

HUGO LEANDRO FERREIRA BORGES

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINAS POR CIANOBACTÉRIAS
BENTÔNICAS E PERIFÍTICAS**

RECIFE
2013

HUGO LEANDRO FERREIRA BORGES

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINAS POR CIANOBACTÉRIAS BENTÔNICAS E PERIFÉRICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do título de mestre em Ecologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO JOSÉ REIS MOLICA

RECIFE
2013

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINAS POR CIANOBACTÉRIAS BENTÔNICAS E PERIFÍTICAS

HUGO LEANDRO FERREIRA BORGES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia (PPGE), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia. Dissertação aprovada pela banca examinadora:

Orientador:

Prof.^o. Dr. Renato José Reis Molica
Titular / UFRPE

Examinadores:

Prof.^o. Dr. William Severi
Titular / UFRPE

Prof.^a. Dr.^a. Ariadne do Nascimento Moura
Titular / UFRPE

Dr. Giulliani Alan da Silva Tavares de Lira
Titular / OPAS

Prof.^a. Dr.^a. Ana Carla Asfora El-Deir
Suplente / UFRPE

Data de aprovação: / / 2013

RECIFE
2013

Ficha catalográfica

B732a Borges, Hugo Leandro Ferreira
 Avaliação da produção de toxinas por cianobactérias
 bentônicas e perifíticas / Hugo Leandro Ferreira Borges. –
 Recife, 2013.
 91 f. : il.

 Orientador: Renato José Reis Molica.
 Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,
 Recife, 2013.

 Inclui referências e anexo(s).

 1. Saxitoxinas 2. Filogenia 3. Semiárido 4. CLAE
 I. Molica, Renato José Reis, orientador II. Título

CDD 574.5

"All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them"
Walt Disney

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível.

À minha família. Minha mãe Iraci, meu pai Luiz Henrique, meu irmão Henrique e minha namorada Natállya, a qual já faz parte da minha família. Que apesar de todas as nossas diferenças, juntos somos apenas um. E sem eles jamais conseguiria chegar aqui. Amo vocês demasiadamente!

Ao Prof. Dr. Renato Molica, meu caro orientador. Agradeço por toda a paciência, ensinamentos, confiança, apoio, oportunidades, etc.

A Prof. Dra. Maria do Carmo, quem sempre me ajudou, mesmo distante. Ao Prof. Cristiano, que com toda sua paciência contribuiu significativamente com as análises filogenéticas. Ao Prof. Luis Branco, Mariellen e Giulliani, que me ajudaram bastante com as identificações morfológicas.

Aos meus amigos e companheiros de turma que fizeram essa experiência ser ainda melhor: Rafael, Carol, Clara, Juliana, André, Alane, Carina, Bárbara e Miguel. Sem vocês, sem dúvidas, tudo teria sido muito mais difícil.

Aos meus amados amigos da graduação, que estiveram sempre presentes durante esses dois anos do curso: Andressa, Ariane, Fernanda, Rafael, Renata e Sérgio. Pessoas que levarei comigo para sempre!

A toda a equipe do CENLAG da Unidade Acadêmica de Garanhuns: Gustavo, Mariana, Phillipe, Timóteo, Rômulo, Camila, Sheila, Carol, Gláucea, Dyana, Joseane, André. Pois, de alguma forma, todos contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado. Pessoas que serão inesquecíveis.

A todos os professores do curso, por todos os ensinamentos e toda a dedicação. Especialmente a Professora Ana Carla, minha querida Aninha, quem eu admiro e quero tê-la como amiga sempre.

A todos os meus amigos pessoais, os quais seriam impossíveis citá-los, mas que sempre foram tão importantes na minha vida.

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento do projeto e a FACEPE pela bolsa de mestrado concedida.

Enfim, a todos que contribuíram com esse trabalho de alguma forma.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
MANUSCRITO	33
Avaliação da Produção de Toxinas por Cianobactérias Bentônicas e Perifíticas	33
Resumo	35
1. Introdução	36
2. Material e métodos	38
3. Resultados	45
4. Discussão	48
5. Agradecimentos	56
6. Referências Bibliográficas	57
ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Estrutura das neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias. (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, análogo da anatoxina-a, (C) anatoxina-a(s) e (D) saxitoxinas (alterações em R1, R2, R3, R4, R5 geram mais de 20 análogos conhecidas com diferentes toxicidades).....17

Figura 2 - Estrutura geral das microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina. (A) Microcistina. X e Z representam os dois L-aminoácidos que podem variar e R¹ e R² são H ou CH₃. (B) Estrutura geral das nodularinas, com as mesmas representações adotadas para as microcistinas. (C) Estrutura da cilindrospermopsina.....19

MANUSCRITO

Figura 1 – Fotos das cepas isoladas de rios e reservatório do Mundaú, Pernambuco e da APA do Araripe, Ceará. A – BC 102 (*Microcoleus* sp.); B – 108 (*Phormidium breve*); C – BC 106 (*P. uncinatum*); D – BC 126 (*Geitlerinema splendidum*); E – BC 141 (*G. amphibium*); F – BC 144 (*Cylindrospermum stagnale*); BC 124 (*Pseudanabaena catenata*); H – BC 134 (*G. lemmermannii*).....68

Figura 2 – Árvore filogenética baseada em sequências parciais do gene 16S rDNA (550 pb). A árvore foi construída utilizando o método de máxima parcimônia (MP). Valores de Bootstrap >50% estão indicados acima dos nós. L. = linhagem; G. = *Geitlerinema*.....74

Figura 3 – Árvore filogenética baseada em sequências da região 16S-23S ITS (442 pb). A árvore foi construída utilizando o método de máxima parcimônia (MP). Valores de Bootstrap >50% estão indicados acima dos nós.....75

Figura 4 – Cromatogramas da análise de saxitoxinas e goniatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A - presença de neosaxitoxina (neoSTX), decarbamoilsaxitoxina (dc-STX) e saxitoxina (STX), B – presença de goniatoxina 1 (GTX1) na cepa BC 144 (*Cylindrospermum stagnale*). Linha azul = padrão de saxitoxinas; Linha preta = amostra.....76

Figura 5 – Cromatogramas da análise de goniatoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A, B e C - presença de GTX1 nas cepas BC 105 (*Phormidium uncinatum*), BC 131 (*Geitlerinema lemmermannii*), BC 145 (*C. stagnale*), respectivamente; D – presença de GTX4 na cepa BC 115 (*G. amphibium*). Linha azul = padrão de saxitoxinas; Linha preta = amostra.....77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Pontos de coleta de cianobactérias da bacia do rio Mundaú, Pernambuco e da Área de Proteção Ambiental (APA) do Araripe, Ceará.68
- Tabela 2** – Principais características das cepas isoladas de rios e reservatório do Mundaú, Pernambuco e da APA do Araripe, Ceará. *Apenas células vegetativas, caso contrário indicado. Comp. = comprimento; Larg. = largura; H = heterócito.....70
- Tabela 3** – Identidade (%) das sequências dos genes do 16S e 16S-23S ITS das cepas estudadas comparadas com outras sequências de cianobactérias do GenBank.72
- Tabela 4** – Detecção de genes envolvidos na produção de microcistinas (*mcyE*) e saxitoxinas (*sxtA*) e análise de CLAE das cepas isoladas no presente estudo. – = negativo; + = positivo; NT = não testada. *Ph.* = *Phormidium*; *P.* = *Pseudanabaena*.....73

Borges, Hugo Leandro Ferreira; M.Sc.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro de 2013; Avaliação da Produção de Toxinas por Cianobactérias Bentônicas e Perifíticas; Renato José Reis Molica (Orientador).

RESUMO

A maior parte do conhecimento sobre a produção de toxinas por cianobactérias concentra-se no estudo das espécies planctônicas formadoras de florações. Entretanto, alguns estudos vêm mostrando que espécies bentônicas e perifíticas podem produzir várias toxinas. Neste sentido, objetivou-se avaliar a produção de saxitoxinas e microcistinas e a potencialidade de produção dessas toxinas através da presença de genes envolvidos na sua síntese em cianobactérias bentônicas e perifíticas isoladas de alguns pontos da bacia do rio Mundaú, Pernambuco, e da Área de Proteção Ambiental do Araripe, Ceará e, em razão da dificuldade de classificação morfológica das cepas isoladas, foram realizadas análises filogenéticas utilizando os genes 16S rDNA e 16S-23S ITS. O material foi coletado em rios e reservatórios de abastecimento e, usando técnicas de micromanipulação, foram isoladas cepas clonais de cianobactérias, as quais foram identificadas morfológicamente e geneticamente. A fim de avaliar a produção de toxinas, as cepas foram cultivadas em condições controladas de laboratório para obtenção de biomassa para posterior extração de toxinas e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De maneira complementar à análise de toxinas, foram realizadas análises genéticas (reação em cadeia da polimerase – PCR) para identificar genes responsáveis pela produção de microcistinas e saxitoxinas. Das 45 cepas isoladas, foram identificadas oito espécies pertencentes às famílias Phormidiaceae, Pseudanabaenaceae e Nostocaceae. Este é o primeiro trabalho feito no Brasil, onde é mostrado que isolados do gênero *Geitlerinema* correspondem a pelo menos três linhagens filogenéticas, que possivelmente correspondem a três espécies distintas a serem posteriormente reclassificadas. Os isolados que apresentaram um dos genes envolvidos na produção de cianotoxinas foram analisados por CLAE e *Geitlerinema amphibium*, *G. lemmermannii*, *Cylindrospermum stagnale* e *Phormidium uncinatum* foram identificadas como produtoras de um ou vários análogos de saxitoxinas, sendo o primeiro registro da produção de saxitoxinas para as três primeiras espécies e o primeiro registro no Brasil para *P. uncinatum*.

Palavras chave: saxitoxinas, filogenia, semi-árido, CLAE

Borges, Hugo Leandro Ferreira; M.Sc.; Federal Rural University of Pernambuco; February 2013; Evaluation of toxin production by benthic and periphytic cyanobacteria; Renato José Reis Molica (Supervisor).

ABSTRACT

Most of the knowledge about cyanobacteria toxin production is traditionally associated with planktonic cyanobacterial blooms. However, some studies have been showing that benthic and periphytic cyanobacteria can produce cyanotoxins. According to this, we aimed to evaluate the production of microcystins and saxitoxins and the yield potential of these toxins through the presence of genes involved in their synthesis in benthic and periphytic cyanobacteria isolated from some sample sites of the Mundaú river basin, Pernambuco, and the Environmental Protection Area of Araripe, Ceará. And due to the difficulty of strains morphological classification, phylogenetic analysis were performed using the 16S rDNA and 16S-23S ITS. The material was sampled in rivers and water supply reservoirs, using micromanipulation techniques. We isolated 45 clonal strains of cyanobacteria, which were identified morphologically and genetically. In order to evaluate the toxins production, the strains were cultured in controlled laboratory conditions for obtaining biomass for subsequent extraction and analysis of toxins by HPLC. In a complementary way of the toxins analysis, PCR's were performed screening for genes involved on microcystins and saxitoxins production. Eight species were identified belonging to the Phormidiaceae, Pseudanabaenaceae and Nostocaceae families. This is the first study in Brazil that shows that strains from the *Geitlerinema* genus correspond to at least three phylogenetic lineages, which possibly correspond to three distinct species to be subsequently reclassified. The strains that showed one of the genes involved in the cyanotoxins production were analyzed by HPLC and *Geitlerinema amphibium*, *G. lemmermannii*, *Cylindrospermum stagnale* and *Phormidium uncinatum* were identified as producing one or more saxitoxins variants. Thus, this is the first report of saxitoxins producing for those first three species and the first report in Brazil for *P. uncinatum*.

Keywords: saxitoxins, phylogeny, semi-arid, HPLC

INTRODUÇÃO

As florações de cianobactérias têm sido reconhecidas pelo seu grande risco para seres humanos e animais em muitas partes do mundo (Chorus e Bartrum, 1999; Carmichael et al., 2001). Esses riscos, tradicionalmente, estão associados a florações de cianobactérias planctônicas que ocorrem em corpos d'águas lênticos e semilóticos e passaram a ter maior evidência após o evento que ficou conhecido com a “Tragédia de Caruaru”, em que mais de 65 pacientes de hemodiálise foram expostos a uma intoxicação fatal por microcistinas naquela cidade (Carmichael et al., 2001). Como resultado de tal tragédia, o número de trabalhos publicados no país em que cianobactérias e suas toxinas foram o foco principal aumentou significativamente, porém a maioria das pesquisas foram voltadas para cianobactérias planctônicas. Pouco se sabe, entretanto, sobre as cianobactérias de hábito bentônico, mesmo que estas já tenham ocasionado mortes e intoxicações de vários animais ao redor do mundo (Edwards et al., 1992; Mez et al., 1997; Hamill et al., 2001; Gugger et al., 2005).

Cianobactérias são microorganismos fotossintetizantes procariotos que habitam diversos ecossistemas aquáticos e terrestres. Em ambientes aquáticos, as cianobactérias podem ter hábitos bentônicos, perifíticos ou planctônicos. As espécies bentônicas são aquelas que crescem sobre o substrato dos corpos d'água, geralmente aderidas a rochas, enquanto que as perifíticas crescem aderidas as vegetações (macrófitas) submersas e as espécies planctônicas vivem livremente na coluna d'água (Lee, 1999). Esses microorganismos produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, sendo as cianotoxinas, cuja função para as cianobactérias ainda é desconhecida, as que despertam mais atenção em razão da sua toxicidade aos vertebrados. Uma das classificações das cianotoxinas toma como base os seus mecanismos de ação, podendo ser separadas em hepatotóxicas ou neurotóxicas.

Cianobactérias ocorrem naturalmente, entretanto o aumento da eutrofização dos ecossistemas aquáticos tem resultado no crescimento significativo das florações destes organismos. Não há um valor específico a partir do qual se diga que há uma floração. Geralmente, valores superiores ao número médio de células de cianobactérias por unidade de volume de um determinado ambiente indicam a presença de uma floração. A Portaria no.

2.914/11 do Ministério da Saúde estabelece que a partir de 20.000 células/mL o ambiente necessita de um monitoramento semanal das cianotoxinas em pontos específicos do ambiente.

A diversidade, o crescimento e a formação de florações de cianobactérias são influenciados por uma ampla variedade de fatores físicos, químicos e biológicos. Nas cianobactérias planctônicas, essas variáveis têm sido extensivamente estudadas (Oliver e Gnaif 2000). Esses estudos têm resultado em modelos que podem prever a dinâmica do fitoplâncton, formação de florações de cianobactérias e o efeito de ações mitigatórias. Além disso, existem estudos que investigam a regulação da produção das toxinas em diferentes espécies de cianobactérias planctônicas. Como exemplo, Rapala et al. (1993) e Rapala e Sivonen (1998) mostraram que concentrações de anatoxina-a em *Anabaena* spp. aumentam em até sete vezes quando cultivada em temperaturas ótimas de crescimento.

Nas últimas décadas, cianobactérias bentônicas tem sido responsáveis por vários casos de envenenamento animal ao redor do mundo (Mez et al., 1997; Baker et al., 2001; Hamill et al., 2001; Gugger et al., 2005; Izaguirre et al., 2007). O crescimento em massa de cianobactérias bentônicas e perifíticas tóxicas estão se tornando cada vez mais prevalentes. Isto representa, também, um grande risco à saúde humana e animal e ao contrário das cianobactérias planctônicas, as bentônicas e perifíticas tem recebido pouca atenção científica. Ademais, o aumento na densidade dessas populações não é visualizado facilmente, já que podem ocorrer bem abaixo da superfície. Os fatores físicos, químicos e biológicos que contribuem para o aumento da densidade das espécies bentônicas, que chegam a formar tapetes (*mats*), bem como a regulação da produção de toxinas ainda são desconhecidos e, na maioria dos casos, os conhecimentos sobre a diversidade das espécies e a capacidade de produção de toxinas são limitados.

As pesquisas realizadas no Brasil nos últimos anos, principalmente após a “Tragédia da Hemodiálise em Caruaru-PE”, sobre espécies planctônicas de cianobactérias produtoras de cianotoxinas resultaram num grande ganho de conhecimento. Em todas as regiões do país já foram identificadas espécies e/ou florações tóxicas de cianobactérias (Domingos et al., 1999; Carmichael et al., 2001; Molica et al., 2002; Bittencourt-Oliveira, 2003; Bittencourt-Oliveira e Molica, 2003; Molica et al., 2005; Bittencourt-Oliveira et al., 2007; Panosso et al., 2007;

Sant'Anna et al., 2008; Moura et al., 2010; Bittencourt-Oliveira et al., 2012). Por outro lado, pouco se sabe sobre a produção de cianotoxinas por espécies bentônicas e perifíticas. Os únicos trabalhos realizados foram publicados por Fiore et al. (2009), que relataram a produção de microcistina-LR por uma cepa de *Fischerella* sp. e por Genuário et al. (2010), que relataram a produção de microcistina-YR por uma cepa de *Nostoc* sp. Ambas as espécies foram isoladas de um reservatório em Piracicaba.

Neste contexto, um maior levantamento sobre as espécies de cianobactérias bentônicas e perifíticas produtoras de toxinas se faz necessário. Como Heath et al. (2010) afirmam, o conhecimento sobre a produção de cianotoxinas por espécies bentônicas é imprescindível para um correto programa de monitoramento dos mananciais de abastecimento, uma vez que aquelas podem contribuir, ou, até mesmo, serem a principal fonte de cianotoxinas de um determinado ecossistema aquático. Esses mesmos autores também chamam a atenção para a necessidade de uma correta identificação daquelas espécies, a qual, quando realizada somente pelas características morfológicas, é muito imprecisa, uma vez que podem não ser suficientes para separar as espécies, principalmente dentro da ordem Oscillatoriales.

REVISÃO DE LITERATURA

Cianotoxinas

O aumento da incidência de florações de cianobactérias é uma preocupação em todo o mundo devido à produção de toxinas por aqueles micro-organismos que são uma ameaça para os seres humanos e animais (Chorus e Bartram, 1999; Carmichael, et al., 2001). Já foram identificados em torno de 40 gêneros, dos 150 descritos para cianobactérias, envolvidos na produção dessas cianotoxinas (Apeldoorn et al., 2007).

Os mecanismos de ação das cianotoxinas podem ser divididos em hepatotóxicos e neurotóxicos, mas de acordo com suas estruturas químicas elas são agrupadas em peptídeos cíclicos, alcalóides e carbamatos (Chorus e Bartram, 1999).

As neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias são a anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas. As saxitoxinas inibem a condução do impulso nervoso na membrana do axônio pelo bloqueio dos canais de sódio e cálcio, o que impede a liberação do neurotransmissor e,

consequentemente, a paralisação dos músculos (Carmichael, 1994, Wang et al., 2003, Su et al., 2004). Elas são produzidas por cianobactérias de água doce dos gêneros *Dolichospermum*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* e *Scytonema*) (Humpage et al., 1994; Yin et al., 1997; Lagos et al., 1999; Pomati et al., 2000; Rapala et al., 2005; Ballot et al., 2010; Humpage et al., 2010) e dinoflagelados marinhos (Anderson, 1994).. Atualmente, mais de 30 análogos de saxitoxinas foram isolados e caracterizados (Llewellyn, 2006). Estas neurotoxinas são um grupo de alcalóides-carbamatos que podem apresentar um único grupamento sulfato (G-toxinas), dois grupamentos sulfatos (C-toxinas) ou não apresentar grupamento sulfato (saxitoxina e neosaxitoxina) (Figura 1D).

A anatoxina-a atua como um potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos, podendo levar a morte de vertebrados em minutos, dependendo da dosagem ingerida. A estrutura da anatoxina-a molecular foi descrita por Devlin et al. (1977) e está apresentada na Figura 1A. Os sintomas de envenenamento por anatoxina-a são desequilíbrio, fasciculação muscular, respiração ofegante e convulsões e a morte se dá devido à parada respiratória. Em todo o mundo já foram identificados vários gêneros de cianobactérias relacionados com a produção dessas cianotoxinas (*Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Cylindrospermopsis*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Anabaena* e *Raphidiopsis*), entretanto, no Brasil ainda não há registros publicados.

A anatoxina – a (s) é um organofosforado natural (N-hidroxi guanidina fosfato de metila) e tem um mecanismo de ação semelhante à anatoxina-a, inibe a ação da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina ligada aos receptores (Figura 1C) (Mahmood e Carmichael, 1986). O “s” no nome da toxina deve-se à intensa salivação observada em animais intoxicados por esta neurotoxina. No Brasil já foi confirmada a presença desta toxina, por teste de inibição de acetilcolinesterase, em florações de *Anabaena spiroides*, no Rio Grande do Sul (Monserrat et al., 2001) e de *Dolichospermum* sp. no estado de Pernambuco (Molica et al., 2005).

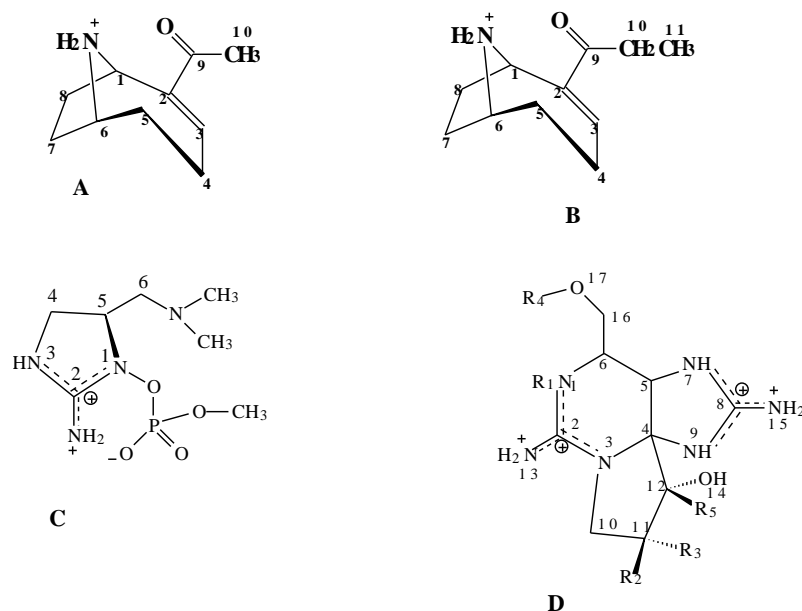


Figura 1 – Estrutura das neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias. (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, análogo da anatoxina-a, (C) anatoxina-a(s) e (D) saxitoxinas (alterações em R1, R2, R3, R4, R5 geram mais de 20 análogos conhecidas com diferentes toxicidades).

As hepatotoxinas produzidas pelas cianobactérias podem ser heptapeptídeos (microcistinas), pentapeptídeos (nodularinas) ou alcalóides (cilindrospermopsina), sendo que as microcistinas são as toxinas de cianobactérias mais frequentemente encontradas nas florações em todo o mundo (Chorus e Bartram, 1999). Estas toxinas tem ação nos hepatócitos dos mamíferos e são produzidas por várias cepas de gêneros planctônicos, bentônicos e terrestres (*Microcystis*, *Dolichospermum*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Radiocystis*, *Arthrospira*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*, *Fischerella*, *Phormidium* e *Plectonema*) (Chorus e Bartram, 1999; Sivonen e Jones, 1999; Mohamed et al., 2006; Fiore et al., 2009). Até o momento existem aproximadamente 90 análogos de microcistinas isoladas e caracterizadas (Welker e Von Döhren, 2006). A estrutura geral das microcistinas é D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, em que X e Z são os dois L aminoácidos variáveis, D-MeAsp é D-eritro ácido metilaspártico, Mdha é N-metildeidroalanina e o Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico (Carmichael et al., 1988) (Figura 2A).

A estrutura geral das nodularinas é o ciclo D-MeAsp-L-Arg-Adda-d-glutamato-Mdhb (Figura 2B). Essas toxinas foram primeiramente identificadas na espécie *Nodularia spumigena*

(Sivonen et al., 1989) e atualmente são conhecidos sete análogos distintos de nodularinas (Apeldoorn et al. 2007). Tanto as microcistinas como as nodularinas chegam aos hepatócitos por meio de receptores dos ácidos biliares (Runnegar et al., 1981, Eriksson et al., 1990, Falconer, 1991) e promovem uma desorganização do citoesqueleto dos hepatócitos. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais, provocando uma hemorragia intra-hepática (Hooser et al., 1991, Carmichael 1994, Lambert et al., 1994). A cilindrospermopsina é um alcaloide tricíclico e possui uma guanina cíclica ligada ao hidroximetiluracil (Othani et al., 1992) (Figura 2C). São conhecidos dois análogos dessa toxina: deoxi-cilindrospermopsina e 7-epicilindrospermopsina (Banker et al., 1997; Norris et al., 1999) e o mecanismo de ação delas se dá por inibição da síntese protéica (Froscio et al., 2001).

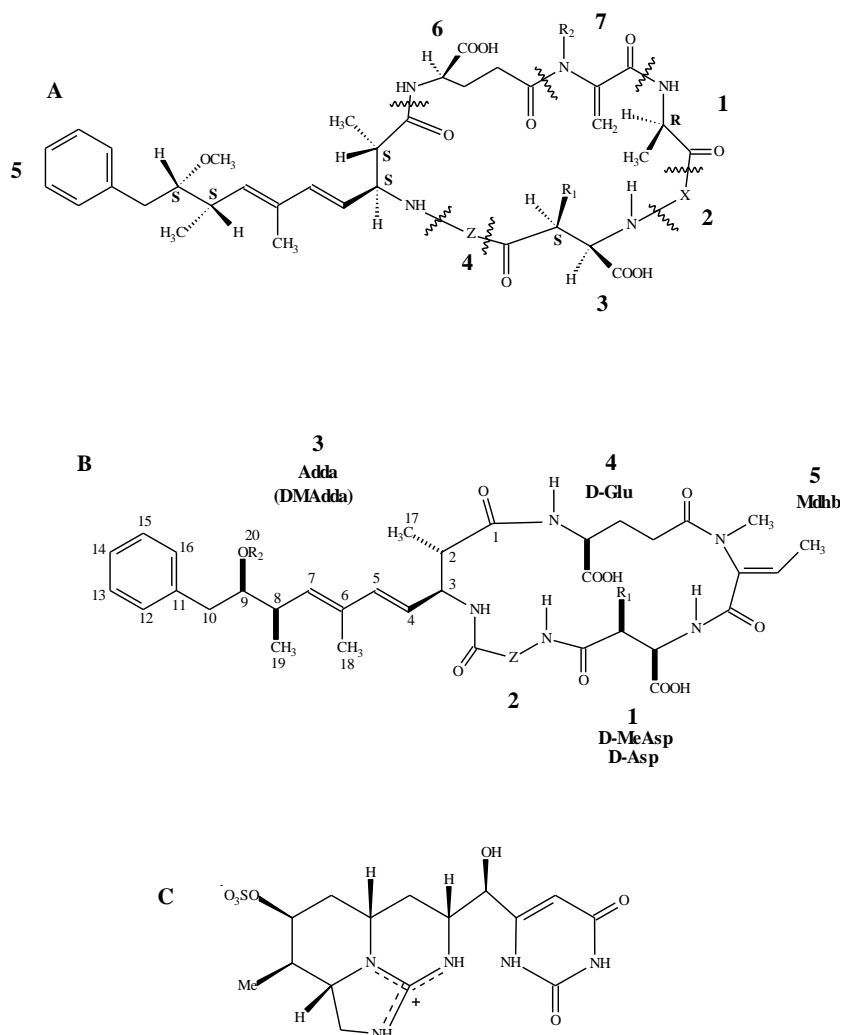


Figura 2 - Estrutura geral das microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina. (A) Microcistina. X e Z representam os dois L-aminoácidos que podem variar e R¹ e R² são H ou CH₃. (B) Estrutura geral das nodularinas, com as mesmas representações adotadas para as microcistinas. (C) Estrutura da cilindrospermopsina.

Cianobactérias e Cianotoxinas

O primeiro relato de produção de toxinas por cianobactérias associado à morte de animais ocorreu em 1878, quando Francis descreveu uma floração de *Nodularia spumigena* no lago Alexandrina, na Austrália, e relacionou tal acontecimento à morte de vários animais (cavalos, ovelhas, cachorros e porcos) decorrente da ingestão de água contaminada. Desde então, vários outros casos de mortes de animais foram relatados em todo o mundo, curiosamente, exceto no Brasil. Na Austrália, a morbidade prolongada e a mortalidade lenta de ovinos e bovinos foram

atribuídas as cianotoxinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* (microcistina), *Nodularia spumigena* (nodularina), *Anabaena circinalis* (saxitoxina) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (cilindrospermopsina) (Carbis et al., 1995; Main et al., 1977; McBarron et al., 1966; McBarron et al., 1975; Negri et al., 1995; e Thomas et al., 1998).

Um caso que chamou bastante atenção foi uma floração de *Anabaena circinalis*, produtora de saxitoxinas, que se formou ao longo de 1.000 km do rio Darling na Austrália e ocasionou a morte de centenas de bovinos e ovinos, após ingerirem água contaminada (Falconer, 1991, 1996). O caso mais dramático envolvendo toxinas de cianobactérias, entretanto, ocorreu em 1996 na cidade de Caruaru – (PE), quando mais de 65 pacientes com problemas renais faleceram em razão de uma contaminação com microcistinas na água utilizada nas sessões de uma clínica de hemodiálise (Carmichael et al., 2001).

Após a “Tragédia de Caruaru”, como ficou conhecida a intoxicação ocorrida naquela cidade, a Portaria 1469/00 do Ministério da Saúde (MS), que trata sobre o padrão e potabilidade de água para consumo humano, em substituição à Portaria 36/90-MS, incluiu dentre os parâmetros a ser monitorados a densidade de cianobactérias nos reservatórios de abastecimento e a obrigação da análise de microcistinas, cuja concentração máxima permitida era $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, e recomendava a análise de saxitoxinas e cilindrospermopsina, com valores máximos permitidos de $3 \mu\text{g}_{(\text{eqstx})}.\text{L}^{-1}$ e $15 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Posteriormente, a Portaria No. 1469/00 foi revogada pela Portaria No. 518/04 (Ministério da Saúde 2004), a qual manteve os mesmos parâmetros para densidade de cianobactérias e cianotoxinas. Desde dezembro de 2011 a Portaria No. 518/04 foi substituída pela 2.914/11, a qual inclui como obrigatória, além da análise de microcistina, a análise de saxitoxina e seus análogos com valor máximo permitido de $3 \mu\text{g}_{(\text{eqstx})}.\text{L}^{-1}$ e recomenda a análise de cilindrospermopsina e anatoxina-a (s), caso sejam encontrados gêneros potencialmente produtores de tais toxinas.

A Portaria No. 2.914/11 refere-se às cianobactérias de forma geral, não há, em nenhum momento, referência às espécies de cianobactérias bentônicas e perifíticas. Entretanto, vários trabalhos recentes vêm mostrando a necessidade de se monitorar as espécies de cianobactérias bentônicas e perifíticas, uma vez que essas podem também produzir cianotoxinas (Teneva et al., 2005; Izaguirre et al., 2007). Há na literatura registros de espécies de cianobactérias bentônicas produtoras de anatoxina-a (Edwards et al., 1992; Hamill, 2001; Gugger et al., 2005; Wood et al.,

2007; Wood e Young, 2011), saxitoxinas (Onodera et al., 1997; Teneva et al., 2005; Simth, 2011), cilindrospermopsina (Seifert et al., 2007) e microcistinas (Mez et al., 1997; Mohamed et al., 2006; Izaguirre et al., 2007; Mohamed et al., 2010).

As espécies bentônicas podem formar, desde que chegue luz suficiente, extensos tapetes (*mats*) ou biofilmes no fundo dos reservatórios (rochas e sedimentos) ou nas paredes das barragens. O oxigênio produzido durante a atividade fotossintética pode, algumas vezes, ficar aprisionado na forma de bolhas nesses tapetes, o que acaba propiciando que pedaços sejam levados para a superfície. A ação dos ventos pode provocar a ressuspensão da biomassa de espécies bentônicas para a coluna d'água (Bergesch et al., 1995). Em ambos os casos, os pedaços são transportados pelos ventos até as margens, onde acabam ficando disponíveis para ser consumidos por animais (Chorus e Bartram, 1999). Foi exatamente isso o que ocorreu nos casos relatados por Gunn et al. (1992) e Mez et al. (1997), em que óbitos de cães e bovinos, respectivamente, foram relacionadas ao consumo de água contendo pedaços desses tapetes.

Mez et al. (1997), devido as grandes intoxicações de bovinos nas regiões alpinas na Suíça por hepatotoxinas e neurotoxinas, investigaram vários corpos d'água na região buscando saber a etiologia dos envenenamentos. Os mesmos encontraram densos tapetes de cianobactérias bentônicas, recobrando sedimento e rochas, representados principalmente por *Oscillatoria limosa* e *Phormidium konstantinosum* (= *Oscillatoria tenuis*). Para detectar a presença de hepatotoxinas em amostras dos tapetes (*mats*) de cianobactérias e na água, foram realizados ensaios de inibição da proteína fosfatase, ELISA cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e bioensaios com camundongos e todos foram positivos para a presença de microcistinas, sendo esse o primeiro relato de hepatotoxicidade causada por cianobactérias bentônicas. Mais recentemente, Gugger et al. (2005) e Wood et al. (2007) relataram a morte de cães, na França e Nova Zelândia, respectivamente, que consumiram água contendo espécies de *Phormidium* produtoras de anatoxina-a. Os primeiros autores acreditam que o ato de ingerir água com o movimento da língua, tenha ressuspensionado as massas de *Phormidium* existentes no fundo, causando assim a intoxicação dos cães.

Mohamed et al. (2006), em um estudo no rio Nilo e em canais de irrigação no Egito, também observaram a produção de microcistinas por espécies bentônicas de cianobactérias. Foram isoladas 19 espécies da região e a toxicidade dos extratos dessas espécies foi analisada

através de ensaios com *Artemia salina*, bioensaios com camundongos e ELISA. Todas as espécies apresentaram toxicidade no ensaio com *A. salina* e cinco espécies apresentaram efeitos hepatotóxicos em camundongos. Através de CLAE foi possível detectar a presença de Microcistina-YR e -LR nas mesmas cinco espécies que apresentaram toxicidade nos camundongos, sendo elas *Anabaena subcylindrica*, *Anabaena variables*, *Nostoc spongiaeforme*, *Plectonema boryanum* e *Phormidium corium*.

Izaguirre et al. (2007) evidenciaram a presença de microcistinas em cianobactérias bentônicas em quatro reservatórios de abastecimento no sul da Califórnia, EUA. Das 17 cepas isoladas, todas foram positivas para presença de microcistina através do teste de ELISA, e 11 delas apresentaram altas concentrações de microcistina-LR. As culturas foram analisadas por CLAE ou Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa e ensaios de inibição da proteína fosfatase. Morfológicamente, algumas das cepas foram semelhantes à *Oscillatoria* e outras à *Lyngbia*. Análises filogenéticas utilizando uma sequência parcial do gene 16S rRNA revelou uma grande similaridade das cepas com uma espécie desconhecida da ordem Oscillatoriales e com *Phormidium* sp.

Teneva et al. (2005) avaliaram a toxicidade de 5 espécies de *Phormidium* (*P. bijugatum*, *P. molle*, *P. papyraceum*, *P. uncinatum*, *P. autumnale*) e todas elas foram tóxicas em bioensaios com camundongos, e as toxinas encontradas através de ensaio imunoenzimático (ELISA), foram microcistinas e saxitoxinas. *Phormidium uncinatum* apresentou a maior concentração de saxitoxinas e maior efeito neurotóxico em camundongos. Em análise por CLAE, verificaram a presença de compostos tóxicos e de atividade antitumoral até então desconhecidos, sugerindo a caracterização dessas substâncias em estudos posteriores.

Smith et al. (2011) analisaram o metafiton de um reservatório de abastecimento de água e um pequeno lago eutrófico na Nova Zelândia e verificaram a presença de saxitoxinas utilizando um kit de teste rápido chamado Jellet PSP (Jellett et al., 2002). A espécie dominante foi identificada como *Scytonema* cf. *crispum*, a qual foi isolada posteriormente. Com a cepa, foi realizada uma busca dos genes envolvidos na produção de toxinas (microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a e cilindrospermopsina) e o único gene encontrado foi o *sxtA*, envolvido na produção de saxitoxina. Através da análise de CLAE, foi possível identificar as concentrações de

saxitoxina, que foi o único análogo presente, tanto na amostra natural quanto no material em cultivo.

Baker et al. (2001), reportaram um caso em que pedaços do tapete (*mats*) de *Phormidium*, um gênero de cianobactéria tipicamente bentônico, se soltaram do sedimento e entraram na rede pública de abastecimento de água. Bioensaios realizados com animais identificaram que as amostras de *Phormidium* eram produtoras de toxinas, porém estas não foram identificadas. Imediatamente os usuários do sistema foram informados sobre os riscos e aconselhados a utilizar outra fonte de abastecimento. Em razão dos riscos associados às espécies bentônicas produtoras de toxinas, como relatado nos parágrafos anteriores, Hurtado *et al.* (2008) recomendam que a comunidade de cianobactérias bentônicas de reservatórios de abastecimento faça parte dos programas de monitoramento. No reservatório estudado pelos autores foi encontrada uma correlação positiva entre microcistinas dissolvidas na água e aquelas presentes na comunidade fitobentônica.

No Brasil, pesquisas avaliando a produção de toxinas por espécies bentônica e perifíticas são escassas, os únicos trabalho publicados até o momento foram os de Sant'Anna et. al (2008) que em uma revisão de espécies tóxicas no Brasil identificaram a presença de uma toxina desconhecida na espécie perifítica *Geitlerinema amphibium* através de bioensaios com camundongos, entretanto, não foi possível identificar a toxina. Posteriormente, estudos verificaram que o extrato metanólico de espécies de *Geitlerinema* foi tóxico em bioensaios com camundongos levando-os a morte, porém os sintomas apresentados pelos animais não se classificam de acordo com a descrição de sintomas já relatados por outras toxinas (Dogo et al., 2011; Rangel et al., 2012). E os trabalhos publicados por Fiore et al. (2009), os quais relataram a produção de microcistina-LR por uma cepa de *Fischerella* sp. e Genuário et al. (2010), que relataram a produção de microcistina-YR por uma cepa de *Nostoc* sp. Ambas isoladas de um reservatório de abastecimento em Piracicaba, São Paulo.

Neste caso, um levantamento sobre as espécies de cianobactérias bentônicas e perifíticas produtoras de toxinas se faz necessário. Como Heath et al. (2010) afirmam, o conhecimento sobre a produção de cianotoxinas por espécies bentônicas é imprescindível para um correto programa de monitoramento dos mananciais de abastecimento, uma vez que aquelas podem

contribuir para o total de cianotoxinas encontrada na coluna d'água. Esses mesmos autores também chamam a atenção para a necessidade de uma correta identificação daquelas espécies, a qual, quando realizada somente pelas características morfológicas, é muito imprecisa, em razão de que aquelas características são suficientes para separar as espécies, principalmente dentro da ordem Oscillatoriales.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D. M. Red tides. **Scientific American**, v. 271, p. 52-58, 1994.

APELDOORN, M.E.; EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**; v.51, p. 7-60, 2007.

BAKER, J. A. et al. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 472-482, 2001. ISSN 1522-7278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/tox.10010> >.

BALLOT, A.; FASTNER, J.; WIEDNER, C. Paralytic Shellfish Poisoning Toxin-Producing Cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1173-1180, February 15, 2010 2010.

BANKER, R. et al. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, v. 33, n. 4, p. 613-616, 1997. ISSN 1529-8817. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00613.x> >.

BERGESCH, M.; ODEBRECHT, C.; ABREU PCO. Microalgas do estuário da lagoa dos Patos: interação entre sedimento e coluna de água. **Oecologia Brasiliensis**, v. 1, p. 273-289, 1995.

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

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

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA R. Cianobactéria Invasora - Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p. 82-90. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portaria nº 518, de 03/2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. seção 1, p.266-270. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2011.

CARBIS, C. et al. Recovery of hepatic function and latent mortalities in sheep exposed to the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Record**, v. 137, n. 1, p. 12-15, July 1, 1995 1995. Disponível em: < <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/137/1/12.abstract> >.

CARMICHAEL, W. W. et al. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 971-3, 1988. ISSN 0041-0101.

CARMICHAEL, W. W. The Toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 64-72, 1994.

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

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water - A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London and New York: E & FN Spon, 1999. ISBN 0-419-23930-8.

DEVLIN, J.P. et al. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44 h. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 55, p. 1367–1371, 1977.

DOGO, C. R. et al. Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. **Toxicon**, v. 58, n. 6–7, p. 464-470, 2011. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111002285> >.

DOMINGOS, P.; RUBIM, T. K.; MOLICA, R. J. R.; AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W. First report of microcystin production by picoplanktonic Cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply. **Environmental Toxicology**, v. 14, 31-35. 1999.

EDWARDS, C., BEATTIE, K.A., SCRIMGEOUR, C.M. AND CODD, G.A. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. **Toxicon**, v. 30, p. 1165-1175, 1992.

ERIKSSON, J. E. et al. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1025, n. 1, p. 60-66, 6/11/1990. ISSN 0005-2736.

FALCONER, I. R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 6, n. 2, p. 177-184, 1991. ISSN 1098-2256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/tox.2530060207> >.

FALCONER, I.R. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. **Phycologia**, v. 35, n. 6S, p. 6-11, 1996. ISSN 0031-8884. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-6.1> >.

FIORE, M. F. et al. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon**, v. 53, n. 7–8, p. 754-761, 6// 2009. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109000956> >.

FRANCIS, G. Poisonous Australian lake. **Nature**, v. 18, p. 11 - 12, 1878.

FROSCIO, S. M. et al. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 408-412, 2001. ISSN 1522-7278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/tox.1050> >.

GENUARIO, D. B. et al. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 846-54, 2010. ISSN 1879-3150.

GUGGER, M. et al. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. **Toxicon**, v. 45, p. 919 - 928, 2005.

GUNN, G. J. et al. Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (cyanobacteria). **Veterinary Record**, v. 130, n. 14, p. 301-2, Apr 4 1992. ISSN 0042-4900

HAMILL, K. D. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): First observations in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 35, n. 5, p. 1057-1059, 2001. ISSN 0028-8330. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00288330.2001.9517062>>.

HEATH, M. W.; WOOD, S. A.; RYAN, K. G. Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 73, n. 1, p. 95-109, Jul 1 2010. ISSN 1574-6941

HOOSER, S. B. et al. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 4, p. 259-66, Jul 1991. ISSN 0300-9858

HUMPAGE, A. et al. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. **Marine and Freshwater Research**, v. 45, n. 5, p. 761-771, 1994. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/paper/MF9940761>>.

HUMPAGE, A. R.; MAGALHAES, V. F.; FROSCIO, S. M. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1655-71, Jul 2010. ISSN 1618-2650.

HURTADO, I. et al. Significance of microcystin production by benthic communities in water treatment systems of arid zones. **Water Research**, v. 42, n. 4-5, p. 1245-53, Feb 2008. ISSN 0043-1354.

IZAGUIRRE, G.; JUNGBLUT, A. D.; NEILAN, B. A. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. **Water Research**, v. 41, n. 2, p. 492-8, 2007. ISSN 0043-1354.

JELLETT, J. F. et al. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert, a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC mouse bioassay. **Toxicon**, v. 40, n. 10, p. 1407-25, Oct 2002. ISSN 0041-0101.

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

LAMBERT, T. W.; HOLMES, C. F. B.; HRUDEY, S. E. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. **Environmental Reviews**, v. 2, n. 2, p. 167-186, 1994. ISSN 1181-8700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/a94-011> >.

LEE, R. E. **Phycology**. 3^a ed. Cambridge, 547 p. 1999.

LLEWELLYN, L. E. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. **Nat Prod Rep**, v. 23, n. 2, p. 200-22, 2006. ISSN 0265-0568.

MAHMOOD, N. A.; CARMICHAEL, W. W. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. **Toxicon**, v. 24, n. 2, p. 175-86, 1986. ISSN 0041-0101.

MAIN, D. C. et al. Sheep mortalities associated with the blue green alga *Nodularia spumigena*. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 578-81, Dec 1977. ISSN 0005-0423

MCBARRON, E. J.; MAY, V. Poisoning of sheep in New South Wales by the blue-green alga *Anacystis cyanea* (Kuetz.) Dr. and Dail. **Australian Veterinary Journal**, v. 42, n. 12, p. 449-53, 1966. ISSN 0005-0423.

MCBARRON, E. J. et al. Letter: Toxicity to livestock of the blue-green algae *Anabaena circinalis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, n. 12, p. 587-8, Dec 1975. ISSN 0005-0423.

MEZ, K. et al. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 2, p. 111-117, 1997. ISSN 0967-0262.

MOHAMED, Z. A.; AL SHEHRI, A. M. Microcystin production in epiphytic cyanobacteria on submerged macrophytes. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1346-52, 2010. ISSN 1879-3150.

MOHAMED, Z. A.; EL-SHAROUNY, H. M.; ALI, W. S. Microcystin production in benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 584-90, 2006. ISSN 0041-0101.

MOLICA, R. et al. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v. 41, n. 6, p. 606-611, 2002. ISSN 0031-8884.

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. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae**, v. 4, p. 743-753. 2005.

MONSERRAT, J. M.; YUNES, J. S.; BIANCHINI, A. Effects of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1228-35, 2001. ISSN 0730-7268

MOURA, A. N. et al. Cianobactérias planctônicas em reservatório eutrófico do estado de Pernambuco. In: Moura, A.N.; Araújo, E.L.; Bittencourt-Oliveira, M.C.; Pimentel, R.M.M.P.; Albuquerque, U.P. (eds.). **Reservatórios do Nordeste do Brasil: Biodiversidade, ecologia e manejo**. Nuppea. 1ªed. p.115-143. 2010.

NEGRI, A. P.; JONES, G. J. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel *Alathyria condola*. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p. 667-78, 1995. ISSN 0041-0101.

NORRIS, R. L. et al. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 163-165, 1999. ISSN 1522-7278.

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

OLIVER, R.L.; AND GNAF, G.G. Freshwater blooms. In **The Ecology of Cyanobacteria** eds. Whitton, B.A. and Potts, M. pp.149-194: Kluwer Academic, Netherlands. 2000.

ONODERA, H. et al. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. **Natural Toxins**, v. 5, n. 4, p. 146-51, 1997. ISSN 1056-9014.

PANOSSO, R. et al. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 433-449. 2007.

POMATI, F. et al. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 553 - 562, 2000.

RANGEL, M. et al. Acute effects of three *Geitlerinema* spp. (Cyanobacteria) extracts administrated in mice: symptoms and histopathological aspects. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-11, 2012/05/01 2012. ISSN 1568-7767.

RAPALA, J. et al. First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. **Environmental Toxicology**, v. 20, p. 331 - 340, 2005.

RAPALA, J.; SIVONEN, K. Assessment of Environmental Conditions That Favor Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena* spp. Strains Cultured under Light Limitation at Different Temperatures. **Microbial Ecology**, v. 36, n. 2, p. 181-92, 1998. ISSN 1432-184X.

RAPALA, J. et al. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains — a laboratory study. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 6, p. 581-591, 1993. ISSN 0921-8971.

RUNNEGAR, M. T.; FALCONER, I. R.; SILVER, J. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 317, n. 3, p. 268-72, 1981. ISSN 0028-1298.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R.; DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v. 126, p. 251-265. 2008.

SEIFERT, M. et al. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. **Harmful Algae**, v. 6, n. 1, p. 73-80, 2007. ISSN 1568-9883.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: **Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management**. I Chorus and J Bertram (Edn) The World Health Organization. E and FN Spon, London, UK, p. 41-111, 1999.

SIVONEN, K. et al. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1990-5, 1989. ISSN 0099-2240.

SMITH, F. M. et al. First report of saxitoxin production by a species of the freshwater benthic cyanobacterium, *Scytonema* Agardh. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 566-73, 2011. ISSN 1879-3150

SU, Z.; SHEETS, M.; ISHIDA, H.; LI, F.; BARRY, W.H. Saxitoxins blocks L-type Ica. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.308, p.324-329, 2004.

TENEVA, I. et al. Toxic potential of five freshwater *Phormidium* species (Cyanoprokaryota). **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 711-25, 2005. ISSN 0041-0101.

THOMAS, A. D. et al. Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* as a probable cause of death in cattle in northern Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 9, p. 592-4, Sep 1998. ISSN 0005-0423.

VAN APELDOORN, M. E. et al. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 7-60, 2007. ISSN 1613-4133. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200600185>>.

WELKER, M., DOHREN, H. V., Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis, **FEMS Microbiology Review**, v.30, p. 530, 2006.

WANG, J.; SALATA, J. J.; BENNETT, P. B. Saxitoxin is a gating modifier of HERG K⁺ channels. **Journal of General Physiology**, v. 121, n. 6, p. 583-98, Jun 2003. ISSN 0022-1295.

WOOD, S. A. et al. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 292-301, 2007. ISSN 0041-0101.

WOOD, S.A. AND YOUNG, R. Benthic Cyanobacteria and Toxin Production in the Manawatu - Whanganui Region. Prepared for Horizons Regional Council. **Cawthron Report**, No. 1959. 36 p. 2011.

YIN, Q.; CARMICHAEL, W.; EVANS, W. Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 1, p. 55-63, 1997. ISSN 0921-8971.

MANUSCRITO

Avaliação da Produção de Toxinas por Cianobactérias Bentônicas e Perifíticas

O trabalho será submetido à revista **Harmful Algae**.

1 **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TOXINAS POR CIANOBACTÉRIAS BENTÔNICAS**
2 **E PERIFÍTICAS**

3 H. L. F. Borges^a, P. T. Barbosa^b, C. S. Lima^b, L. H. Z. Branco^c, M. C. Bittencourt-
4 Oliveira^d & R. J. R. Molica^{b, *}

5 Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. D. Manoel
6 de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-030, Recife, Pernambuco, Brasil. ^a

7 Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
8 Bom Pastor s/n. CEP 55292-270. Garanhuns, PE, Brasil. ^b

9 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Zoologia e
10 Botânica, R. Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil. ^c

11 Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
12 Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Piracicaba, SP, 13418-900 Brasil;
13 Fone: +5519-3429-4128, Fax: +5519-3434-8295. ^d

14 *Autor para correspondência: rmolica@uag.ufrpe.br

15

16

17

18 **Resumo**

19 A maior parte do conhecimento sobre a produção de toxinas por cianobactérias
20 concentra-se no estudo das espécies planctônicas formadoras de florações. Entretanto,
21 alguns estudos vêm mostrando que espécies bentônicas de cianobactérias podem
22 produzir toxinas (microcistinas, saxitoxinas, anatoxina-a e cilindrospermopsina) e
23 formar extensos tapetes (*mats*) no fundo de ambientes aquáticos, de forma
24 imperceptível a olho nu. Neste sentido, objetivou-se avaliar a produção de saxitoxinas e
25 microcistinas e a potencialidade de produção dessas toxinas através da presença de
26 genes envolvidos na sua síntese em cianobactérias bentônicas e perifíticas isoladas de
27 alguns pontos da bacia do rio Mundaú, Pernambuco, e da Área de Proteção Ambiental
28 do Araripe, Ceará. Considerando a dificuldade de classificação morfológica das cepas
29 isoladas, foram realizadas análises filogenéticas utilizando os genes 16S rDNA e 16S-
30 23S ITS. O material foi coletado em rios e reservatórios de abastecimento e, usando
31 técnicas de micromanipulação, foram isoladas cepas clonais de cianobactérias, as
32 quais foram identificadas morfolologicamente e geneticamente. A fim de avaliar a
33 produção de toxinas, as cepas foram cultivadas em condições controladas de
34 laboratório para obtenção de biomassa para posterior extração de toxinas e análise por
35 cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De maneira complementar à análise de
36 toxinas, foram realizadas análises genéticas (reação em cadeia da polimerase – PCR)
37 para identificar genes responsáveis pela produção de microcistinas e saxitoxinas. Das
38 45 cepas isoladas, foram identificadas oito espécies pertencentes às famílias
39 Phormidiaceae, Pseudanabaenaceae e Nostocaceae. Este é o primeiro trabalho feito
40 no Brasil, onde é mostrado que isolados do gênero *Geitlerinema* correspondem a pelo

41 menos três linhagens filogenéticas, que possivelmente correspondem a três espécies
42 distintas a serem posteriormente reclassificadas. Os isolados que apresentaram um
43 dos genes envolvidos na produção de cianotoxinas foram analisados por CLAE e
44 *Geitlerinema amphibium*, *G. lemmermannii*, *Cylindrospermum stagnale* e *Phormidium*
45 *uncinatum* foram identificadas como produtoras de um ou vários análogos de
46 saxitoxinas, sendo o primeiro registro da produção de saxitoxinas para as três primeiras
47 espécies e o primeiro registro no Brasil para *P. uncinatum*.

48 **Palavras chave:** saxitoxinas, filogenia, semi-árido, CLAE

49 **1. Introdução**

50 Dentre aproximadamente 150 gêneros descritos de cianobactérias, 40 estão
51 relacionados à produção de algum tipo de toxina (Van Apeldoorn et al., 2007). Tais
52 toxinas podem causar dermatites, gastroenterites, outras têm atividade antimicrobiana e
53 citotóxica e algumas agem inibindo o crescimento de microalgas e macrófitas aquáticas
54 (Codd et al., 2005). Entretanto, um grupo menor de toxinas, em razão da sua maior
55 toxicidade aos seres humanos e animais, desperta um maior interesse. Neste grupo,
56 estão incluídas as neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a e anatoxina-a(s)) e
57 hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina), cuja função para as
58 cianobactérias e papel ecológico ainda não são claros (Molica e Azevedo, 2009).

59 Em muitas partes do mundo, florações de cianobactérias planctônicas, que
60 ocorrem em corpos d'água lênticos ou semilóticos, têm sido consideradas um risco
61 para a saúde de seres humanos e animais (Chorus e Bartram, 1999). No Brasil, tal
62 percepção se intensificou após a intoxicação fatal causada por microcistinas em mais

63 de 65 pacientes renais de uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru, PE, Brasil
64 (Carmichael et al., 2001). Como resultado de tal tragédia, a Portaria no. 1.469/99 do
65 Ministério da Saúde (Brasil, 1999), posteriormente substituída pelas Portarias N^o.
66 518/05 (Brasil, 2005) e N^o. 2.914/11 (Brasil, 2011), tornou obrigatório o monitoramento
67 de espécies planctônicas de cianobactérias e a análise de cianotoxinas em
68 reservatórios de abastecimento do país. A Portaria 2.914/11 determina que a partir de
69 20 mil células de cianobactérias por mililitro de água a análise de microcistinas e
70 saxitoxinas é obrigatória e recomenda a análise de anatoxina-a(s) e
71 cilindrospermopsina.

72 Entretanto, pouco se sabe sobre a abrangência e frequência da produção de
73 toxinas pelas cianobactérias de hábito bentônico e perifítico, mesmo já havendo
74 registros de mortes e intoxicações de vários animais ao redor do mundo devido ao
75 consumo de água contaminada por tais organismos (Edwards et al., 1992; Mez et al.,
76 1997; Hamill et al., 2001; Gugger et al., 2005; Izaguirre et al., 2007). Estudos mostram
77 que as cianobactérias bentônicas e perifíticas são capazes de produzir diversas
78 cianotoxinas, as quais são nocivas para os vertebrados, tais como anatoxina-a
79 (Edwards et al., 1992; Hamill, 2001; Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007), saxitoxinas
80 (Onodera et al., 1997; Teneva et al., 2005; Simth et al., 2011), cilindrospermopsina
81 (Seifert et al., 2007) e microcistinas (Mez et al., 1997; Mohamed et al., 2006; Izaguirre
82 et al., 2007; Mohamed et al., 2010).

83 Baker et al. (2001) reportaram um caso em que pedaços do tapete de
84 *Phormidium*, um gênero de cianobactéria tipicamente bentônico, se soltaram do
85 sedimento e entraram na rede pública de abastecimento de água. Bioensaios

86 realizados com camundongos identificaram que as amostras com *Phormidium* eram
87 produtoras de toxinas, as quais não puderam ser identificadas. Heath et al. (2010)
88 afirmam que o conhecimento sobre a produção de cianotoxinas por espécies
89 bentônicas é imprescindível para um correto programa de monitoramento dos
90 mananciais de abastecimento, uma vez que aquelas podem contribuir para o total de
91 cianotoxinas encontrada na coluna d'água. Esses mesmos autores também chamam a
92 atenção para a necessidade de uma correta identificação das espécies, a qual, quando
93 realizada somente pelas características morfológicas, é muito imprecisa, em razão de
94 que tais características não são suficientes para separar as espécies, principalmente
95 dentro da ordem Oscillatoriales.

96 No Brasil, apesar da presença de cianobactérias planctônicas produtoras de
97 toxinas já terem sido identificadas em todas as regiões do país, há poucos trabalhos
98 sobre espécies bentônicas (Fiore et al., 2009; Genuário et al., 2010). Neste contexto, o
99 presente trabalho objetivou avaliar a produção de saxitoxinas e microcistinas e a
100 potencialidade de produção dessas toxinas através da presença de genes envolvidos
101 na sua síntese em cianobactérias bentônicas e perifíticas isoladas de alguns pontos da
102 bacia do rio Mundaú, Pernambuco, e da Área de Proteção Ambiental do Araripe,
103 Ceará. Por fim, em razão da dificuldade de classificação morfológica das cepas
104 isoladas, foram realizadas análises filogenéticas utilizando os genes 16S rDNA e 16S-
105 23S ITS.

106 **2. Material e métodos**

107 **2.1. Locais e Coleta de Amostras**

108 As coletas foram realizadas em 7 pontos de amostragem distribuídos em rios e
109 reservatórios de abastecimento na bacia do rio Mundaú, no semi-árido Pernambucano
110 e em 3 pontos na Área de Proteção Ambiental (APA) do Araripe, Ceará, sendo que
111 todos foram georeferenciados no momento da coleta (Tabela 1). Nesses locais foram
112 coletadas amostras de sedimentos ou realizadas raspagens, com auxílio de espátulas,
113 em rochas, macrófitas ou nos paredões das barragens e as amostras acondicionas em
114 sacos plásticos estéreis (NASCO, 100 mL) e transportadas até o laboratório em caixas
115 de isopor à temperatura ambiente. Em laboratório, parte das amostras naturais
116 coletadas foi fixada em lugol acético (Bicudo e Menezes, 2005) para posterior
117 identificação das espécies.

118 **2.2. Isolamento e cultivo das cepas**

119 Para o cultivo das cianobactérias subamostras foram inoculadas em tubos de
120 ensaio contendo meio de cultura ASM-1 (Gorham et al., 1964) previamente
121 autoclavados. Para o isolamento das cepas, os tubos foram agitados vigorosamente
122 em vortex a fim de separar os filamentos dos agregados. Posteriormente, alíquotas
123 foram postas em lâminas de vidro e observadas em microscópio óptico (Zeiss,
124 AxioScope.A1). Os filamentos livres foram transferidos sucessivamente, com auxílio de
125 Pipeta Pasteur (cujas pontas foram afiladas em bico de Bunsen até formarem um
126 capilar), para gotas de meio ASM-1 até que apenas um filamento restasse na gota. Por
127 fim, este único filamento foi transferido para tubo de ensaio contendo meio ASM-1 e
128 cultivado em câmaras germinadoras (Marconi MA402) a $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $80\ \mu\text{mol}\ \text{fótons}\ \text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h.
129

130 Opcionalmente, alíquotas das amostras coletadas foram espalhadas em placas
131 de Petri contendo meio ASM-1 sólido (1% de ágar). As placas foram observadas em
132 microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) e somente os filamentos isolados foram
133 retirados das placas, com auxílio de uma alça de platina, e transferidos para tubos de
134 ensaio contendo meio ASM-1 (Gorham et al. 1964). As condições de cultivos foram
135 iguais às descritas anteriormente.

136 As cepas isoladas foram cultivadas em erlenmeyers de 2 litros contendo 1,6 L de
137 meio ASM-1 a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $80 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoper\u00edodo de 12h e aera\u00e7\u00e3o a fim
138 de obter biomassa para as an\u00e1lise de toxinas e extra\u00e7\u00e3o de DNA. Ao final da fase
139 exponencial de crescimento ou in\u00edcio da fase estacion\u00e1ria, uma al\u00edquota do material foi
140 removida para extra\u00e7\u00e3o de DNA e o restante centrifugado a 18.000 g por 15 minutos
141 (Thermo Scientific, Evolution RC) e as amostras congeladas a -18°C para posterior
142 liofiliza\u00e7\u00e3o (Terroni, LD1500) e extra\u00e7\u00e3o de toxinas.

143 **2.3. Identifica\u00e7\u00e3o taxon\u00f4mica**

144 Para identifica\u00e7\u00e3o morfol\u00f3gica das esp\u00e9cies, foram medidos o tamanho dos
145 filamentos, largura e comprimento das c\u00e9lulas e, quando presentes, heter\u00f3citos e
146 acinetos, sendo que para cada cepa, foram medidas 50 c\u00e9lulas em 30 tricomas.
147 Tamb\u00e9m foi observada a motilidade das esp\u00e9cies em cultivo. Os artigos de Kom\u00e1rek e
148 Anagnostidis (1989; 2005) e Sant'Anna (2006) foram utilizados para a identifica\u00e7\u00e3o das
149 esp\u00e9cies. Quando poss\u00edvel, uma vez que as esp\u00e9cies bent\u00f4nicas crescem bastante
150 agregadas, foram utilizadas amostras da popula\u00e7\u00e3o natural para confirmar a

151 identificação das espécies. As fotos e medições foram realizadas em software
152 AxionVision 40 V. 4.8.2.0.

153 **2.4. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA**

154 Para a extração de DNA das 45 cepas isoladas, foi seguido o método proposto
155 por Rogers e Bendich (1985), em que se utiliza o tampão CTAB
156 (CetylTrimethylAmmoniumBromide) para extração do DNA total e posterior purificação
157 com clorofórmio-isoamílico (24:1), finalizando com precipitação após adição de etanol.
158 Para eluir o DNA, foi utilizada água ultra-pura (ELGA, Classic UVF MK2) em volume
159 conhecido e realizada eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da
160 extração de DNA genômico.

161 As amplificações do DNA genômico foram realizadas em termociclador
162 Eppendorf Mastercycler® pro, utilizando-se kit comercial PCR Supermix Invitrogen®,
163 seguindo recomendações do fabricante. Na amplificação do gene 16S-23S ITS foram
164 utilizados os oligonucleotídeos 322F- 5'-TGTACACACCGCCCGTG-3' e 340R- 5'-
165 CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3' descritos por Iteman et al. (2000) e adotadas as
166 condições descritas em Heath et al. (2010). Já para o 16S rDNA, utilizou-se os
167 oligonucleotídeos 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 809R (5'-
168 GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA-3') descritos por Jungblut et al. (2005), sob as
169 mesmas condições descritas no trabalho. Todos os oligonucleotídeos para as
170 amplificações foram adquiridos da Integrated DNA Technologies, Inc.

171 Os fragmentos de DNA amplificados, utilizados para o sequenciamento, foram
172 purificados utilizando o kit comercial Purelink (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),

173 seguindo normas do fabricante. Quando necessário, as bandas amplificadas de
174 tamanho esperado da região do 16S-23S ITS foram extraídas do gel de agarose
175 utilizando o kit Purelink Gel Extration and PCR purification Combo (Invitrogen,
176 Carlsbad, CA, USA), como recomendado pelo fabricante.

177 **2.5. Análises das sequências e filogenéticas**

178 As regiões 16S-23S ITS e 16S rDNA das cepas foram sequenciadas utilizando-
179 se os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* pela empresa Macrogen Inc., Seul, Coreia.
180 As sequências obtidas foram alinhadas utilizando ClustalW e inspecionadas
181 manualmente no programa BioEdit (Hall, 1999) e sua similaridade comparada usando
182 o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com os dados armazenados no
183 GenBank. As sequências foram comparadas com outras do GenBank, porém só
184 foram usadas aquelas publicadas em revistas indexadas. Árvores filogenéticas foram
185 construídas através do método de máxima parcimônia utilizando o PAUP versão
186 4.02b (Swofford, 1998).

187 **2.6. Detecção dos genes *sxtA* e *mcyE***

188 Para identificar se as cepas isoladas possuíam alguns dos genes envolvidos na
189 produção de saxitoxinas e microcistinas, foram utilizados os protocolos de amplificação
190 das regiões *sxtA* e *mcyE*, de acordo com Jungblut e Neilan (2006) e Ballot et al. (2010),
191 respectivamente. As cepas ITEP-A1 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) (*dados não*
192 *apresentados*) e NPLJ-4 (*Microcystis aeruginosa*) (Ferreira, 2010), reconhecidamente
193 produtoras de saxitoxinas e microcistinas, respectivamente, foram incluídas como
194 controle a fim de confirmar o tamanho das bandas amplificadas.

195 **2.7. Análise de toxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência** 196 **(CLAE)**

197 O cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) utilizado para análise de
198 microcistinas e saxitoxinas era composto por três bombas (LC-20AT, LC-20AD, LC-
199 20AD), degaseificador (DGU-20A₅), sistema para derivatização pós-coluna, forno
200 (CTO-20A), detector de fluorescência (RF-10A_{XL}), detector UV-Vis com arranjo de
201 diodo (SPD-M20A), amostrador automático (SIL-20A_{HT}), sistema controlador para
202 conexão dos módulos com computador (CBM-20A) e software *LC Solution* para a
203 aquisição e processamento dos dados (Shimadzu, Proeminance).

204 2.7.1. Microcistinas

205 À uma massa de 100 mg das amostras previamente liofilizadas, adicionou-se 10
206 mL de metanol 75%. As soluções foram mantidas sob agitação por 1 hora e em
207 seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos (Thermic
208 Scientific, ST16R). O sobrenadante foi transferido para um Becker e o procedimento
209 repetido por duas vezes, como descrito anteriormente, reduzindo o tempo de extração
210 para 30 minutos (Fastner et al., 1998). O total da solução de metanol 75% foi seco sob
211 ar quente e ressuspenso em 0,5 mL de metanol 20% grau HPLC e mantido a -18°C até
212 o momento da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a
213 análise, utilizou-se uma coluna de C18 (250 x 4 mm), forno a 40°C e um gradiente de
214 água:acetonitrila, contendo em cada uma 0,05% de ácido trifluoracético (Lawton et al.,
215 1994). O monitoramento dos cromatogramas foi em 238 nm e o espectro de absorção

216 dos picos monitorado entre 190 a 300 nm. A identificação das microcistinas foi feita
217 pelo seu espectro de absorção e comparação com padrão de microcistina-LR (Abraxis).

218 2.7.2 Saxitoxinas

219 As metodologias descritas por Oshima (1995) foram utilizadas para a extração e
220 análise cromatográfica de saxitoxinas. A extração foi feita com 5 mL ácido acético 0,05
221 M adicionado a uma massa de 100 mg do material liofilizado. A solução foi agitada por
222 1 hora e centrifugada (Hettich, MIKRO 200R) a 12.000 g por 20 minutos, sendo o
223 sobrenadante separado em um Becker. Este procedimento foi repetido mais duas
224 vezes com o precipitado e ao final, o sobrenadante total foi utilizado nas análises
225 cromatográficas. A análise cromatográfica consistiu em um sistema *on line* de
226 derivatização pós-coluna em tubo de teflon (10 m de comprimento e 0,5 mm de
227 diâmetro) e monitoramento em detector de fluorescência (330 nm emissão; 390 nm
228 excitação). Para cada grupo de análogos de saxitoxinas (GTXs e
229 neosaxitoxina/saxitoxina/dc-saxitoxina) utilizou-se uma fase móvel específica. A
230 oxidação pós-coluna foi feita com solução oxidante (ácido acético 7,0 mM em 10,0 mM
231 de tampão fosfato de potássio pH 9,0) e para interromper a reação utilizou-se ácido
232 acético 0,5M. A identificação dos análogos de saxitoxinas se deu pela comparação com
233 os tempos de retenção dos padrões. Como garantia, a análise cromatográfica foi
234 repetida, porém as soluções oxidante e ácido acético 0,5 M foram substituídas por
235 água ultra-pura. O comportamento e tempo de retenção dos picos dos análogos foram
236 comparados aos dos padrões. Os padrões de saxitoxinas utilizados nas análises foram
237 neosaxitoxina, saxitoxina, dc-saxitoxina e GTX1/4, dcGTX2/3, GTX2/3, os quais foram
238 adquiridos da NRC Halifax, Canadá.

239 3. Resultados

240 3.1. Ocorrência e caracterização morfológica

241 Em nove dos dez pontos coletados foi detectada a presença de cianobactérias
242 bentônicas ou perifíticas. Na bacia do rio Mundaú, seis dos sete pontos apresentaram
243 uma ou mais espécies de cianobactérias e na Área de Proteção Ambiental (APA) do
244 Araripe foi observado a ocorrência em todos os pontos coletados de uma ou mais
245 espécies (Tabela 1).

246 No total foram isoladas 45 cepas, sendo 24 da bacia do rio Mundaú,
247 Pernambuco e 21 da APA do Araripe, Ceará. Foi registrada uma riqueza taxonômica de
248 oito espécies, das quais sete pertencem à ordem Oscillatoriales, sendo três
249 representantes da família Phormidiaceae (*Phormidium breve* (Kützing ex Gomont)
250 *Anagnostidis* et Komárek 1988, *Phormidium uncinatum* Gomont ex Gomont 1892 e
251 *Microcoleus* sp. Desmazières ex Gomont, 1892) e quatro da Pseudanabaenaceae
252 (*Pseudanabaena catenata* Lauterborn 1915, *Geitlerinema amphibium* (Agarh ex
253 Gomont) *Anagnostidis* 1989, *Geitlerinema splendidum* (Greville ex Gomont)
254 *Anagnostidis* 1989 e *Geitlerinema lemmermannii* (Woloszynska) *Anagnostidis* 1989).
255 As cepas de *G. amphibium* apresentaram intenso movimento oscilante. Já as cepas de
256 *G. splendidum*, *P. breve* e *P. uncinatum* apresentaram movimento deslizante. Apenas
257 uma espécie da ordem Nostocales, família Nostocaceae (*Cylindrospermum stagnale*
258 (Kützing) ex Bornet et Flahault 1888) foi identificada (Figura 1). As principais
259 características das espécies isoladas estão descritas na Tabela 2.

260 3.2. Análise molecular

261 As sequências do gene 16S do rDNA (550 pb) e da região 16S-23S ITS do rDNA
262 (442 bp) de 38 e 36 cepas, respectivamente, apresentaram diferentes percentuais de
263 identidade quando comparadas às sequências de cianobactérias depositadas no
264 GenBank, NCBI (Tabela 3). As mesmas sequências também foram utilizadas para
265 construir árvores filogenéticas de máxima parcimônia (Figuras 2 e 3) a fim de
266 determinar relações entre as cepas isoladas neste trabalho com outras cianobactérias.

267 As cepas do gênero *Geitlerinema* apresentaram o mesmo padrão nas duas
268 árvores, formando três linhagens distintas, denominadas linhagens I e III, e linhagem
269 *Geitlerinema*. Na árvore do gene parcial 16S rDNA (Figura 2) a linhagem I agrupou as
270 cepas de *G. splendidum* BC 125, 126 e 127 com *G. splendidum* 0ES34S4 e
271 *Geitlerinema* sp. 0SO37S2, com valor de suporte de 92%. Na árvore do ITS (Figura 3),
272 as mesmas cepas agruparam com *G. splendidum* P017 e P014, com valor de suporte
273 de 100%. Na linhagem *Geitlerinema*, gene 16S rDNA, as cepas identificadas
274 morfológicamente como *G. lermmermannii* BC 131, 132, 133, 134, 135, 136 e 137
275 agruparam com a espécie *Geitlerinema carotinosum* GSP167-2, com 100% de suporte
276 e no ITS a linhagem *Geitlerinema* formou seu próprio clado, junto a linhagem III. Na
277 árvore do 16S rDNA, a linhagem III agrupou as cepas de *G. amphibium* com cinco
278 cepas de referência de *Limnothrix* (CHAB709, CHAB759, PCC272.06, CENA111 e
279 CENA110) e duas de *Geitlerinema* (0ES36S4 e 0SO37S2), com 99% e 97% de
280 suporte, respectivamente.

281 Já as cepas BC 122, 123 e 124, identificadas morfológicamente como
282 *Pseudanabaena catenata*, formaram seu próprio clado nas duas árvores, sendo que na
283 árvore do gene 16S rDNA elas agruparam com *Planktolyngbya limnetica* PMC271.06,

284 com suporte de 100%. Cepas do gênero *Phormidium* BC 105, 106, 107, 108 e 110
285 formaram um clado com *Phormidium autumnale* (CYN120 e CYN122) e *Phormidium cf.*
286 *uncinatum* (CYN105 e CYN111). As cepas BC 102, 104, 138, 139 e 140 identificadas
287 como *Microcoleus* sp., apesar de terem ficado próximo a cepas de referência do
288 mesmo gênero na árvore do gene 16S, formaram um clado independente.

289 A ordem Nostocales formou um clado separado nas duas árvores. As cepas BC
290 144, 145 e 146, identificadas de acordo com a sua morfologia como *Cylindrospermum*
291 *stagnale*, agruparam com alto valor de suporte (98%) às cepas de referência de
292 *Cylindrospermum* sp. (PMC185.03, 186.03 e 238.04) na árvore do 16S. Por outro lado,
293 na árvore do ITS as mesmas cepas agruparam com 100% de suporte à *C. muscicola*
294 HA4236-MV2.

295 . O gene *mycE* foi amplificado em quatro cepas (BC 124, BC 144, BC 145 e BC
296 146), com aproximadamente 472 pb. Já o gene *sxtA*, com aproximadamente 628 pb, foi
297 amplificado em dez cepas BC 105, BC 115, BC 131, BC 133, BC 135, BC 136, BC 137,
298 BC 144, BC 145 e BC 146) (Tabela 4). A cepa *Cylindrospermopsis raciborskii* ITEP-A1
299 foi utilizada como controle positivo de saxitoxina e também apresentou um fragmento
300 do gene *sxtA* com 628 bp. Os fragmentos das cepas BC 144, BC 145, BC 146 e ITEP-
301 A1 foram sequenciados e apresentaram alta identidade (99%, 95%, 98% e 95%,
302 respectivamente) com o gene já conhecido de *sxtA* de *Cylindrospermopsis raciborskii*
303 T3 (EU629178.1).

304 Apesar de ter sido amplificado um fragmento de 472 pb para o controle positivo
305 de microcistina (cepa NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*), o seu sequenciamento não
306 foi satisfatório. Por outro lado, o sequenciamento dos fragmentos de mesmo tamanho

307 nas cepas BC 144, BC 145 e BC 146 (*Cylindrospermum stagnale*) apresentou alta
308 identidade (99%, 99% e 98%, respectivamente) com o gene já conhecido do *mycE* de
309 *Microcystis aeruginosa* FCY-28 (JQ290095.1).

310 **3.3. Análise de toxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência** 311 **(CLAE)**

312 As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) identificaram a
313 presença de saxitoxinas em cinco cepas e em nenhuma foi identificada a presença de
314 microcistinas (Tabela 4). Os análogos neosaxitoxina (neoSTX), decarbamoilsaxitoxina
315 (dc-STX) e saxitoxina (STX) foram identificados apenas na cepa BC 144 (*C. stagnale*)
316 (Figura 4 A e Tabela 4). Já goniatóxina 1 (GTX1) foi identificada em quatro cepas, BC
317 144 (Figura 6 B) e BC 145 (*C. stagnale*), BC 105 (*P. uncinatum*) e BC 131 (*G.*
318 *lemmermannii*) (Figura 5 A, B e C). A goniatóxina 4 (GTX4) foi observada apenas na
319 cepa BC 115 (*G. amphibium*) (Figura 5 D).

320 **4. Discussão**

321 *Morfologia e filogenia.* No presente trabalho foram estudadas as relações
322 filogenéticas entre espécies de cianobactérias de hábitos bentônicos e perifíticos. Os
323 isolados de *G. amphibium*, *G. splendidum* e *G. lemmermannii*, cujas classificações
324 foram feitas com base em caracteres morfológicos, apresentaram dimensões celulares,
325 células apicais e motilidade consistentes (Komárek e Anagnostidis, 2005). Entretanto,
326 análises filogenéticas dos genes 16S rDNA e da região 16S-23S ITS do rDNA
327 mostraram que as referidas espécies, na verdade, formam três linhagens distintas,
328 sugerindo que o gênero se comporta como parafilético e também polifilético, conforme

329 já constatado em estudos anteriores (Willame et al., 2006; Bittencourt-Oliveira et al.,
330 2009; Perkerson et al., 2010; Hasler et al., 2012). Analisando a filogenia de gêneros de
331 *Geitlerinema* e *Limnothrix*, Perkerson et al. (2010) os dividiram em quatro linhagens
332 distintas: linhagens I, II, III e IV. A linhagem I foi caracterizada como a linhagem sensu
333 de gênero *Geitlerinema* Anagnostidis 1989, a II foi representada apenas por espécies
334 de *Limnothrix*, a III apresentou características dos dois gêneros, *Geitlerinema* e
335 *Limnothrix*, entretanto constatou-se que faltam autopomorfias morfológica, ecológica ou
336 bioquímica para corresponder ao cluster tão bem suportado pelos dados das
337 sequências do 16S, e a linhagem IV agrupou apenas gêneros de *Geitlerinema* de
338 habitat marinho. As linhagens I e III também foram encontradas neste trabalho, além
339 de uma terceira linhagem, denominada de linhagem *Gietlerinema*, não observada no
340 trabalho de Perkerson et al. (2010), porém essa linhagem foi observada no trabalho de
341 Kirkwood et al. (2008) que apresentou característica monofilética quando comparada a
342 linhagens do gênero *Phormidium*.

343 As cepas BC 122, 123 e 124 descritas como *P. catenata*, apresentaram
344 características morfológicas semelhantes à da espécie descrita por Sant'Anna (2007),
345 embora apresentem valores inferiores para a relação comprimento/largura celular, uma
346 vez que não foi possível identificar a espécie através da população natural e tal
347 alteração pode estar associada às condições de cultivo, devido a variações na
348 disponibilidade de nutrientes ou luz (Cermeno et al., 2006). Essas cepas formaram seu
349 próprio clado nas árvores de 16S rDNA e da região 16S-23S ITS do rDNA, sendo que
350 na árvore do 16S, elas agruparam com *Planktolyngbya limnetica* PMC271.06, que, de

351 acordo com Thomazeau et al. (2010), que trabalharam com análises filogenéticas, se
352 trata de um irmão do gênero *Pseudanabaena*.

353 As cepas BC 108, 109 e 110 foram identificadas como *Phormidium breve*
354 (Komárek e Anagnostidis, 2005), enquanto que as cepas BC 105, 106 e 107
355 apresentaram características morfológicas de *Phormidium uncinatum* (Komárek e
356 Anagnostidis, 2005), exceto para a curvatura do ápice, que é menos extensa e gradual,
357 podendo tal característica estar associada às condições de cultivo. As cepas de
358 *Phormidium* formaram um clado nas duas análises filogenéticas, com o 16S
359 apresentando 96% de suporte com outras cepas de *Phormidium autumnale*, sendo este
360 clado recentemente confirmado através de dados morfológicos e de ultraestrutura
361 (Comte et al., 2007; Palinska et al., 2008; Wood et al., 2012). Hasler et al. (2012), em
362 um estudo da filogenia com espécies de *Geitlerinema*, *Phormidium* e *Microcoleus*,
363 observaram que tais gêneros se comportam de maneira polifilética, o mesmo
364 observado neste trabalho, e sugerem que seja feita uma revisão taxonômica nesses
365 grupos.

366 As cepas BC 102, 103, 104, 138, 139 e 140 foram identificadas
367 morfológicamente como uma espécie de *Leptolyngbya*, considerando as evidências da
368 relação comprimento/largura celular, semelhança estrutural e tricomas isolados
369 (Komarek e Anagnostidis, 2005). Entretanto, as características do tricoma
370 apresentaram-se bastante semelhantes as do gênero *Microcoleus*, porém em
371 condições de cultivo não foi possível observar filamentos multi-tricoma, sendo esse um
372 caractere taxonômico do gênero (Sant'Anna, 2006; Komarek e Anagnostidis, 2005).
373 Por outro lado, o BLASTn do gene 16S mostrou que as cepas compartilharam 95% de

374 identidade com outras espécies de *Microcoleus* depositadas no GenBank, NCBI
375 (Tabela 3). Nas duas análises filogenéticas realizadas neste estudo as cepas formaram
376 cladogramas independentes, sendo que na do gene 16S as cepas se posicionaram próximo
377 às outras espécies de *Microcoleus* e *Phormidium*. Tal relação entre esses dois gêneros
378 também foi observada em vários outros estudos filogenéticos (Comte et al., 2007;
379 Palinska et al., 2008; Heath et al., 2010; Wood et al., 2012; Hasler et al., 2012).

380 Apesar de terem sido encontrados apenas dois acinetos na população natural,
381 as cepas BC 144, 145 e 146 foram identificadas como *Cylindrospermum stagnale*. Tal
382 gênero é considerado indicador de ambientes não poluídos (Komárek, 2003),
383 confirmando a preservação do ponto de amostragem de onde foram isolados, nascente
384 do rio Mundaú. Sant'Anna et al. (2006) chamam a atenção para o fato do gênero ser
385 pouco estudado. As três cepas formaram um clado isolado próximo às espécies da
386 ordem Nostocales nas análises filogenéticas do 16S e do ITS, agrupando com 98% de
387 suporte com cepas do gênero *Cylindrospermum* sp. (PMC185.03, 186.03 e 238.04) na
388 árvore do 16S (Figura 2).

389 *Cianotoxinas*. O gene *mcyE*, um dos envolvidos na síntese de microcistinas, amplificou
390 em quatro cepas (Tabela 4), mas as análises de CLAE não identificaram a presença de
391 microcistinas em nenhuma das cepas analisadas. Vários estudos relatam a mesma
392 situação, em que parte do *cluster mcy* é encontrado, porém a presença da toxina não
393 é confirmada por métodos analíticos (Mankiewicz-Boczek et al., 2006; Saker et al.,
394 2007; Bittencourt-Oliveira et al., 2010). Tal fato poderia estar associado a uma
395 concentração de microcistinas abaixo do limite de detecção do método (Bittencourt-
396 Oliveira et al., 2010), porém a extração foi feita a partir de uma biomassa de material

397 liofilizado bastante elevada. Bittencourt-Oliveira et. al., 2003 afirmam que os genótipos
398 responsáveis por produzir toxinas nem sempre são expressos, o que pode ter ocorrido
399 para as cepas BC 124, BC 144, BC 145 e BC 146.

400 Os resultados deste trabalho apresentaram o primeiro relato da produção de
401 saxitoxinas por espécies de *Geitlerinema* e *Cylindrospermum*, além da primeira
402 descrição no Brasil da produção deste metabólito para *Phormidium* (Figuras 4 e 5 e
403 Tabela 4). Até o momento, saxitoxinas só haviam sido identificadas no Brasil em cepas
404 de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos et al., 1999; Molica et al., 2002). Há vários
405 registros na literatura da produção de saxitoxinas por espécies de cianobactérias
406 (Humpage et al., 1994; Yin et al., 1997; Lagos et al., 1999; Pomati et al., 2000; Rapala
407 et al., 2005; Ballot et al., 2010; Humpage et al., 2010). Entretanto, a maioria dos relatos
408 está associado às cianobactérias planctônicas, sendo raros os estudos com espécies
409 perifíticas ou bentônicas, ainda que algumas dessas espécies já tenham sido
410 identificadas como produtoras de toxinas (Onodera et al., 1997; Teneva et al., 2005;
411 Smith et al., 2011).

412 Recentemente, o cluster do gene envolvido na produção de saxitoxinas por
413 cianobactérias foi identificado por Kellmann et al. (2008). A amplificação do gene *sxtA*
414 ocorreu em dez das quarenta e cinco cepas isoladas (Tabela 4). Por outro lado, a
415 presença de análogos de saxitoxinas por CLAE foi confirmada em apenas cinco
416 isolados. Ballot et al. (2010) também observaram que algumas cepas foram positivas
417 para presença do gene *sxtA* e não encontraram os análogos por CLAE/Espectrometria
418 de massa. Moustafa et al. (2009) hipotetizaram que várias cepas produtoras de
419 saxitoxinas de *Anabaena circinalis* perdem a capacidade de produzir a toxina ao longo

420 do tempo, levando a coexistência no meio ambiente de cepas produtoras e não
421 produtoras de saxitoxinas. Este mecanismo implica que as cepas positivas para *sxtA*
422 podem ter perdido parte do *cluster* envolvido na produção de saxitoxinas (Ballot et al.,
423 2010).

424 Os isolados BC 105 (*Phormidium uncinatum*), BC 115 (*G. amphibium*), BC 131
425 (*G. lemmermanni*) e BC 145 (*C. stagnale*) apresentaram apenas um análogo de
426 saxitoxinas, enquanto que BC 144 (*C. stagnale*) apresentou quatro (Tabela 4).
427 Trabalhos anteriores identificaram mais de um análogo de saxitoxinas em todas as
428 cepas analisadas (Humpage et al., 1994; Negri et al., 1997; Carmichael et al., 1997;
429 Onodera et al., 1997; Pomati et al., 2000; Molica et al., 2002; Pomati et al., 2004;
430 Molica et al., 2005; Ballot et al., 2010), com exceção do trabalho de Smith et al. (2011),
431 que identificaram apenas saxitoxina (STX) na espécie *Scytonema cf. crispum*. Por outro
432 lado, já foram identificados mais de 20 análogos de saxitoxinas em dinoflagelados e
433 cianobactérias (Oshima, 1995; Chorus e Bartram, 1999) e nas análises cromatográficas
434 foram utilizados apenas seis padrões. Portanto, as cepas que foram positivas para o
435 gene *sxtA* e negativas por CLAE, podem estar produzindo outros análogos, diferentes
436 dos padrões utilizados, os quais não puderam ser identificados ou não apresentam
437 parte do cluster envolvido na produção dessas toxinas.

438 Teneva et. al. (2005) estudaram a toxicidade de cinco espécies de *Phormidium*
439 (*P. bijugatum*, *P. molle*, *P. papyraceum*, *P. uncinatum*, *P. autumnale*) e todas foram
440 tóxicas em bioensaios com camundongos. A produção de microcistinas e saxitoxinas,
441 no estudo supracitado, foi confirmada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) e a
442 espécie *P. uncinatum*, identificada no presente trabalho como produtora de GTX-1,

443 apresentou a maior concentração de saxitoxinas e maior efeito neurotóxico em
444 camundongos. Estudos com espécies de *Phormidium* da Nova Zelândia identificaram a
445 presença de vários análogos da neurotoxina anatoxina-a (anatoxina-a, homoanatoxina-
446 a, dihidro-anatoxina-a e dihidro-homoanatoxina-a), a qual está relacionada a vários
447 casos de morte de animais em todo o mundo (Gugger et al., 2005; Wood et al., 2007;
448 Heath et al., 2010; Puschner et al., 2010; Wood e Youg, 2011; Faassen et al., 2012;
449 Wood e Young, 2012).

450 Sant'Anna et al. (2008) constataram a toxicidade de *G. amphibium* em bioensaios
451 com camundongos, mas a toxina não foi identificada. Outros trabalhos também
452 verificaram a toxicidade de espécies de *Geitlerinema* em bioensaios com
453 camundongos, porém os sintomas apresentados pelos animais não eram similares
454 àqueles causados por toxinas conhecidas (Dogo et al., 2011; Bernard et al., 2011;
455 Rangel et al., 2012). No presente trabalho, entretanto, a produção de GTX4 e GTX1 foi
456 confirmada por CLAE nas cepas BC 115 (*G. amphibium*) BC 131 (*G. lermmermannii*),
457 respectivamente (Figura 5), e ambas também possuem o gene envolvido na produção
458 de saxitoxinas (Tabela 4), sendo este o primeiro relato da produção de saxitoxinas para
459 essas espécies.

460 A presença dos genes *mcyE* e *stxA* foram confirmados nas cepas BC 144 e BC
461 145 de *Cylindrospermum stagnale*, no entanto apenas análogos de saxitoxinas foram
462 identificados por CLAE. A cepa BC 144 apresentou a maior quantidade de análogos de
463 saxitoxinas, um total de quatro (neoSTX, dcSTX, STX e GTX1) (Tabela 4), enquanto
464 que em BC 145 apenas a GTX1 foi identificada. A produção de toxinas por
465 *Cylindrospermum* havia sido relatada apenas por Sivonen et al. (1989), que

466 identificaram a presença de anatoxina-a. Destarte, este trabalho registrou pela primeira
467 vez a produção de saxitoxinas por *Cylindrospermum*.

468 *Conclusões.* Trabalhos recentes (Komárek & Anagnostidis 2005; Comte et al., 2007;
469 Palinska et al., 2008; Heath et al., 2010; Wood et al., 2012; Hasler et al., 2012) vêm
470 mostrando a necessidade de revisão da taxonomia de algumas espécies da ordem
471 Oscillatoriales. O presente trabalho corrobora com esta proposta, uma vez que as
472 espécies de *Geitlerinema*, *Pseudanabaena* e *Microcoleus* se comportaram de maneira
473 polifilética. Como exemplo de tal necessidade, a pesquisa apresentou cepas do gênero
474 *Geitlerinema* que correspondem a pelo menos três linhagens filogenéticas, e que,
475 possivelmente, correspondem a três espécies distintas a serem posteriormente
476 reclassificadas.

477 Ademais, faz-se necessário definir cepas tipo com base em estudos
478 filogenéticos para as espécies de cianobactérias, e a disponibilização de sequências
479 dessas cepas no GenBank, NCBI, para que seja possível avançar no conhecimento
480 taxonômico desses organismos. Sugere-se que enquanto as cepas tipos das espécies
481 de cianobactérias não sejam definidas, em razão de complicações de nomenclatura e
482 prioridade de nomes científicos, sejam estabelecidas linhagens filogenéticas e as
483 sequências desses isolados depositadas no GenBank, a exemplo de algumas
484 publicações recentes.

485 Em eventos de florações de espécies de cianobactérias planctônicas, as
486 cianotoxinas representam um risco para o meio ambiente e para a saúde humana e
487 animal. E, de maneira geral, pouca atenção vem sendo dada às espécies bentônicas e

488 perifíticas de cianobactérias em relação à sua capacidade de produzir as mesmas
489 toxinas. Os resultados deste trabalho, bem como de outros autores (Heath et al., 2010;
490 Wood et al. 2011), demonstram a necessidade de incluir aquelas espécies, e não
491 apenas as planctônicas, na avaliação de riscos e em programas de monitoramento de
492 ecossistemas aquáticos, uma vez que elas podem contribuir ou, até mesmo, ser a fonte
493 principal, de cianotoxinas no ambiente.

494 **5. Agradecimentos**

495 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
496 pelo financiamento do projeto, e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do
497 Estado de Pernambuco (FACEPE).

498

499 **6. Referências Bibliográficas**

500 Baker, J.A., Neilan, B.A., Entsch, B., Mckay, D.B., 2001. Identification of cyanobacteria
501 and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis.
502 **Environmental Toxicology**; 16: 472-482.

503 Ballot, A., Fastner, J., Wiedner, C., 2010. Paralytic shellfish poisoning toxinproducing
504 cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany. **Applied**
505 **Environmental Microbiology**, 76 (4), 1173–1180.

506 Bernard, C., S. Froscio, R. Campbell, P. Monis, A. Humpage & L. Fabbro, 2011. Novel
507 toxic effect associated with a tropical *Limnothrix/Geitlerinema*-like cyanobacteria.
508 **Environmental Toxicology** 26: 260–270.

509 Bicudo, C.E.M. & Menezes, M. (orgs.). 2005. **Gêneros de algas de águas**
510 **continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. RiMa Editora, São
511 Carlos.

512 Bittencourt-oliveira, M. C.; Molica, R., 2003. Cianobactéria Invasora - Aspectos
513 moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Revista**
514 **Biociência**, n. 30, p. 82-90.

515 Bittencourt-Oliveira, M.C., Moura, A.N., Oliveira, M.C. & Massola Jr., N.S. 2009.
516 *Geitlerinema* species (Oscillatoriales, Cyanobacteria) revealed by cellular morphology,
517 ultrastructure and DNA sequencing. **Journal of Phycology** 45: 716-725.

- 518 Bittencourt-oliveira, M. C.; Santos, D. M. S.; Moura, A. N., 2010. Toxic Cyanobacteria in
519 reservoirs in northeastern Brazil: detection using molecular method. **Brazilian Journal**
520 **of Biology**, v.70, n.4, p. 1005-1010.
- 521 BRASIL. 2004. Ministério da Saúde, Portaria nº 518, de 03/2004. **Diário Oficial [da]**
522 **República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. seção 1,
523 p.266-270.
- 524 BRASIL. 2011. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, 12 de dezembro de 2011. **Diário**
525 **Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF.
- 526 Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Moczydlowski, E., 1997. Evidence for
527 paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex
528 Gomont) comb. nov. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (8), 3104–3110.
- 529 Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., An, J.S., Molica, R.J.R., Jochimsen, E.M., Lau,
530 S., Rinehart, K.L., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2001. Human fatalities from
531 cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental**
532 **Health Perspectives**; 109: 663-668.
- 533 Cermeno, P., Maranon, E., Harbour, D., Harris, R.P., 2006. Invariant scaling of
534 phytoplankton abundance and cell size in contrasting marine environments. **Ecology**
535 **letters** 9(11), 1210-1215.
- 536 Chorus, I., and Bartrum, J., 1999. **Toxic Cyanobacteria in water: A Guide to their**
537 **public health consequences, monitoring and management**. London and New York:
538 E & FN Spon.

- 539 Codd, G.A.; Lindsay, J.; Young, F.M.; Morrison, L.F.; Metcalf, J.S., 2005. Harmful
540 cyanobacteria: from v mass mortalities to management measures. In: Huisman J et al,
541 editors, **Harmful Cyanobacteria**. Springer; p.1-24.
- 542 Comte, K., Šabacká, M., Carre–Mlouka, A., Elster, J. & Komárek, J., 2007.
543 Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three Phormidium–
544 like strains evaluated by a polyphasic approach. – **FEMS Microbiol. Ecol.** 59: 366–376.
- 545 Dogo, C.R., Bruni, F.M., Elias, F., Rangel, M., Pantoja, P.A., Sant’Anna, C.L., Lima,
546 C., Lopes-Ferreira, M., De Carvalho, L.R., 2011. Inflammatory effects of the toxic
547 cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. **Toxicon**; 58: 464-470.
- 548 Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M. and Codd, G.A., 1992. Identification of
549 anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog
550 poisonings at Loch Insh, Scotland. **Toxicon**, 30: 1165-1175.
- 551 Faassen, E.J., Harkema, L., Begeman, L., Lurling, M., 2012. First report of
552 (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in
553 The Netherlands. **Toxicon**, 60, 378–384.
- 554 Fastner, J., Flieger, I., Neumann, U., 1998. Optimized extraction of microcystins from
555 field samples - a comparison of different solvents and procedures. **Water Research**; 32:
556 3177-3181.
- 557 Ferreira, N., Oliveira, M. F., Oliveira, V. M., da Cunha R.V., Grisolia, P., Pires Júnior, C.
558 K., Rodrigues, O. , 2010. Histopathological effects of [D-Leu1]Microcystin-LR variants

559 on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix*
560 (Valenciennes, 1844). **Toxicon**. 55: 1255-1262.

561 Fiore, M.F., Genuário, D.B., Silva, C.S.P., Shishido, T.K., Moraes, L.A.B., Neto, R.C.,
562 Silva-Stenico, M.E., 2009. Microcystin production by a freshwater spring
563 cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon**; 53: 754-761

564 Genuario, D. B., Silva-Stenico, M. E., Welker, M., Moraes, L. A. B. & Fiore, M. F., 2010.
565 Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a
566 Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon**; 55:846–54.

567 Gorham, P.R., McLachlav, J.R., Hammer, V.T., Kim, W.K., 1964. Isolation and culture of
568 toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verhandlungen der**
569 **Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**; 15:
570 796-804.

571 Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C.,
572 Bernard, C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium
573 *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis.
574 **Toxicon**; 45: 919-928.

575 Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
576 analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids SymposiumSeries**, 1999; 41:
577 95-98.

- 578 Hamill, K.D., 2001. Toxicity in benthic freshwater cyanobacteria (blue-green algae): first
579 observations in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater**
580 **Research**, 35: 1057-1059.
- 581 Hašler, P., Dvořák, P., Johansen, J.R., Kitner, M., Ondřej, V. & Poulíčková, A. , 2012.
582 Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera
583 *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria)
584 **Fottea**, 12(2): 341-356.
- 585 Heath, M.W.; Wood, S.A.; Ryan, K.G., 2010. Polyphasic assessment of fresh-water
586 benthic mat forming cyanobacteria isolated from New Zealand. **FEMS Microbiology**
587 **Ecology**; 73: 95-109.
- 588 Humpage A. R., Rositano J., Bretag A. H., Brown R., Baker P. D., Nicholson B. C. and
589 Ste€Ensen D. A., 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyano- bacterial
590 blooms. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**; 45, 761-771.
- 591 Humpage, A.R., Magalhaes, V., Froscio, S.M., 2010. Comparison of analytical tools and
592 biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Anal. Bioanal.**
593 **Chem.** 397, 1655–1671.
- 594 Iteaman, I., Rippka, R., Tandeau, M., Herdman, M., 2000. Comparison of conserved
595 structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer
596 sequences of cyanobacteria. **Microbiology**; 146: 1275-1286.

- 597 Izaguirre, G., Jungblut, A.-D., Neilan, B.A., 2007. Benthic cyanobacteria
598 (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern
599 California. **Water Research**; 41: 492-498.
- 600 Jungblut, A.-D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B. P.,
601 Neilan, B.A., 2005. Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity
602 meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Environ. Microbiol.** 7 (4), 519–529.
- 603 Jungblut, A.-D., Neilan, B.A., 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic
604 peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of
605 cyanobacteria. **Archives of Microbiology.** 185, 107–114.
- 606 Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008.
607 Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene
608 cluster in cyanobacteria. **Applied Environmental Microbiology** 74 (13), 4044–4053.
- 609 Kirkwood, A.E., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A., and Henley, W.J., 2008.
610 Cyanobacterial diversity and halotolerance in a variable hypersaline
611 environment. **Microb. Ecol.** 55:453-465.
- 612 Komárek, J.; Anagnostidis, K., 1989. Modern Approach to the classification system of
613 cyanophytes, 4 – Nostocales. **Algological Studies**; 56: 247-345
- 614 Komárek, J.; Anagnostidis, K., 2005. Cyanoprokaryota, Part 2: Oscillatoriales,
615 Süßwasserflora Von Mitteleuropa, Bd 19/1. **Spektrum Akademischer Verlag**,
616 Heidelberg

- 617 Komárek, J. Komárková, J. & Kling, H. 2003. Filamentous Cyanobacteria. In: J.D. Wehr
618 & R.G. Sheath (eds.). **Freshwater algae of the United States**. Academic Press,
619 Amsterdam, pp. 117-196.
- 620 Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., Oshima, Y.,
621 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium
622 *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**; 37 (10), 1359–1373.
- 623 Lawton, L.A., Edwards, C., Codd, G.A., 1994. Extraction and high-performance liquid
624 chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated
625 waters. **Analyst**, 119: 1525 - 1530.
- 626 Lee, R. E., 1999. **Phycology**. 3^a ed. Cambridge, 547 p.
- 627 Mankiewicz-Boczek J, Izydorczyk K, Romanowska-Duda Z, Jurczak T, Stefaniak K,
628 Kokocinski M. 2006. Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by
629 application of molecular methods. **Environ Toxicol** 21:380–387.
- 630 Mez, K.; Beattie, K.A.; Codd, G.A.; Hanselmann, K.; Hauser, B.; Naegeli, H.; Preisig,
631 H.R., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle
632 deaths on alpine pastures in Switzerland. **European Journal of Phycology**; 32: 111-
633 117.
- 634 Mohamed, Z.A.; El-Sharouny, H.M.; Ali, W.S.M. , 2006. Microcystin production in
635 benthic mats of cyanobacteria in the Nile River and irrigation canals, Egypt. **Toxicon**;
636 47: 584-590.

- 637 Mohamed Z. A., and Al Shehri A. M., 2010. Microcystin Production in Epiphytic
638 Cyanobacteria on Submerged Macrophytes. **Toxicon**; 55: 1346-1352.
- 639 Molica, R., Onodera, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro,
640 H., Oshima, Y., Azevedo, S., Lagos, N., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium
641 *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in
642 Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, v.
643 41, n. 6, p. 606-611.
- 644 Molica, R. J. R.; Oliveira, E. J. A.; Carvalho, P. V. V. C.; Costa, A. N. S. F.; Cunha, M.
645 C. C.; Melo, G. L.; Azevedo, S. M. F. O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an
646 anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful**
647 **Algae**, v. 4, p. 743-753.
- 648 Molica, R.; Azevedo, S., 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de
649 cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**; 13(2): 229-246.
- 650 Moustafa, A., Loram, J. E., Hackett, J. D, Anderson, D. M., Plumley, F. G., and
651 Bhattacharya, D., 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. **PLoS**
652 **One** 4:1–10.
- 653 Negri, A.P. and Jones, G.J., 1995. Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning
654 (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussel
655 *Alathyria condola*. **Toxicon**, 33(5), 667-678.

- 656 Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T., CARMICHAEL, W.W., 1997. New
657 saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*.
658 **Natural Toxins**; 5(4): 146-151.
- 659 Oshima, Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for
660 paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**, [Gaithersburg], v. 78, n. 2, p.
661 523- 532.
- 662 Palinska, K.A. & Marquardt, J., 2008. Genotypic and phenotypic analysis of strains
663 assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale*
664 (Oscillatoriales). **Arch. Microbiol.** 189: 325–335.
- 665 Perkerson, R.B.; Perkerson, E.A. & Casamatta, D.A., 2010. Phylogenetic examination
666 of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Limnothrix* (Pseudanabaenaceae) using
667 16S rDNA gene sequence data. **Algological Studies**, 134: 1–16.
- 668 Pomati, F., Moffitt, M.C., Cavaliere, R., Neilan, B.A., 2004. Evidence for differences in
669 the metabolism of saxitoxin and C1p2 toxins in the freshwater cyanobacterium
670 *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. **Biochim.Biophys. Acta.** (BBA) Gen. Subj. 1674,
671 60–67.
- 672 Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y., Neilan,
673 B., 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp FP1: molecular identification
674 and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **J Phycol** 36, 553 - 562.

- 675 Puschner, B.; Pratt, C.; Tor, E.R., 2010. Treatment and diagnosis of a dog with
676 fulminant neurological deterioration due to anatoxin-a intoxication. **J. Vet. Emerg. Crit.**
677 **Care**; 20, 518–522.
- 678 Rangel, M., Brunetti R L., Garcia, A.N., Cambui, C.C.N., Conserva, G.A.A., Neves,
679 A.C., Sant' Anna, C.L., Carvalho, L.R., 2012. Acute effects of three Geitlerinema spp.
680 (Cyanobacteria) extracts administrated in mice: symptoms and histopathological
681 aspects. **Phytochemistry Reviews**, 1-11.
- 682 Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K.,
683 Lahti, K., Hoppu, K., Lepistö, L., 2005. First report of saxitoxin in Finnish lakes and
684 possible associated effects on human health. **Environmental Toxicology** 20 (3), 331–
685 340.
- 686 Rogers, S., Bendich, A., 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh,
687 herbarium and mummified plant tissues. **Plant Mol Biol** 5(2), 69-76.
- 688 Saker, M.L., Vale M., Kramer, D., Vasconcelos, V.M., 2007. Molecular techniques for
689 the early warning of toxic cyanobacteria blooms in freshwater lakes and rivers. **Appl**
690 **Microbiol Biotech**; 75:441–449.
- 691 Sant' Anna , C. L.; Azevedo, M. T. P.; Werner, V. R.; Dogo, C. R.; Rios, F. R.; Carvalho,
692 L. R., 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**
693 126, 251-265.

694 Sant'Anna, C.L., Melcher, S.S., Carvalho, M.C., Gemelgo, M.P. & Azevedo, M.T.P.,
695 2007. Planktic cyanobacteria from upper Tiête basin reservoirs, SP, Brazil. – **Rev. Bras.**
696 **Bot.** 30 (1): 1–17.

697 SANT'ANNA, C.L., BRANCO, L.H.Z. & AZEVEDO, M.T.P. 2006.
698 Cyanophyceae/Cyanobacteria. In **Gêneros de algas de águas continentais do**
699 **Brasil: chave para identificações e descrições** (C.E.M. Bicudo & M. Menezes, orgs.).
700 2nd ed. RIMA, São Carlos, p.19-63.

701 Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., Shaw, G., 2007. First
702 evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by
703 the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale
704 and Dyck. **Harmful Algae**; 6: 73-80.

705 Sivonen, K., Himberg, K., Luukkainen, R., Niemela, S. I., Poon, G. K. & Codd, G. A.,
706 1989. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacteria blooms and strains from
707 Finland. *Toxic Assess* 4, 339-352.

708 Smith, F.; Wood, S.A.; Ginkel, R.V.; Broady, P.; Gaw, S., 2011. First report of saxitoxin
709 production by a specie of the freshwater benthic cyanobacterium, *Scytonema* Agardh.
710 **Toxicon**; 57, 566–573.

711 Swofford, D. L., 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other
712 methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

- 713 Teneva, I., Dzhaambazov, B., Koleva, L., Mladenov, R., Schirmer, K., 2005. Toxic
714 potential of five freshwater Phormidium species (Cyanoprokaryota). **Toxicon**; 45: 711-
715 725.
- 716 Thomazeau, S., Houdan-Fourmont, A., Coute´, A., Duval, C., Couloux, A., Rousseau,
717 F., Bernard, C., 2010. The contribution of sub-Saharan African strains to the phylogeny
718 of cyanobacteria: focusing on the Nostocaceae family (Nostocales order,
719 Cyanobacteria). **J. Phycol.** 46, 564–579.
- 720 Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komárek, J. & Hoffmann, L., 2006.
721 Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium
722 and Luxemburg. **J. Phycol.** 42: 1312–1332.
- 723 Wood, S.A.; Selwood, A.I.; Rueckert, A.; Holland, P.T.; Milne, JR.; Smith, K.F.; Smits,
724 B.; Watts, L.; Cary, C.S. , 2007. First report of homoantoxin-a and associated dog
725 neurotoxicosis in New Zealand. **Toxicon**; 50: 292-301.
- 726 Wood, S.A. and Young, R., 2011. Benthic Cyanobacteria and Toxin Production in the
727 Manawatu - Whanganui Region. Prepared for Horizons Regional Council. **Cawthron**
728 **Report** No. 1959. 36 p.
- 729 Wood, S.A.; Young, R.G., 2012. Review of Benthic Cyanobacteria Monitoring
730 Programme 2012; **Cawthron Report** No. 2217; Horizon Regional Council: Palmerston
731 North, New Zealand;p. 30.

732 Wood, S. A., Smith, F. M. J., Heath, M. W., Palfroy, T., Gaw, S., Young, R. G., Ryan,
733 K.G., 2012. Within-Mat Variability in Anatoxin-a and Homoanatoxin-a Production among
734 Benthic *Phormidium* (Cyanobacteria) Strains. **Toxins**. 4: 900-912.

735 Yin, Q., Carmichael, W., Evans, W., 1997. Factors influencing growth and toxin
736 production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex
737 Gomont. **Journal of Applied Phycology**. 9 (1), 55–63.

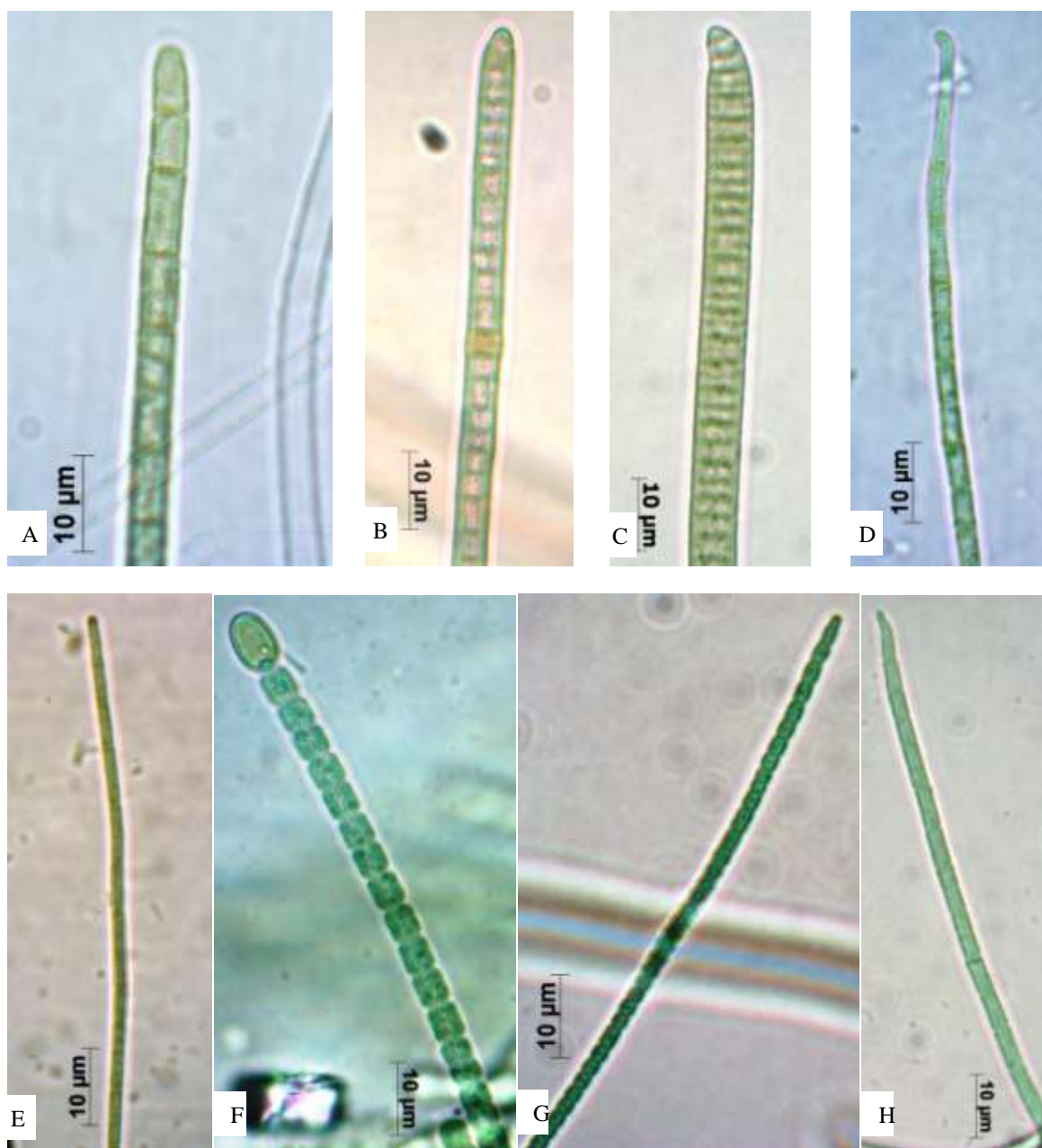
738

739 **Tabela 1** – Pontos de coleta de cianobactérias da bacia do rio Mundaú, Pernambuco e
 740 de açudes da Área de Proteção Ambiental (APA) do Araripe, Ceará.

Pontos	Local	Habitat	Taxa	Latitude/Longitude
P-01	Mundaú, Pernambuco	Bentos em riacho	<i>Phormidium uncinatum</i>	S 08°53'16.0" O 036°31'10.2"
P-02	Mundaú, Pernambuco	Bentos em riacho	<i>Microcoleus</i> sp.	S 08°55'02.8" O 036°30'11.0"
P-03	Mundaú, Pernambuco	Bentos em riacho	<i>Phormidium uncinatum</i> <i>Pseudanabaena catenata</i>	S 08°55'59.3" O 036°29'19.1"
P-04	Mundaú, Pernambuco	Bentos em reservatório	<i>Geitlerinema amphibium</i>	S 08°56'42.9" O 036°29'25.8"
P-05	Mundaú, Pernambuco	Bentos em rio	<i>Phormidium uncinatum</i>	S 09°07'54.5" O 036°18'44.3"
P-06	Mundaú, Pernambuco	Perífiton em nascente	<i>Cylindrospermum stagnale</i>	S 08°53'33.4" O 036°29'24.0"
P-07	Mundaú, Pernambuco	Perífiton em nascente	-	S 08°53'34.4" O 036°29'26.2"
P-08	APA do Araripe, Ceará	Bentos em açude	<i>Phormidium breve</i>	S 07°39'17.5" O 039°17'05.9"
P-09	APA do Araripe, Ceará	Bentos em açude	<i>Geitlerinema amphibium</i>	S 07°39'24.8" O 039°15'44.9"
P-10	APA do Araripe, Ceará	Bentos em açude	<i>Geitlerinema amphibium</i> <i>Geitlerinema splendidum</i>	S 07°39'10.21" O 039°16'20.83"

741

742



743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777

778 **Figura 1** – Fotos das cepas isoladas de rios e reservatório do Mundaú, Pernambuco e
779 da APA do Araripe, Ceará. A – BC 102 (*Microcoleus* sp.); B – 108 (*Phormidium breve*);
780 C – BC 106 (*P. uncinatum*); D – BC 126 (*Geitlerinema splendidum*); E – BC 141 (*G.*
781 *amphibium*); F – BC 144 (*Cylindrospermum stgnale*); G – BC 124 (*Pseudanabaena*
782 *catenata*); H – BC 134 (*G. lemmemannii*).

783 **Tabela 2** – Principais características das cepas isoladas de rios e reservatório do Mundaú, Pernambuco e da APA do
 784 Araripe, Ceará. *Apenas células vegetativas, caso contrário indicado. Comp. = comprimento; Larg. = largura; H =
 785 heterócito

Identificação da cepa	Organização celular	Morfologia do tricoma/célula	Tamanho celular (µm)*		
			Comp.	Larg.	Comp./Larg.
<i>G. amphibium</i>					
BC 111; BC 112; BC 113; BC 114; BC 115; BC 116; BC 117; BC 118; BC 119; BC 120; BC 121; BC 128; BC 129; BC 130; BC 141; BC 142; BC 143	Células formando tricomas dispostos em feixes agregados com intenso movimento oscilante.	Tricomas retos ou flexuosos, não constrictos, não atenuados; célula apical cilíndrica com polos arredondados; células cilíndricas; sem aerótopos.	7,5 - 2,7 (5,01)	2,4 - 1,3 (1,85)	4,72 - 1,4 (2,73)
<i>G. splendidum</i>					
BC 125; BC 126; BC 127	Células formando tricomas dispostos em feixes agregados com movimento deslizante.	Tricomas retos ou flexuosos, geralmente curvos no ápice, atenuados, não constrictos; Células apicais atenuadas, com polos arredondados; sem aerótopos.	6,98 - 3,98 (5,6)	3,34 - 2,56 (2,92)	2,44 - 1,37 (1,94)
<i>G. lemmermannii</i>					
BC 131; BC 132; BC 133; BC 134; BC 135; BC 136; BC 137	Células formando tricomas, dispostos em feixes agregados, com movimento oscilante.	Tricomas retos ou flexuosos, geralmente curvos no ápice, atenuados, não constrictos; Células apical atenuadas, com polos acuminados; sem aerótopos.	6,51 - 3,1 (4,86)	2,61 - 1,9 (2,22)	2,90 - 1,56 (2,30)
<i>P. catenata</i>					
BC 122; BC 123; BC 124	Células formando tricomas emaranhados. Aderidos ao vidro (biofilme).	Tricomas flexuosos, constrictos, não atenuados; Célula apical cilíndrica com polos arredondados; sem aerótopos.	3,37 - 1,57 (2,66)	2,02 - 1,56 (1,79)	2,1 - 0,87 (1,48)

786
787
788

Tabela 2 - Continuação

Identificação da cepa	Organização celular	Morfologia do tricoma/célula*	Tamanho celular (µm)		
			Comp.	Larg.	Comp./Larg.
<i>Phormidium uncinatum</i>					
BC 105; BC 106; BC 107	Células formando tricomas emaranhados, aderidos ao vidro (biofilme). Aspecto membranoso. Movimento deslizante.	Tricomas retos ou curvos, geralmente curvos no ápice, não atenuados, não constrictos; Célula apical atenuada, caliptra ± arredondado; sem aérotopos.	4,02 - 1,54 (2,65)	6,83 - 5,18 (6,43)	0,6 – 0,26 (0,4)
<i>Phormidium breve</i>					
BC 108; BC 109; BC 110	Células formando tricomas emaranhados, aderidos ao vidro (<i>mats</i>). Aspecto membranoso. Movimento deslizante.	Tricomas geralmente retos, pouco atenuados, não constrictos; Célula apical cônica arredondada, com grânulos entre as paredes das células, sem caliptra; sem aérotopos.	3,91 - 2,37 (3,00)	5,63 - 3,97 (4,89)	0,98 – 0,43 (0,62)
<i>Microcoleus</i> sp.					
BC 102; BC 103; BC 104; BC 138; BC 139; BC 140	Células formando tricomas emaranhados	Tricomas cilíndricos e retos. Células isodiamétricas, células apicas geralmente cônicas.	8,84 - 5,34 (6,97)	4,04 - 3,05 (3,48)	2,51 – 1,51 (2,00)
<i>Cylindrospermum stagnale</i>					
BC 144; BC 145; BC 146	Células formando tricomas densamente emaranhados, aderidos ao vidro (biofilme), com aspecto mucilaginoso.	Tricomas retos, constrictos, não atenuados; Células subcilíndricas; heterócitos alongados ou ovais; acinetos oblongo ou subcilíndrico.	5,47 - 3,8 (4,81)	4,36 - 3,06 (3,76)	1,78 – 0,96 (1,27)
			H: 8,2 - 6,3 (7,3)	H: 5,4 - 4,6 (5,05)	

791 **Tabela 3** – Identidade (%) das sequências dos genes do 16S e 16S-23S ITS das cepas estudadas comparadas com
 792 outras sequências de cianobactérias do GenBank.

Código da cepa	Táxon	Comprimento do fragmento do gene 16S rRNA / 16S-23S ITS(bp)	Identidade 16S / 16S-23S ITS (%)	Cobertura da consulta 16S / 16S-23S ITS (%)	Mais próximo no GenBank 16S / 16S-23S ITS (Número de acesso)
BC 102; 103; 104; 138; 139; 140	<i>Microcoleus</i> sp.	546 / 606	95 / 85	99 / 54	<i>Microcoleus</i> sp. HTT-U-KK5(EF654070.1); / <i>Chroococcidiopsis</i> sp. Clone AR1_4 (FJ805853.1)
BC 105; 106; 107	<i>Phormidium uncinatum</i>	545 / 628	98 / 100	99 / 68	<i>Phormidium autumnale</i> VUW1 (GQ451411.1) / <i>Phormidium autumnale</i> svS1 (JQ769128.1)
BC 108; 109; 110	<i>Phormidium breve</i>	545 / 716	98 / 99	99 / 57	<i>Phormidium autumnale</i> VUW1 (GQ451411.1) / <i>Phormidium</i> cf. <i>autumnale</i> CCALA 145 (JN230340.1)
BC 111; 112; 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119; 120; 121; 128; 129; 130; 141; 142;143	<i>G. amphibium</i>	544 / 593	100 / 94	100 / 52	<i>Limnothrix planctonica</i> CHAB763 (JQ004026.2) / <i>Geitlerinema</i> sp. PCC 10602 (EF061078.2)
BC 122; 123; 124	<i>P. catenata</i>	544 / 709	99 / 83	97 / 61	<i>Planktolyngbya limnetica</i> PMC271.06 (GQ859645.1) / <i>Leptolyngbya</i> sp. GSE-PSE30-01B (HM018675.1)
BC 125; 126; 127	<i>G. splendidum</i>	546 / 624	94 / 90	99 / 77	Uncultured Oscillatoriales cyanobacterium clone QB85 (FJ790637.1) / <i>Geitlerinema splendidum</i> P014 (JQ347230.1)
BC 131; 132; 133; 134; 135; 136; 137	<i>G. lemmermannii</i>	545 / 595	94 / 82	100 / 59	Uncultured cyanobacterium clone LPSB71 (FJ901832.1) / <i>Spirulina subsalsa</i> PD2002/gca (AY575935.1)
BC 144; 145; 146	<i>C. stagnale</i>	543 / 491	93 / 91	100 / 51	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7524 (CP003552.1) / <i>Cylindrospermum stagnale</i> PCC 7417 (CP003642.1)

Tabela 4 – Detecção de genes envolvidos na produção de microcistinas (*mcyE*) e saxitoxinas (*sxtA*) e análise de CLAE das cepas isoladas no presente estudo. – = negativo; + = positivo; NT = não testada. *Ph.* = *Phormidium*; *P.* = *Pseudanabaena*

Cód. Ident.	Local	Táxon	Toxinas			
			Genes		CLAE	
			<i>mcyE</i>	<i>sxtA</i>	Microcistinas	Saxitoxinas
BC 102	Mundaú	<i>Microcoleus</i> sp.	–	–	–	NT
BC 103	Mundaú	<i>Microcoleus</i> sp.	–	–	–	–
BC 104	Mundaú	<i>Microcoleus</i> sp.	–	–	–	NT
BC 105	Mundaú	<i>Ph. uncinatum</i>	–	+	NT	GTX1
BC 106	Mundaú	<i>Ph. uncinatum</i>	–	–	–	NT
BC 107	Mundaú	<i>Ph. uncinatum</i>	–	–	NT	NT
BC 108	APA Araripe	<i>Ph. breve</i>	–	–	–	–
BC 109	APA Araripe	<i>Ph. breve</i>	–	–	NT	–
BC 110	APA Araripe	<i>Ph. breve</i>	–	–	NT	NT
BC 111	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	–
BC 112	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	NT
BC 113	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	–	–	–	NT
BC 114	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	–	–
BC 115	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	+	NT	GTX4
BC 116	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	NT
BC 117	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	–	NT
BC 118	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	–
BC 119	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	NT
BC 120	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	NT
BC 121	APA Araripe	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	NT
BC 122	Mundaú	<i>P. catenata</i>	–	–	–	–
BC 123	Mundaú	<i>P. catenata</i>	–	–	–	NT
BC 124	Mundaú	<i>P. catenata</i>	+	–	–	NT
BC 125	APA Araripe	<i>G. splendidum</i>	–	–	NT	–
BC 126	APA Araripe	<i>G. splendidum</i>	–	–	NT	NT
BC 127	APA Araripe	<i>G. splendidum</i>	–	–	NT	NT
BC 128	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	NT
BC 129	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	–	–	NT	–
BC 130	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	–	–	–	NT
BC 131	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	–	+	NT	GTX1

Tabela 4 - Continuação

Cód. Ident.	Local	Táxon	Toxinas			
			Genes		CLAE	
			mcyE	sxtA	Microcistinas	Táxon
BC 132	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	-	-	NT	-
BC 133	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	-	+	NT	-
BC 134	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	-	-	-	NT
BC 135	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	-	+	NT	-
BC 136	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	-	+	NT	-
BC 137	APA Araripe	<i>G. lemmermannii</i>	-	+	NT	-
BC 138	Mundaú	<i>Microcoleus</i> sp.	-	-	NT	NT
BC 139	Mundaú	<i>Microcoleus</i> sp.	-	-	NT	NT
BC 140	Mundaú	<i>Microcoleus</i> sp.	-	-	-	NT
BC 141	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	-	-	-	NT
BC 142	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	-	-	-	-
BC 143	Mundaú	<i>G. amphibium</i>	-	-	-	NT
BC 144	Mundaú	<i>C. stagnale</i>	+	+	-	neoSTX / dc-STX / STX / GTX1
BC 145	Mundaú	<i>C. stagnale</i>	+	+	-	GTX1
BC 146	Mundaú	<i>C. stagnale</i>	+	+	-	-



Figura 2 – Árvore filogenética baseada em seqüências parciais do gene 16S rDNA (550 pb). A árvore foi construída utilizando o método de máxima parcimônia (MP). Valores de Bootstrap >50% estão indicados acima dos nós. L. = linhagem; G. = *Geitlerinema*.

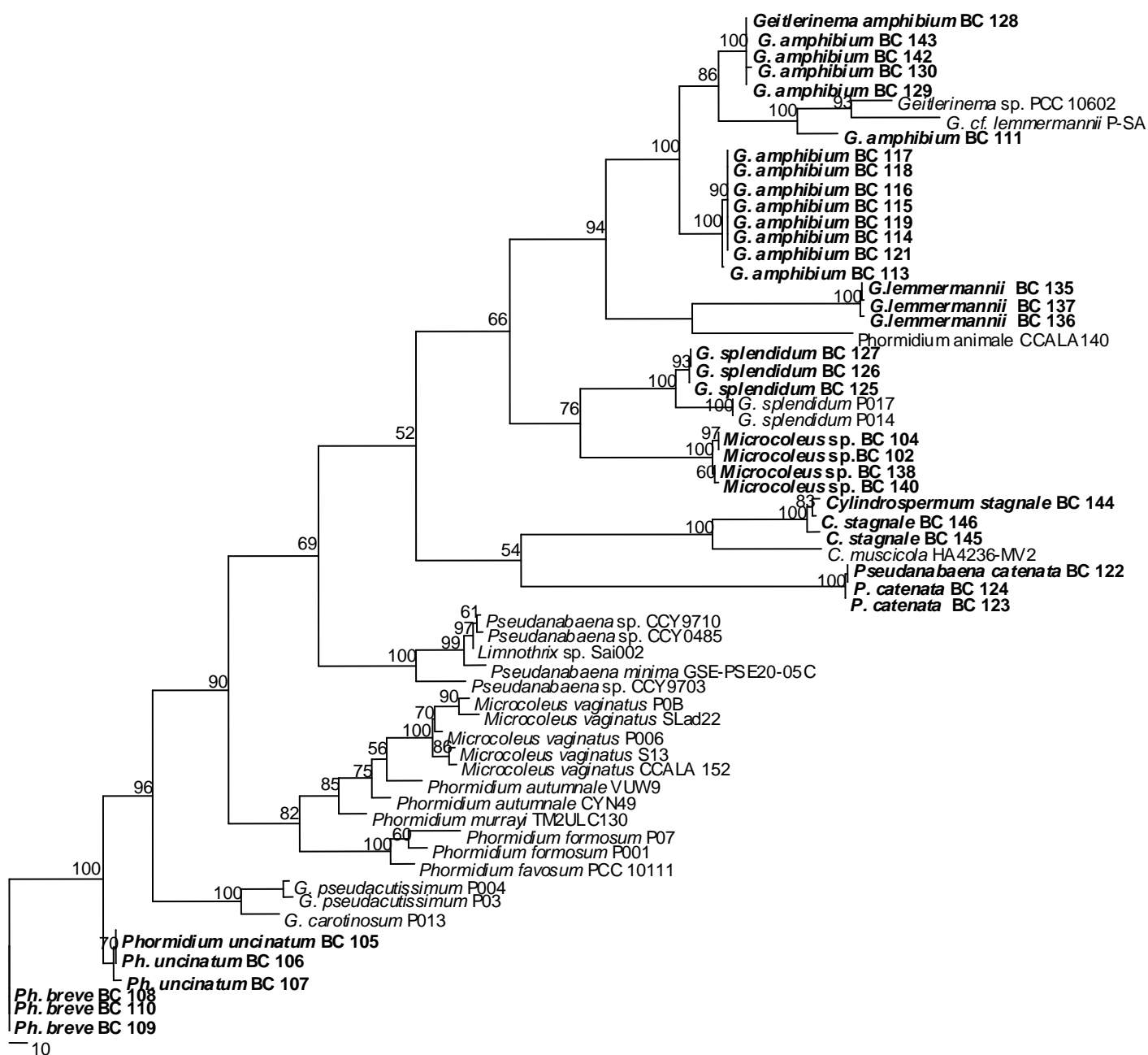


Figura 3 – Árvore filogenética baseada em sequências da região 16S-23S ITS (442 pb). A árvore foi construída utilizando o método de máxima parcimônia (MP). Valores de Bootstrap >50% estão indicados acima dos nós.

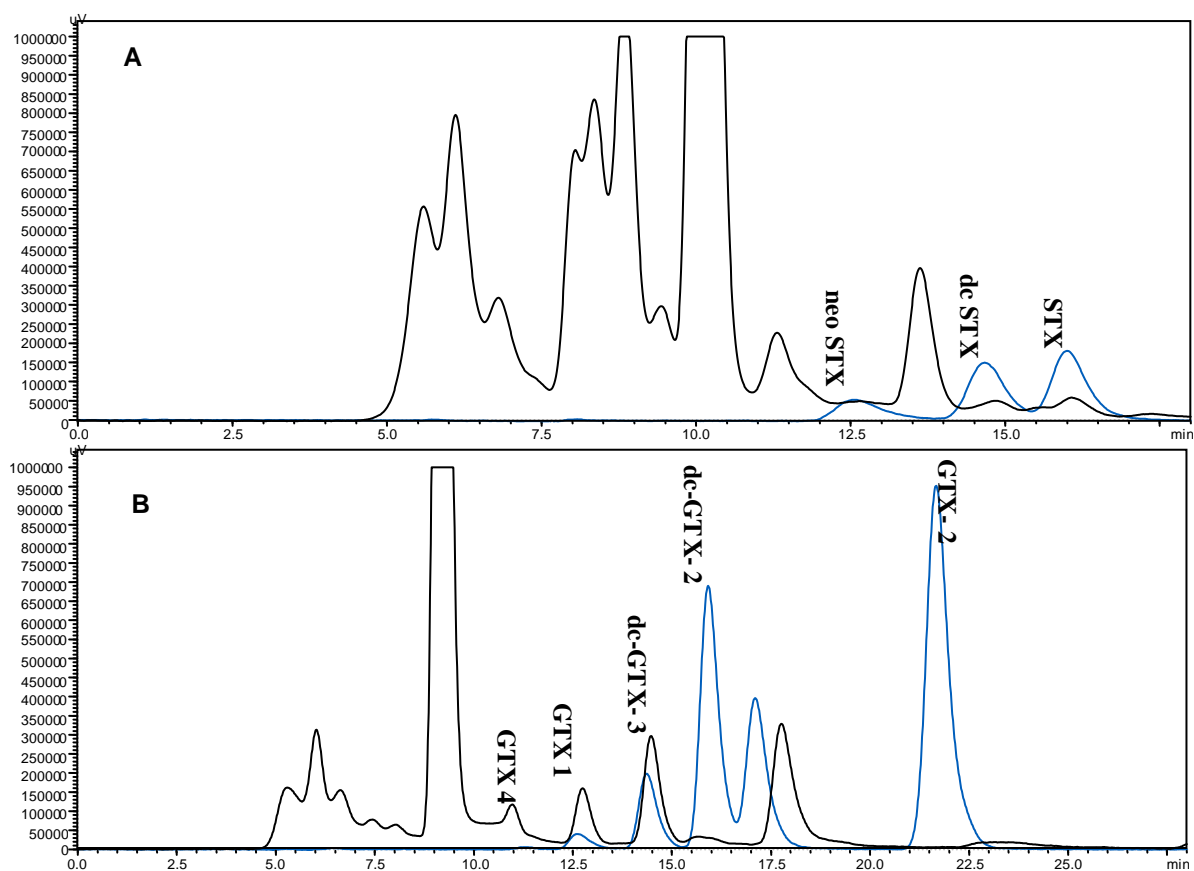


Figura 4 – Cromatograma da análise de saxitoxinas e goniautoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A - presença de neosaxitoxina (neoSTX), decarbamoilsaxitoxina (dc-STX) e saxitoxina (STX), B – presença de goniautoxina 1 (GTX 1) na cepa BC 144 (*Cylindrospermum stagnale*). Linha azul = padrão de saxitoxinas; Linha preta = amostra.

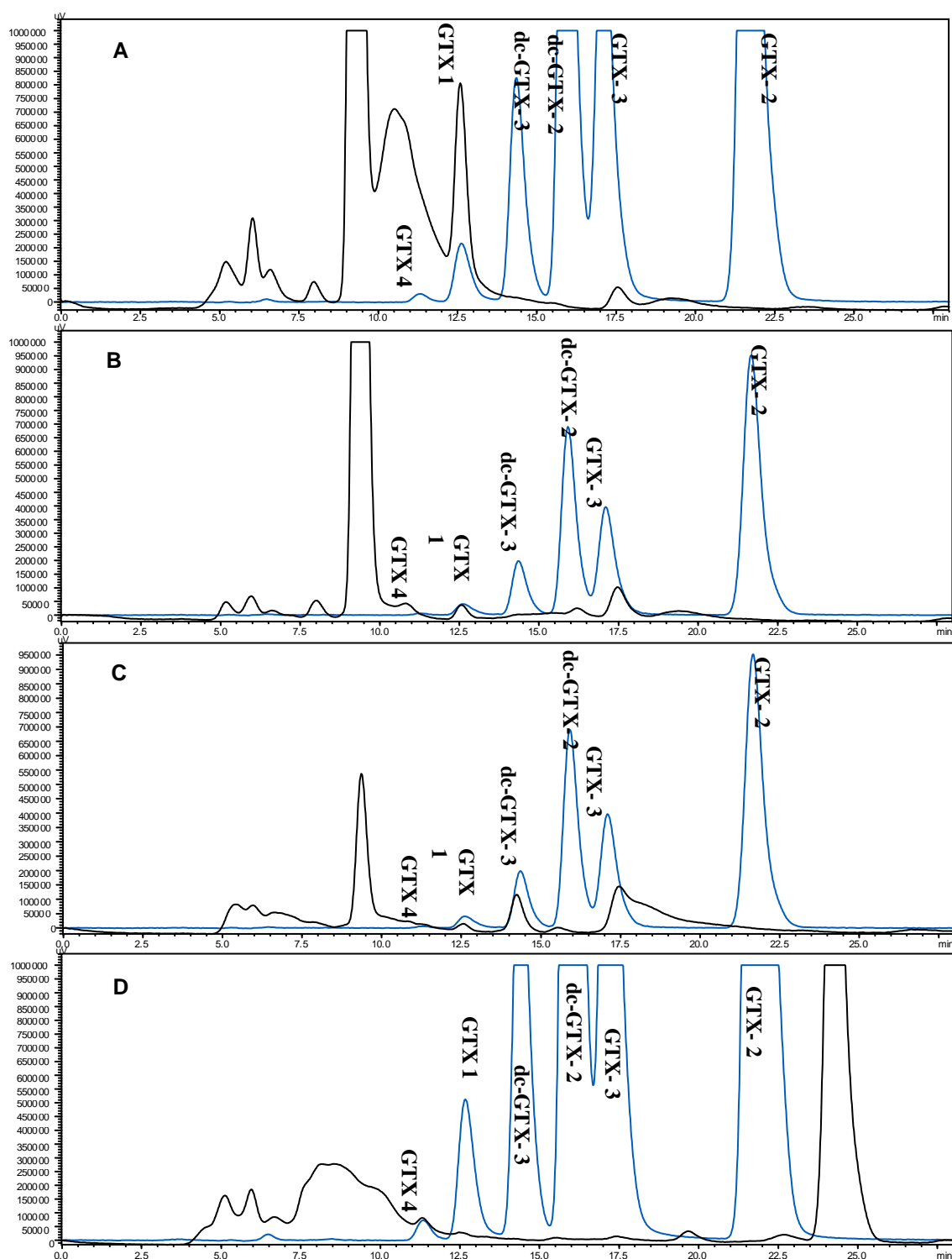


Figura 5 – Cromatograma da análise de goniautoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A, B e C - presença de GTX1 nas cepas BC 105 (*Phormidium uncinatum*), BC 131 (*Geitlerinema lemmermannii*), BC 145 (*C. stagnale*), respectivamente; D – presença de GTX4 na cepa BC 115 (*G. amphibium*). Linha azul = padrão de saxitoxinas; Linha preta = amostra.

ANEXOS

HARMFUL ALGAE

AUDIENCE

. Marine Biologists, Aquaculturalists, Fisheries Biologists, Oceanographers, Ecologists, Environmental Scientists, Chemists, Food Scientists, and Toxicologists.

IMPACT FACTOR

.2011: 3.083 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Original research articles (Regular Articles) Book Reviews *Original research articles* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Ethics in Publishing

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association* (Declaration of Helsinki) for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are

available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language Services

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/haralg/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Page charges

Harmful Algae has no page charges.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>. The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article Structure

Manuscripts should be typewritten with numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered in the upper righthand corner.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text. *Subdivision - numbered sections* Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. 2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is used, with the exception of common domestic animals. 3. The first mention of the scientific names of the species used in the work - in title or text – should be accompanied by the taxonomic authority unless they can all be referred to a general work in which the authorities are given. Scientific names of species referred to in other studies need no authority. Generic names should only be abbreviated when immediately preceded in the text by the mention of the same species or another of the same genus. 4. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. 5. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed. 6. When referring to salinity, please do not use units i.e. no PSU or 0/00. Please use "a salinity of X, or salinity" instead of adding units.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Artwork

Electronic Artwork

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following font in your illustrations: Arial.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- When labelling composite figures, please label as A,B,C, etc. in Arial font, positioned on the upper left corner, on the panel whenever possible. Please do not include any periods, parentheses, etc.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.
- Extra frames and boxes around figures should be eliminated. Please include only X and Y (and Z if applicable) axes. Background lines on figures should only be included when absolutely necessary.
- Legend material and explanations of symbols, etc. should be on the panel, not hanging off to the side of the figure. No frame is necessary. If this material does not fit on the panel, it should be included in the actual figure legend.
- Submitting figures as they are printed from Excel or other spread sheets is not acceptable formatting for publication. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'. **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then

Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition highresolution black and white versions of all the color illustrations. Simply printing color as black and white is not acceptable.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurements should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.
9. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that. . ." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1993, pp. 12-16)".
3. When reference is made to a work by two authors, both names should be given using "and". If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1993a, 1993b, etc. For Volume (Vol.) Bulletin (Bull.), and No., Arabic numerals should be used (not underlined); the full number of pages should be given in the form of pp. 123-128.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*

Jones, H.D., Richards, O.G., Southern, T.A., 1992. Gill dimensions, water pumping and body size in the mussel *Mytilus edulis* I. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155(2), 213-237.
 - b. *For books* Clark, R.B., 1992. Marine pollution, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford.
 - c. *For multi-author books*

Hawkins, A.J.S., Baynes, B.L., 1992. Physiological processes, and the regulation of production. In: Gosling, E. (Ed.), The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier Publishers B.V., Amsterdam, pp. 171-222.
6. The name of the journal should be abbreviated according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*, published by the International Serials Data Systems; Paris, France.
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.