

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO E M BOTÂNICA

**Detecção de *Microcystis* potencialmente tóxicas em
reservatórios de Pernambuco, através de marcadores
moleculares para o operon da sintetase da microcistina-
mcyB e *mcyA***

Danilo Mamede da Silva Santos

Recife-PE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO E M BOTÂNICA

**Detecção de *Microcystis* potencialmente tóxicas em
reservatórios de Pernambuco, através de marcadores
moleculares para o operon da sintetase da microcistina-
mcyB e *mcyA***

Danilo Mamede da Silva Santos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte do requisito
para obtenção do Título de Mestre em
Botânica.

Orientadora:

Prof^a Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira

Co-orientadoras:

Prof^a Dra. Ariadne do Nascimento Moura

Prof^a Dra. Mariana Cabral de Oliveira

Recife-PE

2008

Detecção de *Microcystis* potencialmente tóxicas em reservatórios de Pernambuco, através de marcadores moleculares para o operon da sintetase da microcistina-*mcyB* e *mcyA*

Danilo Mamede da Silva Santos

Orientador (a):

Prof^a. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira – ESALQ/USP
Presidente

Examinadores:

Prof^a. Dra. Glícia Maria Torres Calazans – UFPE
Titular

Prof^a. L.D. Enide Eskinazi Leça – UFRPE
Titular

Prof^a. Dra. Margareth Ferreira de Sales – UFRPE
Titular

Prof^o Dr. William Severi – UFRPE
Suplente

Data de Aprovação: 14 / 02 / 2008

Recife
2008

Você não sabe o quanto
eu caminhei pra chegar até aqui;
percorri milhas e milhas antes de
dormir, eu não cochilei; os mais
belos montes escalei, nas noites
escuras de frio chorei...

(Toni Garrido/ Lazão/ Da Gama/
Bino)

Existem trabalhos maçônicos que são descartáveis, porque, destituídos de utilidade prática, são fantasistas e sem compromisso com a realidade. Existem, outros, que, ao contrário, são fundamentais para o conhecimento da verdade histórica, documental e apoiada por sólida pesquisa bibliográfica. Aqueles, como ervas daninhas, vegetam na obscuridade e não deixam rastros e nem saudades; estes, ao contrário, como os sólidos patriarcas das brenhas, são duradouros e úteis a muitas gerações dos que se recolhem à sua sombra.

José Castellani

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me fazer andar por sobre as águas em todos os momentos em que o mar não se abriu... pelas grandes obras que fez e continua a fazer em minha vida, a ti Senhor que és fiel!

À minha Orientadora, Maria do Carmo, pela orientação, amizade, amabilidade, disponibilidade de ajuda e por não ter desistido de mim quando eu menos merecia e mais precisava.

À minha Co-orientadora, Ariadne Moura, pela presteza, coletas, amabilidade, amizade, conselhos valiosos e confiança.

À minha co-orientadora, Mariana Cabral, pela disponibilidade em ajuda sempre que necessário;

Aos meus pais, Edilemos Mamede e Rita de Cássia, pelo amor, carinho, compreensão amizade, apoio, dedicação e exemplo de vida.

Ao meu irmão e cunhada, Saulo Mamede e Pollyana Melo, pelo apoio, amor, respeito e compreensão.

À minha avó Maria Zélia, pelo amor, oração e exemplo de vida.

Aos meus tios e tias: Wilson Silva e José Wilson, Marcelo Fragoso; Jurandi Mamede, Fátima Fragoso, Solange Fragoso e Sandra Fragoso pelo apoio, carinho, amor, respeito e incentivo.

Aos meus primos Filipe Wilson e Lucas Fragoso, por estarem sempre presentes em minha vida me apoiando em tudo e enchendo minha vida de ternura.

Aos meus avós e tios que já não se encontram mais presentes, porém deixaram uma lição de vida e exemplo de perseverança.

À Theyla Mégara, minha gata persa que mesmo sem entender o sentido de minha Dissertação de Mestrado tem me dado forças para continuar quando a saudade era tamanha, o frio intenso e a dor profunda, a você thethe, meu presente piracicabano, muito obrigado;

À amiga de laboratório, Talita Hereman (vulgo Mainha), pelo apoio, incentivo, amabilidade, disponibilidade em ajuda, compreensão, desabafo e respeito.

À amiga de laboratório, Selma Barros (vulgo Rapel), pela ajuda no início do trabalho, pelas dicas de laboratório, auxílio nos experimentos de biologia molecular, amizade e presteza.

À amiga de laboratório, Bruna Buck (vulgo Bati), pela amizade, seriedade em prosa, compreensão, apoio e incentivo.

À amiga de laboratório, Viviane (vulgo Lollypop), pelas longas tardes de conversa, apoio na fotodocumentação, incentivo, amabilidade e confiança.

Ao amigo de laboratório, Fabricio Barros (vulgo Lama), pelo incentivo, ajuda nos ensaios de biologia molecular no início do trabalho, amizade, amabilidade e momentos de descontração.

Ao amigo técnico do laboratório, Paulo Jaoude (vulgo K-juru), pelo apoio, momentos de descontração, amizade, desabafo, presteza e incentivo.

À amiga Juliana Galvão, Doutoranda do Programa de Energia nuclear do CENA/USP, pela amizade, amabilidade, confiança, apoio, incentivo, abraço e sorriso que tornavam meus dias mais felizes.

Ao amigo, Luciello Manoel, pelos momentos juntos em Piracicaba dos quais jamais esquecerei. Pelo apoio, incentivo, presteza e sorriso que ilusionavam a saudade de casa.

Aos amigos da pensão de dona Adeláide, minha primeira residência em Piracicaba, pelos bons momentos vividos juntos.

Aos amigos Igor Ferrante e Daniel Cassarot, por todo apoio, incentivo, desabafo, amizade, amabilidade, sorriso e abraço.

Ao amigo Wirifran, pelos bons momentos juntos e disponibilidade de ajuda.

À amiga Fabiana Lima, por tudo tem fez e faz em prol da realização deste sonho, onde palavras não são suficientes para expressar o quanto estou grato a você. Amo você Fabi, MUITO OBRIGADO por tudo.

Às minhas amigas irmãs, Walesca e Wanessa, pelo consolo nos momentos difíceis, amizade, presteza, carinho, compreensão, estima e exemplo de humildade e seriedade.

À amiga Roberta Eliane, pelas ligações que tornavam meus dias mais felizes diminuindo a distancia entre os corações, pela amizade, amabilidade, demonstrações de afeto e carinho.

À amiga Cristiana Marinho, pelas mensagens enviadas como demonstrações de carinho e estima confiança, amabilidade, seriedade, desabafo, incentivo, amor e apoio.

Ao amigo Renê Marcelino, pelas “fechações” amabilidade, apoio, incentivo e afeto.

Ao amigo Hélio Inácio, pelo apoio, incentivo e ensinamentos “de vida”.

À amiga de mestrado, Milena Dutra, por ser minha representante durante a matrícula, pela amizade, desabafo, amabilidade e oração.

Aos amigos de curso, em especial Silvana Dias, Juliana Santana e Airton Cysneiros pela amizade, incentivo e disponibilidade de ajuda.

Aos amigos de graduação de torcem por mim, em especial Severina Kátia e Diana Couto.

À você que me fez sorrir, que me fez chorar, que me fez sonhar, que me fez feliz, que me fez amar... mas que do fundo do meu coração: Não volte NUNCA mais pra mim...

Aos que fazem o Laboratório de Ficologia da UFRPE, em especial Emanuel Cardoso e Ênio Wocilly, pela amizade e disponibilidade de ajuda.

Ao programa de Pós-Graduação em Botânica - PPGB pela oportunidade em realizar meu Curso de Mestrado, em especial a dona Margarida (secretária) pela atenção especial sempre que solicitado.

À ESALQ/USP pela realização de toda parte prática.

Ao CNPq pelo apoio financeiro da bolsa de pesquisa.

A todos os meus amigos do Dept. de Antibióticos-UFPE, pelo apoio, incentivo e amabilidade mesmo distante.

A todos os professores e amigos que juntos contribuíram para minha formação profissional.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma colaboraram com a execução dessa vitória, meu MUITO OBRIGADO!

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1: Reservatórios de abastecimento público de água no Estado de Pernambuco, amostrados neste estudo.	28
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para identificação dos genes <i>mcyA</i> e <i>mcyB</i> .	29
Tabela 3: Condições de PCR na amplificação das amostras para verificação da presença de genes envolvidos na biossíntese da microcistina.	30
Tabela 4: Representação da presença ou ausência da amplificação de fragmentos de DNA para a identificação da ficocianina (PC), <i>mcyB</i> , <i>mcyA</i> e análise de HPLC e org. L ⁻¹ .	31

Lista de Abreviaturas

NRPS	Síntese de peptídeos não-ribossomais
MC ou MCs	Microcistina
Ala	Alanina
MeAsp	Ácido D-eritro-β-metilaspártico
Adda	β- aminoácido residual
Glu	Ácido glutâmico
Mdha	N-metildehidroalanina
IDR	Instituto de doenças renais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>mcy</i>	Módulo do operon da microcistina (A – J)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ELISA	Ensaio imunoenzimático
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
HPLC-FLD	Cromatografia líquida com detecção por fluorescência
Org.	Organismo
L ⁻¹	Litro
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxiribonuclêico
PC	Ficocianina
PCα-F/ PCβ-R	Oligonucleotídeo para o operon da ficocianina
<i>mcyB</i> - FR/ <i>mcyB</i> - FRA	Oligonucleotídeo para o operon do <i>mcyB</i>
<i>mcyA</i> -F	Oligonucleotídeo para o operon do <i>mcyA</i>
MC-LR	Microcistina (2 e 4 – leucina, arginina)
MC-RR	Microcistina (2 e 4 – arginina, arginina)
MC-YR	Microcistina (2 e 4 – histidina, arginina)

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1: Estrutura química da microcistina - LR.	32
Figura 2: Modelo biossintético da microcistina - LR.	32
Figura 3: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Arcoverde, 23/08/06 (período seco). MM: (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: <i>mcyB</i> -FR; 3: <i>mcyB</i> -FRA.	33
Figura 4: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Arcoverde, 01/03/05 (período chuvoso). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: <i>mcyB</i> -FR; 3: <i>mcyB</i> -FRA.	33
Figura 5: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Jazigo, 03/03/05 (período chuvoso). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: <i>mcyB</i> -FR; 3: <i>mcyB</i> -FRA.	34
Figura 6: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Carpina, 26/08/06 (período chuvoso). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: <i>mcyB</i> -FR; 3: <i>mcyB</i> -FRA.	34
Figura 7: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Tapacurá, 16/10/06 (período seco). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: <i>mcyB</i> -FR; 3: <i>mcyB</i> -FRA.	35
Figura 8: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Tapacurá, 26/08/04 (período chuvoso). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: <i>mcyB</i> -FR;	35

3: *mcyB*-FRA.

Figura 9: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, 36
mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da
natureza do reservatório Botafogo, 18/10/06 (período seco). MM (Low
DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3:
mcyB-FRA.

Figura 10: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, 36
mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da
natureza do reservatório Duas Unas, 17/10/06 (período seco). MM (Low
DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3:
mcyB-FRA.

Figura 11: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, 37
mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da
natureza do reservatório Mundaú, 19/09/06 (período seco). MM (Low
DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3:
mcyB-FRA.

Figura 12: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, 37
mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da
natureza do reservatório Tapacurá, 26/08/04 (período chuvoso). MM
(Low DNA Mass Ladder Standard); 1: *mcyA*- cdR/ cdF.

Figura 13: Cromatograma - HPLC do reservatório de Jazigo, chuvoso 38
(03/03/05)

Sumário

	Pág.
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Figuras	x
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
3. Referências Bibliográficas	9
Manuscrito	14
Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	16
2. Materiais e Métodos	18
3. Resultados	20
4. Discussão	21
5. Agradecimentos	24
6. Referências Bibliográficas	24
Anexos	39
Normas para Submissão a Revista Freshwater Biology	40

Santos, Danilo Mamede da Silva. Msc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2008. Detecção de *Microcystis* potencialmente tóxicas em reservatórios de Pernambuco, através de marcadores moleculares para o operon da sintetase da microcistina - *mcyB* e *mcyA*. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira (Orientadora), Ariadne do Nascimento Moura e Mariana Cabral de Oliveira (Co-orientadoras).

Resumo: Cianobactérias ou algas cianofíceas, embora tenham muitas semelhanças com algas eucarióticas e ocupem os mesmos nichos ambientais, pertence ao domínio Eubacteria. No Brasil, foi evidenciada a ocorrência de florações de cianobactérias, principalmente no Estado de Pernambuco, ocasionando a morte de vários pacientes em 1996. Dentre as cianobactérias capazes de produzir toxinas, destaca-se o gênero *Microcystis*, sendo requeridos alguns genes (*mcyA* a *J*) para produção de toxina. Este trabalho tem como objetivo verificar a presença do operon para os genes, *mcyB* e *mcyA*, em populações de cianobactérias ocorrentes em reservatórios do Estado de Pernambuco. O levantamento taxonômico dos reservatórios possibilitou a identificação de 16 táxons representados por três ordens: Chroococcales; Nostocales e Oscillatoriales, onde *M. aeruginosa* foi à espécie mais amplamente distribuída nos reservatórios estudados. O reservatório do Agreste foi o que apresentou o maior número de organismos por L^{-1} , com o valor de 51.423.078 org. L^{-1} , seguido dos reservatórios do Sertão e Zona da Mata. O operon da ficocianina comprovou a presença de cianobactérias para todos os reservatórios estudados. O gene do *mcyB* esteve presente para todos os reservatórios e *mcyA* apenas para o reservatório de Tapacurá, período chuvoso, representando por 11,11% das amostras. Dentre os primers utilizados para o *mcyB*, o *mcyB*-FR demonstrou ser mais específico que o *mcyB*-FRA, por não apresentar bandas inespecíficas. Os ensaios em HPLC foram efetuados até o presente momento apenas para dois reservatórios, Arcoverde chuvoso e Jazigo chuvoso, sendo positivo apenas para o reservatório de Jazigo. Os resultados apontam uma necessidade periódica de monitoramento dos reservatórios do Estado de Pernambuco frente a cianobactérias potencialmente tóxicas, sendo o método de PCR apropriado para a detecção de potenciais produtores de microcistinas em amostras ambientais.

Palavras-Chave: *Microcystis*, Pernambuco, cianobactéria, toxina, PCR.

Santos, Danilo Mamede da Silva. Msc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2008. Detecção de *Microcystis* potencialmente tóxicas em reservatórios de Pernambuco, através de marcadores moleculares para o operon da sintetase da microcistina - *mcyB* e *mcyA*. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira (Orientadora), Ariadne do Nascimento Moura e Mariana Cabral de Oliveira (Co-orientadoras).

Abstract: Cyanobacterias or cyanoficeas, even they have many similarities with eukariotics seaweed and occupy the same ambient niches, they belong to the Eubactéria domain. In Brazil, the occurrence of blooms of cyanobacterias was evidenced, mainly in the state of Pernambuco, where some patients died in 1996. Amongst the cyanobacterias capable of producing toxins, the Genus *Microcystis* is distinguished; being required some genes (*mcyA* the J) for toxin production. This work has the objective to verify the presence of operon for the genes, *mcyB* and *mcyA*, in populations of cyanobacterias in the reservoirs of the state of Pernambuco. The taxonomic survey of the reservoirs made possible the identification of 16 taxon represented by three orders: Chroococcales; Nostocales and Oscillatoriales, which *M. aeruginosa* was more widely distributed species in the studied reservoirs. The reservoir of the Agreste was the one where could be found the biggest number of organisms for L^{-1} with the value of 51,423,078 L^{-1} , followed by reservoirs of Sertão and Zona da Mata. Operon of the ficocianine, proved the presence of cyanobacterias for all the studied reservoirs. The gene of *mcyB* was presented for all reservoirs. The *mcyA* only for the Tapacurá reservoir in the rainy period, representing for 11,11% of the samples. Amongst the primers employed for *mcyB*, *mcyB*-FR demonstrated to be more specific than *mcyB*-FRA, not showing unexpected bands. The assays in HPLC had performed so far only for two reservoirs, Arcoverde and Jazigo in rainy season, being positive only for the Jazigo reservoir. The results demonstrate the necessity for a periodic monitoring in the Pernambuco's reservoirs state emphasized for the potentially toxic cyanobacterias, as PCR an appropriate method with respect to the detention of potentials microcystins producer in environment samples.

Key Words: *Microcystis*, Pernambuco, cyanobacteria, toxin, PCR.

1. Introdução

Os reservatórios de água potável do Estado de Pernambuco vêm representando um problema de saúde pública, devido a florações de cianobactérias potencialmente tóxicas. Contudo, a presença de toxinas, em reservatórios brasileiros, provenientes do metabolismo algal, demonstra a necessidade de monitoramento da qualidade da água, onde a detecção prévia de organismos pode fornecer meios de melhorar a gerência da qualidade e tratamento da mesma (Baker *et al.* 2002; Molica *et al.* 2005).

O Estado de Pernambuco possui 22 bacias hidrográficas e cerca de 250 reservatórios com capacidade de acumulação acima de 1.000.000m³ de água, os quais se encontram distribuídos em regiões com regimes climáticos e hidrológicos diferentes.

Cianobactérias, ou algas cianofíceas são organismos procariontes, Gram-negativos, fotossintetizantes, que contêm clorofila-*a* e pigmentos acessórios, talo unicelular, colonial ou filamentoso, sendo alguns gêneros capazes de produzir toxinas como *Microcystis* (Kützing), *Anabaena* (Komárec & Komárková) e *Cylindrospermopsis* (Woloszynska) (Komárek & Anagnostidis, 1999; Boone & Castenholz, 2001).

Algumas cianobactérias tais como *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* e *Microcystis*, podem produzir toxinas que são classificadas de acordo com sua estrutura química em: alcalóides; lipopolissacarídeos e peptídeos cíclicos (Kaebernick & Neilan, 2001). Dentre as toxinas sintetizadas por cianobactérias, a microcistina é produzida através de uma via não-ribossomal formada por um complexo enzimático multifuncional que consiste em módulos com domínios específicos (sintetases de peptídeos não-ribossomais - NRPS) os quais são responsáveis pela incorporação dos aminoácidos na cadeia do peptídeo (Kleinkauf & Von Döhren, 1996).

A produção de microcistina é uma característica intrapopulacional, onde alguns genes são responsáveis pela produção de toxina codificando para a sintetase de microcistina. Contudo, a utilização de marcadores moleculares para microcistina *in situ* torna-se extremamente útil na detecção de cianobactérias que possuam o potencial genético de produção da microcistina, independente de sua isoforma e da produção de toxina no momento da análise (Bittencourt-Oliveira, 2003). Dentre as cianobactérias capazes de produzir microcistinas destaca-se o gênero *Microcystis*.

As microcistinas (MCs) podem ser consideradas como compostos xenobióticos em ambientes aquáticos, como um hepatopeptídeo cíclico composto por 7 aminoácidos, o qual possui a estrutura (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-) (Figura 1) (Chorus & Bartman, 1999). Os constituintes variáveis (X e Z) e invariáveis dos MCs incluem peptídeos polares (hidrofílico) e apolares (hidrofóbico). Os aminoácidos variáveis presentes na microcistina (MC) são solúveis em água, embora em graus variáveis. Alterações aos peptídeos invariáveis podem ou não alterar a toxicidade (Meriluoto *et al.* 1989).

No Brasil, foi evidenciada a ocorrência de florações de cianobactérias, dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis*, no reservatório de Itaparica (Bahia), sugerindo que esta eventualidade poderia ter sido a possível causadora da morte de 88 pessoas (Teixeira *et al.* 1993). A exposição de seres humanos e demais mamíferos a microcistina resulta desde intoxicação e náuseas a outros efeitos que podem levar a morte. Concentrações consideradas relativamente baixas ($0,8\mu\text{M}$) podem causar apoptose nas células e conduzir a degeneração crônica do fígado (McDermott *et al.* 1998).

Em 1996, foi detectada a presença de toxina nas máquinas da clínica de Hemodiálise do Instituto de Doenças Renais (IDR) (Caruaru - PE, Brasil), causando a morte de mais de 70 pacientes. Este foi o relato mais sério envolvendo população humana (Jochimsen *et al.* 1998). Yuan; Carmichael & Hilborn (2006) relataram resultados da análise de amostras biológicas de fígado humano após, 10 anos do acidente, demonstrando a detecção e estabilidade da microcistina em células hepáticas, após este período.

A bioacumulação de microcistinas em alimentos de origem animal é um sério problema de saúde pública. Magalhães; Soares & Azevedo (2001) investigaram, por ensaios de ELISA, a presença de microcistinas em tecidos de músculos e fígado de peixes *Tilapia rendalli* (Boulenger) da lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil, em um período de três anos. Constataram que as amostras analisadas continham concentrações de microcistina próximo, ou acima, do limite recomendado ($1,0\ \mu\text{g L}^{-1}$) para o consumo humano, mesmo com baixa densidade de *Microcystis*, o que demonstra que esses peixes podem acumular microcistinas em seus tecidos, comprometendo a saúde humana se ingeridos.

O potencial de impactos ambientais associados à florações tóxicas de cianobactérias tem repercutido em implicações drásticas no ambiente aquático, como as do lago Elphinstone, Austrália, onde houve a morte maciça de caracóis e

outros macroinvertebrados, diminuindo a abundância total e riqueza de espécies de comunidades de macroinvertebrados, coincidindo com o aumento da toxicidade da *Microcystis* (White; Duivenvoorden & Fabbro, 2005).

A utilização da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem crescendo nas últimas décadas, sendo empregada nos mais variados ramos da ciência, auxiliando assim a caracterização e identificação de organismos. Embora ainda não seja difundida em ensaios de rotina na análise da água, a utilização da técnica de PCR para identificação de linhagens de cianobactérias tóxicas, como *Microcystis* sp., é uma forma rápida, barata e segura de prever fenômenos de florações tóxicas, visto o aumento de sua ocorrência em grandes sistemas de abastecimentos de água e a inexistência, em muitos casos, de tecnologia para remoção de toxinas. Em amostras ambientais apresenta a vantagem de ser preditiva, podendo ser implementada individualmente ou integrada com outras técnicas agilizando o monitoramento das águas (Bittencourt-Oliveira, 2003).

Corpos d'água são utilizados para fins recreativos e/ou como fonte de água potável, portanto, deve existir o controle regular da presença de cianobactérias tóxicas (Pan *et al.* 2002). A legislação brasileira, através da Portaria n° 518, de 2004 estabelece concentrações máximas de toxinas produzidas por cianobactérias, para água potável, de 1,0 µg L⁻¹ de microcistina e recomenda 3 a 15 µg L⁻¹ de saxitoxina e cilindrospermopsina, respectivamente (Brasil, 2004).

Estudos de microbiologia ambiental geralmente são limitados, uma vez que o isolamento e cultivo dos microrganismos de ambientes naturais em laboratório são difíceis (Castiglioni *et al.* 2004). A diferença entre espécies tóxicas e não-tóxicas de *Microcystis* sp. tem um caráter genético. Contudo, análises de PCR mostram que espécies de *Microcystis* identificadas morfológicamente podem não corresponder com a característica genética da espécie (Otsuka *et al.* 1999).

No Brasil, são poucos os trabalhos relacionados à investigação de populações de cianobactérias potencialmente tóxicas. O difícil acesso aos reservatórios de água, a eutrofização e a falta de iniciadores específicos às linhagens brasileiras, são fatores limitantes à coleta e processamento de dados. Assim, este trabalho objetivou verificar a presença dos genes, *mcyB* e *mcyA* relacionados à biossíntese de microcistina em populações de cianobactérias ocorrentes em sete reservatórios do estado de Pernambuco, avaliando novos oligonucleotídeos desenhados especificamente para populações brasileiras de *Microcystis*.

2. Revisão Bibliográfica

Os efeitos da temperatura da água e da intensidade de luz branca na produção da toxina parecem ser específicos entre espécies e linhagens da mesma espécie. A presença de luz verde e vermelha mostra aumento de, aproximadamente, 50% na produção de microcistina (Utkilen & Gjølme, 1992). Rapala & Sivonem (1998) sugerem que a produção de MC-LR está regulada primeiramente pela luz, enquanto que a MC-RR é regulada pela temperatura. A luz vermelha induz uns níveis mais elevados da transcriptase dos dois genes (*mcyB* e *mcyD*) responsáveis pela síntese da toxina em *M. aeruginosa* PCC 7806 (Kaebernick *et al.* 2000).

Cianobactérias heterocitadas (que apresentam células diferenciadas chamadas de heterócitos, para armazenamento de nitrogênio) e não heterocitadas diferem na produção de toxina em resposta às concentrações ambientais de nitrogênio. Enquanto que, concentrações de fósforo parecem estar ligadas com a produção de toxinas em ambas as espécies, heterocitadas e não-heterocitadas (Rapala *et al.* 1997).

Espécies de cianobactérias tóxicas parecem ser mais exigentes de Nitrogênio e fósforo do que espécies não tóxicas, possivelmente devido à energia extra e materiais requeridos para a síntese da toxina (Vézie *et al.* 2002). Para espécies não heterocitadas e não fixadoras de nitrogênio, uma concentração mais elevada de nitrogênio foi associada com a toxicidade mais elevada. Entretanto, Watanabe & Oishi (1985) constataram também que a deficiência de nitrogênio poderia aumentar a toxicidade.

Efeitos ambientais ligados à disponibilidade para aminoácidos e metabolismo da célula, podem atuar como variantes na síntese de microcistina. Procedimentos de PCR, baseados na detecção do gene, estabelecem uma correlação entre a existência do gene do *mcyB* e a produção de microcistinas, sugerindo o gene *mcyB* como responsável por tal variante (Dittmann *et al.* 1997; Kurmayer *et al.* 2002; Pan *et al.* 2002).

A síntese não ribossomal de peptídeos é um mecanismo para produção de metabólitos secundários como os MCs, em cianobactérias. Os peptídeos produzidos por este mecanismo são pequenos (2 à 48 peptídeos) com estruturas diversas e um largo espectro de atividades biológicas. A presença de genes é requerida para a produção de microcistina (Dittmann *et al.* 1997). As MCs serão produzidos somente

sob circunstâncias fisiológicas particulares e que estejam sujeitas às influências ambientais múltiplas (Orr & Jones, 1998).

A síntese dos peptídeos não ribossomais ocorre em complexos modulares multienzimáticos, chamados de peptídeo sintetase, que permitem incorporar e modificar, de forma muito variada, os aminoácidos. Os genes que codificam as proteínas que formam estes grandes complexos multienzimáticos estão agrupados em operons, onde cada módulo é responsável pela adição de um aminoácido (Figura 2). Os módulos ativam e modificam um aminoácido específico dando forma à ligação dos peptídeos entre aminoácidos ativados, onde os aminoácidos ativados são tioesterificados através de ligações covalentes (Moffitt & Neilan, 2000).

O modelo biossintético proposto para a microcistina-LR (Figura 2), mostra a organização do *mcyA-J* do gene e da toxina, microcistina, para *Microcystis aeruginosa* PCC7806. A biossíntese do microcistina ocorre bidirecionalmente através de dois operons: *mcy-ABC* e *mcy-DEFGHIJ*. Os genes do *mcyA*, B e C codificam a sintetase do peptídeo. O gene do *mcyE* codifica a sintetase do D-Glutamato (D-Glu) e os demais genes do segundo operon são responsáveis pela síntese de Adda (Kaebernick & Neilan, 2001; Vaitomaa *et al.* 2003).

Diversos autores utilizaram fragmentos amplificados do *mcy* como marcadores moleculares para cianobactérias potencialmente tóxicas, dentre eles: Neilan *et al.* 1999; Tillett, Parker & Neilan, 2001; Baker *et al.* 2002; Nonneman & Zimba, 2002; Pan *et al.* 2002; Bittencourt-Oliveira, 2003; Hisbergues *et al.*; 2003; Wilson *et al.* 2005.

Pan *et al.* (2002), através da amplificação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando *primers* para o *mcyB* e células de cianobactérias intactas, caracterizaram cepas de *Microcystis* tóxicas e não-tóxicas, que corroboraram com os resultados aplicados aos métodos de HPLC (Cromatografia líquida de alta aficiência) e ELISA, sendo assim, uma maneira simples, eficiente e de confiança para caracterizar as amostras.

Ao investigar a ocorrência de mortalidade em viveiros de criação de peixes, Nonneman & Zimba (2002) constataram o potencial genótipo hepatotóxico para a presença do *mcyB* nos mesmos, corroborando com os resultados em HPLC.

Hisbergues *et al.* (2003) relatam o uso da técnica de PCR como rápida e simples para monitorar corpos d'água com genótipos produtores de microcistinas por *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix*, baseado na seqüência de informações do *mcy*, pelo fragmento de gene *mcyA*.

A fim de monitorar o desenvolvimento sazonal da população total de *Microcystis* para o genótipo *mcyB*, fez-se uso da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) para amostras do lago Wannsee, Berlim-Alemanha, no período de junho de 1999 a outubro de 2000. Ficou evidenciado que, no campo, a proporção de genótipos *mcyB*, quando relacionado ao genótipo da microcistina, é estável do inverno ao verão (Kumayer & Kutzenberger, 2003).

Com a finalidade de avaliar o potencial genético para produção de toxinas de cianobactérias do gênero *Microcystis* em diferentes regiões fitogeográficas, Via-Ordorica *et al.* (2004) avaliaram a ocorrência dos genes do *mcyA* e *mcyB*, juntamente com seus caracteres morfológicos, em nove países europeus, onde concluíram que a análise das morfoespécies pode ser indicativa para produção de microcistina, devido a um relacionamento muito próximo entre ocorrência do gene do *mcy* e morfoespécie.

A caracterização genética de linhagens de *Microcystis aeruginosa* tem focado os esforços dos pesquisadores devido a sua importância potencial crescente. O estudo da variação genética da formação de florações em lagos da península Michigan evidenciou que 91%, dos 53 corpos d'água, continham *M. aeruginosa* com o gene *mcyA* para a toxina, onde todos os lagos possuíam o genótipo para a toxina, e dentre eles, quatro abrigavam linhagens com e sem o gene da toxina. Na natureza, espécies produtoras e não produtoras de microcistina coexistem e são morfológicamente idênticas (Wilson *et al.* 2005; Mbedi *et al.* 2005).

A fim de caracterizar as culturas potencialmente produtoras de microcistinas, foram amplificados seis segmentos característicos do conjunto do *mcy* sintetase, *mcyA*, *mcyB* e *mcyC*, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*, validando assim que vários genes do *mcy* em *Microcystis* podem ser utilizados como um critério muito útil pelas companhias responsáveis pelo manejo da água, para lidar com o evento de florações tóxicas (Ouahid; Pérez-Silva & Campo, 2005).

A variação sazonal no número de células com genótipos da microcistina (*mcy*) e a diversidade genotípica total da população de *Microcystis* foram investigadas utilizando PCR no lago Mikata (Fukui, Japão), onde células foram submetidas a ensaios com *mcyA*, HPLC e ELISA, diferenciando-as em 11 ribotipos. A diferença básica entre espécies tóxicas e não tóxicas de *Microcystis* tem caráter genético (Yoshida *et al.* 2005).

Mankiewicz-Boczec *et al.* (2006) fizeram uso do *mcyA*, *mcyB* e *mcyE* para investigar o potencial genético do reservatório de Sulejów (Polônia central),

conhecido pela prática esportiva de natação e canoagem, onde predominava a cianobactéria *M. aeruginosa*, entre os meses de maio à outubro, revelando o potencial genético de 89% das amostras para o *mcyA* e 67% para o *mcyB* e E, corroborando com os resultados de ELISA.

Três lagoas, com florações de *Microcystis*, na Romênia foram analisadas quanto a presença de genes *mcyA* e *mcyB*, para produção de microcistina e a sua presença em tecidos dos peixes do local. A identidade morfológica da presença de cianobactérias foi realizada pela análise do operon da ficocianina e o potencial produtor de microcistinas pela região do operon *mcyA* e *mcyB*, sendo os resultados positivos para ambos os *mcys* em todas as lagoas, corroborando com ensaios de ELISA feito nos peixes do local, demonstrando que o efeito da toxina em peixes parece ser menos agressivo que em mamíferos (Boaru, *et al.* 2006).

Investigações utilizando o *mcyA* foram feitas em 26 amostras de lagos, rios e reservatórios de Portugal, onde apenas 5 das 26 amostras (19%) foram portadoras do gene *mcyA* para biossíntese da microcistina (Saker; Vale & Kramer, 2007).

Os metabólitos de células de *Microcystis* lisadas por fricção mecânica ou variações de stress, estimulam o gene *mcyB* das células restantes a produzirem toxina. Contudo, culturas mais velhas ou recentemente propagadas para crescimento, respondem mal aos componentes do extrato celular (Schatz *et al.* 2007).

No Brasil, Bittencourt-Oliveira (2003), ao investigar a composição genotípica de populações de cianobactérias potencialmente tóxicas, do gênero *Microcystis*, em reservatórios de água para abastecimento público do Nordeste e Sudeste do Brasil, através do *mcyB*, constatou que a detecção de toxinas por cianobactérias através de marcadores moleculares é de grande valia para análises rotineiras de ecossistemas aquáticos, possibilitando o monitoramento e aplicação de ações corretivas precoces. O mesmo autor, ao estudar os reservatórios de Tabocas, Tapacurá, Jucazinho e Duas Unas, localizados no Estado de Pernambuco, Brasil, verificou que apenas no reservatório de Duas Unas foi detectada a presença do gene do *mcyB*.

A ocorrência de florações de cianobactérias no reservatório Armando Ribeiro Gonçalves, no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, aponta um risco permanente à saúde pública, chegando aos valores máximos de até 8,8 $\mu\text{g. L}^{-1}$, excedendo o valor máximo aceitável para consumo humano (Costa *et al.* 2006). Martin (2006), ao analisar a ocorrência de *Microcystis* spp potencialmente tóxicas fazendo uso da região do gene *mcyB* em reservatórios de abastecimento público do Rio Grande do

Norte, constatou que 33% das amostras revelaram resultado positivo para o gene do *mcyB*, corroborando com seus resultados obtidos por HPLC.

O reservatório da Billings, São Paulo, Brasil, é alvo freqüente de florações de cianobactérias. Esses relatos levaram Anjos *et al.* (2006) a realizar análises de investigação molecular quanto à região do *mcyB* e ensaios de cromatografia líquida acoplada a espectro de massa, a fim de verificar o potencial genético das florações ocorrentes e possíveis evidências de produção de microcistina e sua isoforma, onde comprovaram a existência do potencial genético para produção da microcistina, bem como três variantes distintas da mesma, MC-LR, MC-RR e MC-YR, contribuindo assim para o conhecimentos da ecologia e biogeografia deste ecossistema.

Na tentativa de otimizar procedimentos metodológicos para detecção de genes envolvidos na biossíntese de microcistina através de PCR, Barros *et al.* (2006) fizeram uso de células intactas provenientes de florações do reservatório Billings, com três novos *primers* especialmente desenhados para populações de *Microcystis* brasileiras e outros *primers* de literatura foram utilizados para comparações, onde a comprovação da toxidade da amostra foi obtida por HPLC. Esses autores constataram a presença de falso positivos e negativos para os *primers* de literatura.

A determinação de toxinas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia líquida com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) confirmam a presença de toxinas, em reservatórios do Estado de São Paulo, corroborando com a técnica de PCR para o *mcyB* descrita por Anjos *et al.* (2006).

Mais experiências de campo devem ser conduzidas para avaliar os fatores da dinâmica ambiental e populacional da concentração total de microcistina nos lagos. Contudo, os dados moleculares e fisiológicos apontam uma sucessão dos genótipos e da variação da produção da microcistina (Dittmann & Börner, 2005).

3. Referências Bibliográficas

- Anjos F.M.; Bittencourt-Oliveira M.C.; Zajac M. P.; Hillen S.; Christian B.; Luckas B. & Pinto E. (2006) Determinação de cianobactérias e suas toxinas por PCR e LC-MS durante uma floração na represa Billings. In: *XI Congresso Brasileiro de Ficologia*, 73. Itajaí – Santa Catarina/ Brasil.
- Baker J.A.; Entsch B.; Neilan B.A. & McKay D.B. (2002) Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (12), 6070-6076.
- Barros S.G.; Oliveira M.C; Meira-Barros F.S. & Bittencourt-Oliveira M.C. (2006) Seleção de marcadores moleculares para microcistina utilizando células intactas em populações brasileiras de cianobactérias. In: *XI Congresso Brasileiro de Ficologia*, 65. Itajaí – Santa Catarina/ Brasil.
- Bittencourt-Oliveira M.C. (2003) Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Hamful Algae*, **2**, 51-60.
- Boaru D.A.; Dragos N.; Welker M. & Bauer A. (2006) Toxic potential of microcystin-containing cyanobacterial extracts from three Romanian freshwaters. *Toxicon*, **47**, 925: 932.
- Boone D.R. & Castenholz R.W. (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1**, 474-600.
- Brasil (2004) *Ministério da Saúde Portaria 518, de 03/ 2004*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, poder executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção **1**, 266-270.
- Castiglioni B.; Rizzi E. Frosini A.; Sivonen K.; Rajaniemi P.; Rantala A.; Mugnai M. A.; Ventura S.; Wilmotte A.; Boutte C.; Grubisic S.; Balthasart P.; Consolandi C.; Bordoni R.; Mezzelani A.; Battaglia C. & Bellis G. (2004) Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 7161–7172.
- Chorus I. & Bartram J. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their Public Health consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, Londres, 416 p.
- Costa I.A.S.; Azevedo S.M.F. O.; Senna P.A.C.; Bernardo R.R.; Costa S.M. & Chellappa N.T. (2006) Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal Biology*, **66** (1b), 211-219.

- Dittmann E. & Börner T. (2005) Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203**, 192-200.
- Dittmann E.; Neilan B.; Erhard M.; Von Döhren H. & Börner T. (1997) Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Molecular Microbiology*, **26**, 779-787.
- Hisbergues M.; Christiansen G; Rouhiainen L; Sivonen K. & Borner T. (2003) PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, **180**(6), 402-410.
- Jochimsen E.M.; Carmichael W.W.; An J.; Cardo D.; Cookson S.T.; Holmes C.E.M.; Antunes M.B.C.; Melo-Filho D.A.; Lyra T.M.; Barreto V.; Azevedo S.M.F.O. & Jarvis W.R. (1998) Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, **36**, 373-378.
- Kaebernick M. & Neilan B.A. (2001) Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, **35**, 1–9.
- Kaebernick M.; Neilan B.A.; Börner T. & Dittmann E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3387–3392.
- Kleinkauf H. & Von Döhren H. (1996) A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, **236**, 335-351.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1999) Cyanoprocarota: Chroococcales. In. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart **19**(1), 1-548.
- Kurmayer R.; Dittmann E.; Fastner J. & Chorus, I. (2002) Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. In Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology*, **43**, 107-118.
- Kurmayer R. & Kutzenberger T. (2003) Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(11), 6723-6730.
- Magalhães V.F.; Soares R. M.; Azevedo S.M. F.O. (2001) Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risks. *Toxicon*, **39**, 1077-1085.
- Mankiewicz-Boczek J.; Urbaniak M.; Romanowska-Duda Z. & Izydorczyk K. (2006) Toxic cyanobacteria strains in lowland dam reservoir (Sulejów Res., Central

- Poland): Amplification of *mcy* genes for detection and identification. *Polish Journal of Ecology*, **54**, 171-180.
- Martin C.P.S. (2006) Utilização de métodos moleculares na detecção de *Microcystis* spp. potencialmente hepatotóxicas em reservatórios de água do Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.
- Mbedi S.; Welker M.; Fastner J. & Wiedner C. (2005) Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiology Letters*, **245**, 299-306.
- McDermott C.M.; Nho C.W.; Howard W. & Holton B. (1998) The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon*, **36**, 1981-1998.
- Meriluoto, J.A.O.; Sandström A.; Eriksson J.E.; Remaud G.; Craig A.G. & Chattopadhyaya J. (1989) Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon*, **27**, 1021–1034.
- Moffitt M.C. & Neilan B.A. (2000) The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiology Letters*, **191**, 159-167.
- Molica R.J.R.; Oliveira E.J.A.; Carvalho P.V.V.C.; Costa A.N.S.F.; Cunha M.C.C.; Melo G.L. & Azevedo S.M.F.O. (2005) Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*, **4**, 743-753.
- Neilan B.A.; Dittmann E.; Rouhiainen L.; Bass A.; Schaub V.; Sivonen K. & Börner T. (1999) Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, **181**, 4089-4097.
- Nishizawa T.; Asayama M. & Shirai M. (2001) Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiology*, **147**, 1235-1241.
- Nonneman D. & Zimba P.V. (2002) A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology*, **38**, 230-233.
- Orr P.T. & Jones G.J. (1998) Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*, **43**, 1604–1614.

- Ouahid Y.; Pérez-Silva G. & Campo F.F. (2005) Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of microcystin synthetase gene regions. *Environmental Toxicology*, **20**, 235-242.
- Otsuka S.; Suda S.; Li R.; Watanabe M.; Oyaizu H.; Matsumoto S. & Watanabe, M.M. (1999) 16S rDNA sequences and phylogenetic analysis of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters*, **164**, 119-124.
- Pan H.; Song L.; Liu Y. & Börner T. (2002) Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Archives of Microbiology*, **178**, 421- 427.
- Rapala J.; & Sivonen K. (1998) Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. Strains cultured under light limitation at different temperatures. *Microbial Ecology*, **36**, 181–192.
- Rapala J.; Sivonen K.; Lyra C. & Niemelä S.I. (1997) Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2206–2212.
- Saker M.L.; Vale M. & Kramer D. (2007) Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**, 441-449.
- Schatz D.; Keren Y.; Vardi A.; Sukenik A.; Carmeli S.; Börner T.; Dittmann E. & Kaplan A. (2007) Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology*, **9**, 965-970.
- Teixeira M.G.L.C.; Costa M.C.N.; Carvalho V.L.P.; Perreira M.S. & Hage C. (1993) Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia. *Revista Panamericana de Salud Publica*, **144**(6), 502-512.
- Tillett D.; Parker D.L. & Neilan B.A. (2001) Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6), 2810-2818.
- Utkilen H.; & Gjørlme N. (1992) Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 1321–1325.
- Vaitomaa J.; Rantala A.; Halinen K.; Rouhiainen L.; Tallberg P.; Møkelke L. & Sivonen K. (2003) Quantitative real-time PCR for determination of microcystin

- synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(12), 7289-7297.
- Vézie C.; Rapala J.; Vaitomaa J.; Seitsonen J. & Sivonen K. (2002) Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology*, **43**, 443–454.
- Via-Ordorika L.; Fastner J.; Kurmayer R.; Hisbergues M.; Dittmann E.; Komarek J. Erhard M. & Chorus I. (2004) Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in european freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiol*, **27**, 592-602.
- Watanabe M.F. & Oishi S. (1985) Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1342–1344.
- White S.H.; Duivenvoorden L.J. & Fabbro L.D. (2005) Impacts of a toxic *Microcystis* bloom on the macroinvertebrate fauna of lake Elphinstone, Central Queensland, Austrália. *Hydrobiologia*, **548**, 117-126.
- Wilson A.E.; Sarnelle O.; Neilan B.A.; Salmon T.P.; Gehring M.M. & Hay M.E. (2005) Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: Implications for harmful algal blooms. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(10), 6126-6133.
- Yoshida M.; Yoshida T.; Takashima Y.; Hosoda N. & Hiroishi S. (2005) Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters*, **266**, 49:53.
- Yuan M.; Carmichael W.W. & Hilborn E.D. (2006) Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon*, **48**, 627-640.

Manuscrito:

Trabalho a ser submetido à
Revista Freshwater Biology

INVESTIGAÇÃO DO OPERON DA SINTETASE DA MICROCISTINA, *mcyB* E *mcyA*, EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE RESERVATÓRIOS DO NORDESTE BRASILEIRO

Palavras-chave: *Microcystis*; Pernambuco-BR; cianobactéria; toxina, PCR.

Danilo Mamede da Silva Santos¹, Mariana Cabral de Oliveira², Ariadne do Nascimento Moura³, Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira⁴

¹PPGB/ Dept. de Ciências Biológicas – UFRPE dan_mamede@yahoo.com.br

²Dept. de Ciências Biológicas – IC/ USP

³PPGB/ Dept. de Ciências Biológicas – UFRPE

⁴Dept. de Ciências Biológicas – ESALQ/ USP

Resumo:

1. Os ensaios de caracterização molecular, utilizando o operon da sintetase da microcistina, *mcyB* e *mcyA*, foram conduzidos em sete reservatórios de água potável do estado de Pernambuco – Brasil, para avaliar o potencial genético de produção de toxinas, contribuindo para um melhor gerenciamento da qualidade da água.
2. O levantamento taxonômico dos reservatórios possibilitou a identificação de 16 táxons representados por três ordens: Chroococcales; Nostocales e Oscillatoriales, onde *Microcystis aeruginosa* foi à espécie mais amplamente distribuída nos reservatórios estudados. O reservatório do Agreste foi o que apresentou o maior número de organismos por L⁻¹, seguido dos reservatórios do Sertão e Zona da Mata.
3. O operon da ficocianina comprovou a presença de cianobactérias em todos os reservatórios estudados. O gene do *mcyB* esteve representado em todos os reservatórios e o *mcyA*, amplificado, apenas para o reservatório de Tapacurá, no período chuvoso.
4. Ao analisar os oligonucleotídeos desenhados para populações brasileiras de *Microcystis*, o *mcyB*-FR demonstrou ser mais específico que o *mcyB*-FRA, por não apresentar bandas inespecíficas corroborando com ensaios de HPLC.
5. Os resultados apontam uma necessidade periódica de monitoramento de cianobactérias tóxicas nos reservatórios do estado de Pernambuco, sendo a técnica de PCR e as regiões do *mcyA* e *mcyB* apropriadas para a detecção de potenciais produtores de microcistinas em amostras ambientais.

Abstract:

1. The assays for molecular characterization, using operon synthetase of the microcystin, *mcyA* and *mcyB*, had been lead in seven reservoirs for drinking waters, in state of Pernambuco - Brazil, to evaluate the genetic potential of toxin production, contributing for a better management of the water quality.
2. Taxonomic survey of the reservoirs made possible the identification of 16 taxons represented by three orders: Chroococcales; Nostocales and Oscillatoriales, which *Microcystis aeruginosa* was the specie most distributed in the studied reservoirs. The Agreste reservoir showed the biggest number of 51.423.078 organisms L⁻¹ followed by Sertão and Zona da Mata reservoirs.
3. The ficocianine operon proved the presence of cyanobacterias for all the studied reservoirs. The gene of *mcyB* was represented in all reservoirs and *mcyA* only for Tapacurá reservoir on rainy period.
4. Analyzing the oligonucleotides designed for brazilian populations of *Microcystis*, *mcyB*-FR demonstrated to be more specific than *mcyB*-FRA, showing unspecific bands corroborating with HPLC assays.
5. The results shown the necessity of periodic monitoring of toxics cyanobacterias from reservoirs of Pernambuco state, being PCR as an appropriate technique using *mcyA* and *mcyB* fragments for detention of potentials producers of microcystins in environmental samples.

1. Introdução

Os reservatórios de água potável do estado de Pernambuco vêm representando problemas de saúde pública, devido à florações de cianobactérias potencialmente tóxicas. Dentre as toxinas sintetizadas por cianobactérias, a microcistina é produzida através de uma via não-ribossomal formada por um complexo enzimático multifuncional (Kleinkauf & Von Döhren, 1996).

As microcistinas (MCs) podem ser consideradas como compostos xenobióticos em ambientes aquáticos; como um hepatopeptídeo cíclico composto por 7 aminoácidos, o qual possui a estrutura (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-) (Chorus & Bartman, 1999).

A exposição de seres humanos e demais mamíferos a microcistina resulta desde intoxicação e náuseas a outros efeitos que podem levar a morte. Em 1996, foi

detectada a presença de toxina nas máquinas da Clínica de Hemodiálise do Instituto de Doenças Renais (IDR), Caruaru-PE, Brasil, o que levou pouco mais de 70 pacientes a morte. Este foi o relato mais sério envolvendo a população humana (Jochimsen *et al.* 1998). A produção de microcistina é uma característica intrapopulacional e a habilidade de uma linhagem de *Microcystis* sp em produzir microcistinas depende de possuir genes requeridos, *mcyB* e *mcyA* (Kleinkauf & Von Döhren, 1996).

Diversos autores utilizaram fragmentos amplificados do *mcy* como marcadores moleculares para cianobactérias potencialmente tóxicas (Neilan *et al.* 1999; Tillett, Parker & Neilan, 2001; Baker *et al.* 2002; Nonneman & Zimba, 2002; Pan *et al.* 2002; Bittencourt- Oliveira, 2003; Hisbergues *et al.* 2003; Wilson *et al.* 2005). Via-Ordorika *et al.* (2004), avaliaram a ocorrência dos genes *mcyA* e *mcyB* juntamente com os caracteres morfológicos das cianobactérias em nove países europeus, onde concluíram que a análise das morfoespécies pode ser indicativa para produção de microcistina, devido a um relacionamento muito próximo entre ocorrência do gene *mcy* e morfoespécie.

No Brasil, Bittencourt-Oliveira (2003), ao investigar a composição genotípica de populações de cianobactérias potencialmente tóxicas, do gênero *Microcystis* (Kützing), em reservatórios de água para abastecimento público do Nordeste e Sudeste do Brasil, através do *mcyB*, constatou que a detecção de toxinas por cianobactérias, através de marcadores moleculares é de grande valia para análises rotineiras de ecossistemas aquáticos, possibilitando o monitoramento e aplicação de ações corretivas precoces.

São escassos os trabalhos relacionados à investigação de populações de cianobactérias potencialmente tóxicas no nordeste brasileiro, sendo Bittencourt-Oliveira (2003) a pioneira no Brasil. O difícil acesso aos reservatórios de água, a eutrofização e a falta de iniciadores específicos às linhagens brasileiras, são fatores limitantes à coleta e processamento de dados. Assim, este trabalho objetivou verificar a presença dos genes *mcyB* e *mcyA*, relacionados à biossíntese de microcistina em populações de cianobactérias, ocorrentes em 7 reservatórios do Estado de Pernambuco, avaliando novos oligonucleotídeos desenhados especificamente para populações brasileiras de *Microcystis*.

2. Material e Métodos

As coletas foram realizadas em sete reservatórios artificiais de três regiões fitogeográficas do Estado de Pernambuco, Brasil (Tabela 1), utilizados principalmente para abastecimento público. Sendo estas regiões: Zona da Mata (clima úmido, solo fértil e vegetação exuberante), Agreste (faixa de transição entre a Zona da Mata e o sertão, com solo raso, rios temporários e vegetação rala e pequena) e Sertão (clima semi-árido e vegetação de pequeno porte, tortuosa, rasteira e/ou espinhadas).

As amostras destinadas à análise da composição taxonômica da comunidade de cianobactérias foram coletadas com auxílio de uma rede de plâncton com 25 μm de abertura de malha ou, eventualmente, com frascos de boca larga de 250mL de capacidade, em casos de alta densidade de cianobactérias, e preservada em formol a 4% , sendo necessário aproximadamente 1mL de formol para cada 100mL da amostra.

A identificação das cianobactérias foi realizada através da identificação de caracteres morfológicos, utilizando microscópio binocular Nikon, modelo YS100, baseada em características morfológicas com auxílio de literatura especializada, tais como: Anagnostidis & Komárek (1985), Komárek & Anagnostidis (1986, 1999) e Komárek & Komárková (2002). A fotodocumentação das cianobactérias foi realizada utilizando um sistema digital composto por um microscópio óptico Nikon Eclipse E200, com câmara digital acoplada (Samsung) e software Imagelab 2000.

Para o cáculo da densidade algal, as amostras foram coletadas à superfície da água com frascos de vidro com boca larga e capacidade de 250mL, acondicionadas em frascos âmbar e preservadas em lugol acético. A contagem das cianobactérias foi realizada em microscópio invertido (Zeiss/Modelo Axioverte 135M), utilizando uma cubeta de 10mL baseado no método de Uthermöhl (1958). Os organismos (células, colônias, filamentos) foram enumerados em campos por transecto (quadrante). A densidade final foi calculada e os valores expressos em org. L^{-1} .

As amostras destinadas à análise molecular foram coletadas à superfície da água com rede de plâncton com 25 μm de abertura de malha, acondicionados em frascos de prolipropileno e transportados ao laboratório. Para extração de DNA total utilizou-se o tampão CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio) e o método proposto por Rogers & Bendich (1985). A concentração de DNA extraído foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com brometo de

etídio, com a utilização do marcador molecular de concentração molecular (Low DNA Mass™, Invitrogen) e visualizada com o auxílio de um transluminador. A fotodocumentação foi realizada com o sistema de fotodocumentação EDAS 290 com o programa Kodak Digital Science 1D v. 3.6 com o auxílio de um transiluminador.

As ampliações dos fragmentos de DNA foram realizadas em termociclador GeneAmp PCRSystem 9700 (Applied Biosystems), utilizando o kits comerciais para PCR (Pure Taq™ Ready –to-Go™ PCR Beads, Amersham Biosciences, USA), segundo recomendação do fabricante. Todos os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2) foram sintetizados por laboratórios especializados e adquiridos comercialmente.

Para verificar a presença de genes envolvidos na biossíntese da microcistina foram utilizados iniciadores que amplificam seqüências dos genes *mcyB* e *mcyA* (Tabela 2 e 3). Utilizou-se o marcador molecular para o operon da c-ficocianina (PC α -F, PC β -R) como controle positivo para cianobactérias. Todas as análises ocorreram em triplicata, segundo Bittencourt-Oliveira (2003).

As análises em HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) foram realizadas segundo a metodologia descrita por Bittencourt-Oliveira *et al.* (2005), com algumas modificações: 1) amostras com cianobactérias foram liofilizadas; 2) extração da microcistina com MetOH/H₂O 3:1; 3) banho de ultrassom por 10 min., 4) centrifugação a 10.000 rpm por 15 min., coletou-se o sobrenadante; 5) repetição dos itens 1, 2 e 3; 6) secou-se o sobrenadante em rotaevaporador (SpeedVac, Savant, US; banho 40°C); 7) material seco, ressuspenso em 3mL de MetOH e aplicado em coluna de sílica (20x5 cm, Sílica Gel Keisegel 60, Merck); 8) etapas de eluição em 30mL água, 30mL água:MetOH e 30mL MetOH: H₂O; 9) frações secadas em rotaevaporador; 10) última fração seca e ressuspendida em 1mL de MetOH: H₂O; 11) acoplou-se a fase móvel do HPLC com uma bomba LC-10 AD, um PDA detector (SPD10AV) e um sistema controlador de SCL-10 Avp (Shimadzu, Kyoto, Japão); 12) adicionou-se a amostra em um tubo “vial” com “insert” de 200 μ L e desprezou-se o pellet; 13) injetou-se a amostra no sistema de cromatografia em uma coluna de HPLC semipreparativa (Phenomenex, Luna C18, 5 μ m, 250x10mm) eluída com uma mistura de MeCN e 0,05 mol/L, pH 3, NH₄CH₃COO (1:3) em uma taxa de 4,7 mL min⁻¹; 14) a detecção foi ajustada em 238 nanômetros com um detector de SPD10AV PDA. 15) análises do HPLC foram executadas com um sistema do HPLC de Shimadzu e a curva de calibração foi obtida com o MCY -LR e [Asp3] - MCY-LR isolada de *M. panniformis*.

3. Resultados

A classe Cyanophyceae esteve representada por três ordens: Chroococcales; Nostocales e Oscillatoriales, 53,3%; 26,6% e 20%, respectivamente. O levantamento taxonômico, dos sete reservatórios, possibilitou a identificação de 16 táxons pertencentes à classe Cyanophyceae: *Anabaena circinalis* (Rabenhorst), *Anabaena constricta* (Szafer), *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska), *Geitlerinema amphibium* (Agardh), *Merismopedia mínima* (Beck), *Merismopedia* sp. (Meyer), *Microcystis aeruginosa* (Kützing), *Microcystis* sp. (Kützing), *Microcystis* sp.2 (Kützing), *Chroococcus turgidus* (Kützing) Nägeli, *Aphanothece* sp. (Nägeli), *Aphanocapsa incerta* (Lemmermann), *Spirulina* sp. (Turpin ex Gomont), *Pseudanabaena acicularis* (Nygaard) Anagnostidis & Komárek, *Raphidiopsis mediterranea* (Fritsch & Rich), *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek.

A maior riqueza de espécies foi encontrada no reservatório de Arcoverde (01/03/05) com nove táxons identificados, seguido de Arcoverde (23/08/06), Botafogo (18/10/06) e Tapacurá (16/10/06) com oito táxons identificados; Carpina (26/08/06) e Mundaú (19/09/06) com seis táxons identificados; Jazigo (03/03/05) e Tapacurá (26/08/04) com quatro táxons identificados e Duas Unas (17/10/06) com três táxons identificados.

Dentre os reservatórios estudados, Mundaú foi o que apresentou a maior densidade de org. L⁻¹ (Tabela 4), com o valor de 51.423.078 org.L⁻¹ seguido de Arcoverde, Jazigo, Botafogo, Tapacurá, Carpina, e Duas Unas.

Análise qualitativa mostrou-se mais representativa na biodiversidade de táxons encontrados, se comparada à análise quantitativa (densidade algal). Essa divergência pode ser explicada pelo maior volume capitado através da rede de fitoplâncton, permitindo assim uma maior abrangência de espécies. Devido a este fator, foi possível evidenciar a presença de *M. aeruginosa* e *Microcystis* sp. para o reservatório de Duas Unas (17/10/06) e de *M. aeruginosa* para o reservatório de Jazigo (03/03/05).

Em todos os reservatórios analisados foi comprovada a presença de cianobactérias, através do indicador do operon da ficocianina PC (PC α -F e PC β -R), bem como para os oligonucleotídeos *mcyB*-FR e *mcyB*-FRA (Figuras 4, 6, 7, 8 e 12). Dentre os *primers* *mcyB*-FR e *mcyB*-FRA, o *primer* *mcyB*-FR demonstrou ser mais específico que o *mcyB*-FRA, por não apresentar bandas inespecíficas (Figuras 3, 5, 9, 10, 11) e (Tabela 4).

Todos os reservatórios analisados possuem cianobactérias, e em seu material genético, genes (*mcyB*) para produção de toxinas, sendo possíveis produtores de microcistinas por cianobactérias do gênero *Microcystis*. Porém, apenas o reservatório de Tapacurá no período chuvoso (26/08/04), contém o operon para o *mcyB* (Figuras 7 e 8) e *mcyA* (Figura 12), estando representado por 11,11% das amostras analisadas.

Dentre os reservatórios analisados por HPLC, apenas o reservatório de Jazigo (03/03/05) (Tabela 4) apresentou toxicidade comprovada (Figura 13), confirmando assim a técnica de biologia molecular empregada.

4. Discussão

Os reservatórios estudados apresentam características distintas pela localização geográfica e climatológica, tornando a comunidade de cianobactérias importantes para seu estudo ecológico. As análises qualitativas e quantitativas revelam que estas comunidades estão amplamente distribuídas nos reservatórios do Estado de Pernambuco, apresentando um maior número de org. L⁻¹ no reservatório localizado no Agreste (Mundaú), seguido pelos reservatórios do Sertão (Arcoverde e Jazigo) e Zona da Mata (Botafogo, Tapacurá, Carpina e Duas Unas). Dentre as espécies descritas, pode-se destacar a maior densidade de *Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii* (morfotipo reto e espiralado), *Merismopedia minima* e *Geitlerinema* sp. A presença de cianobactérias pode ser explicada devido a maior intensidade luminosa, temperatura da água e do ar, favoráveis ao seu desenvolvimento (Koksharova & Wolk, 2002).

A classe Cyanophyceae esteve representada por três ordens: Chroococcales; Nostocales e Oscillatoriales; 53, 3%; 26, 6% e 20%, respectivamente. A espécie *M. aeruginosa* foi a mais encontrada entre os reservatórios, corroborando assim com Bittencourt-Oliveira (2000), que afirma ser esta a espécie amplamente distribuída em corpos d'água brasileiros.

Sendo o operon da ficocianina uma região altamente útil para identificação de cianobactérias, amplificando seletivamente o material genético presente na amostra (Neilan, Jacobs & Goodman, 1995), já era esperado que as amostras ambientais apresentassem resultados positivos para o gene da ficocianina (PC), devido a existência de outras cianobactérias que não as do gênero *Microcystis*, porém a determinação preditiva do potencial genético para produção de microcistinas apenas

pode ser determinado com a investigação dos *mcys*, onde a detecção microscópica de *Microcystis* não é capaz de discernir entre linhagens tóxicas e não tóxicas (Ouellette, Handy & Wilhelm, 2006).

Há ainda a necessidade de oligonucleotídeos específicos para sua determinação, onde outros gêneros de cianobactérias também possuem potencial genético para produção de microcistinas através do operon do *mcyB*, embora apresentem outra conformação de transcrição e seqüência dos *mcys* (Mikalsen *et al.* 2003; Dittmann & Börner, 2005; Anjos *et al.* 2006).

A avaliação ambiental de toxinas de cianobactérias torna-se difícil, devido aos fatores ambientais e fisiológicos de cada espécie (Bittencourt-Oliveira, Oliveira & Yunes, 2001). Mesmo não sendo detectado *Microcystis* na análise quantitativa para os reservatórios de Duas Unas (17/10/06) e Jazigo (03/03/05), o referido gênero foi evidente na análise qualitativa. Contudo, ambos os reservatórios mostraram-se positivos para a presença de cianobactérias frente ao controle PC e ao gene para o *mcyB*. Esse tipo de evidencia pode ser confirmado pelos relatos de Kurmayer & Kutzenberger (2003), que afirmam que a produção de microcistina, em cianobactérias, pode ser quantificada com sucesso numa escala a partir de 10 células, por PCR baseada no gene do *mcyB*.

Em todos os reservatórios analisados foi comprovada a presença de cianobactérias através do indicador do operon da ficocianina PC ($PC\alpha$ -F e $PC\beta$ -R), bem como os genes para o *mcyB*-FR e *mcyB*-FRA, revelando-se uma técnica eficaz na identificação de cianobactérias com potencial genético para avaliar a produção de toxinas (Bolch *et al.* 1996; Baker *et al.* 2001). Neilan *et al.* (1999) fizeram uso do *primer* FAA e RAA para distinguir espécies que produzem microcistinas, com êxito. Outros autores fizeram uso do operon do *mcyB*, como Nonneman & Zimba (2002) que distinguiram cianobactérias com potencial produtor de toxina e Bittencourt-Oliveira (2003) que caracterizou linhagens brasileiras de *Microcystis* produtoras de microcistina.

Houve a presença de bandas inespecíficas nos reservatórios de Arcoverde (23/08/06), Jazigo (03/03/05), Botafogo (18/10/06), Duas Unas (17/10/06) e Mundaú (19/09/06) para o *primer* *mcyB*-FRA, onde o *primer* amplificou o fragmento esperado e fragmentos inespecíficos. Não se pode esperar que um *primer* de PCR amplifique unicamente todo o alvo desejado de uma amostra misturada (Stiller & McClanahan, 2005). Impurezas, como DNA de bactérias heterotróficas e de outras algas, podem vir a influenciar na reação de PCR. Generalizações para dinâmica de espécies de

Microcystis podem ter um potencial de aplicabilidade inválido de região para região (Bittencourt-Oliveira *et al.*; 2001).

O reservatório de Tapacurá no período chuvoso (26/08/04), apontou a presença dos genes *mcyA* e *mcyB*, sendo o *mcyA* evidente apenas para este reservatório dentre as nove amostras analisadas. A presença desse gene apenas para a amostra ambiental do reservatório de Tapacurá corrobora os resultados de Yoshida *et al.* (2007), que retrata a presença do *mcyA* em proporções de 0,5 à 35% em populações ambientais analisadas.

Dos nove reservatórios estudados, dois (Arcoverde 01/03/05 e Jazigo 03/03/05) foram analisados por HPLC. O resultado para o ensaio utilizando HPLC (Figura 13) confirma os dados moleculares quanto à presença da toxina microcistina, para o reservatório de Jazigo (03/03/05), bem como o indício de produção de cinco variantes distintas, corroborando assim com Chorus & Bartram (1999), que afirmam que uma única cepa pode produzir mais do que uma variante para microcistina. Estes resultados assemelham-se aos de Anjos *et al.* (2006), que fez uso da região do *mcyB* para detectar cianobactérias potencialmente tóxicas em floração de um reservatório brasileiro do estado de São Paulo, onde ensaios de HPLC determinaram três variantes distintas de microcistina, MC-LR, MC-RR e MC-YR.

Os ensaios em HPLC corroboram com a necessidade do monitoramento da qualidade da água nos reservatórios de abastecimento público do estado de Pernambuco. Torna-se então, de suma importância, a continuidade de biomonitoramento dos ambientes aquáticos destinados ao abastecimento público principalmente quanto à dinâmica fitoplanctônica da divisão Cyanophyta, visando o controle de seu desenvolvimento associado à produção de toxina e gerenciamento da qualidade da água, uma vez que, espécies produtoras e não produtoras de microcistina coexistem no ambiente e são morfologicamente idênticas (Mbedi *et al.* 2005).

O método de PCR apresentado é sensível e apropriado para a detecção de potenciais produtores de microcistinas em amostras ambientais, exemplificado pela figuras. Sua habilidade em revelar o potencial tóxico das cianobactérias, nos reservatórios estudados, sugere que poderá ser utilizado como um método de alerta para florações de algas tóxicas.

5. Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa ao primeiro Autor; ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo pelo apoio institucional.

6. Referências Bibliográficas

- Anagnostidis K. & Komárek J. (1985) Modern approach to the classification system of cyanophytes. *Algological Studies*, **38/39**, 291-302.
- Anjos F.M.; Bittencourt-Oliveira M.C.; Zajac M.P.; Hillen S.; Christian B.; Luckas B. & Pinto E. (2006) Determinação de Cianobactérias e suas toxinas por PCR e LC-MS durante uma floração na represa Billings. In: *XI Congresso Brasileiro de Ficologia*, **73**. Itajaí – Santa Catarina/ Brasil.
- Baker J.A.; Entsch B.; Neilan B.A. & McKay D.B. (2002) Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (12), 6070-6076.
- Baker J.A.; Neilan B.A.; Entsch B.; McKay D.B. (2001) Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. *Environmental Toxicology*, **16**, 472–482.
- Bittencourt-Oliveira M.C. (2000) Development of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz. (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and its taxonomic implications. *Algological Studies*, **99**, 29-37.
- Bittencourt-Oliveira M.C. (2003) Detection of potencial microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Hamful Algae*, **2**, 51-60.
- Bittencourt-Oliveira M.C.; Kujida P.; Cardoso K.H.M.; Carvalho V.M.; Moura A.N.; Colepicolo P. & Pinto E. (2005) A novel rhythm of microcystin biosynthesis is described in the cyanobacterium *Microcystis panniformis* Komárek *et al.* *Biochemical and biophysical research communications*, **326** (3), 687-694.
- Bittencourt-Oliveira M.C.; Oliveira M.C. & Yunes J.S. (2001) Cianobactérias tóxicas: O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética. *Biotecnologia*, **37**, 44-47.

- Bolch C.J.S.; Blackburn S.I.; Neilan B.A. & Grewe P.M. (1996) Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR- RFLP of the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions. *Journal of Phycologia*, **32**, 445-451.
- Chorus I. & Bartram J. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water. Aguide to their Public Health consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, Londres, 416 p.
- Dittmann E. & Börner T. (2005) Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203**, 192-200.
- Hisbergues M, Christiansen G, Rouhiainen L, Sivonen K. & Börner T. (2003) PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, **180**(6), 402-410.
- Jochimsen E.M.; Carmichael W.W.; An J.; Cardo D.; Cookson S.T.; Holmes C.E.M.; Antunes M.B.C.; Melo-Filho D.A.; Lyra T.M.; Barreto V.; Azevedo S.M.F.O. & Jarvis W.R. (1998) Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, **36**, 373-378.
- Kleinkauf H. & Von Döhren H. (1996) A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, **236**, 335-351.
- Koksharova O.A. & Wolk C.P. (2002) Genetic tools cyanobacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, **58**, 123-137.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1986) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2: Chroococcales. *Algological*, **43**, 157-226.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1999) Cyanoprocarota: Chroococcales. In. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart **19**(1), 1-548.
- Komárek J. & Komárková J. (2002) Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology*, **2**, 1-24.
- Kurmayer R. & Kutzenberger T. (2003) Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(11), 6723-6730.
- Mankiewicz-Boczek J.; Urbaniak M.; Romanowska-Duda Z. & Izydorczyk K. (2006) Toxic cyanobacteria strains in lowland dam reservoir (Sulejów Res., Central Poland): Amplification of *mcy* genes for detection and identification. *Polish Journal of Ecology*, **54**, 171-180.
- Mbedi S.; Welker M.; Fastner J. & Wiedner C. (2005) Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiology Letters*, **245**, 299-306.

- Mikalsen B.; Boison G.; Skulberg O.M.; Fastner J.; Davies W.; Gabrielsen T.M.; Rudi K. & Jakobsen K.S. (2003) Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *Journal Bacteriology*, **185**, 2774-2785.
- Neilan B.A.; Dittmann E.; Rouhiainen L.; Bass A.; Schaub V.; Sivonen K. & Börner T. (1999) Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, **181**, 4089-4097.
- Neilan B.A.; Jacobs D. & Goodman A.E. (1995) Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3875–3883.
- Nonneman D. & Zimba P.V. (2002) A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. *Journal of Phycology*, **38**, 230-233.
- Ouellette A.J.A.; Handy S.M. & Wilhelm S.W. (2006) Toxic *Microcystis* is widespread in lake Erie: PCR detection of toxin genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities. *Microbial Ecology*, **51**, 154–165.
- Pan H.; Song L.; Liu Y. & Börner, T. (2002) Detection of hepatotóxico *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Archives of Microbiology*, **178**, 421- 427.
- Rogers S.O. & Bendich A.J. (1985) Extration of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, **5**, 69-76.
- Stiller J.W. & McClanahan A. (2005) Phyto-specific 16S rDNA PCR primers for recovering algal and plant sequences from mixed samples. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 1-3.
- Tillett D.; Parker D. L. & Neilan B.A. (2001) Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6), 2810-2818.
- Utermohl H. (1958) Zur vervollkommer der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt int Verein Theor Angew Limnology*, **10**, 109-122.
- Via-Ordorika L.; Fastner J.; Kurmayer R.; Hisbergues M.; Dittmann E.; Komarek J.; Erhard M. & Chorus I. (2004) Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in european freshwater bodies: detection of

microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**, 592-602.

Wilson A. E.; Sarnelle O.; Neilan B.A.; Salmon T.P.; Gehringer M. . & Hay M.E. (2005) Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: Implications for harmful algal blooms. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(10), 6126-6133.

Yoshida M.; Yoshida T.; Takashima Y.; Hosoda N. & Hiroishi S. (2007) Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in Japanese lake. *FEMS Microbiology Letters*, **266**, 49-53.

Tabela 1: Reservatórios de abastecimento público de água no Estado de Pernambuco, amostrados neste estudo.

Reservatório	Latitude	Longitude	Região Fitogeográfica	Município	Período	
					Seco	Chuvoso
Arcoverde	8°33'33"S	36°59'07"W	Sertão	Arcoverde	23/08/06	01/03/05
Jazigo	7°59'58"S	38°14'31"W	Sertão	Serra Talhada	NR	03/03/05
Mundaú	8°57'17"S	36°29'55"W	Agreste	Garanhuns	19/09/06	NR
Carpina	7°53'51"S	35°20'13"W	Zona da Mata	Carpina	NR	26/08/06
Tapacurá	8°02'14"S	35°09'46"W	Zona da Mata	São Lourenço da Mata	16/10/06	26/08/04
Botafogo	7°53'2''S	35°03'32''W	Zona da Mata	Igarassú	18/10/06	NR
Duas Unas	8°05'31"S	35°02'19"W	Zona da Mata	Jaboatão dos Guararapes	17/10/06	NR

NR: Não Realizado

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para identificação dos genes *mcyA* e *mcyB*

	Fonte	Sequências	Fragmento
<i>PC</i>			
PC α -F:	Bolch <i>et al.</i> 1996	5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3'	500-600bp
PC β -R:		5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3'	
<i>mcyA</i>			
cdF	Hisbergues <i>et al.</i> 2003	5'-AAAATTAAAAGCCGTATCAAA-3'	~300bp
cdR		5'-AAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT-3'	
<i>mcyB</i>			
<i>mcyB</i> -F	Bittencourt-Oliveira <i>et al.</i> (em preparação)	Sigilo de patente	~570bp
<i>mcyB</i> -R			
<i>mcyB</i> -F	Bittencourt-Oliveira <i>et al.</i> (em preparação)	Sigilo de patente	~315bp
<i>mcyB</i> -RA			

Tabela 3: Condições de PCR na amplificação das amostras para verificação da presença de genes envolvidos na biossíntese da microcistina

Condições de PCR						
	Ciclo Inicial	Desnaturação	Annealing	Extensão	Ciclo Final	Nº de Ciclos
PC	94 °C 2 min.	94 °C 40 seg.	55 °C 50 seg.	72 °C 2 min.	72 °C 2 min	30
<i>mcyA</i>	95 °C 10 min.	94 °C 30 seg.	59 °C 30 seg.	72 °C 30 seg.	72 °C 5 min.	33
<i>mcyB</i>	94 °C 2 min.	94 °C 10 seg.	50 °C 20 seg	72 °C 1 min.	72 °C 5 min.	35

Tabela 4: Representação da presença ou ausência da amplificação de fragmentos de DNA para a identificação da ficocianina (PC), *mcyB*, *mcyA* e análise de HPLC e org. L⁻¹.

Reservoir	Arcoverde	Arcoverde	Jazigo	Mundaú	Tapacurá	Tapacurá	Carpina	Botafogo	Duas Unas
Semanas	23/08/06 (Seco)	01/03/05 (Chuvoso)	03/03/05 (Chuvoso)	19/09/06 (Seco)	16/10/06 (Seco)	26/08/04 (Chuvoso)	26/08/06 (Chuvoso)	18/10/06 (Seco)	17/10/06 (Seco)
<i>cpcBA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>mcyA</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
cdF/cdR									
<i>mcyB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F/R									
<i>mcyB</i>	+*	+	+*	+*	+	+	+	+*	+
F/RA									
HPLC	NR	ND	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Cyanobac	28.769.231	30.928.568	17.228.569	51.423.078	7.730.770	91.665	2.192.309	13.807.694	30.762
(cel/mL)									

NR: Não realizado; ND: Não Determinado.

(+) e (-). Presença e ausência do fragmento esperado; (*) Presença de fragmentos não esperado

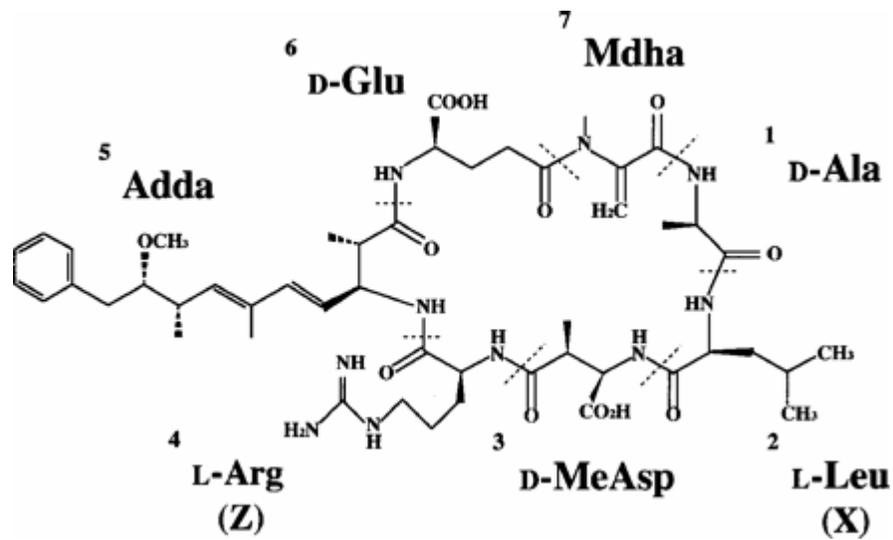


Fig. 1: Estrutura química da microcistina- LR. (Fonte: Nishizawa *et al.* 2001)

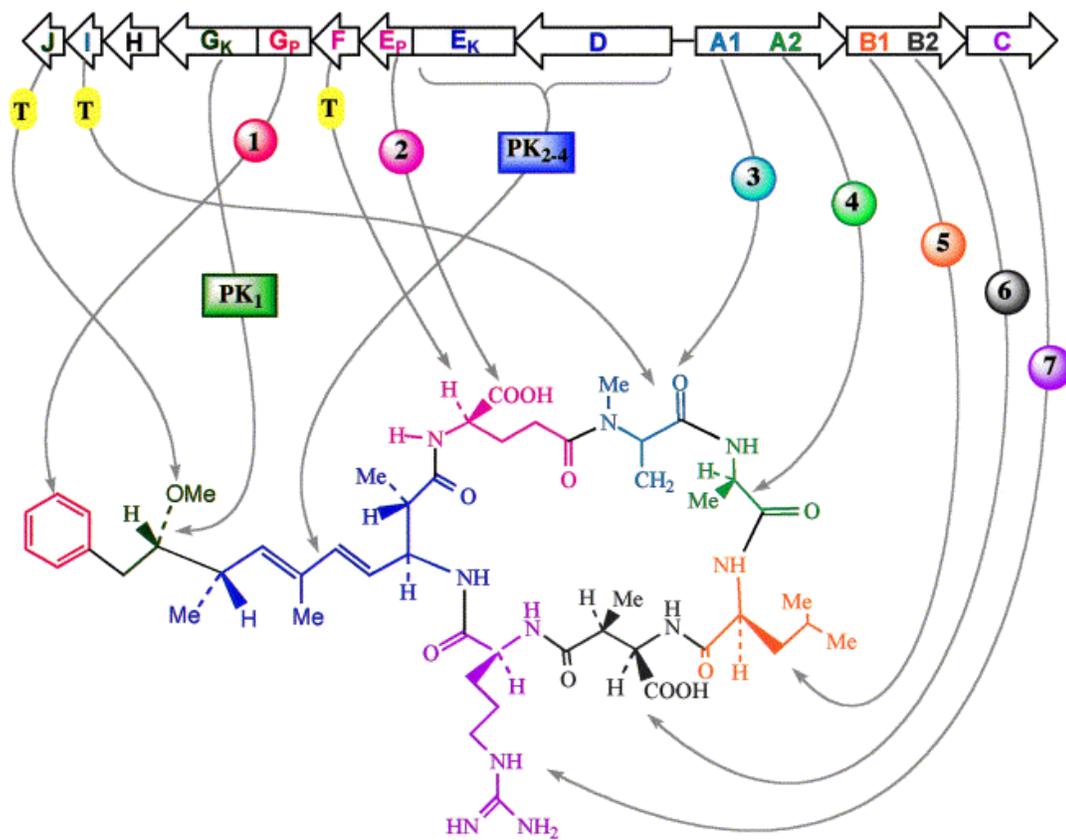


Fig. 2: Modelo biossintético da microcistina- LR. (Fonte: Kaebernick & Neilan, 2001)

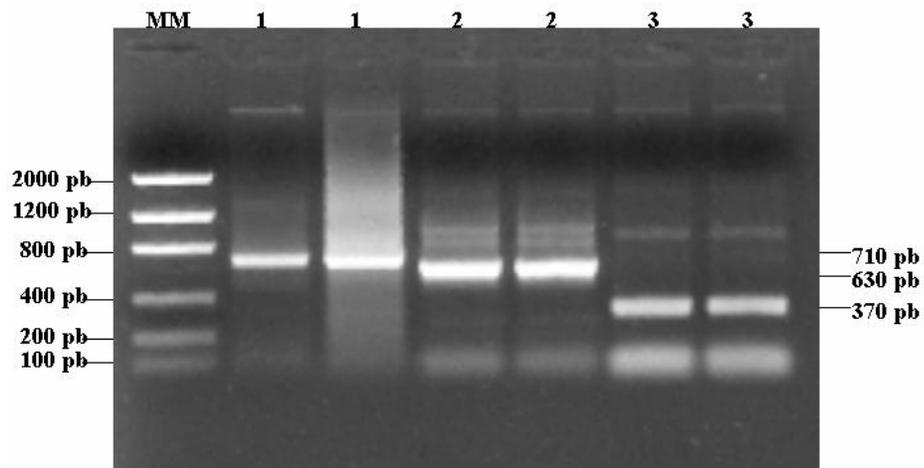


Figura 3: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Arcoverde, 23/08/06 (período seco). MM:(Low DNA Mass Ladder Standard) 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA.

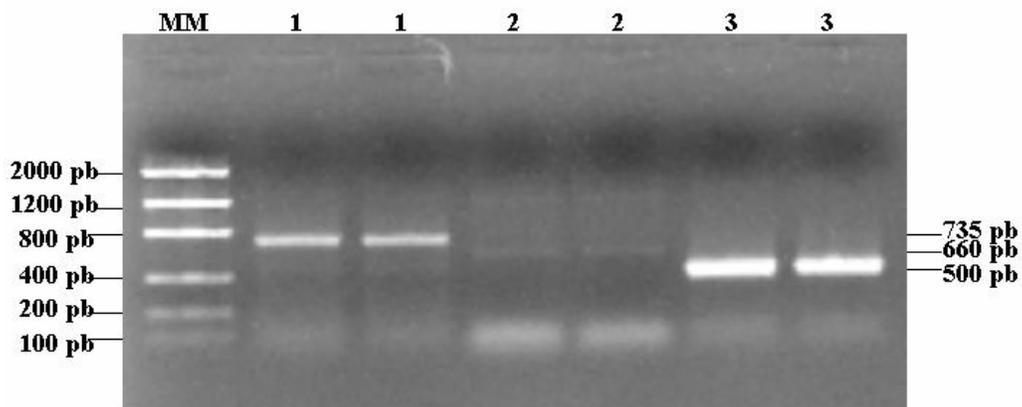


Figura 4: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Arcoverde, 01/03/05 (período chuvoso). MM: (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-RF; 3: *mcyB*-RAF.

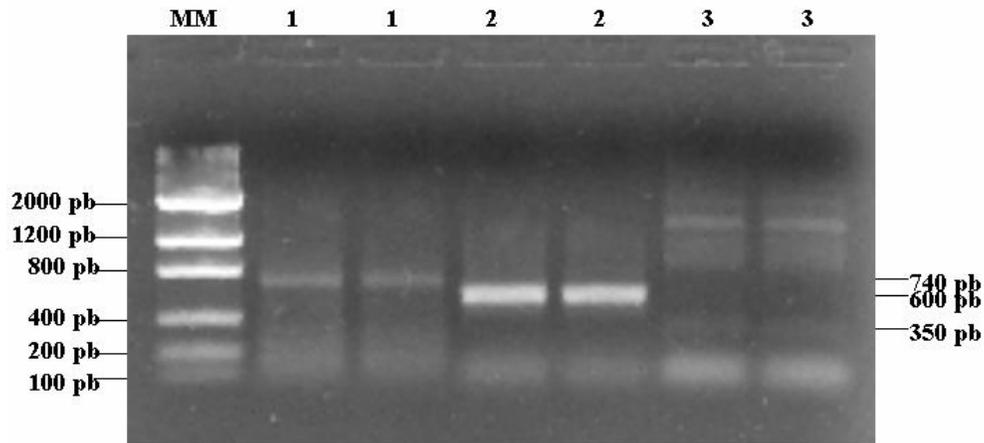


Figura 5: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Jazigo, 03/03/05 (período chuvoso). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA..

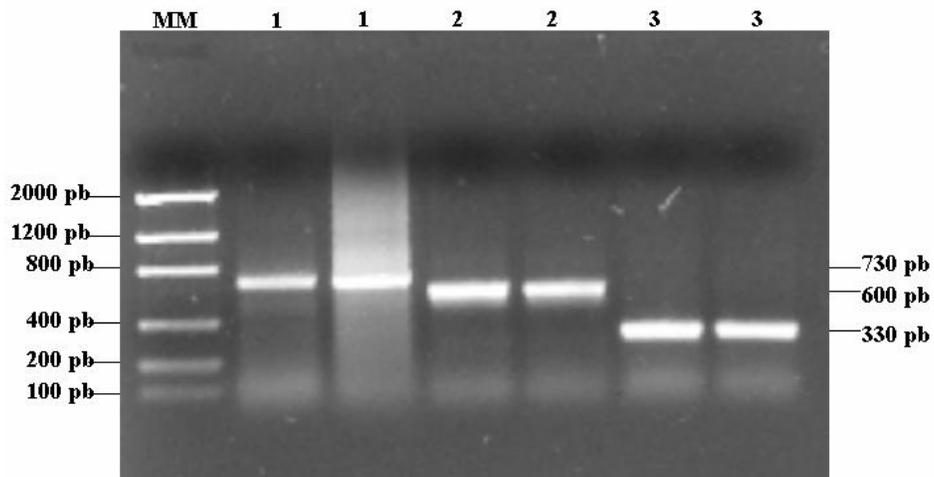


Figura 6: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório de Carpina, 26/08/06 (período chuvoso). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA.

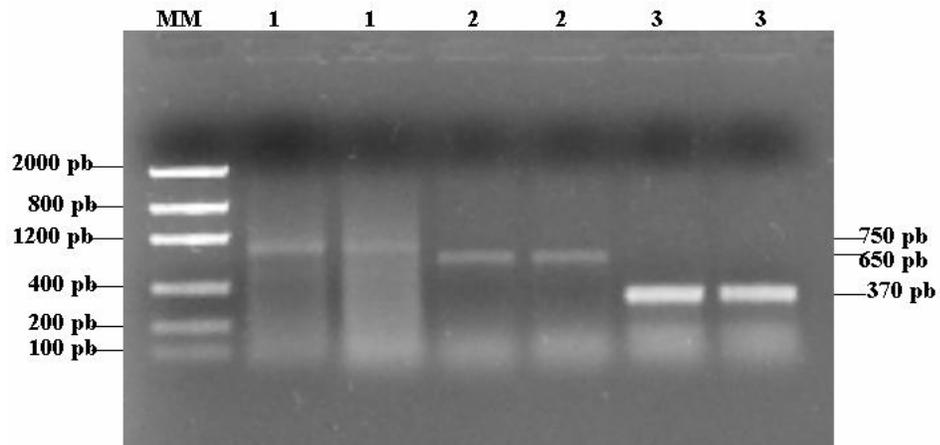


Figura 7: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Tapacurá, 16/10/06 (período seco). MM: (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA.

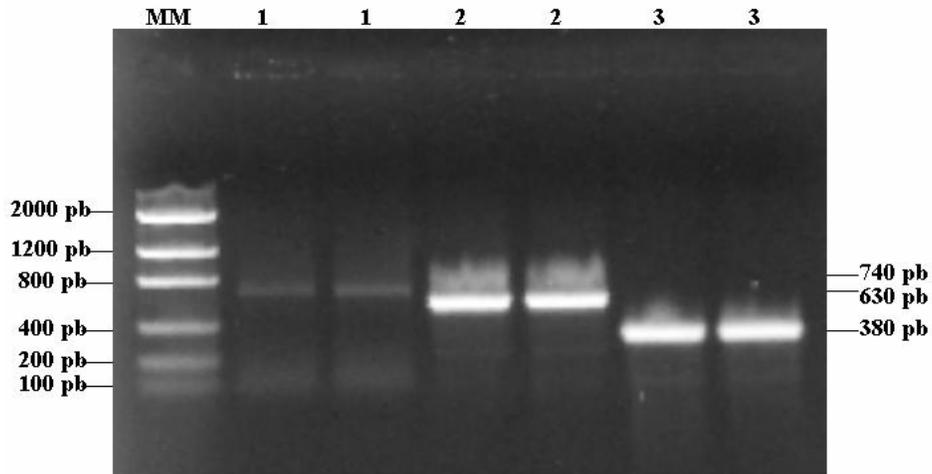


Figura 8: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Tapacurá, 26/08/04 (período chuvoso). MM: (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA.

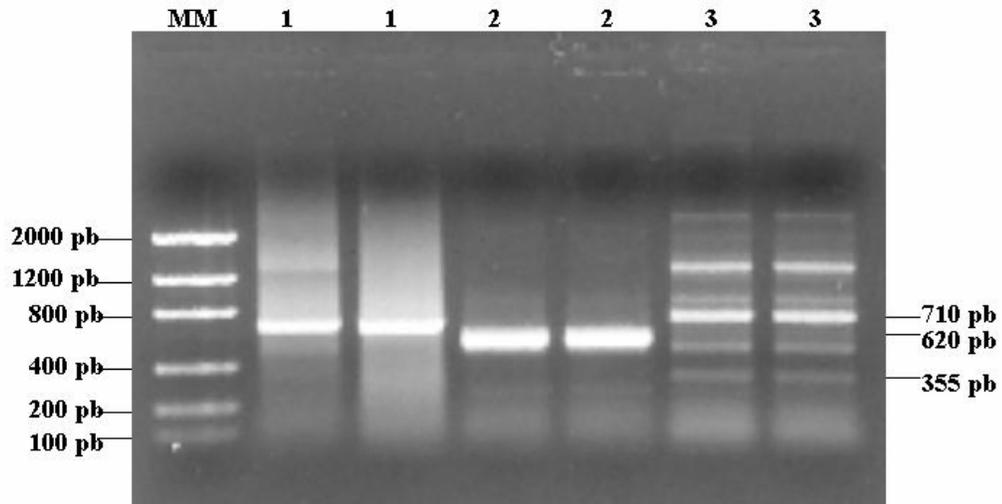


Figura 9: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Botafogo, 18/10/06 (período seco). MM: (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA.

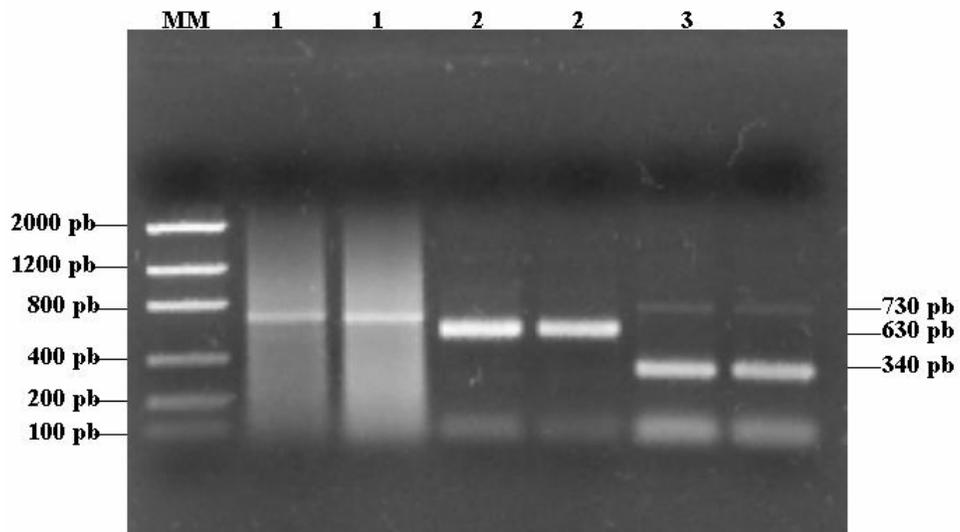


Figura 10: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Duas Unas, 17/10/06 (período seco). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA.

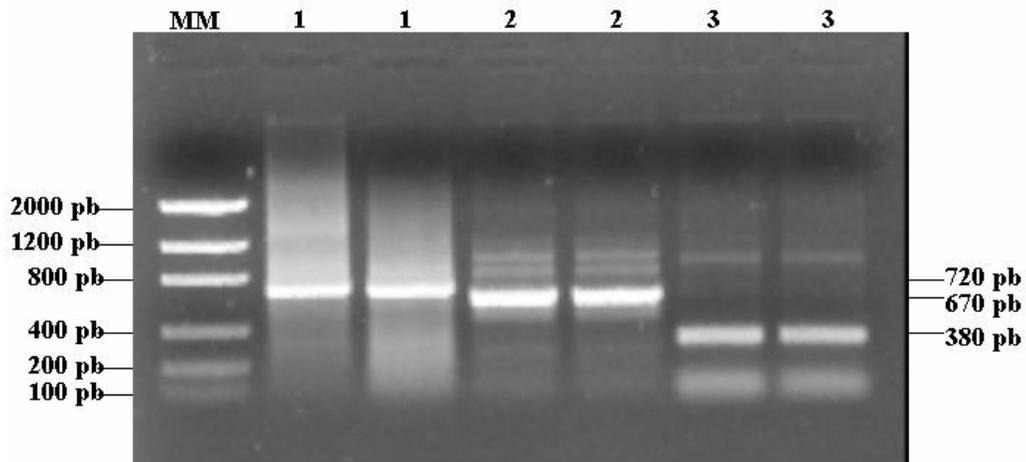


Figura 11: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Mundaú, 19/09/06 (período seco). MM (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: PC (PC α -F e PC β -R); 2: *mcyB*-FR; 3: *mcyB*-FRA..

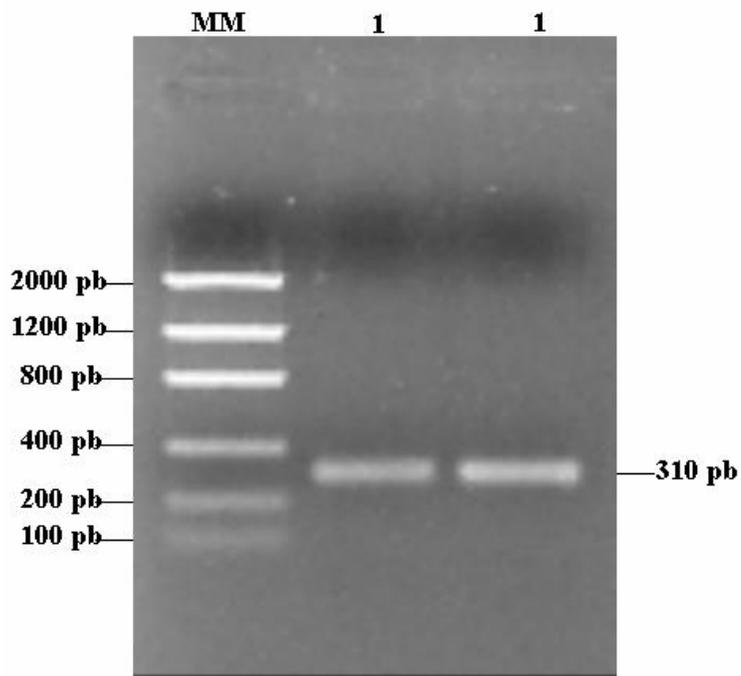


Figura 12: Gel de agarose 0,7%, corado com brometo de etídio, mostrando produto de amplificação de DNA extraído de amostra da natureza do reservatório Tapacurá, 26/08/04 (período chuvoso). MM: (Low DNA Mass Ladder Standard); 1: *mcyA*- cdF /cdR.

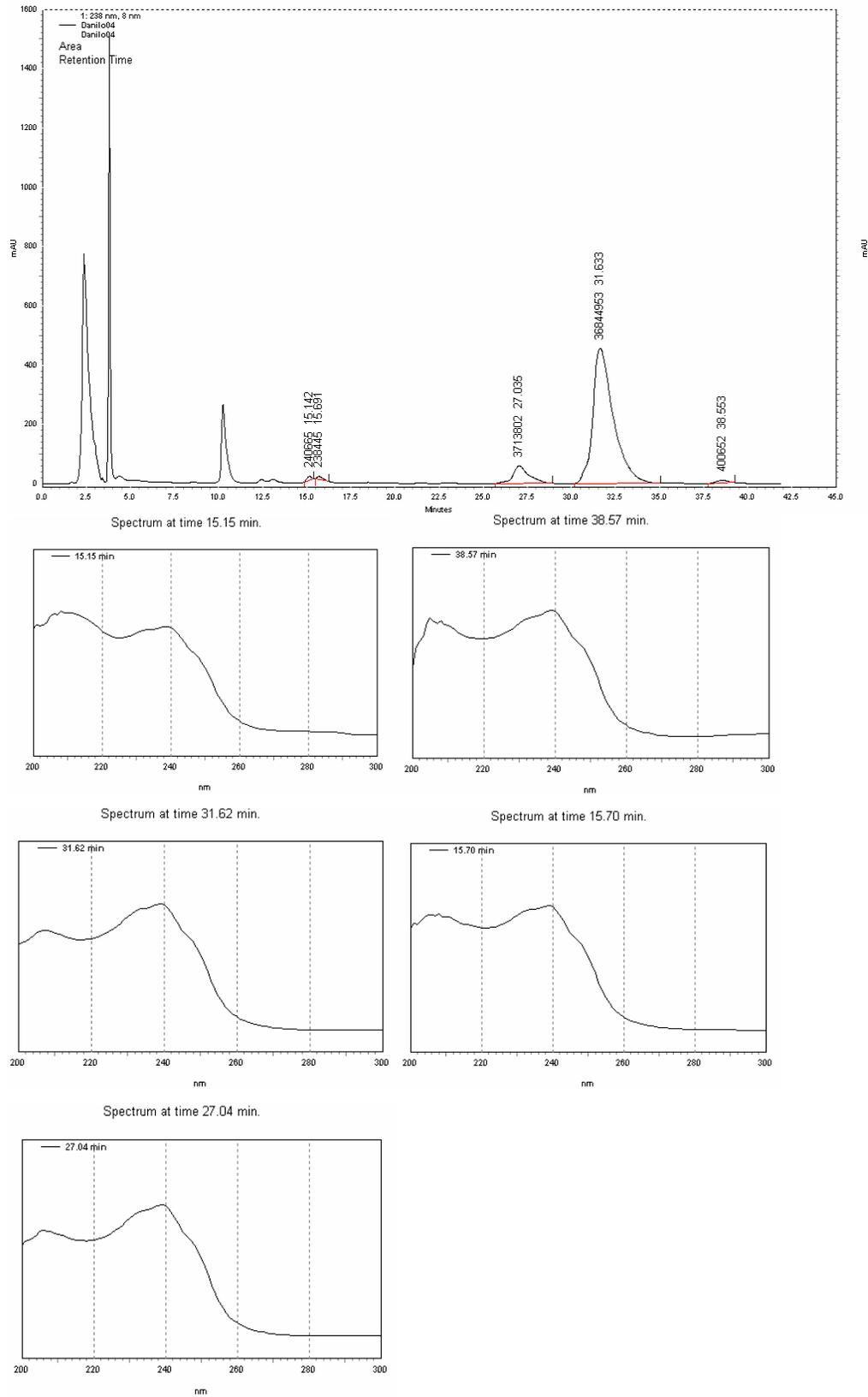


Figura 13: Cromatograma - HPLC do reservatório de Jazigo, chuvoso (03/03/05).

Anexos

Normas de submissão da Revista *Freshwater Biology*

Freshwater Biology

Edited by:

Alan G. Hildrew and Colin R. Townsend

Print ISSN: 0046-5070**Online ISSN:** 1365-2427**Frequency:** Monthly**Current Volume:** 52 / 2007**ISI Journal Citation Reports® Ranking:** 2006: 6/79 (Marine & Freshwater Biology)**Impact Factor:** 2.502**Author Guidelines****Did you know... *Freshwater Biology* has no page charges?****NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.**

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [this page](#) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

All manuscripts should be submitted through the Freshwater Biology Manuscript Central electronic editorial office, which may be accessed through the following site: <http://mc.manuscriptcentral.com/fwb>

The corresponding author will need to create an account (top left hand corner) the first time he/she accesses the site, and will be asked to provide full contact details. Freshwater Biology - Manuscript Central will then create a user name and password which should be retained for future access to the site. Once the author is logged into the system, the Main Menu will be displayed. Clicking on the Author Centre will bring up instructions for uploading the manuscript and associated files. All subsequent correspondence regarding the manuscript will be handled by e-mail.

If the author is absolutely unable to submit the manuscript through Freshwater Biology Manuscript Central, he/she should contact Professor Alan Hildrew (a.hildrew@qmul.ac.uk) or Professor Colin Townsend (colin.townsend@stonebow.otago.ac.nz) by e-mail.

SPECIAL ISSUES

Freshwater Biology publishes two-three themed issues each year which are available at the special single-issue price of £25.00 each. Visit the [Special Issues](#) page for more information. Only papers for those Special Issues that have been agreed with the Special Issues Editor (Professor Mark Gessner) should be submitted via Freshwater Biology Manuscript Central. However, if you have any queries in advance of submission, authors should contact him (mark.gessner@eawag.ch). Guest Editors should consult the [Guidelines for Guest Editors of SpecialIssues](#).

APPLIED PAPERS

Any queries in advance of submission via Manuscript Central should be directed to Professor Richard Johnson (richard.johnson@ma.slu.se).

SUBMISSION GUIDELINES

A single file should be prepared containing the title page, summary, text, acknowledgements, references and tables (see guidelines below). Additional files may be created for each figure. DOS or Windows operating system and Word Perfect or Word for Windows word-processing packages should be used to prepare the text file.

- Please leave the right-hand margin unjustified
- Turn the hyphenation option off
- Use tabs, not spaces to separate data in tables

(a) *Title page*. This should include the title, list of authors names, institute or laboratory of origin, name, postal address and email address of the author to whom proofs should be sent, an abbreviated title for use as a running head line and five keywords, which should be relevant for literature searching and each normally comprising not more than two words.

(b) *Summary*. All papers should include a summary, in short numbered paragraphs, limited to about 3% of the length of the text, and in any case to not more than 500 words. This should provide a concise statement of the scope of the work and its principal findings and be fully intelligible without reference to the main text.

(c) *Introduction*. This should contain a clear statement of the reason for doing the work, outlining essential background information but should not include either the results or conclusions.

(d) *Methods*. This should be concise but provide sufficient details to allow the work to be repeated. **Product and manufacturer names:** Where specific named materials/products are mentioned or named equipment used (including software packages), these should be identified by their manufacturer, followed by the manufacturer's location (e.g. town, state, country), or a source reference should be given if a standard or replicated procedure is being followed or uses.

(e) *Results*. This should not include material appropriate to the Discussion.

(f) *Discussion*. This should highlight the significance of the results and place them in the context of other work.

(g) *Acknowledgments*.

(h) *References*.

(i) *Tables*.

(j) *Figure legends*.

(k) *Illustrations*. The original drawings should not be sent until the Editor requests them. Please see section on Tables, Figures and Illustrations for further information on electronic submission of artwork.

WELFARE AND LEGAL POLICY

Researchers must have proper regard for conservation and animal welfare considerations. Attention is drawn to the 'Guidelines for the Use of Animals in Research' published in each January issue of the journal *Animal Behaviour* since 1991. Any possible adverse consequences of the work for populations or individual organisms must be weighed against the possible gains in knowledge and its practical applications. Authors are required to sign a declaration that their work conforms to the legal requirements of the country in which it was carried out ([see below](#)), but editors may seek advice from referees on ethical matters and the final decision will rest with the editors.

SUBMISSION

Freshwater Biology Manuscript Central will require Authors to confirm the following:

- (i) that the work as submitted has not been published or accepted for publication, nor is being considered for publication elsewhere, either in whole or substantial part.
- (ii) that the work conforms to the legal requirements of the country in which it was carried out, including those relating to conservation and welfare, and to the journals policy on these matters ([see above](#)).
- (iii) that all authors and relevant institutions have read the submitted version of the manuscript and approve its submission.
- (iv) that all persons entitled to authorship have been so included.

Manuscripts must be in English and spelling should conform to the *Concise Oxford Dictionary of Current English*. Editors reserve the right to modify manuscripts that do not conform to scientific, technical, stylistic or grammatical standards, and minor alterations of this nature will normally be seen by authors only at the proof stage.

ONLINE OPEN

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via the Blackwell Synergy website. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1300 (equivalent to \$2600) to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via the Blackwell Synergy service.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and copyright licence form available [here](#). (Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY). Once complete this form should be sent to the Production Editor along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before acceptance.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

© [date] TheAuthor(s)

Journal compilation © [date] Blackwell Publishing Ltd

AUTHOR MATERIAL ARCHIVE POLICY

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

SCIENTIFIC NAMES

The complete scientific name (genus, species and authority) should be cited for every organism when first mentioned except that the authority should not be given in the title or summary. Tables are often useful in collating specific names and, if used in this way, should be referred to early in the text. Subsequent to its first appearance in the text, the generic name may be abbreviated to an initial except where intervening references to other genera would cause confusion. Common names

of organisms, if used, must be accompanied by the correct scientific name on first mention. Latin names should be italicized.

ABBREVIATIONS AND UNITS

Full names with uncommon abbreviations must be given with the first mention; new abbreviations should be coined only for unwieldy names and should not be used at all unless the names occur frequently. In the title and summary unusual abbreviations should be identified, in the introduction and discussion they should be used sparingly. SI units are preferred. Contributors should consult the Royal Society pamphlet *Quantities, Units and Symbols* (1975) and the IBP pamphlet *Quantities Units and Symbols for IBP Synthesis* (1975).

TABLES, FIGURES AND ILLUSTRATIONS

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals with a fully informative caption as a heading. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. Vertical lines should not be used to separate columns. Electronic tables should be provided in an editable format (.rtf or .doc). All illustrations (including photographs) are classified as figures and should be numbered consecutively.

Authors should submit artwork electronically. **Photographs** should be saved at 300 d.p.i. in TIF format, or in JPG format with low compression. **Line figures** should preferably be submitted in vector graphics format, and either embedded as such in a Word document or saved in PDF or EPS format). If this is not possible, they should be saved separately as pixel-based graphics at 600 d.p.i. (at the required print size) and saved in TIF (not JPG) format, or embedded as such in a Word document. **Combination figures** (e.g. with photographic and line/text content) should be prepared as for line figures. For help in preparing your figures please go to our Electronic Artwork Information page [here](#).

In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

COLOUR ILLUSTRATIONS

It is the policy of Freshwater Biology for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. The cost of colour printing in this Journal has recently gone down, with the first figure costing 150 GBP and all subsequent figures 50 GBP each. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* [here](#). If you are unable to download the form, please contact the Production Editor (Freshwater Biology, Blackwell Publishing Services Singapore PTE Ltd, 600 North Bridge Road, #05-01 Parkview Square, (S) 188 778, Singapore; e-mail: fwb@oxon.blackwellpublishing.com) and you will be emailed or faxed a form. Once completed, please return the form to the Production Editor at the above address.

Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.

* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, it is available as a free download from the following web address:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

REFERENCES

References in articles - We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp> Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp> References should be made by giving the authors name with the year of publication in parentheses. When reference is made to a work by three authors all names should be given when cited for the first time and thereafter using only the first name and adding *et al.*; for four or more authors the first name followed by *et al.* should be used on

all occasions. If several papers by the same author and from the same year are cited, a, b, c, etc., should be put after the year of publication. References should be listed in alphabetical order at the end of the paper in the following standard form:

Avise J.C. (1994a) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.

Avise J.C. (1994b) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. PhD Thesis, Chapman University, New York.

Brittain J.E. & Lillehammer A. (1987) Variability in the rate of egg development of the stonefly, *Nemoura cinerea* (Plecoptera). *Freshwater Biology*, **17**, 565-568.

Simon C. (1991) Molecular systematics at the species boundary. In: *Molecular Techniques in Taxonomy* (Eds G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston & J.P.W. Young), pp. 33-71. NATO ASI Series, Vol. 57. Springer-Verlag, Berlin.

Simon C. (1992) Molecular systematics. In: *Proceedings of First International Symposium on Molecular Techniques in Taxonomy* (Ed. J.C. Avise), pp. 23-34. Denton, Texas, 4-6 November 1992. Springer, Berlin.

Titles of journals should not be abbreviated. Unpublished material, except for PhD theses, should not be included among the references, but should be cited as 'X. Xxxxx, unpubl. data' in the text.

EXCLUSIVE LICENCE FORM

Authors will be required to sign an Exclusive Licence Form (ELF) for all papers accepted for publication. Signature of the ELF is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Exclusive Licence Form does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the form for further details). An appropriate form will be e-mailed to authors during the final stages of acceptance. Alternatively, authors may like to download a copy of the form [Here](#).

PROOFS

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

OFFPRINTS

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered.

Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address

and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.

ONLINE EARLY

Freshwater Biology is covered by Blackwell Publishing's OnlineEarly service. OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. OnlineEarly articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication.

The nature of OnlineEarly articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so OnlineEarly articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>. To receive an e-mail alert once your article has been published, please see [this page](#).

Supplementary material

Supplementary material can be published as web materials on the Freshwater Biology web site at the Editor's discretion. Note that if material is integral to the article it should be published as part of the article and not as supplementary material. Supplementary material must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the journal. Supplementary materials may include raw data in tables, more detailed versions of tables containing information of use to specialists but not necessary to understand the article, long species lists, detailed site information and distribution maps, descriptions of complex models, worked examples of complex statistical procedures, etc. In order to provide long term access to supplementary information the Editors will generally prefer to see the material mounted on the Freshwater Biology web site rather than on authors' sites. The supplementary material will be accessible by hot links from the on-line version of Freshwater Biology. Authors should note that supplementary material is merely 'linked' to the article but will not be organised into any easily searched database; nor will it be subject to copy-editing. Authors are responsible for the preparation of supplementary material, which should be supplied in a format that will be most accessible by readers. For more information please see our guidelines at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/suppmat.asp>