruginosa* variou de 0,5 a 47,1%.

Os resultados de Yoshida *et al.* (2008) mostraram que a proporção de *mcyA* na população total foi maior na primavera e no verão e indicaram que a abundância relativa da subpopulação produtora de microcistina muda ao longo do tempo e que populações produtoras de microcistina são competidoras com espécies não tóxicas durante o verão. De acordo com Carmichael & Gorham (1977, 1981) a toxicidade das florações é variável, devido à coexistência no mesmo nicho ecológico de linhagens tóxicas e não tóxicas. Coexistência de genótipos tóxicos e não-tóxicos numa mesma população já foi relatada, através de análises de PCR de presença e/ou ausência, nos reservatórios de Cantareira e Barra Bonita, São Paulo, Brasil (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003). Em nossos estudos esta coexistência também ficou bastante clara, e as razões para dominância de uma ou outra população ainda não são bem compreendidas.

Recentemente, Kurmayer & Kutzenberger (2003) reportaram que a abundância relativa de genótipos *mcyB* são sazonalmente estáveis durante a sucessão de *M. aeruginosa*, com baixas densidades no inverno e altas densidades no verão e não dependem de influências térmicas. Nossos resultados, no entanto, não mostraram nenhuma tendência sazonal cíclica da quantidade dos genótipos *mcyD* no ambiente. Somente no mês de Dezembro de 2006 tivemos

valores médios bastante elevados e em Fevereiro de 2008, valores médios extremamente baixos.

Alguns estudos revelaram variações dentro do genoma de cianobactérias, como mudanças na toxicidade de certas cepas (NEILAN *et al.*, 1997) e possíveis trocas de material genético (RUDI *et al.*, 1997). Comparações de estudos de registros fósseis com árvores filogenéticas dos genes *mcy* sugerem que esses genes já estavam presentes em ancestrais de todas cianobactérias heterocitadas e também são bastante antigos, com cerca de dois bilhões de anos (RANTALA *et al.*, 2004). Além do mais, é possível que alguns gêneros previamente relatados como não tóxicos, possam reter genes *mcy* e se tornarem aptos a produzirem microcistina (RANTALA *et al.*, 2004). Portanto não podemos desconsiderar a idéia de que o potencial de muitas cianobactérias para a produção de toxinas seja ainda desconhecido.

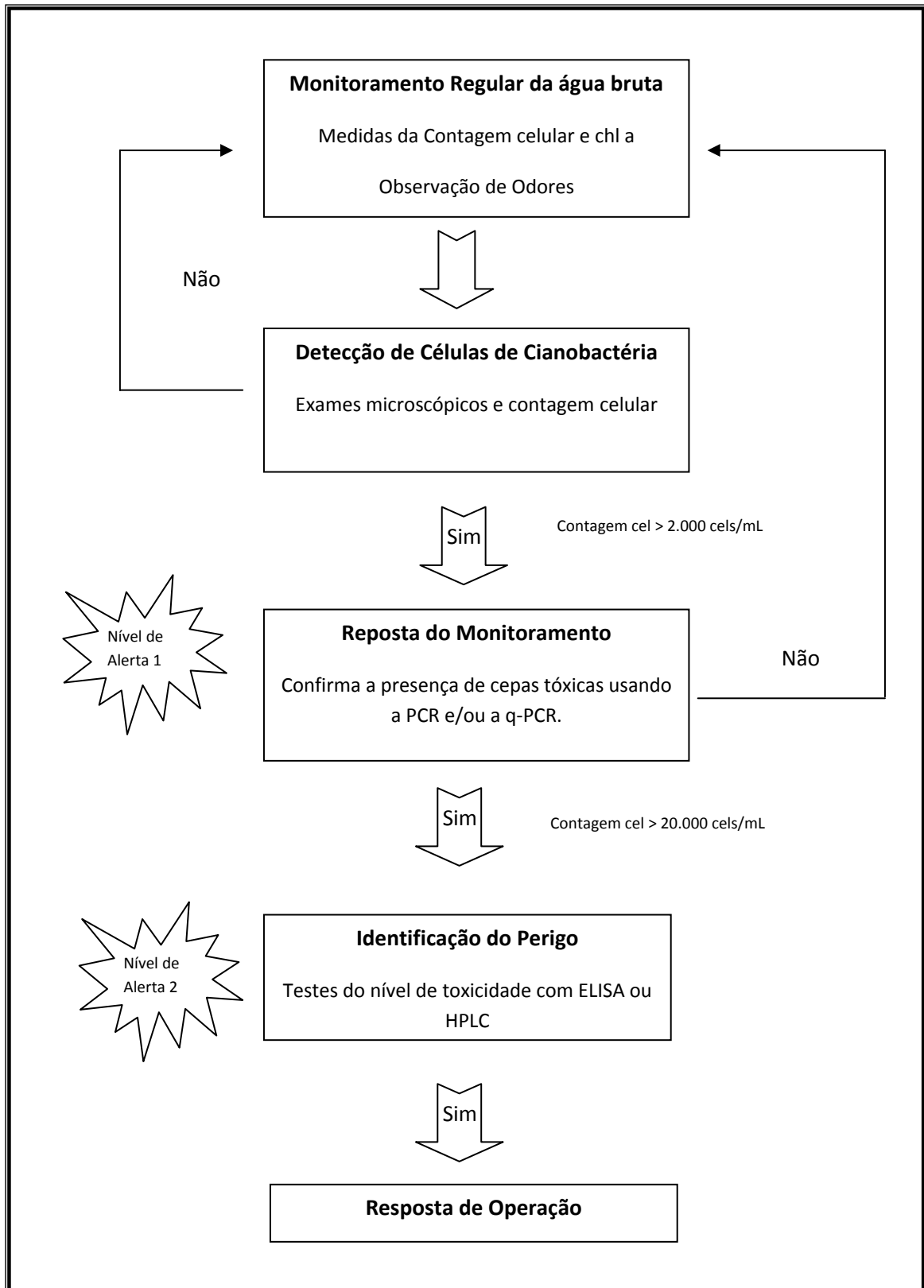
### **5.7 Sensibilidade dos Métodos e Viabilidade no Monitoramento Ambiental**

Os métodos de detecção de microcistina utilizados neste trabalho foram bastante sensíveis. No entanto a q-PCR foi a mais sensível de todas já que conseguiu detectar genótipos tóxicos em 100% das amostras analisadas, enquanto que a PCR convencional conseguiu detecção de 84% e o método ELISA detectou microcistina em 99% das amostras. Oberholster *et al.* (2008) encontrou em seu estudos que métodos baseados na PCR são altamente sensíveis na detecção de cepas tóxicas, mesmo a baixas concentrações celulares. Hawkins *et al.* (2005) recentemente avaliaram os métodos para identificação do alto risco da microcistina em ambientes aquáticos, usando *mcyA*, ELISA, PP1 e HPLC durante uma pesquisa em sistemas aquáticos na Austrália temperada e Tailândia tropical. Eles concluíram que de todos os métodos listados, ELISA foi o melhor por sua superior especificidade para microcistina. Eles encontraram que a PCR convencional é altamente sensível, mas encontraram três resultados com falso negativos quando utilizaram somente iniciadores específicos pra *mcyA*. O PP1 foi menos específico que ELISA apesar de ser mais barato e o HPLC foi citado como método mais trabalhoso e caro e também menos sensível que o ELISA. Ainda, a tecnologia baseada na PCR possuem preços razoáveis (~ \$5,00/reacção) e a presença de cianobactérias podem ser detectadas facilmente.

Lorenzi (2008) avaliou os custos operacionais da q-PCR e da técnica de Utermöhl e encontrou que a técnica de q-PCR torna-se bastante viável economicamente quando se tem a necessidade de análises rápidas e em grande escala. Kurmayer e Kutzenberger (2003) relatam ainda que o tempo necessário para a contagem em microscópio invertido, intensa mão de obra e maior grau de formação do analista, tornam essa técnica desvantajosa com relação a técnica de q-PCR, que exige menos tempo e mão de obra qualificada.

Oberholster *et al.* (2008) criou um interessante modelo que consiste em uma estrutura de monitoramento de avaliação preventiva do risco de cianobactéria (Fig. 25). A estratégia proposta implica no monitoramento de células vinculadas a cianotoxinas, concentração total de cianotoxinas e a presença de células potencialmente produtoras de toxinas. A estratégia permite uma detecção mais cedo (com um DNA de boa qualidade a sensibilidade pode ser de  $10 \text{ cels.mL}^{-1}$ ) e medidas preventivas, já que as cianotoxinas são solúveis na água, dificultando e tornando onerosa sua retirada em processo de purificação da água.





**Fig. 25** - Plano de Monitoramento de Cianobactéria, adaptado de Oberholster et al. (2008) usando a contagem celular e a PCR como indicadores primários da qualidade da água.

## 6.0 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou a grande importância dos estudos moleculares juntamente com a avaliação dos parâmetros ambientais para o entendimento da toxidez de cianobactérias no ambiente. Alguns fatores ambientais foram correlacionados com a quantidade de genótipos *mcyD* e isso pode ajudar em direcionar o controle destes fatores para prevenção do aparecimento de cianobactérias tóxicas.

Abordagens moleculares podem ser mais vantajosas na identificação de cianobactérias tóxicas do que as técnicas convencionais (microscópio, testes biológicos, bioquímicos ou químicos), já que são rápidas e bastante sensíveis. Entretanto, as técnicas convencionais ainda auxiliam bastante no entendimento de vários fatores envolvidos na produção da microcistina.

A análise microscópica nos possibilitou identificar e caracterizar o ambiente de Furnas e também identificar problemas encontrados nestas amostras, como dominância ou ausência de certos grupos de cianobactérias. No entanto, a quantificação de espécies picoplantônicas não pode ser realizada nesta análise. A técnica de microscopia exige muita experiência e tempo de quem tiver analisando. Além do mais, existem cepas tóxicas e não tóxicas dentro da mesma população e isso não pode ser identificado no microscópio. Por outro lado, ainda é uma técnica bastante necessária por auxiliar na compreensão dos dados moleculares.

Os dados obtidos com o teste ELISA também nos auxiliaram na compreensão de alguns dados moleculares e ambientais, já que apesar da correlação positiva significativa destes dados com a quantidade de genótipos *mcyD* no ambiente, em alguns momentos (pontos e períodos estudados) essa relação foi muito baixa ou inexistente, indicando a existência de fatores ambientais que possam controlar a transcrição ou tradução do gene.

A tecnologia da PCR em tempo real é um método extremamente eficiente e sensível para uma detecção quantitativa de genótipos *mcy* em amostras ambientais e a detecção de cianobactérias pela PCR qualitativa ou quantitativa pode auxiliar como um método de alerta precoce de uma floração tóxica e também na detecção da presença de produtores de microcistina presentes em baixas concentrações nas amostras. Quando comparado com outros métodos com relação ao tempo envolvido para mensurar a concentração de microcistina, a Q-PCR não consome muito tempo e não exige muito esforço. O método pode ser usado para estimar fácil e rapidamente a toxicidade das amostras ambientais.

Em um futuro próximo, este método poderá fornecer informações valiosas dos organismos produtores de microcistina. Por ser quantitativo, pode ser associado a outros parâmetros ambientais, sugerindo novas hipóteses de quais fatores estariam promovendo a seleção de cianobactérias tóxicas e especialmente porque ocorrem florações tóxicas. No caso em que vários produtores são encontrados nas amostras ambientais, esta técnica poderá revelar qual o organismo é o maior produtor. Isso pode ter grande importância para o monitoramento de água, onde esquemas de mitigação são necessários e diferenciados por grupos. Por exemplo, *Microcystis* e cianobactérias fixadoras de nitrogênio como a *Anabaena* ou as adaptadas a pouca luz como *Planktothrix* ou *Cylindrospermopsis*, cada gênero requer diferentes abordagens (SIVONEN, 2008).

Contudo, a detecção de cianobactérias tóxicas por métodos moleculares representa uma ferramenta poderosa para análises de rotina em ecossistemas aquáticos, capaz de antecipar ações corretivas auxiliares no controle, embora estudos complementares de outras variáveis ambientais e biológicas ainda são imprescindíveis.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS, F. M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; ZATAC, M. P. ; HILLEN, S.; CHRISTIAN, B.; ERLER, K.; LUCKAS, B.; PINTO, E. Detection of harmful cyanobacterial and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. **Toxicon**, v. 48, p. 239-245, Jun. 2006.

APHA (American Public Health Association). Standard methods for the examination of water and wastewater, **American Public Health Association Publications**, Washington DC. Ed. 19<sup>th</sup>, 1995.

ARMENT, A. R., CARMICHAEL, W. W. Evidence that microcystin is a thiotemplate product. **J Phycol.**, v. 32, p. 591–597, abr. 1996.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. **Resumos do IV Simpósio da Soc. Bras. de Toxinol.**, 1996, Recife, Pe., p. 83.

BECKER, S., PETER, B., RALFH, O., ANNELIESE, E. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. **Appl. Env. Microbiol.** v. 66, p. 4945-4953, nov. 2000.

BAKER, J. A., ENTSCH, B., NEILAN, B.A., MCKAY, D.B. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n.12, p. 6070-6076, Dez 2002.

BINDER, L. E., CHISHOLM, S.W. Cel cycle regulation in marine *Synechococcus* sp. strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 2, p. 708-717, feb. 1995.

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

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. ; OLIVEIRA, M. C.; YUNES, J. S. Cianobactérias tóxicas: o uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, Brasília, v. 23, p. 44-47, dez. 2001.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., CUNHA, M. C. C. MOURA, A. N. Genetic polymorphism in Brazilian *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) toxic and non-toxic through RFLP-PCR of the *cpcBA*-IGS. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. xx, p. y-w, 2008.

BOARU, D. A., N. DRAGOȘ, M. WELKER, A. BAUER, A. NICOARĂ, AND K. SCHIRMER. Toxic potential of microcystin-containing cyanobacterial extracts from three Romanian freshwaters. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 925-932, mar. 2006.

BOLCH, C. J.; BLACKBURN, S. I.; NEILAN, B. A.; GREWE, P. M. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* Intergenic Spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, Malden, v. 32, p. 445-451, 1996.

BRANT, Bruna. **Detecção de *mcyA* no Reservatório de São Simão/Cemig Através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)**. 2007. 74p. Dissertação (mestrado em Biologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

BRASIL. Portaria nº 518, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do BRASIL**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. 70 p.

BRYANT, D. A. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 128, p. 835-844, 1982.

CALIJURI, M. C. AND SANTOS, A. C. A. Short-term changes in the Barra Bonita reservoir (São Paulo, Brazil): emphasis on the phytoplankton communities. **Hydrobiologia**, v. 330, nº 3, p. 163–175, set. 1996.

CALIJURI, M. C., DEBERDT, G. L. B. AND MINOTI, R. A produtividade primária pelo fitoplâncton na represa de Salto Grande (Americana – SP). In HENRY, R. (ed.), **Ecologia de Reservatórios: Estrutura, Função e Aspectos Sociais**. FAPESP, FUNABIO, 1999. p. 109–148.

CALIJURI, M.C. AND SANTOS, A.C.A. Temporal variations in phytoplankton primary production in a tropical reservoir (Barra Bonita, SP – Brazil). **Hydrobiologia**, v. 44, p. 11–26, feb. 2001.

CAMPOS, Camila Aida. **Estudo da diversidade de Cyanobacteria do reservatório de Furnas (MG, Brasil) por meio de caracterização morfológica e molecular**. 2008. 81p. Dissertação (mestrado em Ecologia Conservação e Manejo da Vida Silvestre) – Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P.R. Factors influencing the toxicity and animal susceptibility of *Anabaena flos-aquae* (cyanophyta blooms). **Journal of Physiology**, Paris, v. 13, nº 2, p. 97-101, 1977.

CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: CARMICHAEL, W. W. (Ed.). **The Water Environmental: Algal Toxins and Health**. New York: Plenum Press, 1981, p. 161-172.

CARMICHAEL, W.W. Toxic *Microcystis* and the environment. In: WATANABE, HARADA, K.I., CARMICHAEL, W.W. AND FUJIKI, H. **Toxic Microcystis**. CRC Press, Boca Raton, 1996. p.1-11.

CARMICHAEL W.W. The toxins of cyanobacteria. **Sci Am**. v. 270, p. 78-86, jan. 1994.

CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J. T. et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. p. 1710-1799.

CHORUS, I. Cyanotoxin occurrence in freshwaters – a summary of survey results from different countries. (2001). p. 75-82. In Chorus, I. (ed.). **Cyanotoxins - occurrence, causes, consequences**. Springer-Verlag. Berlin.

- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health, consequences, monitoring and management.** London: E & FN Spon, 1999. 416 p.
- CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BORNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin Biosynthesis in Planktothrix: Genes, Evolution, and Manipulation. **Journal of Bacteriology**, Germany, v. 185, n. 2, p.564-572, jan. 2003.
- COSTA, H. H. & SILVA, P. R. Limnological research and training in Sri Lanka: state of the art and future needs. In GOPAL, B. & R. G.Wetzel (eds), **Limnology in Developing Countries.** SIL, Índia. 1995. p. 1–39.
- DITTMANN, E.; ERHARD, M.; KAEBERNICK, M.; SCHELER, C.; NEILAN, B. A.; DOHREN, H. V.; BORNER, T. Altered expression of two lighth-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Microbiology**, v. 147, p. 3113-3119, 2001.
- DITTMANN, E., K. MEIßNER, AND T. BÖRNER. Conserved sequences of peptide synthetase genes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Phycologia**, v. 35, p.62-67. 1996.
- DITTMANN, E.; NEILAN, B. A.; ERHARD, M.; VON DÖRHEN, H.; BÖRNER, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Mol. Biol.**, v. 26, p. 779-787, 1997.
- DOMINGOS, P., RUBIM, T.K., MOLICA, R.J.R., AZEVEDO, S.M.F.O., AND CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeastern Brazilian drinking water supply. **Environ. Toxicol.** v. 14, p. 31–35, jan. 1999.
- DUY, T. N., LAM, P.K.S., SHAW, G.R., CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue–green algal) toxins in water. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 163, p.113–185, 2000.
- FIGUEREDO, Cleber Cunha AND GIANI, Alessandra. Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. **Hydrobiologia**, v. 445, p. 165–174, jan. 2001.
- FOULDS, I. V., GRANACKI, A., XIAO, C., KRULL, U. J., CASTLE, A. AND HORGAN, P. A. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E.coli* in water by 5'-nuclease PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 825-834, 2002.
- FRAY, P. The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria). **Studies in biology**, Institute of Biology: no 160 (1st ed). Edward Arnold Ltd, London. p. 5– 83, 1983.
- FUNASA. **Cianobactérias Tóxicas: Impactos na Saúde Pública e processos de remoção em água para o consumo humano.** Brasília, DF, 2003.
- FURUKAWA, K., NODA, N., TSUNEDA, S., SAITO, T., ITAYAMA, T., AND INAMORI, Y. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. **J. Biosc. Bioeng.** v. 102, n. 2, p. 90-96, aug. 2006.

- GIANI, A., PINTO-COELHO, R. M., OLIVEIRA, S. J. M. & PELLI, A. Ciclo sazonal de parâmetros físico-químicos da água e distribuição horizontal de nitrogênio e fósforo no Reservatório da Pampulha (Belo Horizonte, MG, Brasil). **Cienc. Cult.** V. 40, n.1, p. 69–77, 1988.
- GIANI, A., BIRD, D.F., PRAIRIE, Y.T., LAWRENCE, J.F. Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. **Can J Fish Aquat Sci**, v 62. p. 2100-2109, 2005.
- GOBLER, C. J., T. W. DAVIS, K. J. COYNE, AND G. L. BOYER. Interactive influences of nutrient loading, zooplankton grazing, and microcystin synthetase gene expression on cyanobacterial bloom dynamics in a eutrophic New York lake. **Harmful Algae**, v. 6, n. 1, p. 119-133, jan. 2007.
- GUILLARD, R. R. L. & LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllidae C<sup>1,2</sup>. 1972. **J. Phycol**, v. 8, p. 10-14.
- GUNKEL, G., LANGE, U, WALDE, D AND ROSA, J. W. C. Environmental Impact of an Amazon Reservoir, Curuá-Una /Pará: Limnological Aspects. German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems – **Achievements and Prospects of Cooperative Research**. Hamburg, 3-8, September 2000.
- HARADA, K.-I., F. KONDO, AND L. LAWTON. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: I. CHORUS AND J. BARTRAM (ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management**. E & FN Spon, London, United Kingdom. 1999. p.369-405.
- HAWKINS PR, NOVIC S, COX P, NIELAN BA, BURNS BP, SHAW G, WICKRAMASINGHE W, PEERAPORPISAL Y, RUANGYUTTIKARN W, ITAYAMA T, SAITOU T, MIZUOCHI M, INAMORI Y. A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment. **Journal of Water supply, Research and Technology –AQUA**. v. 54, n.8, p. 509-518, 2005.
- HILBORN, E.D., CARMICHAEL, W.W., YUAN, M., AZEVEDO, S.M.F.O. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. **Toxicon**, v. 46, n. 2, p. 218-221, aug. 2005.
- HISBERGUES, M.; GUNTRAM, C.; ROUHIAINEM, L.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. **Arch. Microbiol.**, v. 180, p. 402-410, dec. 2003.
- HOOKER, E. & S. HERNANDEZ, Phytoplankton biomass in Lake Xolotlan (Managua): its seasonal and horizontal distribution. **Hydrobiol. Bull.** v. 25, n. 2, p. 125–131, 1991.
- HOTTO, A., SATCHWELL, M., AND BOYER, G. Seasonal production and molecular characterization of microcystins in Oneida Lake, New York, USA. **Environ. Toxicol.** V. 20, p.243-248, may 2005.
- HOTTO, A., SATCHWELL, M., AND BOYER, G. Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 73, p. 4570-4578, july 2007.

HUSZAR, V. L.M. & REYNOLDS, C. S. Phytoplankton periodicity and sequences of dominance in an Amazonian flood-plain lake (Lago Batata, Pará, Brazil): responses to gradual environmental change. **Hydrobiologia**, v. 346, p. 169–181, mar. 1997.

IZAGUIRREA, G.; JUNGBLUT, A. D. B.; NEILAN, B. A. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. **Water Research**, v. 41, p. 492–498, 2007.

JUNG, R., SOONDRUM, K. AND NEUMAIER, M. Quantitative PCR. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**, v. 38, n. 9, p. 833–836. 2000.

JUNGBLUT, A.-D., AND B. A. NEILAN. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. **Arch. Microbiol.** v. 185, p. 107-114, 2006.

KAEBERNICK, M., B. A. NEILAN, T. BÖRNER, AND E. DITTMANN. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 3387-3392, may 2000.

KAEBERNICK, M., T. ROHRLACK, K. CHRISTOFFERSEN, AND B. A. NEILAN. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. **Environ. Microbiol.**, v. 3, p. 669-679, nov. 2001.

KAEBERNICK, M. et al. Multiple alternative transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 449-455, feb. 2002.

KNIGHT, A; NAKASUGI, K.; NEILAN, B. Lateral Gene Transfer and Cyanobacterial Toxicity. School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, UNSW. Disponível em <http://www.water.unsw.edu.au/symposium0705/presentations/10.%20Alex%20and%20Kenle.pdf>.

KOMAREK, J; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1: Chroococcales. In: Ettl, H., Gardner, G., Heynig, H. AND Mollenheuer, D. **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Gustav Fischer, Jena, 2000. v.19, p.1-548.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASHOF, K. (ed.) **Methods of Seawater Analysis**. Verlag Chemie Weinheim, 1976. p.117-181.

KREADER, C. A. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Appl Environ Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 1102–1106, march 1996.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; CHORUS, I. The Abundance of Microcystin-Producing Genotypes Correlates Positively with Colony Size in *Microcystis* sp. and Determinates Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 787-795, fev. 2003.

KURMAYER, R., E. DITTMANN, J. FASTNER, AND I. CHORUS. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). **Microb. Ecol.** v. 43, p. 107-118, jan. 2002.



KURMAYER, R., G. CHRISTIANSEN, J. FASTNER, AND T. BÖRNER. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. **Environ. Microbiol.** v. 6, p.831-841, 2004.

KURMAYER, R.; KUTZENBERGER, T. Application of Real-Time PCR for Quantification of Microcystin Genotypes in a Population of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, n. 11, p. 6723–6730, nov. 2003.

LORENZI, A. S. **Implementação da técnica de qPCR para o monitoramento de Microcystis e genótipos potencialmente produtores de microcistinas.** 2008. 172f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

LORENZI, A. S. **Abordagens Moleculares para Detectar Cianobactérias e seus Genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil.** 2004. 92f. Dissertação (mestrado em ciências, área de concentração: energia nuclear na agricultura) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

LUKAC M, AEGERTER R (1993) Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 293–305, mar. 1993.

LUND, J. W. G., KIPLING, C. AND LE CREN, E. D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. **Hydrobiologia**. v. 11, n. 2, p. 143-170, april 1958.

LYCK, S. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. **J. Plankton Res.** v. 26, n. 7, p. 727–736, mar. 2004.

MACKAY, IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin Microbiol Infect.** v. 10, n. 3, p.190-212, Mar 2004.

MAIA-BARBOSA, PM., PEIXOTO, RS. AND GUIMARÃES, AS. Zooplankton in littoral waters of a tropical lake: a revisited biodiversity. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 4 Suppl, p. 1069-1078, nov. 2008.

MANKIEWICZ-BOCZEK, J., K. IZYDORCZYK, Z. ROMANOWSKA-DUDA, T. JURCZAK, K. STEFANIAK, AND M. KOKOCINSKI. Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods. **Environ. Toxicol.** v. 21, p.380-387, jul. 2006.

MARGALEF, R. Diversity and biodiversity – their possible meaning in relation with the wish for sustainable development. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 66 (supl. 1), p. 3–12, 1994.

MARTIN-LUNA, B., SEVILLA, E., HERNANDEZ, J. A., BES, M. T., FILLAT, M. F., AND PELEATO, M. L. Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Phytochem.** v. 67, n. 9, p.876-881, may 2006.

MBEDI, S., M. WELKER, J. FASTNER, AND C. WIEDNER. Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). **FEMS Microbiol. Lett.** v. 245, p.299-306, mar. 2005.

- MIKALSEN, B., BOISON, G., SKULBERG, O. M., FASTNER, J., DAVIES, W., GABRIELSEN, T. M., RUDI, K. & JAKOBSEN, K. S. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. **J Bacteriol**, v.185, n. 9, p. 2774–2785, may 2003.
- MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **An. Chim. Acta.**, v. 27, p. 31-36, 1962.
- NEILAN, B. A., PEARSON, L.A, MOFFITT, M.C, MIHALI, K.T, KAEBERNICK, M., KELLMANN, R., POMATI, F. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: HUDNELL, H. K. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. v. 619, 2008, United States Environmental Protection Agency, USA. Cap 17, p. 416-452.
- NEILAN, B. A., D. JACOBS, T. DEL DOT, L. L. BLACKALL, P. R. HAWKINS, P. T. COX, AND A. E. GOODMAN. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.47, p.693-697. 1997.
- NEILAN, B. A.; DITTMANN, E.; ROUHIAINEN, L.; BASS, R. A.; SCHAUB, V.; SIVONEN, K.; BORNER, T. Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxicity of Cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 13, p. 4089-4097, jul. 1999.
- NEILAN, A. B. Identification and Phylogenetic Analysis of Toxic Cyanobacteria by Multiplex Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2286-2291, jun. 1995.
- NICOLAS, L., MILON, G., PRINA, E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. **J. Microbiol. Methods**, v. 51, p. 295–299, 2002.
- NISHIZAWA, T., M. ASAYAMA, K. FUJI, K.-I. HARADA, AND M. SHIRAI. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. **J. Biochem.** v. 126, n.3, p.520-529, set. 1999.
- NISHIZAWA, T., A. UEDA, M. ASAYAMA, K. FUJI, K.-I. HARADA, K. OCHI, AND M. SHIRAI. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. **J. Biochem.** v. 127, p. 779-789, 2000.
- NISHIZAWA T, ASAYAMA M, SHIRAI M. Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. **Microbiol**, v. 147, n.5, p.1235–1241, 2001.
- NOGUEIRA, Marcos Gomes. Phytoplankton composition, dominance and abundance as indicators of environmental compartmentalization in Jurumirim Reservoir (Paranapanema River), São Paulo, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 431, n. 2-3, p. 115–128, jul. 2000.
- NONNEMAN, D., & ZIMBA, P. V. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. **J. Phycol.** v. 38, n. 1, p.230-233, 2002.
- NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Arch.Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.** v. 14, p.14-36. 1980.

OBERHOLSTER, ANA-MARIA BOTHA- & OBERHOLSTER, PAUL JOHAN. **Pcr Based Markers for Detection and Identification of Toxic Cyanobacteria**. Report to the Water Research Commission. marc 2008. Disponível em <http://www.wrc.org.za/downloads/report%20lists/web%20rpts/potable/1502-web.pdf>. Acesso em 20 dez 2008.

OBERHOLSTER, P. J., BOTHA, A. M., AND GROBBELAAR, J. U. *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water. **Afr. J. Biotechnol**, v. 3, p.159-168, dec. 2003.

OLIVEIRA, M. C. B.; OLIVEIRA, M. C.; YUNES, J. S. **Cianobactérias Tóxicas**. Disponível em < [www.biotecnologia.com.br/bio/bio23/7.htm](http://www.biotecnologia.com.br/bio/bio23/7.htm)>. Acesso em 10 nov. 2002.

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 Academic Publishers, 2000. p. 149-194.

ORR, P. T. & JONES, G. J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. **Limnol. Oceanogr**. v. 43, p. 1604-1614, 1998 .

OUAHID, Y., PÉREZ-SILVA, G., AND DEL CAMPO, F. F. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. **Environ. Toxicol**. v. 20, p.235-242, 2005.

OUDRA, B., LOUDIKI, M., VASCONCELOS, V., SABOUR, B., SBIYYAA, B., OUFDOU, K., AND MEZRIOUI, N. Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. **Environ. Toxicol**., v . 17, n. 32–39, jan. 2002.

OUELLETTE, A. J. A., S. M. HANDY, AND S. W. WILHELM. 2006. Toxic *Microcystis* is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities. **Microb. Ecol**. v. 51, p.154-165.

OUELLETTE, Anthony JA; WILHELM, Steven W. Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 7, p. 359 – 366, 2003.

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

PAPIN, J.F., VAHRSON, W., DITTMER, D.P. SYBR Green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability. **J. Clin. Microbiol**. v. 42, p. 1511–1518, 2004.

RANTALA A., D.P. FEWER, M. HISBERGUES, L. ROUHIAINEN, J. VAITOMAA, T. BÖRNER, AND K. SIVONEN. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v. 101, n. 1, p. 568-573, jan. 2004.

RANTALA, A.; RAJANIEMI-WACKLIN; C. LYRA; L. LEPISTÖ; J. RINTALA; J. MANKIEWICZ- BOCZEK; K. SIVONEN. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*)

PCR and associations with environmental factors. **Environ. Microbiol.**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6101-6110, 2006.

RANTALA, ANNE. **Evolution and Detection of Cyanobacterial Hepatotoxin Synthetase Genes**. Academic Dissertation in Microbiology, Department of Applied Chemistry and Microbiology Division of Microbiology, Faculty of Agriculture and Forestry and Viikki. Helsinki, 2007. 54 p.

RANTALA A., E. RIZZI, B. CASTIGLIONI, G. DE BELLIS, AND K. SIVONEN. Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip. **Environ Microbiol.** v.10, n. 3, p. 653-64, mar. 2008

RAPALA J, ERKOMAA K, KUKKONEN J, SIVONEN K, LAHTI K. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. Comparison of methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, p.213-231, 2002.

RAPALA, J.; SIVONEN, K.; LYRA, C.; NIEMELA, S.I. Variation of microcystins cyanobacterial hepatotoxins in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.6, p.2206-2212, 1997.

RINTA-KANTO, J. M., AND WILHELM, S. W. Diversity of microcystin-producing cyanobacteria in spatially isolated regions of Lake Erie. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p. 5083-5085, 2006.

RINTA-KANTO JM, OUELLETTE AJA, BOYER GL, TWISS MR, BRIDGEMAN TB, WILHELM SW. Quantification of toxic *Microcystis* spp during the 2003 and 2004 blooms in Western Lake Erie using quantitative real-time PCR. **Environ Sci Technol**, v. 39, p. 4198-4205, 2005.

ROSET, J.; AGUAYO, S.; MUÑOZ, M. J. Detección de Cianobacterias y sus Toxinas: Una Revisión. **Toxicol**, Madrid, v. 18, p. 65-71, 2001.

ROUHIAINEN, L., SIVONEN, K., BUIKEMA, W. J., AND HASELKORN, R. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 6021-6026, 1995.

ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIANEN, H.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes Encoding Synthetases of Cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* Strain 90. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 156-167, abr. 2000.

RUDI, K.; SKULBERG, OM.; LARSEN, F.; AND JAKOBSEN, KS. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2593-2599, jul. 1997.

SAKER, M. L.; FASTNER, J.; DITTMANN, E.; CHRISTIANSEN, G., AND VASCONSELOS, V. M. Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, p. 749-757, 2005a.

SAKER, M. L.; FASTNER, J.; DITTMANN, E.; CHRISTIANSEN, G., AND VASCONCELOS, V. M. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. **Toxicon** v. 46, p.555-562, 2005b.

SAKER, M. L., VALE, M., KRAMER, D., AND VASCONCELOS, V. M. Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 75, p. 441-448, 2007a.

SAKER, M. L., WELKER, M., AND VASCONCELOS, V. M. Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 73, p. 1136-1142, 2007b.

SALOMON, P. S., YUNES, J. S., PARISE, M., COUSAN, J. C. B. Toxicidade de um Extrato de *Microcystis aeruginosa* da Lagoa dos Patos sobre Camundongos e suas Alterações sobre o Tecido Hepático. **Vitalle**, v. 8, p. 23-32, 1996.

SANT'ANNA, C. L., AZEVEDO, M.T.P., SENNA, P.A.C, KOMAREK, J. AND KOMARKOVA, J. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasil. Bot.**, v.27, n.2, p.213-227, abr.-jun. 2004.

SEVILLA, E.; LUNA, B. M.; VELA, L.; BES, M. T.; FILLAT, M.F.; e PELEATO, M. L. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Spain. Environmental Microbiology.** v. 10 (10), p. 2476–2483, 2008.

SCHOBER, E., M. WERNDL, K. LAAKSO, I. KORSCHINECK, K. SIVONEN, AND R. KURMAYER. Interlaboratory comparison of Taq nuclease assays for the quantification of the toxic cyanobacteria *Microcystis* sp. **J. Microbiol. Meth.**, v. 69, p.122- 128, 2007.

SILVA, C. S. P. **Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais.** 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.; NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K. L.; DAHLEM, A. M.; NIEMELA, S. I. Isolation and Characterization of Hepatotoxic Microcystin Homologs from the Filamentous Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain 152. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2650-2657, jun. 1990.

SIVONEN, K. & JONES, G. Cyanobacterial toxin. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacterial in water.** A guide to their public health consequences, monitoring, and management. London: Spoon. 1999. chap. 3, p. 41-111.

SIVONEN, Karina. Emerging high throughput analyses of cyanobacterial toxins and toxic cyanobacteria. In: HUDNELL, H. K. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs.** United States Environmental Protection Agency, USA, v. 619, 2008, Cap 24, p.539-557.

SONG, L., SANO, T., LI, R., WATANABE, M.M., LIU, Y., KAYA, K. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. **Phycol Res**, v. 46, p 19-23, 1998.

STANIER RY & COHEN-BAZIRE G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annu Rev Microbiol**, V. 31, p. 225-274, 1977.

TANABE, Y., K. KAYA, AND M. M. WATANABE. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. **J. Mol. Evol.** v. 58, p. 633-641, 2004.

TILLET, D.; PARKER, D.; NEILAN, B. A. Detection of Toxicogenicity by a Probe for the Microcystin Synthetase A Gene (*mcyA*) of the Cyanobacterial Genus *Microcystis*: Comparison of Toxicities with 16S rRNA and Phycocyanin Operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) Phylogenies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2810-2818, jun. 2001.

TILLET, D. E.; DITTMANN, M; ERHARD, H; VON DOHREN, T.; BOERNER; B. A. NEILAN. 1999. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chem. Biol.** v. 7, p. 753-764.

TILLET, D. et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry and Biology**, London, v. 7, p. 753-764, 2000.

UTHERMOHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. **Mit. Ins. Ver. Limnol.**, v. 9, p. 1-38, 1958.

VAITOMAA J, RANTALA A, HALINEN K, ROUHIAINEN L, TALLBERG P, MOKELKE L & SIVONEN K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for microcystis and anabaena in lakes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 7289-7297, 2003.

VALASEK, M. A. & REPA J. J. The power of real-time PCR. **Adv Physiol Educ**, v. 29, p.151-159, 2005.

VAN DER WESTHUIZEN AJ & ELOFF JN. Effects of temperature and light on toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*[UV-006]. **Planta.** v.163, p. 55-59, 1985.

VARGAS, A & JAMES, D. Real – Time PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon Size, melt rate, and dye translocation. **J Virol Methods.** v. 132, n.1-2, p.146-53, mar. 2006.

VEZIE, C., L. BRIENT, K. SIVONEN, G. BERTRU, J.-C. LEFEUVRE, AND M. SALKINOJA-SALONEN. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). **Microb. Ecol.** v. 35, p. 126-135, 1998.

VEZIE, C.; RAPALA, J.; VAITOMAA, J.; SEITSONEN, J.; SIVONEN, K. Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Nontoxic *Microcystis* Strains and on Intracellular Microcystin Concentrations. **Microb Ecol**, France, v. 43, p. 443-454, abr. 2002

VIA-ORDORIKA, L., J. FASTNER, R. KURMAYER, M. HISBERGUES, E. DITTMANN, J. KOMAREK, M. ERHARD, AND I. CHORUS. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of

microcystins and microcystin genes in individual colonies. **System. Appl. Microbiol.** v. 27, p. 592-602, 2004.

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

WHITTON, B. A. & POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In **The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-11.

WHO. **Guidelines for safe recreational water environments**. Volume 1, Coastal and fresh waters. 2003. Chapter 8, Algae and cyanobacteria in fresh water. Geneva, World Health Organization.

WIEDNER, C.; VISSER, P. M.; FASTNER, J.; METCALF, J. S.; CODD, G. A.; LUUC R. MUR. Effects of light on the microcystin content of *microcystis* strain PCC7806. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1475-1481, 2003.

WILSON, A. E., O. SARNELLE, B. A. NEILAN, T. P. SALMON, M. M. GEHRINGER, AND M. E. HAY. Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 6126-6133, 2005.

WILSON, K.M., SCHEMBRI, M.A., BAKER, P.D., SAINT, C.P. Molecular Characterization of the Toxic Cyanobacterium *Cylindropermopsis reciborskii* and Design of a Species – Specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 332-338, jan. 2000.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; KASHIMA, A., TAKASHIMA, Y., HOSODA, N., NAGASAKI, K.; AND HIROISHI, S. Ecological Dynamics of the Toxic Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and Its Cyanophages in Freshwater. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3269–3273, May 2008.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; HOSODA, N.; AND HIROISHI, S. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 266, p. 49-53, 2007.

YOSHIDA, M., T. YOSHIDA, Y. TAKASHIMA, R. KONDO, AND S. HIROISHI. Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata. **Environ. Toxicol.** v. 20, p.229-234, 2005.