

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL

YOHANNA MAYELLE GOMES

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS
POTENCIALMENTE TÓXICAS E MICROCISTINAS NAS LAGOAS
HIPEREUTRÓFICAS DA REGIÃO DA GRANDE VITÓRIA, ES.

VITÓRIA (ES)

2014

YOHANNA MAYELLE GOMES

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS
POTENCIALMENTE TÓXICAS E MICROCISTINAS NAS LAGOAS
HIPEREUTRÓFICAS DA REGIÃO DA GRANDE VITÓRIA, ES.

Dissertação apresentada ao Programa
de
Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da
Universidade Federal do Espírito Santo, como
requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Ambiental, Área de Concentração:
Saneamento Ambiental.

Orientador: Profª Regina de P.Keller
Co-Orientador: Prof. Sérgio Túlio A. Cassini

VITÓRIA (ES)

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial Tecnológica,

Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Gomes, Yohanna Mayelle, 1989-

G633a Avaliação da presença de cianobactérias potencialmente tóxicas e
microcistinas nas lagoas hipereutróficas da região da Grande Vitória, ES /
Yohanna Mayelle Gomes. – 2014.

92 f. : il.

Orientador: Regina de Pinho Keller.

Coorientador: Sérvio Túlio Cassini.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Lagoas. 2. Cianobactéria. 3. Microcistina. 4. Eutrofização. I. Keller,
Regina de Pinho. II. Cassini, Sérvio Túlio. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV. Título.

CDU: 628



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**“Avaliação da presença de cianobactérias
potencialmente tóxicas e microcistinas nas lagoas
hipereutróficas da região da Grande Vitória - ES”.**

YOHANNA MAYELLE GOMES

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Regina de Pinho Keller
Orientadora – DEA/CT/UFES

Prof. Dr. Sérgio Túlio Cassini
Coorientador – DEA/CT/UFES

Profa. Dra. Edumar Ramos Cabral Coelho
Examinadora Interna – DEA/CT/UFES

Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore
Examinadora Externa – USP

Coordenadora do PPGEA: Profa. Dra. Regina de Pinho Keller

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, ES, 30 de maio de 2014.

Agradecimentos

Durante esses dois anos que se passaram, aprendi muitas coisas, fiz novos amigos e passei por diversas situações que me fizeram amadurecer e crescer pessoalmente e profissionalmente. Agradeço à Deus por todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora Regina Keller, por acreditar no meu potencial e me encorajar nos momentos difíceis, pelos ensinamentos, por ser um exemplo de pesquisadora, pela paciência, dedicação e orientação ao longo destes dois anos.

Ao professor e co-orientador Sérgio Túlio pela oportunidade de trabalhar neste projeto e por sua paciência, disponibilidade e atenção.

À prof^a Marli Fiore e a prof^a Edumar Coelho por, gentilmente, terem aceitado participar da comissão examinadora desta dissertação.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a minha dedicação a este trabalho.

Ao Paulão pelos os ensinamentos, dedicação e por toda colaboração neste trabalho.

À Larissa e a Marcela pela ajuda nos experimentos e por muitas vezes ficarem mais tarde comigo no laboratório.

Aos funcionários Paulo Rosa e Márcia Coutinho pela amizade e ajuda que me ofereceram.

Aos colegas e parceiros do LabSAn: Helenice Torres, Rodrigo Pratte, Sara Angelini, Karol Scarpati, Suzane Loss, Elaine, Cristiane Veronesi, Karol Barros, Lorena, Dariene, Cristiano, Rodrigo Oss, Livia Prate, Mirella, Juliana, Renata, Jairo, Waldileia e Marcus.

Aos amigos, companheiros dos momentos bons e ruins: Romenique, Fernando, Welida, Luciana, Poli, Paola, Bruno, Pablo, André, Simone, Fabiana, Natália Becher, Zé.

A minha família, em especial a minha avó Cleuza e avô Antônio (*in memoria*), mãe, pai e irmã pela pessoa que sou hoje.

Se esqueci de alguém por favor me perdoem! Porque para a minha sorte, vocês são muitos!

A sorte é um aliado dos corajosos!

(Autor desconhecido)

RESUMO

Um dos problemas mais graves relacionados com a eutrofização de corpos hídricos são as florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. O objetivo da pesquisa foi verificar a presença e avaliar o potencial tóxico de cianobactérias em três lagoas localizadas no município da Serra-ES, Brasil. Entre os meses de fevereiro a dezembro de 2013, foram coletadas amostras de água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném. Foram realizadas as análises dos parâmetros de qualidade de água (temperatura, pH, turbidez, DQO, DBO, fósforo, nitrogênio, clorofila a e estado trófico do corpo d'água), a detecção e quantificação das microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a detecção dos genes para expressão de ficocianina e microcistinas por reação em cadeia da polimerase (PCR). Durante todo o estudo estas lagoas apresentaram concentrações superiores a 56 µg/L de clorofila e 50 µg/L de fósforo, sendo então classificadas como ambientes hipereutróficos. Além disso foram encontrados altos níveis de nitrogênio, DBO e DQO indicando um ambiente altamente impactado. As microcistinas estiveram presentes em 56,2% (9/16) das amostras de águas analisadas, sendo que no mês de junho foi detectado concentrações de 8,9 µg/L da variante LR e 18,8 µg/L da variante RR nas lagoas Juara e Jacuném, respectivamente. O gene responsável pela codificação da ficocianina foi detectado em 87,5% (14/16) das amostras de águas e nessas mesmas amostras genes *mcy* foram detectados. Os resultados das análises físico-químicas da água das três lagoas avaliadas e a presença do gene *mcy* indicam condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento de florações de cianobactérias com potencial tóxico. As altas concentrações de microcistinas detectadas nas lagoas oferecem risco à saúde pública.

Palavras chaves: Eutrofização, lagoas, cianobactérias e microcistinas.

ABSTRACT

One of the most relevant issues related to the eutrophication of water bodies is the proliferation of cyanobacterial strains that produce cyanotoxins. The aim of this research was to verify the presence and evaluate the potential toxicity of cyanobacteria in three lakes located in Serra-ES, Brazil. Water samples from Maringá, Juara and Jacuném lakes were collected between February and December 2013. The following analyses were undertaken: water quality parameters (temperature, pH, turbidity, COD, BOD, phosphorus, nitrogen, chlorophyll a and trophic state of the water body); the detection and quantification of microcystin through High-Performance Liquid Chromatography (HPLC); and the detection of genes for the expression of phycocyanin and microcystin through Polymerase Chain Reaction (PCR). Throughout the study these lakes presented concentrations superior to 56 µg/L for chlorophyll and 50 µg/L for phosphorus, being therefore classified as hypereutrophic. Moreover, high levels of nitrogen, COD and BOD were detected, demonstrating that these lakes are being impacted. Microcystins were present in 56,2% (9/16) of the water samples, and in June, concentrations of 8,9 µg/L for the LR variant and 18,8 µg/L for the RR variant were respectively detected in Juara and Jacuném lakes. The gene responsible for the encoding of phycocyanin was detected in 87,5% (14/16) of the water samples, and in these same samples, the gene *mcy* was also detected. The results of the physicochemical analyses of the water samples and the presence of the *mcy* gene indicate that these lakes have favourable conditions for a cyanobacterial bloom with potential toxicity. The high levels of microcystin detected in these lakes poses a risk to public health.

Keywords: Eutrophication, lakes, cyanobacteria e microcystin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das principais cianotoxinas, táxons produtores, toxicidade e órgãos alvos.	26
Tabela 2 – Valor máximo permitido (VMP) dos padrões físico-químicos e biológicos para classes de água doce segundo CONAMA nº 357/2005 (alterada pelas Resoluções nº 410/2009 e 430/2011).	32
Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação da região da ficocianina para detecção de cianobactérias.	45
Tabela 4 – Valor máximo permitido (VMP) dos padrões de nitrogênio orgânico e amoniacal (NTK) para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções nº410/2009 e 430/2011).	55
Tabela 5 – Classificação do nível trófico de acordo índice de Carlson modificado (CETESB).	57
Tabela 6 – Resumo dos resultado das avaliações do índice de estado trófico e classificação das lagoas Maringá, Juara e Jacuném no período de fevereiro a dezembro de 2013.	58
Tabela 7 – Detecção e quantificação de microcistinas nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném no período de fevereiro a dezembro de 2013.	59
Tabela 8 – Presença ou ausência do fragmento genômico detectado com iniciadores para a região de síntese de ficocianina e síntese de microcistina para as regiões mcyB e D.	60
Tabela 9 – Comparações dos valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas detectadas no presente estudo e dados da literatura para a lagoa Maringá (Serra, ES).	61
Tabela 10 – Comparações dos valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas detectadas no presente estudo e dados da literatura para a lagoa Juara (Serra, ES).	62
Tabela 11 – Comparações dos valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas detectadas no presente estudo e dados da literatura para a lagoa Jacuném (Serra, ES).	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lagoa Maringá (Serra, ES) com sua extensão toda coberta por macrófitas.	19
Figura 2 - Área de recreação e turismo na lagoa Juara (Serra, ES).	20
Figura 3 - Lagoa Jacuném (Serra, ES).	20
Figura 4 - Gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas frequentemente encontradas em ecossistemas aquáticos continentais.	24
Figura 5 - Estrutura química da Microcistina e exemplos da composição dos aminoácidos na formação das variantes de microcistinas.	27
Figura 6 – Esquema do grupo de genes <i>mcy</i> responsáveis pela codificação e síntese da microcistina no gênero <i>Microcystis</i> .	28
Figura 7 - Representação esquemática da via de biossíntese da microcistina-LR	29
Figura 8 - Esquema de um sistema de CLAE.	35
Figura 9 – Imagem de satélite das lagoas Maringá (A); Juara (B) e Jacuném (C)	39
Figura 10 – Fluxograma das principais etapas do processamento das amostras de água coletadas.	41
Figura 11 – Monitoramento da temperatura da água superficial (10 cm de profundidade) das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013.	46
Figura 12 - Monitoramento da turbidez das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela do valor máximo permitido (VMP) de turbidez para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005.	48
Figura 13 - Monitoramento da turbidez da lagoa Maringá (Serra, ES) e dados de precipitação acumulada cinco dias anteriores a data de coleta, no período de fevereiro a dezembro de 2013.	49
Figura 14 - Monitoramento da turbidez da lagoa Juara (Serra, ES) e dados de precipitação acumulada cinco dias anteriores a data de coleta, no período de fevereiro a dezembro de 2013.	49
Figura 15 - Monitoramento da turbidez da lagoa Jacuném (Serra, ES) e dados de precipitação acumulada cinco dias anteriores a data de coleta, no período de junho a dezembro de 2013.	49
Figura 16 - Monitoramento do oxigênio dissolvido da água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném Serra,ES no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela do valor máximo permitido (VMP) de oxigênio dissolvido para classes de água doce	50

segundo CONAMA nº357/2005

Figura 17 - Monitoramento do oxigênio dissolvido e o pH da água da lagoa Maringá, (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013. 50

Figura 18 - Monitoramento do oxigênio dissolvido e o pH da água da lagoa Juara (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013. 51

Figura 19 - Monitoramento do oxigênio dissolvido e o pH da água da lagoa Jacuném (Serra, ES) no período de junho a dezembro de 2013. 51

Figura 20 – Monitoramento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) em cinco dias das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela do valor máximo permitido (VMP) de DBO para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005. 52

Figura 21 - – Monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido na água e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) em cinco dias das lagoas Maringá no período de fevereiro a dezembro de 2013. 52

Figura 22 – Monitoramento da demanda química de oxigênio (DQO) das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013. 53

Figura 23 – Relação entre DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (Demanda química de oxigênio) nas amostras de água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném no período de fevereiro a dezembro de 2013. 53

Figura 24 – Monitoramento da concentração de NTK (nitrogênio orgânico e amoniacal) na lagoa Maringá (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013. 54

Figura 25 – Monitoramento da concentração de NTK (nitrogênio orgânico e amoniacal) na lagoa Juara (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013. 55

Figura 26 – Monitoramento da concentração de NTK (nitrogênio orgânico e amoniacal) na lagoa Jacuném (Serra, ES) no período de junho a dezembro de 2013. 55

Figura 27 – Monitoramento do nitrato e nitrito das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013. 56

Figura 28 – Monitoramento da clorofila-*a* das lagoas Maringá, Juara e Jacuném, Serra, ES no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela do valor máximo permitido (VMP) de clorofila *a* para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005. 56

Figura 29– Monitoramento do fósforo orgânico e orto-fosfato nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném, Serra, ES no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela dos valores máximo permitido (VMP) de fósforo para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005. 57

LISTA DE SIGLAS

µg/kg – Micrograma por kilograma

µM – Micro Molar

Adda - Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienólico

Ala – Alanina

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Cla – Clorofila –a

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DGGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação

DQO - Demanda Química de Oxigênio

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ETE – Estação de tratamento de Esgoto

Glu - Ácido glutâmico

IET - Índice de Estado Trófico

LabSan - Laboratório de Saneamento Ambiental

MC – Microcistina

MCs – Microcistinas

Mdha - N-metil-dehidroxi-alanina

MeAsp - Ácido aspártico metilado

MS - Espectroscopia de Massa

ng/L – Nanograma por litro

NRPSs – *Sintases* de peptídeos não ribossômicos

NTK - Nitrogênio Total *Kjeldahl*

ORFs - *Open Reading Frame*

PC – Ficocianina

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

PCRq – PCR quantitativa

PDA - Arranjo de Diodos

pH – Potencial Hidrogeniônico

PKSs – *Sintases* de policetídeos

PT – Fósforo Total

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

TFA - Ácido trifluoroacético

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

uT – Unidade de Turbidez

UV - Ultra Violeta

VMP's - Valores Máximos Permitidos

µg/L – Micrograma por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Situação ambiental dos recursos hídricos no Brasil	17
2.1.1 Lagoas costeiras	18
2.1.1.1 Lagoa Maringá	18
2.1.1.2 Lagoa Juara	19
2.1.1.3 Lagoa Jacuném	20
2.2 Biologia das cianobactérias	21
2.3 Cianotoxinas	25
2.3.1 Microcistinas (MCs)	27
2.4 Legislação: padrões e limites nacionais para cianobactérias e cianotoxinas	31
2.5 Métodos de detecção e quantificação de cianobactérias e cianotoxinas	32
2.5.1 Identificação morfológica	32
2.5.2 Bioensaios	33
2.5.3 Imuno-ensaios (ELISA - <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	33
2.5.4 Inibição da fosfatase	34
2.5.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	34
2.5.6 Reação em cadeia pela polimerase convencional e quantitativa (PCR e PCRq)	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Descrição das áreas de estudo	39
4.2 Coleta das amostras de água	40
4.3 Avaliação dos parâmetros de qualidade de água	41
4.3.1 Parâmetros físico-químicos	41
4.3.2 Índice de Estado Trófico (IET)	42
4.3.3 Precipitação Pluviométrica	42
4.4 Análises de microcistinas	42
4.4.1 Extração de microcistinas	42

4.4.2 Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	43
4.5 Cultivo e manutenção da cepa <i>Microcystis aeruginosa</i>	43
4.6 Detecção gênica de cianobactérias	44
4.6.1 Concentração e eluição das amostras ambientais	44
4.6.2 Extração do material genético	44
4.6.3 PCR (Reação em cadeia pela polimerase)	44
4.6.4 Eletroforese em gel de agarose	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Avaliações dos parâmetros de qualidade de água	47
5.1.1 Temperatura superficial da água	47
5.1.2 Turbidez	48
5.1.3 Oxigênio Dissolvido	50
5.1.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	52
5.1.5 Demanda química de oxigênio e biodegradabilidade	53
5.1.6 Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	54
5.1.7 Nitrato e Nitrito	56
5.1.8 Clorofila- <i>a</i>	56
5.1.9 Fósforo total e orto-fosfato	57
5.1.10 Índice do Estado Trófico (IET)	57
5.2 Análise de microcistinas	59
5.3 Análises de detecção gênica de cianobactérias	60
6 DISCUSSÃO	61
6.1 Parâmetros de qualidade de água	63
6.2 Análise de microcistinas	67
6.3 Detecção gênica de cianobactérias	69
7 CONCLUSÕES	72
8 RECOMENDAÇÕES	73
9 REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O processo de eutrofização antrópica em ambientes de água doce favorece condições ideais para a proliferação de cianobactérias ou algas levando a formação de eventos denominados de florações ou “blooms”. As florações produzem grande impacto negativo nos corpos d’água, pois alteram as características de qualidade, tais como odor e sabor da água e também pela produção de toxinas (BRASIL, 2006).

As florações de cianobactérias são um problema de saúde pública e preocupação ambiental, devido à produção de uma grande variedade de cianotoxinas. Essas cianotoxinas podem provocar efeitos hepatotóxico, neurotóxico e dermatológico, podendo causar a morte (CARMICHAEL *et al.*, 2001). De acordo com dados mundiais a *Microcystis aeruginosa* é a espécie de cianobactéria mais relatada em lagos e reservatórios de água, por produzir uma cianotoxina denominada microcistina (MC) que possui efeito hepatotóxico em mamíferos (HOTTO *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2008; de OLIVEIRA, 2010; MOHEBBI *et al.*, 2012).

Conforme a portaria MS nº 2.914/2011 os reservatórios d’água devem ser monitorados quanto à presença de cianobactérias. Atualmente o monitoramento é realizado pela metodologia contagem de células e identificação por microscopia ótica. O problema destas técnicas é que nem todas as cianobactérias são produtoras de cianotoxinas e que características fenotípicas não definem cepas tóxicas (OLIVEIRA, 2003).

Por outro lado, utilizando-se métodos moleculares de detecção como a PCR é possível detectar os genes que codificam a cianotoxina, sendo assim possível identificar de maneira precoce as florações de cianobactérias tóxicas, permitindo uma ação preventiva para reduzir a exposição do consumidor às cianotoxinas (PEARSON & NEILAN, 2008).

Neste contexto, este estudo visou monitorar a presença de cianobactérias, de genes codificantes de microcistinas nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném, localizadas na região da grande Vitória (Serra), Espírito Santo. Estas lagoas são utilizadas para recreação, turismo, pesca e cultivo de peixes e se contaminadas por cianotoxinas podem representar um risco a saúde da população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Situação ambiental dos recursos hídricos no Brasil

Os recursos hídricos são extremamente importantes para o desenvolvimento sócio econômico. As atividades humanas requerem usos múltiplos destes recursos, tais como; abastecimento público, irrigação, industrial, recreação, aquicultura controle de inundação, receptor de efluentes, paisagístico, valorização imobiliária e turismo. Essas atividades variam de acordo com a população residente do entorno da bacia de contribuição do corpo hídrico (NETTO *et al.*, 2003).

O crescente e desordenado uso de recursos hídricos além de sua capacidade de suporte tem provocado danos na quantidade e qualidade da água. Isso deve-se ao crescimento econômico nos últimos 50 anos no Brasil, que acarretou no êxodo rural, atualmente mais da metade da população brasileira urbana reside em grandes metrópoles (PEREIRA-JÚNIOR, 2004).

O processo de urbanização concentrada e acelerada remove rapidamente a cobertura natural do solo impermeabilizando-o com as construções de edifícios e estradas, acelerando o escoamento superficial das águas. O crescimento das cidades não respeita as áreas de risco, como as encostas de morros e maciços montanhosos, impróprios para moradias, ocasionando a erosão de seus terrenos (PEREIRA-JÚNIOR, 2004). Além disso o saneamento básico não acompanhou o crescimento das cidades. Em 2008, pouco mais da metade dos municípios brasileiros (55,2%) tinham serviço de esgotamento sanitário por rede coletora, e apenas 28,5% dos municípios brasileiros fizeram tratamento de seu esgoto. Mesmo na Região Sudeste, onde 95,1% dos municípios possuíam coleta de esgoto, menos da metade desses (48,4%) o trataram (IBGE, 2010).

Segundo Morelli, (2005) no Brasil a contaminação aumentou cinco vezes nos últimos dez anos e como consequência, os impactos sobre os recursos hídricos afetam diretamente a qualidade de vida das populações. De acordo com o relatório “O estado real da água no Brasil” cerca de 70% das águas de rios, lagos e lagoas se tornaram impróprios ao consumo devido a poluição. Este relatório revela que no ano de 2004 a 2008 a contaminação das águas superficiais cresceu 280% e estima que nos próximos dez anos cerca de 90% dos recursos hídricos estarão poluídos (CNBB apud LOURENÇO, 2008).

2.1.1 Lagoas costeiras

As lagoas costeiras são de fundamental importância, tendo em vista a sua rica biodiversidade, econômica, social e turística para diversos municípios. Entretanto estes ecossistemas são pouco estudados (SCHÄFER et al., 1980; SCHWARZBOLD, 1982; SCHÄFER, 1991) e correm o risco de serem utilizados de forma inadequada (LANZER, 2005). O reduzido reconhecimento econômico dos bens e serviços gerados por tais ecossistemas, principalmente por parte dos gestores e políticos, torna-se uma grave ameaça em decorrência da expansiva degradação a que tais ambientes estão submetidos (BARROSO, 2007).

Além disso as lagoas costeiras possuem como características a estabilidade térmica, a baixa profundidade e são classificadas como ambientes lênticos. Estas condições ambientais submetidas a impactos como despejos de excessivas cargas de nutrientes, favorecem a explosão populacional de microalgas, cianobactérias e macrófitas aquáticas. Ao longo do tempo, este aumento populacional resulta no aumento da matéria orgânica a ser decomposta, redução do oxigênio, redução da diversidade e na mortandade de peixes, perda das características estéticas, do potencial de lazer e formações de florações de cianobactérias, os quais comprometem os diversos usos da água, como abastecimento público (ESTEVES, 1998; NETTO *et al.*, 2003).

A maioria das lagoas do Estado do Espírito Santo são lagoas costeiras. Um grande número destas lagoas situa-se em Linhares, no norte do estado, Maratáizes e Guarapari no sul e na Serra, localizada na região metropolitana.

O estado trófico das lagoas está intimamente relacionado com a ocupação do solo entorno da bacia hidrográfica e os usos do corpo hídrico. Sendo assim, as lagoas localizadas em áreas metropolitanas estão mais sujeitas a eutrofização. Na região da grande Vitória, ES, destacam-se a lagoa artificial Maringá e as lagoas naturais Juara e Jacuném pela sua importância ambiental e econômica para a região.

2.1.1.1 Lagoa Maringá

A lagoa Maringá foi originada a partir do represamento do curso do Córrego Maringá pela construção da Rodovia ES-010 na década de 1970. Esta rodovia propiciou a ocupação do litoral serrano do Espírito Santo. O desenvolvimento urbano da região

gerou como consequência a produção de efluentes domésticos e industriais que passaram a ser lançados inicialmente direto nos cursos d'água que originam o córrego Maringá. No ano de 1983 foi construída uma estação de tratamento de esgoto e o efluente tratado é lançado córrego Maringá, que em seu curso deságua na Lagoa Maringá. Atualmente a estação de tratamento de esgoto atende os bairros: Parque Residencial Laranjeiras II, Residencial Alterosas, Vila Nova de Colares, Colina de Laranjeiras, Aldeia de Laranjeiras e Centro Industrial de Vitória (ANDRADE, 2011). Além de corpo receptor a lagoa Maringá é utilizada por algumas pessoas como área de pesca.



Figura 1 – Lagoa Maringá (Serra, ES) com sua extensão toda coberta por macrófitas

2.1.1.2 Lagoa Juara

No entorno da bacia de contribuição da lagoa Juara possui aproximadamente 77.818 habitantes. Os efluentes de duas estações de tratamento de esgoto são lançados nos córregos contribuintes da lagoa que também recebe grande aporte de esgoto clandestino. Nos últimos 10 anos a lagoa vem sofrendo bastante impacto ambiental devido ao crescimento populacional e assentamento urbano desprovido de planejamento. No ano 2000 a lagoa esteve classificada como oligo-mesotrófica em quase a totalidade de sua extensão, exceto a porção próxima ao córrego laranjeiras, classificada como eutrófica. Já no ano 2009 a lagoa passa a ser classificada como eutrófica a hipereutrófica (LÉLLIS 2006; 2010; LÉLLIS & BARROSO 2013).

O manancial abriga um projeto de piscicultura de criação de tilápias e é realizado através da Associação de Pescadores da Lagoa do Juara. Conta com restaurante onde são servidos pratos à base da tilápia e com a venda de peixes frescos abatidos na hora e

espaço para recreação e turismo (Figura 2). O projeto contempla 30 famílias que sobrevivem com o resultado da criação e pesca da tilápia (PMS, 2009).



Figura 2 – Área de recreação e turismo na lagoa Juara (Serra, ES)

2.1.1.3 Lagoa Jacuném

A lagoa Jacuném (Figura 3) foi utilizada como manancial de abastecimento público até em 1983, ano em que foram desativados os sistemas de captação e tratamento convencional. Desde a década de 1980, este ecossistema sofre impactos ambientais pelo mau uso e ocupação do solo de sua bacia de drenagem. Atualmente, cerca de 10% da extensão da lagoa é ocupada por indústrias e 48% desta situada em área urbana. A lagoa é utilizada para pescaria, recreação e lazer.

O entorno da bacia de contribuição da Lagoa Jacuném possuía uma população de 145.272 habitantes em 2000 (IBGE, 2000), entre 2000 e 2010 a população do município cresceu cerca de 27% (IBGE- censo 2010) resultando em aproximadamente 184.000 pessoas. A lagoa encontra-se em processo de eutrofização artificial devido ao constante aporte de efluentes domésticos e industriais lançados diretamente ou indiretamente por meio de córregos. Os efluentes de sete sistemas de tratamento de esgoto (Maringá, Nova Carapina, Eldorado, Porto Canoa, Mata da Serra, Barcelona e Civit I, sendo que este último trata os efluentes industriais e sanitários do centro industrial) são lançados nos córregos contribuintes da lagoa Jacuném (LEAL 2006, LÉLLIS 2006; DUARTE *et al.*, 2012).



Figura 3 – Lagoa Jacuném (Serra, ES)

2.2 Biologia das cianobactérias

A etimologia da palavra cianobactéria significa bactéria azul, devido a sua coloração. Inicialmente essas bactérias eram classificadas como algas verde-azuladas ou Cyanophyta, devido suas características fotossintéticas. Atualmente esses microorganismos são classificadas como procariontes pertencentes à divisão Cianofíceas e inseridas no reino Eubacteria, que por sua vez pertencem ao domínio Bacteria. São descritos na literatura aproximadamente 150 gêneros cianofíceas com mais de duas mil espécies identificadas, porém estima-se que esse número seja subestimado devido à grande diversidade morfológica e de seus diferentes habitats, necessitando de mais estudos na área (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; CALIJURI *et al.*, 2006).

Esses organismos são bactérias gram-negativas, podendo ser encontrados nas formas unicelulares, coloniais ou filamentosas e é somente conhecida a sua reprodução assexuada (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; CALIJURI *et al.*, 2006; WHITTON & POTTS, 2000; CHURRO *et al.*, 2012; WHITTON & POTTS, 2012). Outra característica morfológica é a ausência de células flageladas em todo o seu estágio de vida (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995). As cianobactérias são altamente diversas e possuem grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Podemos encontrá-las em ambientes de água doce, marinho, solos úmidos, estuários e em ambientes extremos tais como geleiras e desertos ou em simbiose com fungos (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; KOKSHAROVA, 2010).

A diversidade de habitats das cianobactérias pode ser explicada pela tolerância às altas temperaturas, a alta radiação solar (UVB e UVC), a resistência à dessecação e por apresentar adaptações como, por exemplo, células diferenciadas denominadas

heterocistos (capazes de fixar o nitrogênio), acinetos (células de resistência às condições adversas do ambiente) e a camada de mucilagem no entorno da célula (auxilia na fluatibilidade e na retenção de CO₂, quando este se encontra em baixa concentração no ambiente) (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; CALIJURI *et al.*, 2006; WHITTON & POTTS, 2000; 2012).

As cianobactérias apresentam vários pigmentos fotossintéticos, tais como ficobilina, ficocianina, caroteno, xantofila, ficoeritrina, aloficocianina e a clorofila-*a*. Esta diversidade de pigmentos conferem uma maior faixa de absorção de comprimento de onda da luz, o que possibilita maior absorção de energia luminosa, mesmo em ambientes com pouca luminosidade. A eficiência de absorção luminosa confere a estes organismos maiores competitividade e vantagens de colonização em diferentes habitats (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995).

A maioria das espécies de cianobactérias possui melhor desenvolvimento em águas neutro-alcalinas (faixa de pH entre 6 e 9), temperaturas entre 15 e 30°C e águas com alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (CALIJURI *et al.*, 2006). As cianobactérias de água doce quando encontram um ambiente rico em nutrientes podem apresentar uma explosão de crescimento populacional denominado floração (PAERL *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012), que é caracterizado pelo intenso crescimento de células de uma ou várias espécies de algas, bem como de cianobactérias potencialmente tóxicas que ocorrem na coluna da água (CHORUS e BARTRAM, 1999).

As florações acontecem em corpos d'água que apresentam alto grau de eutrofização. A eutrofização pode acontecer por modo natural ou antrópico. A eutrofização é um processo natural, lento e essencial para a manutenção da vida aquática. Este processo ocorre através do enriquecimento dos ecossistemas aquáticos continentais e marinhos, principalmente por nitrogênio e fósforo, que são despejados de forma dissolvida ou particulada em lagos, represas e rios, sendo então assimilados pelo metabolismo dos vegetais (ESTEVES, 1998). Porém, as atividades antrópicas como a utilização de fertilizantes químicos e pesticida na agricultura e os lançamentos de efluentes domésticos e industriais nos corpos d'água aceleram o processo de eutrofização dos corpos d'água e assim contribuem para o fenômeno de florações (BRANDÃO & DOMINGOS, 2006; SMITH & SCHINDLER, 2009). Outros fatores como alterações aos fluxos naturais em sistemas fluviais e o aquecimento global podem ser responsáveis

pelo aumento na frequência e intensidade de florações de cianobactérias (ELLIOT, 2012; CATHERINE *et al.*, 2013).

Whitton & Potts (2012) sugerem que a maior eficiência no controle de florações está relacionada com disponibilidade de fósforo em detrimento ao nitrogênio. Devido a habilidade dos organismos assimilarem o nitrogênio atmosférico e que todo o fósforo disponível nos corpos d'água está associado a atividades antrópicas. Outro fator ambiental importante na floração são as altas temperaturas, pois influenciam diretamente no processo metabólico relacionado à fotossíntese e outras vias biossintéticas (COLE & JONES, 2000).

As florações provocam alterações das propriedades organolépticas e estéticas da água, alterações ecológicas, explosão populacional de poucas espécies, diminuição da zona luminosa, decréscimo na concentração de oxigênio, mortandade de muitos organismos, produção de mau cheiro devido à decomposição de organismo (CALIJURI *et al.*, 2006). Além de todos esses malefícios da floração, ainda existe a potencialidade de cianobactérias produzirem cianotoxinas (OLIVEIRA, 2003).

As cianotoxinas são produzidas através do metabolismo secundário das cianobactérias. Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo que o produziu. Porém nem todas as cianobactérias produzem cianotoxinas (CARMICHAEL, 1992; OLIVEIRA, 2003).

Existem cerca de 40 gêneros de cianobactérias descritos como produtores de cianotoxinas nocivas, podendo este número estar subestimado mediante dificuldades relacionadas à identificação taxonômica (VAN DEN HOEK *et al.*, 1995; CARMICHAEL, 2008). Os principais gêneros tóxicos descritos são: *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Coelosphaerium*, *Gomphosphaeria*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Schizothrix*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Aphanizomenon*, *Hormothamnion*, *Gleotrichia* (Figura 4) e *Fischerella* (FUNASA, 2003; FIORE *et al.*, 2009).

As florações de cianobactérias nem sempre são compostas de espécies tóxicas, contudo, estudos têm demonstrado que 35 a 70% das florações de cianobactérias são constituídos por espécies tóxicas (SIVONEN *et al.*, 1990; YOO *et al.*, 1995; YOSHIDA *et al.*,

2007). Com isso, é possível encontrar indivíduos produtores e não produtores de cianotoxinas em uma mesma população (OLIVEIRA, 2003).

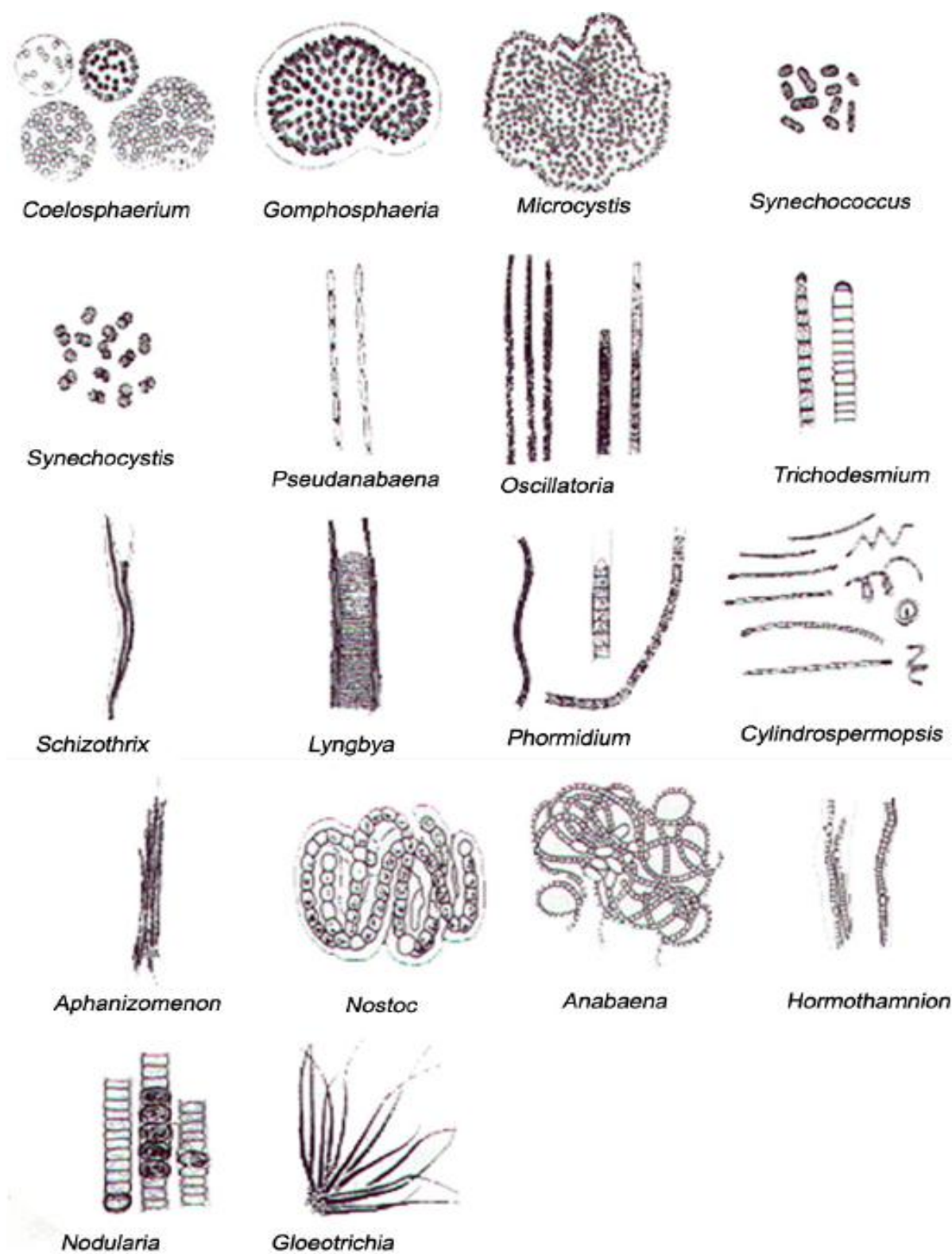


Figura 4 - Gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas frequentemente encontradas em ecossistemas aquáticos continentais. Fonte: FUNASA, 2003

2.3 Cianotoxinas

A cianotoxina é uma endotoxina cujo o mecanismo de liberação para o meio externo ainda não foi elucidado. Sabe-se que a liberação das cianotoxinas pode ocorrer por lise celular provocada por senescência celular ou por uso de algicidas. Discute-se que mudanças na permeabilidade na membrana celular possam ser responsáveis pela liberação da toxina no ambiente (CYBIS *et al.*, 2006). As espécies produtoras de cianotoxinas podem produzi-las em todos os estágios do ciclo celular e/ou em certas condições ecofisiológicas não muito bem conhecidas (MOLICA & AZEVEDO, 2009).

As causas da produção das cianotoxinas não são totalmente conhecidas e esta produção pode estar relacionada à defesa contra herbívoros (IZYDORCZYK *et al.*, 2008) ou a comunicação entre as cianobactérias (DITTMANN *et al.*, 2001; CHU *et al.*, 2010).

De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos bioquímicos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. Entretanto, por suas ações farmacológicas em mamíferos as cianotoxinas são classificadas como hepatotoxina, citotoxina, dermatoxina e neurotoxina (CHURRO *et al.*, 2013) (Tabela 1).

Das cianotoxinas, a hepatotoxina é a causa mais comum de intoxicação, podendo causar morte num intervalo de poucas horas a poucos dias, sendo a microcistina de maior prevalência de contaminação dos recursos hídricos e de intoxicação de humanos e animais (FUNASA, 2003).

Tabela 1 – Classificação das principais cianotoxinas, táxons produtores, toxicidade e órgãos alvos.

Toxina	Táxon produtor	Alvo primário em mamíferos	Mecanismo de ação
Hepatotoxina			
Microcistina (MC) ~ 80 variantes Heptapeptídeo cíclico	<i>Microcystis spp.</i> <i>Planktothrix spp.</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Nostoc</i> <i>Anabaena spp.</i> <i>Anabaenopsis</i> <i>Hapalosiphon</i> <i>Snowella</i> <i>Woronichinia</i> <i>Aphanocapsa</i>	Fígado	Inibe a serina / treonina, proteína fosfatase tipo 1 e tipo 2A e induz o estresse oxidativo levando a cascata de eventos reponsáveis pelos efeitos citotóxicos e genotóxicos em células animais.
Nodularina 9 variantes Heptapeptídeo cíclico	<i>Nodularia spumigena</i>	Fígado	Similar a MC
Citotoxina			
Cilindropermopsina 3 variantes Pentapeptídeo cíclico	<i>C. raciborskii</i> <i>Umezakia natans</i> <i>Aph. ovalisporum</i> <i>Raphidiopsis curvata</i> <i>Anabaena bergii</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Lyngbya</i>	Fígado, rins, pulmões e coração	Inibição da glutamina, síntese protéica e do citocromo P450
Dermatotoxina			
Aplysiatoxina Bis-lactona fenólica	<i>Lyngbia</i> <i>Planktothrix</i> <i>Schizothrix</i>	Pele	Agente inflamatório, ativador da proteína quinase C
Debromoaplysiatoxin Bis-lactona fenólica	<i>Lyngbia</i>	Pele	Similar a Aplysiatoxina
Lyngbiatoxin-A alcaloide	<i>Lyngbia</i>	Pele	Similar a Aplysiatoxina
Neurotoxina			
Anatoxina-a 5 variantes Tropona-relacionada-alcalóide	<i>Anabaenna spp.</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Cylindrospermum</i> <i>Microcystis</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>Planktothrix</i> <i>Planktothrix</i> <i>Oscillatoria</i> <i>Anabaena</i> <i>Raphidiopsis</i> <i>Phormidium</i>	Junção neuromuscular pós-sináptica	Antagonismo do receptor de acetilcolina nicotínico neuronal e muscular
Homoanatoxina-a Alcaloide	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i>	Junção neuromuscular pós-sináptica	Similar a Anatoxina-a
Anatoxina-a(s) Ester fosfatase metil guanidina	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i>	Junção neuromuscular pós-sináptica	Inibição irreversível da acetilcolinesterase
Saxitoxina 20 variantes alcalóide carbonada	<i>Anabaena</i> <i>Aphanizomenon</i> <i>C. raciborskii</i> <i>Lyngbya</i> <i>Planktothrix</i>	Axônio	Bloqueio do canal de sódio ou cálcio das membranas dos axônios

Fonte: CHURRO *et al.* (2013).

2.3.1 Microcistinas (MCs)

As MCs compreendem o grupo mais diversos de cianotoxinas, apresentando mais de 90 isoformas diferentes segundo o grau de metilação, hidroxilação, epimerização, sequência peptídica e toxicidade (PEARSON *et al.*, 2010). A maioria das MCs são composta por sete aminoácidos e constituem uma fórmula estrutural geral [ciclo (-D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha-)], onde os resíduos de D-aminoácidos, alanina (Ala), ácido aspártico metilado (MeAsp) e ácido glutâmico (Glu), se intercalam com os aminoácidos incomuns N-metil-dehidroxi-alanina (Mdha) e Ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-dienóico (Adda). Nas posições 2 e 4 da estrutura cíclica, ainda são encontrados os resíduos de L-aminoácidos variáveis (Xaa e Zaa), principais responsáveis pela nomenclatura das MCs (Figura 5) (CARMICHAEL *et al.*, 1988).

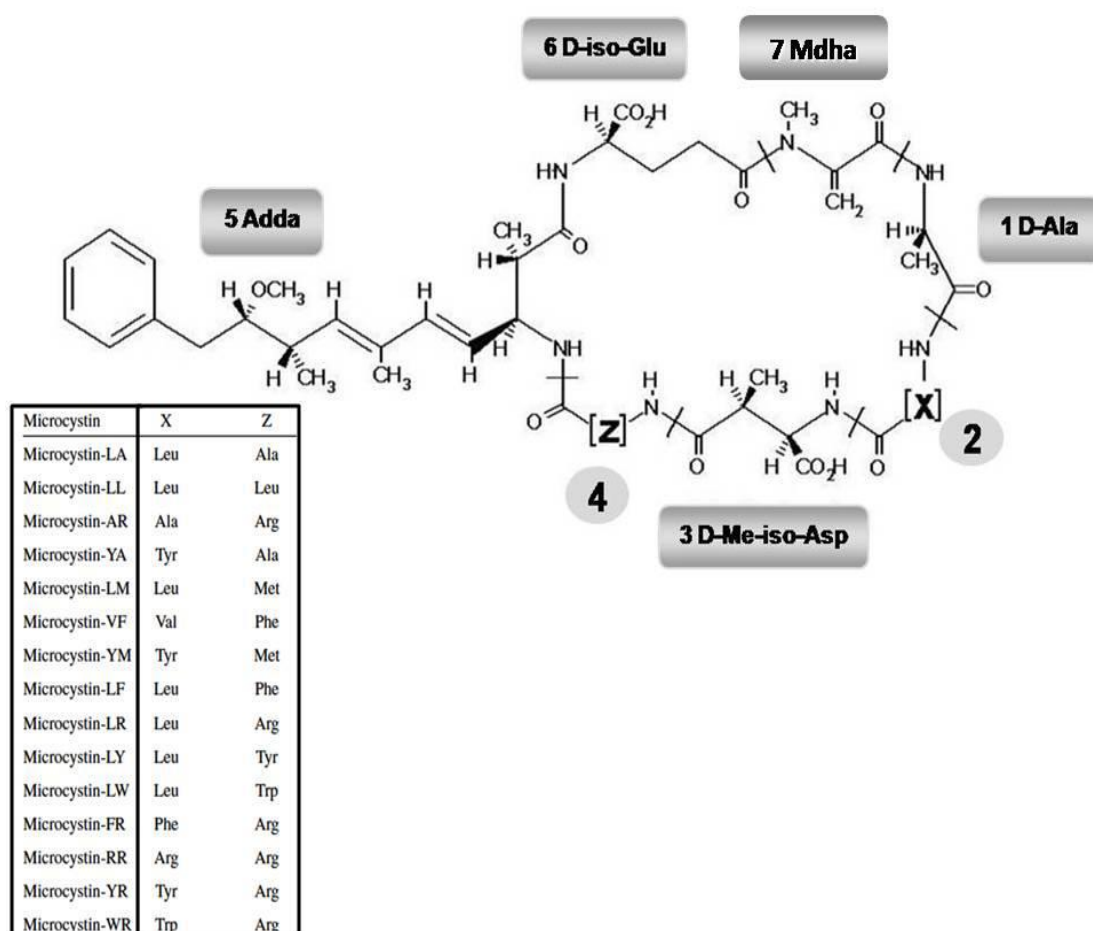


Figura 5 - Estrutura química da Microcistina e exemplos da composição dos aminoácidos na formação das variantes de microcistinas. As letras X e Z são dois aminoácidos variáveis.

Fonte: Sivonen e Jones (1999) e Silva-Stenico *et al.* (2009) modificado.

O agrupamento gênico responsável pela síntese da microcistina é o *mcy*, composto por seis quadros de leitura aberta (ORFs - *open reading frame*) (*mcyA-E* e *G*) e quatro ORFs pequenas (*mcyF* e *H-J*) encontrados no cromossoma da cianobactéria. As ORFs são regiões dentro do genoma que possuem sequências de bases nitrogenadas necessárias para a codificação de proteínas. Este agrupamento contém 55 kb de codificação de DNA. A MC é sintetizada por uma via metabólica não ribossômica onde participam as enzimas NRPSs e PKSs (TILLET *et al.*, 2000).

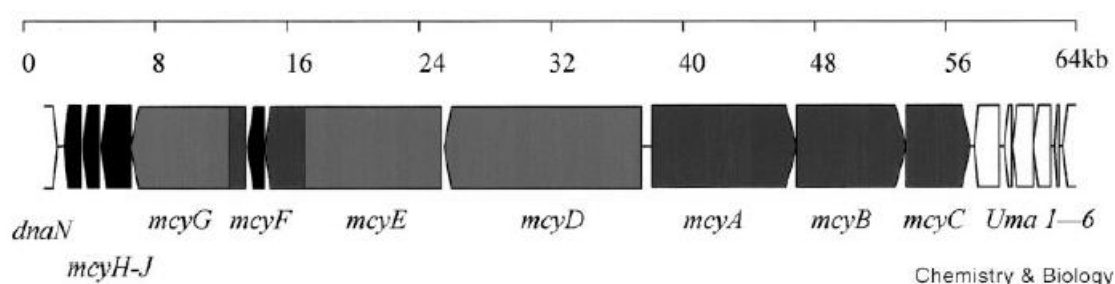


Figura 6 – Esquema do grupo de genes *mcy* responsáveis pela codificação e síntese da microcistina no gênero *Microcystis*.

Fonte: TILLET *et al.*, 2000

O conjunto de genes responsáveis pela produção de MCs pode ser agrupado em dois operons. Um maior, composto pelos genes *mcyD* – *J*, responsável por catalisar a formação do derivado s-aminoácido Adda e o liga ao D-glutamato, enquanto que o menor, composto pelos genes *mcyA-C*, codificam módulos de NRPS que faz a extensão deste intermediário dipeptídeo para o heptapeptídeo e subsequente ciclização. O processo de síntese da MC-LR pode ser visualizado na figura 7 (TILLET *et al.*, 2000).

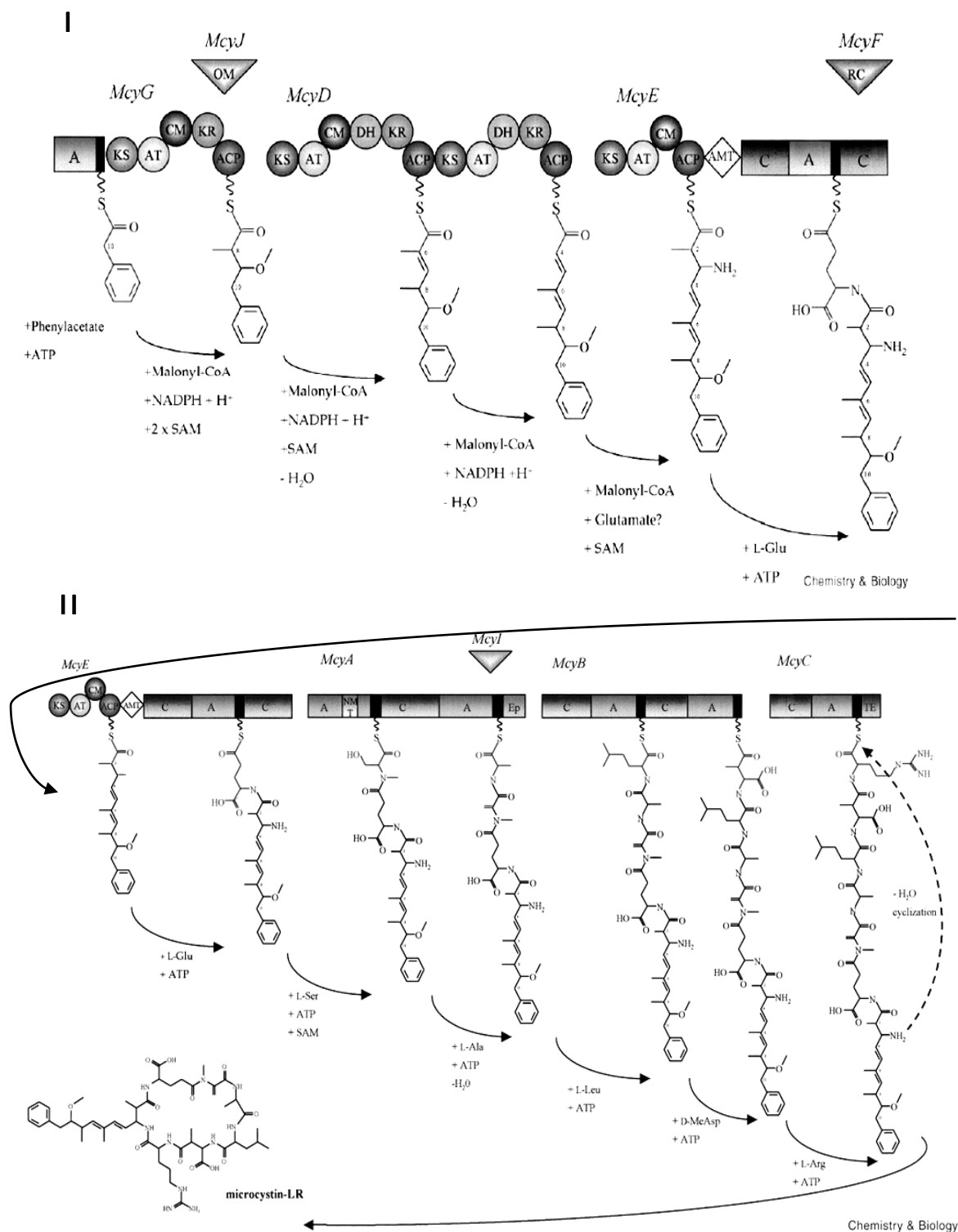


Figura 7 - Representação esquemática da via de biossíntese da microcistina-LR

Legenda: I - Modelo para a formação da porção Adda das microcistinas. Prevê as estruturas dos genes *mcyG*, *D* e *E*. O círculo representa uma PKS; Retângulo: NRPS; Losango: domínio putativo da aminotransferase. O *mcyJ* e *F*: enzimas de “costura” demonstrados em triângulos invertidos. II - Modelo Biosintético para formação de microcistina –LR. Prevê as estrutura dos genes de *mcyE*, *A*, *B* e *C*. O *mcyI*: enzima de “costura” demonstrado em triângulo invertido. KS: L- cetoacil sintase; AT: aciltransferase; ACP: acil proteína transportadora; KR: cetoacil redutase; DH: desidratase; CM: C-metiltransferase; OM: O- metiltransferase; A: adenilação

aminoacil; C: condensação; AMT: aminotransferase; RC: racemase; NM: N-metiltransferase; Ep: epimerização; TE: tioesterase; LZ- Adda, L-glutamato , L-metilserina , D -alanina, L-leucina, D -metil- aspartato, L-arginina, a ciclização.

Tem sido relatado que as microcistinas no ambiente podem persistir por tempo relativamente longo, que varia entre 1 a 3 meses, podendo chegar a até seis meses (ZEGURA *et al.*, 2011). Além disso, as microcistinas podem sofrer o processo de biomagnificação ao longo da cadeia trófica. Estudos indicam a contaminação de invertebrados aquáticos e peixes por toxinas, provocando a morte desses organismos e/ou prejudicando a vida aquática (FERRÃO-FILHO & KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011). É discutido o potencial risco de bioamagnificação por plantas, através de águas de irrigação contaminadas por MCs (APELDOORN *et al.*, 2007; SAQRANE & OUDRA, 2009, 2011).

As microcistinas são hidrofílicas e penetram no interior das células do fígado através do sistema de transporte multi-específico para ácidos biliares, que foi descoberto através de bioensaios em camundongos e assim são tradicionalmente consideradas como hepatotoxinas. Tem como ação a inibição das enzimas fosfatase tipo 1 e tipo 2A (RUNNEGAR *et al.*, 1981). Atualmente sabe-se que as MCs podem afetar outros órgãos, como intestino, rim e o cérebro através do transportador ânion orgânico polipeptídico presente na membrana celular de diversas células (FISCHER *et al.*, 2005).

A contaminação por MC pode provocar diversos sintomas: dor abdominal, vômitos, diarreia, inflamação do fígado, hemorragia, pneumonia aguda, dermatite aguda e danos nos rins (EPA, 2012). Além disso, as MCs apresentam potencial carcinogênico devido à atividade de inibição de proteínas fosfatases, o que leva a hiperfosforilação das proteínas celulares, que pode ser associado como promotor de tumores. Podem também induzir o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e em consequência provocar danos oxidativos ao DNA. Existe evidência de que as MCs podem induzir a formação de micronúcleos e interferir no mecanismo eucariótico de reparação ao DNA. Em 2010, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer classificou MC-LR possível carcinógeno humano (ZEGURA *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos têm indicado uma associação entre o aumento da incidência de câncer do fígado e do cólon com o consumo de água potável de fontes potencialmente contaminadas por MCs (ZHOU *et al.*, 2002; SVIRČEV *et al.*, 2009). Ainda, mesmo em baixas concentrações,

as toxinas podem apresentar risco à saúde humana, pois sua exposição crônica através do consumo de água e alimentos contaminados pode causar efeito carcinogênico (ZEGURA *et al.*, 2011).

2.4 Legislação: padrões e limites nacionais para cianobactérias e cianotoxinas

Em 2011 foi criada a Portaria MS nº 2.914 que estabelece padrões para a qualidade de águas de consumo humano. Esta portaria estabelece o monitoramento de cianotoxinas de acordo com a densidade de cianobactérias encontradas nos mananciais. Quando a densidade for maior ou igual a 20.000 células/mL o monitoramento de cianotoxinas deve ser semanal e quando essa densidade for menor a análise deve ter frequência mensal. Também é recomendado a análise semanal de clorofila-*a* no manancial, como indicador de potencial aumento da densidade de cianobactérias. Se a concentração de clorofila-*a* em duas semanas consecutivas tiver seu valor duplicado ou mais, deve-se proceder nova coleta de amostra para quantificação de cianobactérias no ponto de captação do manancial, para reavaliação da frequência de amostragem de cianobactérias.

Os valores máximos permitidos (VMP's) de cianotoxinas estabelecidos pela portaria MS 2.914/2011 leva em consideração os efeitos agudos das toxinas na água potável e não leva em consideração os efeitos crônicos e carcinogênicos destas toxinas (ZEGURA *et al.*, 2011). Os VMP's são de 1 µg/L, 1 µg/L e 3 µg/L para as cianotoxinas microcistinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas, respectivamente. Quando as concentrações de cianotoxinas no manancial forem menores que seus respectivos VMPs, será dispensada a análise de cianotoxinas na saída do tratamento. Além disso, o uso de algicidas é vedado em reservatórios de abastecimento d'água.

No Brasil as condições de balneabilidade são normatizadas pela Resolução CONAMA nº 274 de 29 de novembro 2000, que estabelece restrições à recreação de contato primário em corpos hídricos que apresentam ocorrência de florações e considera passível de interdição pelos órgãos de controle ambiental trechos dos corpos d'água em que ocorra toxicidade ou formação de espuma decorrente de florações de algas. Esta resolução não estabelece VMP para parâmetros de clorofila ou de cianotoxinas.

A Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), estabelece a classificação, enquadramento dos corpos d'água e os valores máximos permitidos de clorofila-*a* e células de cianobactérias nas diferentes classes de uso dos corpos d'água. Também determina condições e padrões para parâmetros físicos, químicos e microbiológicos de lançamentos de efluentes. A resolução CONAMA 430, de maio de 2011, dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes que complementa e altera parcialmente a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (Tabela 2).

Tabela 2 – Valor máximo permitido (VMP) dos padrões físico-químicos e biológicos para classes de água doce segundo CONAMA nº 357/2005 (alterada pelas Resoluções nº 410/2009 e 430/2011).

Parâmetro/Variável	Valor Máximo Permitido (VMP) – Água Doce			
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
DBO ₅ (mg/L)	3	5	10	-
Turbidez (UNT)	40	100	100	-
pH	6 – 9	6 – 9	6 – 9	6-9
Fósforo total (mg/L)	0,02	0,03	0,05	-
Nitrato (mg/L)	10	10	10	-
Nitrito (mg/L)	1	1	1	-
Nitrogênio kjeldahl total-NTK (mg/L)	pH ≤ 7,5 = 3,7	pH ≤ 7,5 = 3,7	pH ≤ 7,5 = 13,3	-
	7,5 < pH ≤ 8 = 2	7,5 < pH ≤ 8 = 2	7,5 < pH ≤ 8 = 5,6	
	8 < pH ≤ 8,5 = 1	8 < pH ≤ 8,5 = 1	8 < pH ≤ 8,5 = 2,2	
	pH ≥ 8,5 = 0,5	pH ≥ 8,5 = 0,5	pH ≥ 8,5 = 1	
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	≥ 6	≥ 5	≥ 4	>2
Clorofila- <i>a</i> (µg/L)	10	30	60	-
Densidade de cianobactérias (cél/mL)	≤ 20.000	≤ 50.000	≤ 100.000	-

2.5 Métodos de detecção e quantificação de cianobactérias e cianotoxinas

As principais metodologias de detecção e quantificação de cianobactérias e cianotoxinas, em amostras de águas incluem a identificação morfológica, bioensaios, imuno-ensaios (ELISA), inibição da fosfatase, cromatografia líquida (HPLC), reação em cadeia pela polimerase convencional e quantitativa (PCR e PCRq) (DITTMANN *et al.*, 2013).

2.5.1 Identificação morfológica

A identificação microscópica e contagem de células é uma técnica básica para o monitoramento de florações de cianobactérias e é uma metodologia de baixo custo que pode ser utilizada como triagem das amostras para métodos de quantificação de MCs. Porém as cianobactérias apresentam grande variabilidade morfológica que dificulta sua identificação e necessita de profissional qualificado para realização da análise. Esta técnica não fornece informações detalhadas sobre a composição das espécies e não indica toxicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2001; CALIJURI *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

2.5.2 Bioensaios

Os primeiros testes de toxicidade de cianotoxinas foram realizados em camundongos e também podem ser utilizados para detecção. O método possui baixo custo e simples diagnóstico. Possui como desvantagem a baixa especificidade e precisão, sendo o limite de detecção 25–150 µg/kg (camundongo). Devido a questões éticas em relação aos experimentos com animais e o desenvolvimento de novos métodos de detecção com maior sensibilidade e especificidade, o uso de bioensaio é limitado à pesquisa toxicológica. Bioensaios com outros organismos tem sido desenvolvido, como *Daphnia sp*, *Drosophila melanogaster*, larvas de mosquito e camarões (*Artemia salina*), no entanto não apresentam especificidade e necessitam de mais estudos (MCELHINEY & LAWTON, 2005; SANGOLKAR *et al.*, 2006; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2011; MEREL *et al.*, 2013).

2.5.3 Imuno-ensaios (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

O método baseia-se no uso de ensaios imunológicos com anticorpos mono ou policlonais que reconhecem e ligam-se à toxina. Apresenta como vantagens a alta sensibilidade e pode atingir um limite de detecção tão baixo como 4 ng/L, com limite de quantificação (devido à saturação) próximo a 2 µg/L de MC-LR. Atualmente existem vários kits comerciais de detecção de cianotoxinas por ELISA. Esses kits são de fácil manuseio, requerem o mínimo de processamento da amostra e possibilitam a análise de um grande número de amostras por kit utilizado. A desvantagem do método está em isolar anticorpos específicos à toxina, o alto custo de cada kit e requer equipamento

específico de leitura dos resultados (CALIJURI *et al.*, 2006; SANGOLKAR *et al.*, 2006; MEREL *et al.*, 2013).

Foram verificadas interferências de outros componentes da amostra no reconhecimento do anticorpo com a toxina, possibilitando falsos positivos e falsos negativos. Ainda, a possibilidade de reações cruzadas entre variedades de MCs têm colocado algumas restrições no uso destes kits. A detecção baseada na estrutura química das microcistinas faz com que os ensaios de ELISA apresentem baixa correlação entre a reatividade e a toxicidade aguda da amostra, pois detectam tanto a forma ativa, quanto a inativa da toxina (RAPALA *et al.*, 2002; CALIJURI *et al.*, 2006; SANGOLKAR *et al.*, 2006; TRIANTIS *et al.*, 2010).

2.5.4 Inibição da Fosfatase

As enzimas fosfatases catalisam a liberação de grupos fosfatos de substratos fosforilados e a inibição desta reação pela MC, pode ser utilizada como indicador primário de presença/ausência nas análises de qualidade de águas, ou ainda, em ensaios de quantificação (MCELHINEY & LAWTON, 2005).

A mensuração da toxina pode ser realizada pelo método fluorescente (baseado em técnicas de radioisótopos ³²P e substratos radiomarcados) ou colorimétrico (com base em substratos, tais como fosfato de p- nitrofenilo) (MEREL *et al.*, 2013). A concentração de MCs no ensaio enzimático é inversamente proporcional à concentração do grupo fosfato liberado pela reação entre a enzima fosfatase e o substrato sintético (MCELHINEY & LAWTON, 2005).

O método apresenta como vantagens o baixo custo e a facilidade de obtenção do resultado apresentando alta sensibilidade e também indica o potencial toxicológico. Porém não é um método capaz de identificar variantes de MCs (MCELHINEY & LAWTON, 2005; MSAGATI *et al.*, 2006; MEREL *et al.*, 2013).

2.5.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser utilizado para detectar, quantificar, purificar e isolar algumas cianotoxinas e é amplamente utilizado

na detecção das MCs. O método consiste na separação da toxina por polaridade em um sistema utilizando uma coluna C18 em um gradiente de concentração de acetonitrilo e água acidificado com ácido trifluoroacético (TFA) ou ácido fórmico. De acordo com a polaridade, as MCs vão sendo retidas na coluna e o tempo necessário do desprendimento da toxina da coluna denomina-se tempo de retenção. Após a separação das substâncias pela coluna é feita a detecção da toxina através dos leitores de ultra violeta (UV), arranjo de diodos (PDA – Photodiode Array) ou espectroscopia de massa (MS) (Figura 8) (NICHOLSON e BURCH, 2001; MCELHINEY & LAWTON, 2005; MSAGATI *et al.*, 2006; MEREL *et al.*, 2013).

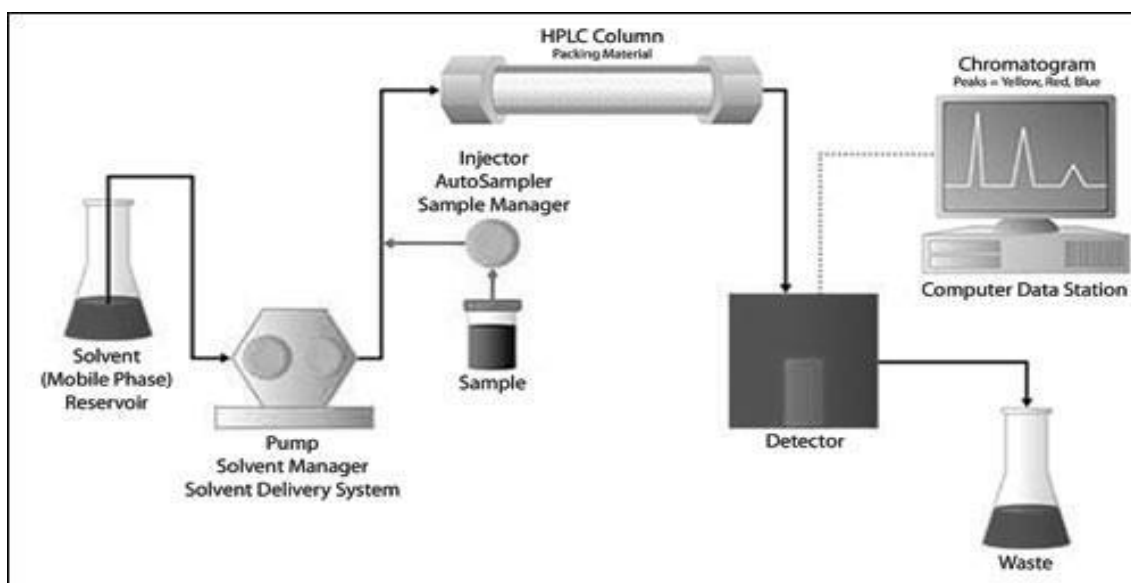


Figura 8 - Esquema de um sistema de CLAE. Uma bomba de alta pressão proporciona um fluxo constante de fase móvel, tipicamente acetonitrila em água, para a coluna de CLAE. Uma alíquota da amostra a ser analisada é injetada neste fluxo. Na saída da coluna, os componentes separados da amostra são detectados e aparecem como picos na cromatograma.

O método possui como vantagem a alta especificidade do resultado. Entretanto apresenta como desvantagens a necessidade de concentração das amostras antes do processamento em CLAE, um operador qualificado para as análises e de padrões de toxinas. Sabe-se que existem mais de 80 variantes de microcistinas e não há padrões para todas (CALIJURI *et al.*, 2006; KHREICH *et al.*, 2009).

2.5.6 Reação em cadeia pela polimerase convencional e quantitativa (PCR e PCRq)

Após a elucidação dos genes responsáveis pela síntese da MC foi possível o desenvolvimento de iniciadores moleculares específicos para a detecção, identificação e quantificação de espécies potencialmente tóxicas em amostras ambientais, mesmo em baixas quantidades (DITTMANN *et al.*, 1997; TILLET *et al.*, 2000; SANGOLKAR *et al.*, 2006). Diferente de outros métodos que detectam a toxina, a PCR (reação da polimerase em cadeia) detecta as sequências gênicas responsáveis pela produção de toxinas, podendo distinguir cepas tóxicas das não tóxicas (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A PCR convencional pode ser utilizada para a detecção de cianobactérias, através de iniciadores moleculares específicos para a amplificação de uma região específica do genoma. Os iniciadores para a região do gene RNAr 16S e da ficocianina são amplamente utilizados para indicar a presença de cianobactérias em amostras ambientais. A técnica de DGGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de desnaturação) associado a PCR é capaz de identificar perfis genômicos que indicam a biodiversidade da comunidade bacteriana. A diversidade das cianobactérias também pode ser avaliada pelas técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e pelo sequenciamento da região amplificada (OLIVEIRA *et al.*, 2001; LORENZI, 2004; SANTOS, 2011; CAI *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012).

Sabe-se que o agrupamento gênico envolvido na síntese das MCs, o *mcy* é dividido em dez genes (A-J) (TILLET *et al.*, 2000). Assim a detecção de cepas potencialmente tóxicas pode ser realizada por iniciadores genômicos desses genes. A detecção de cepas potencialmente tóxicas a partir de iniciadores desenhados para o gene *mcyB* foi realizada por Oliveira *et al.* (2003); Mankiewicz-Boczek *et al.* (2006); dos Anjos *et al.* (2006); Oliveira *et al.* (2010a); (2010b); Hotto *et al.* (2007); Dyble *et al.* (2008); Fathalli *et al.* (2011); Głowacka *et al.* (2011); Te *et al.* (2011).

Oliveira *et al.* (2010 a, b) desenharam iniciadores para o gene *mcyB* utilizando cepas tóxicas de *Microcystis sp.* brasileiras. Neste estudo foi verificado que iniciadores específicos para estas cepas brasileiras detectaram mais cianobactérias potencialmente tóxicas nas amostras de água quando comparado com iniciadores para o gene *mcyA* que foi desenhado por Hisbergues *et al.* (2003) utilizando cepas provenientes de ambientes temperados.

Mankiewicz-Boczek *et al.* (2006) avaliaram a presença de cepas potencialmente tóxicas com iniciadores para os genes *mcyA*, B, D e E, a taxa de detecção de cianobactérias

potencialmente tóxicas foi diferente para cada iniciador em amostras de água de lagos poloneses. Hotto *et al.* (2007) utilizaram marcadores moleculares para a região do gene *mcyB* e *D* e também obtiveram resultados diferentes entre esses iniciadores, algumas amostras foram somente positivas para os genes *mcyB* ou *D*. As cianobactérias apresentam grande diversidade genética e ainda não há um marcador molecular que seja capaz de detectar todas as variedades de cepas.

A quantificação de cepas potencialmente produtoras de toxina pode ser realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (PCRq) (SANGOLKAR *et al.* 2006). Esta análise é bastante sensível, permitindo resultados fiáveis com apenas algumas células por reação (PEARSON & NEILAN, 2008). A PCRq permite inferir a quantidade de cepas potencialmente tóxicas das não tóxicas de indivíduos da mesma população, assim pode ser utilizada para correlações ecológicas como sucessão entre linhagens e dinâmicas destas cepas em relação a fatores bióticos e abióticos (PEARSON & NEILAN, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2007; RINTA-KANTO *et al.*, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas e quantificar microcistinas em amostras de águas superficiais de lagoas Maringá, Juara e Jacuném no município de Serra - ES.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a qualidade da água das lagoas através da análise de parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, turbidez, DQO, DBO, fósforo, nitrogênio) e clorofila-*a*;

Detectar e quantificar microcistinas RR, YR, LR e LA em amostras de água das lagoas;

Verificar a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas avaliando os genes responsáveis pela expressão de ficocianina e microcistinas nas amostras de água das lagoas;

4 METODOLOGIA

4.1 Descrição das Áreas de Estudo

O estudo foi realizado nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném localizadas no município da Serra, ES, Brasil (Figura 9). A escolha destas lagoas justifica-se pela importância quanto aos múltiplos usos que estes ecossistemas oferecem ao município e às demandas por estratégias de gestão visando à conservação das mesmas.

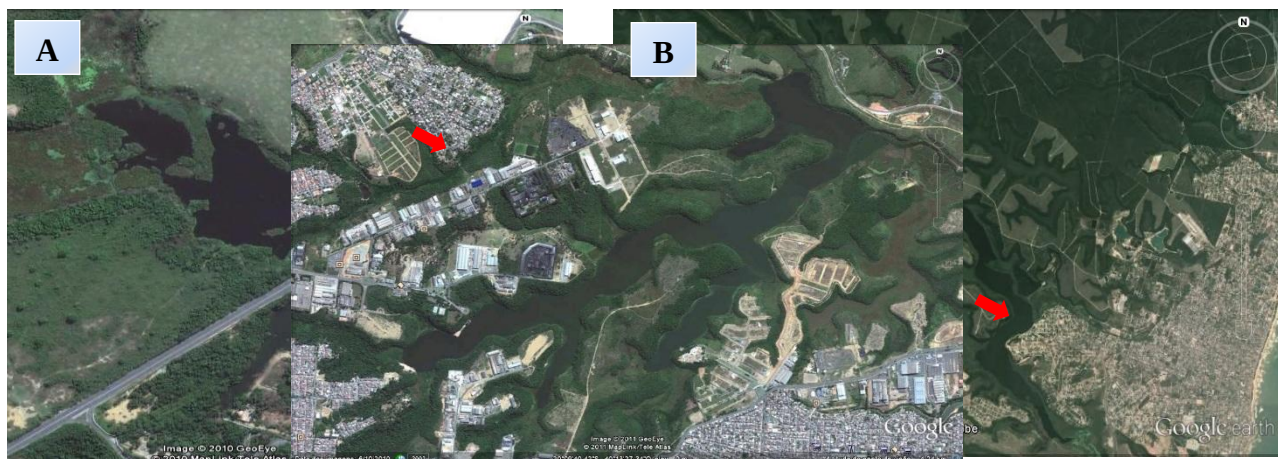


Figura 9 – Imagem de satélite das lagoas Maringá (A); Juara (B) e Jacuném (C). As setas indicam as estações amostrais.

A lagoa Maringá formou-se pelo represamento do seu vale de drenagem devido à implantação da Rodovia ES-010, no município de Serra, ES. A lagoa está distante 1,4 km da linha de costa e possui uma área de 0,59 km². A bacia de drenagem possui vegetação de restinga em mosaicos e, em algumas porções mais distantes da lagoa, bairros residenciais e algumas ocupações industriais (SERRA, 2010).

A lagoa Juara compreende uma área de 2,9 km² e está localizada na bacia do rio Jacaraípe (PMS, 2010). Seus tributários são os córregos Juara, Cavada, Doutor Robson, Castelo, Cachoeira do Putiri, Independência, Roncador, São Domingos, Laranjeiras e Quibebe (PMS, 2010). Apresenta ligação com o mar através do rio Jacaraípe, com 4,5 km de extensão. O entorno da lagoa é composto por mata ciliar, plantações de Eucaliptus sp e bairros residenciais.

A Lagoa Jacuném possui uma área de 1,46 Km² e pertence à bacia hidrográfica do Rio Jacaraípe e seus principais tributários são os Córregos Barro Branco, Jacuném e Veneer. Partes da extensão desta lagoa situa-se em uma Área de Proteção Ambiental (APA) de mesmo nome, com remanescentes de Mata Atlântica de Tabuleiro em diversos estágios de regeneração, criada através da Lei municipal nº. 2.135 de 25 de novembro de 1998. (LEAL, 2006; SERRA, 2010). A bacia do rio Jacaraípe está distante cinco km do Oceano Atlântico e possui uma população de aproximadamente 140 mil habitantes. A maior parte das indústrias químicas (fertilizantes, produtos de limpeza) está localizada no CIVIT (Centro Industrial da Grande Vitória), próximas à lagoa Jacuném (GTZ, 2000; LEAL, 2006).

4.2 Coleta das amostras de água

Foram realizadas seis coletas nas lagoas Maringá e Juara no período de fevereiro a dezembro e somente quatro coletas no período de junho a dezembro de 2013 na lagoa Jacuném. As coletas na lagoa Jacuném iniciaram posteriormente devido a dificuldade de acesso à margem desta lagoa no perímetro urbano. As datas das coletas foram: 25 de fevereiro; 23 de abril; 25 de junho; 20 agosto; 8 de outubro e 2 de dezembro. As amostras de água foram coletadas por arraste subsuperficial em uma estação amostral à

margem de cada lagoa. As coletas iniciavam aproximadamente às 9h da manhã na lagoa Maringá, por volta das 10h na lagoa Juara e por último, aproximadamente às 11h30min, a coleta na lagoa Jacuném.

Após a coleta, as amostras foram armazenadas e transportadas em temperatura ambiente e ao abrigo de luz até o laboratório de Saneamento Ambiental (LabSan) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) onde foram realizadas as análises dos parâmetros físico-químicos, detecção de cianobactérias e microcistinas (Figura 10).

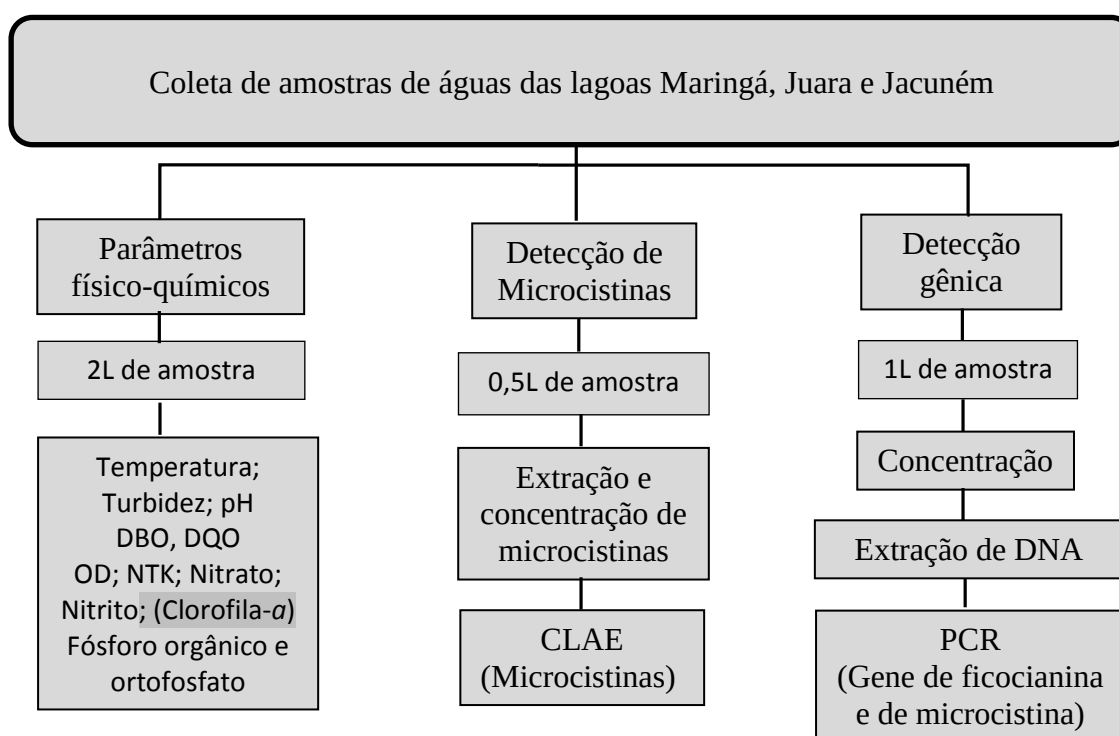


Figura 10 – Fluxograma das principais etapas do processamento das amostras de água coletadas

4.3 Avaliação dos parâmetros de qualidade de água

4.3.1 Parâmetros físico-químicos

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition, 1995 (Quadro 1).

Quadro 1 – Análises físico-químicas realizadas e seus respectivos métodos:

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	
Parâmetro	Método
Temperatura	----

pH	----
Turbidez	2130 B - método Nefelométrico
DQO	5220 D - Método Colorimétrico
DBO	Método OXITOP
Fósforo Total	4500 PE - Método do Ácido Ascórbico
Orto-fosfato	4500 PE - Método do Ácido Ascórbico
Nitrogênio Total	4500 N _{ORG} - Método de Kjeldahl
Nitrogênio Nitrato	Método Colimétrico da Brucina
Nitrogênio Nitrito	4500 NO ₂ ⁻ - Método Colorimétrico
Clorofila- <i>a</i>	Equipamento AquaFluor®

4.3.2 Índice de Estado Trófico (IET)

O Índice de Estado Trófico (IET) classifica corpos d'água em relação ao grau de eutrofização (CETESB, 2010). O IET é composto pelo Índice do Estado Trófico para o fósforo total – IET (PT) e o Índice do Estado Trófico para a clorofila-*a* – IET (Cl-*a*), modificados por Lamparelli (2004, Apud: CETESB, 2010), segundo as equações:

$$IET (Cl-a) = 10 \times \left(6 - \left(\frac{0,92 - (0,34 \times \ln Cl-a)}{\ln (2)} \right) \right)$$

$$IET (PT) = 10 \times \left(6 - \left(\frac{1,77 - (0,42 \times \ln PT)}{\ln (2)} \right) \right)$$

$$IET = \frac{IET (PT) + IET (Cl-a)}{2}$$

Onde: PT: concentração de fósforo total, medida à superfície da água, em µg.L-1;
Cl-*a* (clorofila-*a*): concentração de clorofila-*a*, medida à superfície da água, em µg.L-1;

4.3.3 Precipitação Pluviométrica

Os dados de precipitação pluviométrica utilizados neste trabalho foram disponibilizados pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica E Extensão Rural (INCAPER) referente à estação localizada em Vitória-ES. Foram utilizados os dados de precipitação acumulada de cinco dias anteriores à data de coleta.

4.4 Análises de microcistinas

4.4.1 Extração de microcistinas

A análise foi realizada a partir de um volume de 500 mL de cada amostra aquecida até o ponto de ebulição e depois concentrada e extraída em cartuchos de extração de fase

sólida (C18, Agilent Technologies®), segundo metodologia descrita na ISO 20.179:2005.

As toxinas foram eluídas do cartucho em 4,0 mL de solução de MeOH:TFA:H₂O (89,9:0,1:10 v/v). O eluato foi evaporado à temperatura ambiente e ressuspensão em 0,5 mL de solução de MeOH:H₂O (80:20 v/v) para as análises cromatográficas.

4.4.2 Análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa foram realizadas em uma coluna analítica Kinetex™ C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 nm). A detecção de microcistinas a partir de 50 µL da amostra extraída, em fluxo da fase móvel de 0,250 mL/min, temperatura de 37°C. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 238 nm. As soluções utilizadas para a fase móvel A e fase móvel B foram H₂O:MeOH:TFA (69,9:30:0,1 v/v) e Metanol 100%, respectivamente (CASSINI *et al.*, 2013).

Todas as soluções preparadas para compor as fases móveis foram previamente filtradas e mantidas por 15 minutos em banho de ultrassom (Limpsonic®, Brasil) antes de serem utilizadas. A quantificação das MCs foi determinada pela relação linear entre as áreas dos picos de toxinas padrão com as amostras analisadas.

4.5 Cultivo e manutenção da cepa *Microcystis aeruginosa*

A cepa *Microcystis aeruginosa* Kützinger (NPLJ-4) produtora de microcistina foi utilizada como controle positivo para as reações de PCR. A cepa NPLJ-4 foi isolada da Lagoa Jacarepaguá (RJ), em 1996, pela equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, RJ) e foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Água, da Universidade Federal de Viçosa (UFV, MG).

A cepa foi cultivada em meio de cultura ASM-1, o qual é composto apenas por substâncias inorgânicas, com pH ajustado para 7,5 conforme descrito por Gorham *et al.* (1964). O cultivo foi mantido em estufa incubadora climatizada (Modelo Nova Técnica – NT – 0708), sob agitação manual (sem aeração), temperatura média 25°C e fotoperíodo 10:14 (luz/escuro).

4.6 Detecção gênica de cianobactérias

4.6.1 Concentração e eluição das amostras ambientais

Um litro de cada amostra de água coletada das lagoas foi filtrado em membranas de éster-celulose 0,22µm (Millipore®). As membranas foram conservadas a temperatura de -80°C para posterior eluição em 10mL de solução tampão TE (0,22mM EDTA e 0,08mM tris HCl). A suspensão foi armazenada em freezer -80°C até a realização da extração do material genético.

4.6.2 Extração do material genético

A extração do material genômico foi realizada a partir do pellet formado do volume de 500 µL da solução proveniente da eluição da membrana de éster celulose para as amostras ambientais, do cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kützinger (NPLJ-4) (controle positivo) e água MiliQ (controle negativo). A partir do pellet foi seguido o procedimento descrito no Kit Purelink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante para bactérias gram-negativas. O DNA extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro Ultrospec 100 (Amersham Pharmacia Biotech), através da densidade óptica (DO) com os comprimentos de onda de 260nm e 280nm para quantificação do DNA e proteínas, respectivamente. Os resultados foram expressos em ng/µL e a razão DNA/proteína foram utilizadas para avaliação da qualidade do DNA.

4.6.3 PCR (Reação em cadeia pela polimerase)

Cerca de 20ng de DNA foi utilizado para a amplificação de fragmentos específicos do genoma das cianobactérias por PCR (tabela 3). A reação foi realizada utilizando um termociclador PTC-100, versão 7.0, MJ Research®.

Foram utilizados iniciadores moleculares (quadro 2) para a detecção do gene responsável pela produção de ficocianina (PC). A fim de detectar a presença de cianobactérias nas amostras ambientais, pois a ficocianina é um pigmento fotossintético encontrado em todas as cianobactérias. A detecção da potencialidade de produção de microcistina foi utilizado iniciadores para a região *mcyB* e *mcyD* da microcistina.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase para amplificação da região da ficocianina para detecção de cianobactérias

Reagente	Concentração
H ₂ O MiliQ	-
DNTP	16 µM
Tampão*	1X
MgCl ₂	1,6mM
Iniciadores**	0,16pmol/cada
Taq Platinum (Invitrogen TM ,Brasil)	0,16U/µL
DNA extraído	20ng

*Tampão de reação: 20 mM de tris-HCl, pH 8.4, 50 mM de KCl

** Iniciadores para detecção da ficocianina: PCβF e PCαR e os iniciadores para microcistina: *mcyBF*-R; *mcy BF*-RA; *mcyBF*-RB; c *mcyD*-F e q *mcyD*-R (Quadro 2).

4.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Foram utilizados 10µL de produto de amplificação para visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O gel foi submetido a eletroforese (100V) utilizando-se tampão TBE (Tris-HCl/ Ácido bórico /EDTA, pH 8,5) e observado em luz UV.

Gene alvo	Nome do iniciador	Sequência (5' - 3')	Descrição	Programa de amplificação			Fragmento (pb)	Região
				Desnaturação	Emparelhamento	Extensão		
Ficocianina	PCβF	GGCTGCTTGTTTACGCGACA	Neilan <i>et</i>	1ciclo	40 ciclos	1ciclo	685	2209881-

Quadro 2 – Sequência dos iniciadores moleculares para regiões da ficocianina, *mcyB* e *mcyD* e o programa de amplificação de cada fragmento.

	PCaR	CCAGTACCACCAGCAACTAA	<i>al.</i> (1995)	92°C 2min	92°C 40s	55°C 50s	72°C 2min	72°C 8min		2210566 ⁽¹⁾
<i>mcy B</i>	<i>mcyB</i> -F <i>mcyB</i> -R	TTCAACGGGAAAACCCAAAG CYAATATGTAAATCTCCAG	Oliveira <i>et al.</i> (2010)	1ciclo	35 ciclos			1ciclo	570 315 195	1875-1894 ⁽²⁾ 1875-2190 ⁽³⁾ 1875-2070 ⁽²⁾
	<i>mcyB</i> -F <i>mcyB</i> -R-A	TTCAACGGGAAAACCCAAAG GGCTATATTTTCATCCCATT		94°C 2min	94°C 10s	50°C 20s	72°C 1min	72°C 5min		
	<i>mcyB</i> -F <i>mcyB</i> -R-B	TTCAACGGGAAAACCCAAAG GTCAGGTTTAGCCACGACT								
<i>mcy D</i>	c <i>mcyD</i> -F q <i>mcyD</i> -R	GCATCTTCTAAAGAAAAGACTCC AAATTATGGCAATCTTGGGGAATA	Pimentel <i>et al.</i> (2013)	94°C 3min	94°C 30s	50°C 30s	72°C 40s	72°C 2min	370	3230- 3600 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Posição no genoma referente à sequência completa da cepa *Microcystis aeruginosa* NIES-843 de código NC_010296.1 disponível no GenBank.

⁽²⁾ Posição no genoma referente à sequência do gene *mcyB* da cepa *Microcystis aeruginosa* FCY-26 de código JQ290082.1 disponível no GenBank.

⁽³⁾ Posição no genoma referente à sequência do gene *mcyB* parcial da *Microcystis* sp. clone EHN3S25 de código JX965888.1 disponível no GenBank.

⁽⁴⁾ Posição no genoma fornecido no estudo de Pimentel *et al.* (2013).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade de água

Os resultados das avaliações dos parâmetros de qualidade de água nas lagoas (temperatura, turbidez, clorofila-*a*, O₂ dissolvido, DBO, DQO, fósforo e nitrogênio), volume de precipitação pluviométrica acumulado em cinco dias anteriores à cada coleta e a comparação destes resultados com os VMPs pela resolução CONAMA 357 estão apresentados neste tópico. As análises foram realizadas a fim de caracterizar o ambiente de estudo e identificar as condições favoráveis ao desenvolvimento de cianobactérias nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném.

5.1.1 Temperatura superficial da água

A temperatura da água superficial em todas as estações amostrais variou entre 21 e 31°C (figura 11), tendo as maiores temperaturas nos meses de verão (fevereiro e dezembro). A variação da temperatura da água entre as lagoas foi influenciada pelo horário de coleta. A lagoa Jacuném apresentou sempre as maiores temperaturas em relação às outras lagoas, justificado pela coleta ocorrer por volta das 11h30min.

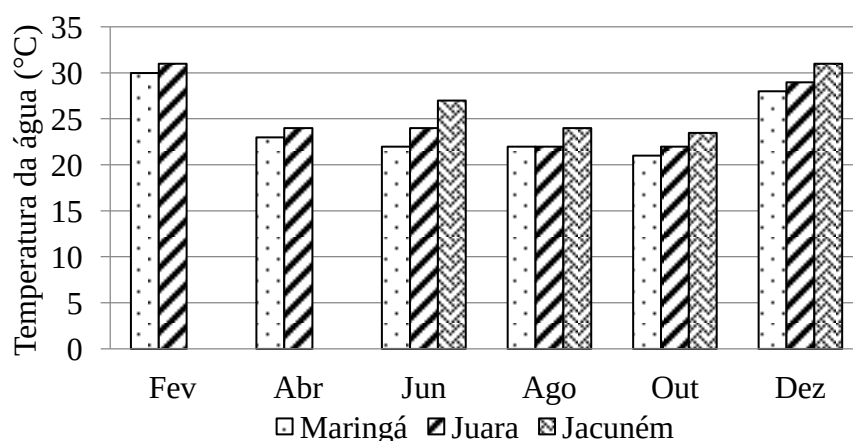


Figura 11 – Monitoramento da temperatura da água superficial (10 cm de profundidade) das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013.

5.1.2 Turbidez

A turbidez das lagoas variou entre 9,00 e 916,00uT (Figura 12). A maior variação de turbidez pode ser vista na lagoa Maringá onde se observou uma variação de 15,80 a 916,00uT. Os dados de turbidez referentes às lagoas Juara e Jacuném foram inferiores a 100uT.

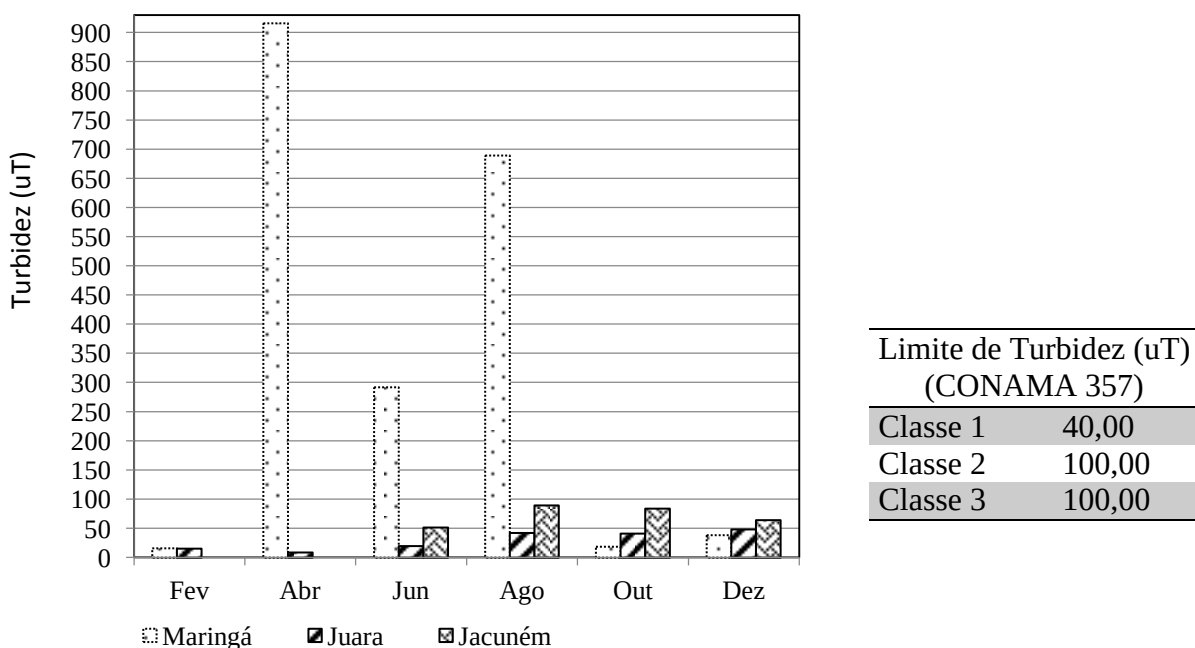


Figura 12 - Monitoramento da turbidez das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela dos valores máximo permitido (VMP) de turbidez para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções nº410/2009 e 430/2011).

Podemos observar a variação da turbidez em relação a precipitação. Na figura 13 observa-se que os maiores valores de turbidez foi nos meses de abril, junho e agosto, na lagoa Maringá. Nas lagoas Juara e Jacuném (Figura 14 e 15) os maiores valores de turbidez foram observados nos momentos de maior precipitação pluviométrica.

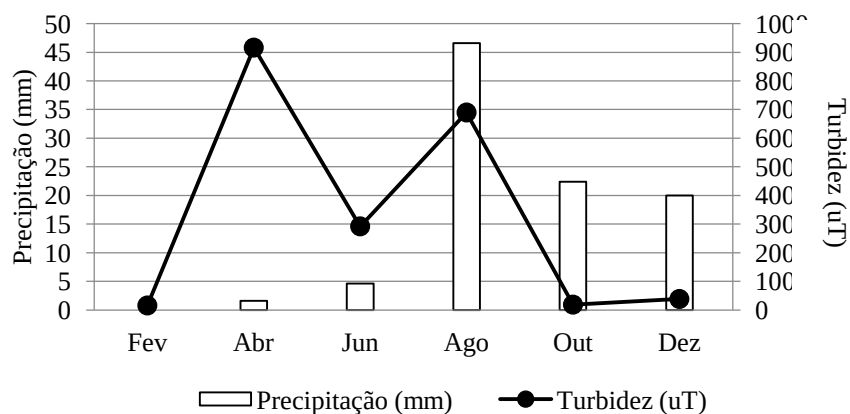
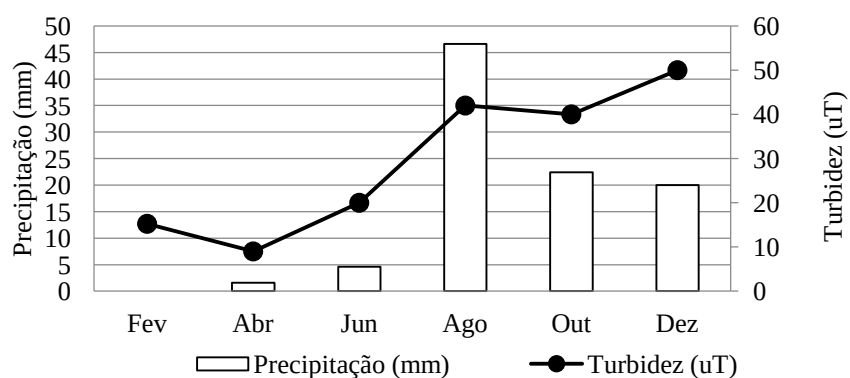


Figura 13 - Monitoramento da turbidez da lagoa Maringá (Serra, ES) e dados de precipitação acumulada cinco dias anteriores a data de coleta, no período de fevereiro a



dezembro de 2013.

Figura 14 - Monitoramento da turbidez da lagoa Juara (Serra, ES) e dados de precipitação acumulada cinco dias anteriores a data de coleta, no período de fevereiro a dezembro de 2013.

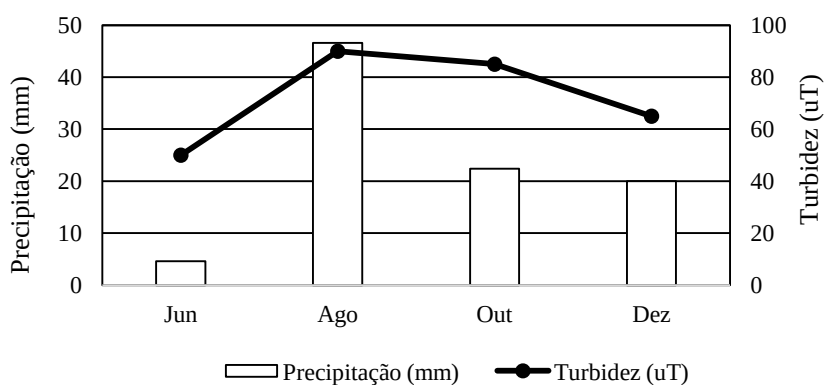


Figura 15 - Monitoramento da turbidez da lagoa Jacuném (Serra, ES) e dados de precipitação acumulada cinco dias anteriores a data de coleta, no período de junho a dezembro de 2013.

5.1.3 Oxigênio Dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido da água apresentou grande variação entre as lagoas, variando de níveis não detectáveis na lagoa Maringá a concentração de 15,90 mg/L na lagoa Jacuném (figura 16). Em pH alcalino a concentração de oxigênio na água foi maior (figuras 17,18 e 19).

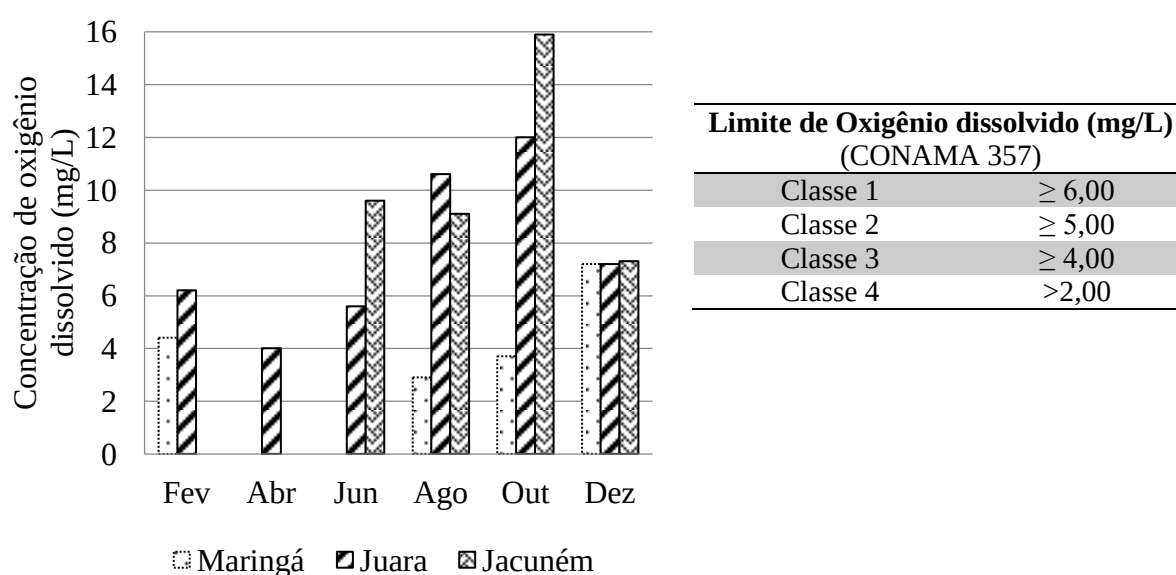


Figura 16 - Monitoramento do oxigênio dissolvido da água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném Serra,ES no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela dos valores máximo permitido (VMP) de oxigênio dissolvido para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções nº410/2009 e 430/2011).

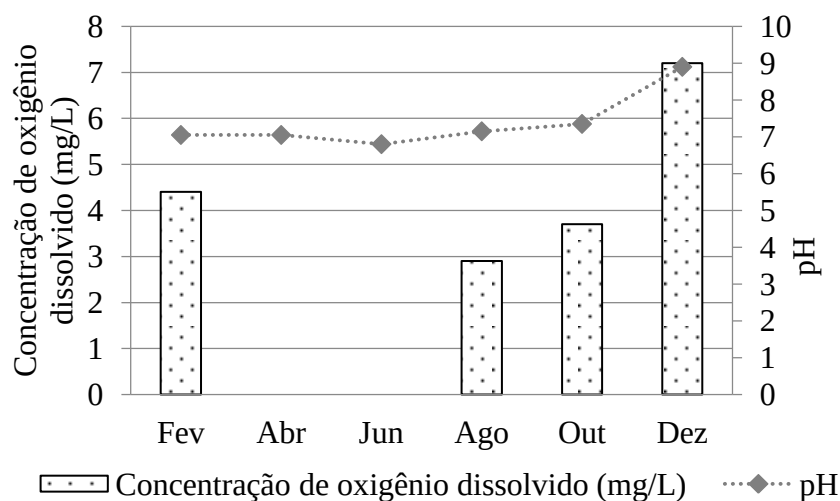


Figura 17 - Monitoramento do oxigênio dissolvido e o pH da água da lagoa Maringá, Serra, ES no período de fevereiro a dezembro de 2013.

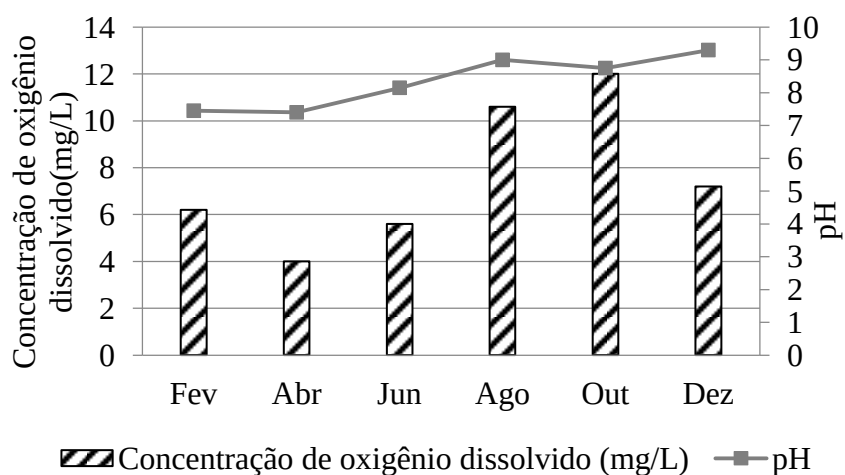


Figura 18 - Monitoramento do oxigênio dissolvido e o pH da água da lagoa Juara (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013.

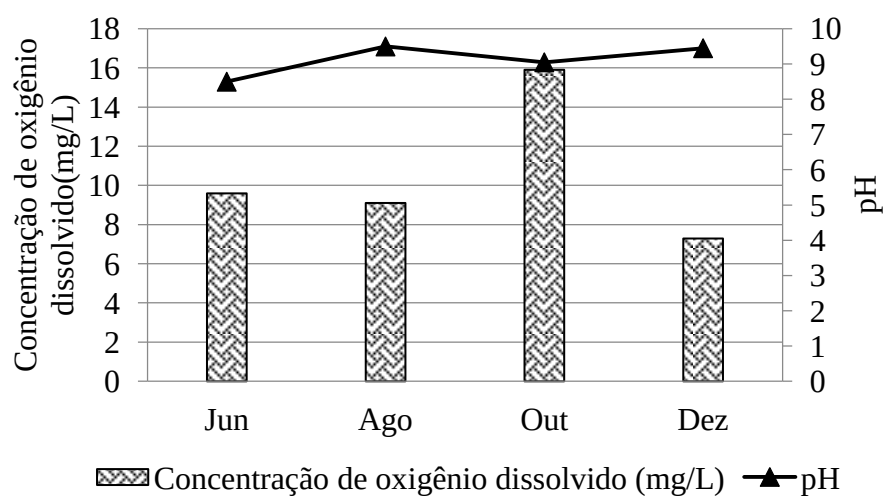


Figura 19 - Monitoramento do oxigênio dissolvido e o pH da água da lagoa Jacuném (Serra, ES) no período de junho a dezembro de 2013.

5.1.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A DBO apresentou variação de 10,70 a 81,00 mg/L nas lagoas. De acordo com esse parâmetro as lagoas apresentam níveis superiores ao preconizado pela legislação CONAMA 357 de classificação dos corpos hídricos (Figura 20). Os maiores valores de DBO foram encontrados nos meses de Abril e Junho na lagoa Maringá, meses em que houve a menor concentração de oxigênio dissolvido (Figura 21).

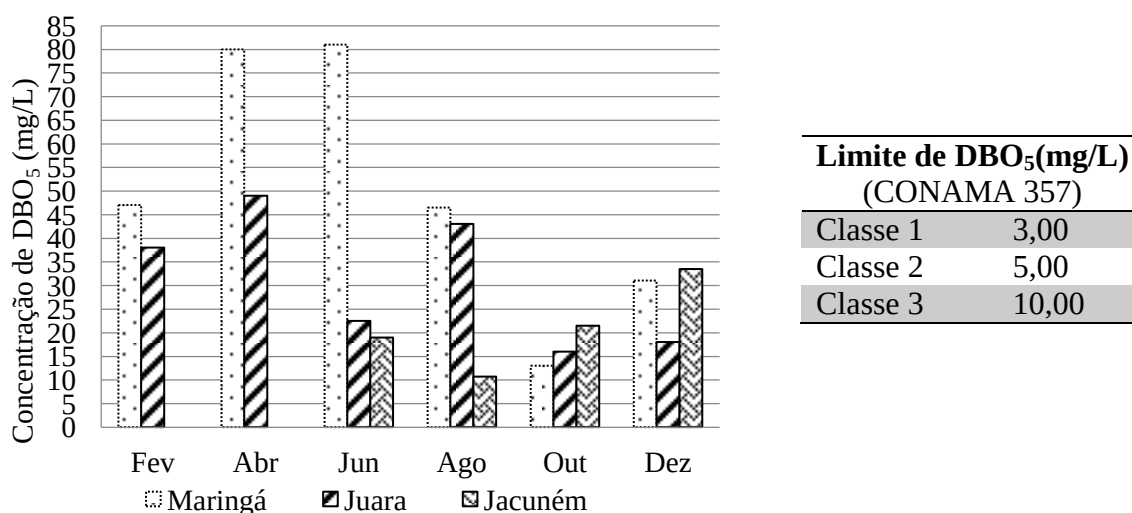


Figura 20 – Monitoramento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) em cinco dias das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela do valor máximo permitido (VMP) de DBO para classes de água doce segundo CONAMA n°357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções n°410/2009 e 430/2011).

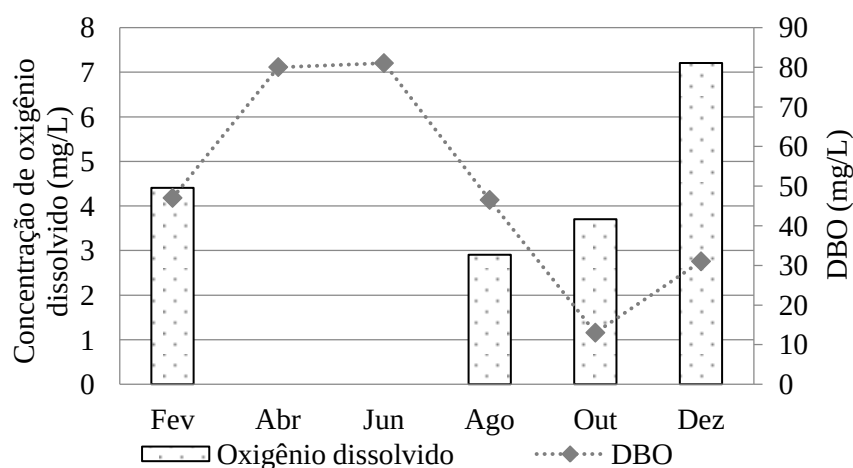


Figura 21 - – Monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido na água e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO₅) em cinco dias das lagoas Maringá no período de fevereiro a dezembro de 2013.

5.1.5 Demanda química de oxigênio e biodegradabilidade

Os valores de DQO variaram de 38,00 a 1157,00 mg/L nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Figura 22). A biodegradabilidade da matéria orgânica presente nas amostras é medida pela relação DBO e DQO, observa-se que esta relação variou de 0,04 a 0,94 (Figura 23).

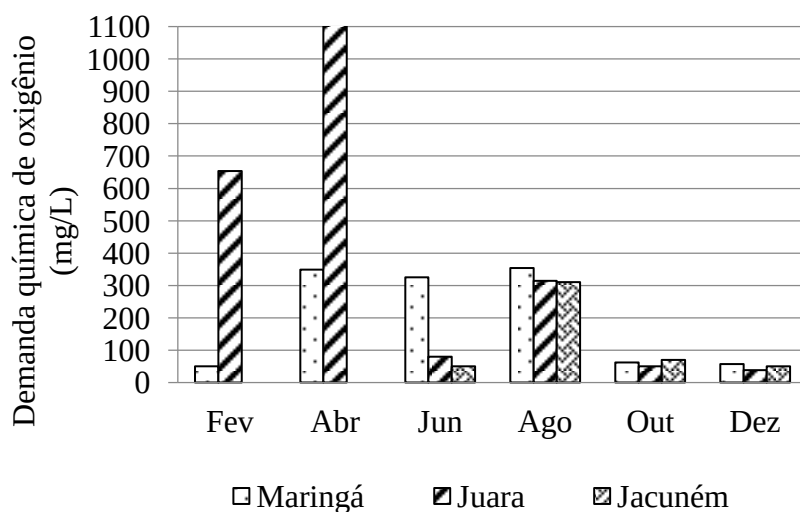


Figura 22 – Monitoramento da demanda química de oxigênio (DQO) das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013.

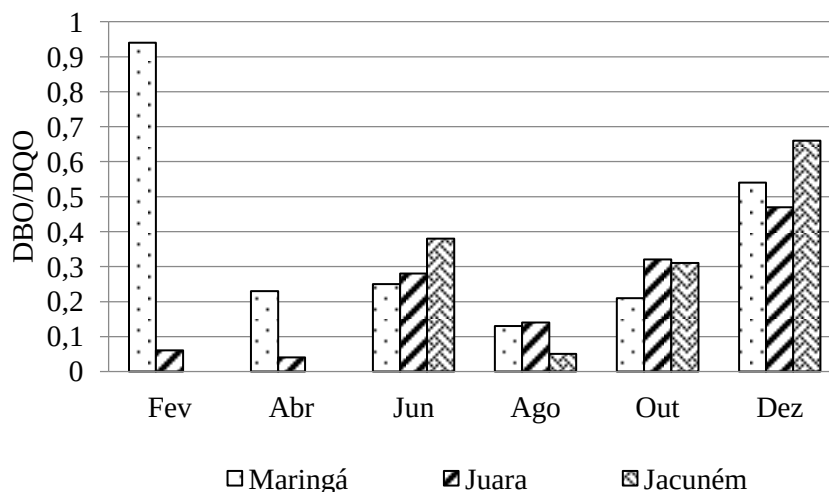


Figura 23 – Relação entre DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (Demanda química de oxigênio) nas amostras de água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném no período de fevereiro a dezembro de 2013.

5.1.6 Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)

A solubilidade do NTK na água varia de acordo com os valores de pH, quanto mais neutro for o pH maior será a solubilidade do NTK. Diante deste fato, a resolução CONAMA 357 determina os limites de NTK de acordo com o pH da água para classificação dos corpos hídricos (tabela 4). As concentrações de NTK nas amostras analisadas variaram de 0,30 a 19,90 mg/L (Figuras 24, 25 e 26).

Os níveis de concentração de NTK na lagoa Maringá nos meses de abril, junho e outubro em pH neutro estiveram dentro do limite estabelecido para o enquadramento na classe 3, nos meses de agosto e dezembro os níveis encontrados foram superiores aos valores estabelecidos pela legislação CONAMA 357 (Figura 24). Na lagoa Juara nos meses de fevereiro, abril e junho foram observadas concentrações de NTK dentro do limite estabelecido para as classes 1 e 2 (figura 25). Durante o estudo a lagoa Jacuném apresentou pH básico e valores de NTK superiores aos valores máximos permitidos na legislação CONAMA 357 (figura 26).

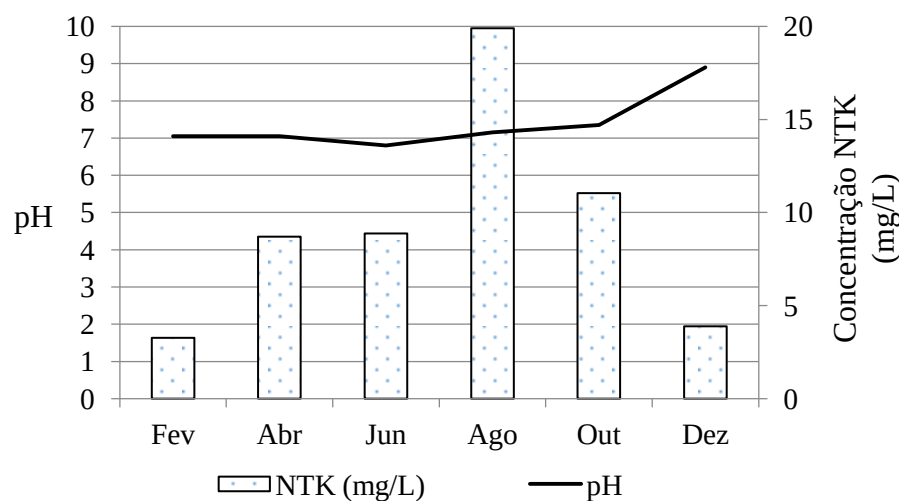


Figura 24 – Monitoramento da concentração de NTK (nitrogênio orgânico e amoniacal) na lagoa Maringá-Serra, ES no período de fevereiro a dezembro de 2013.

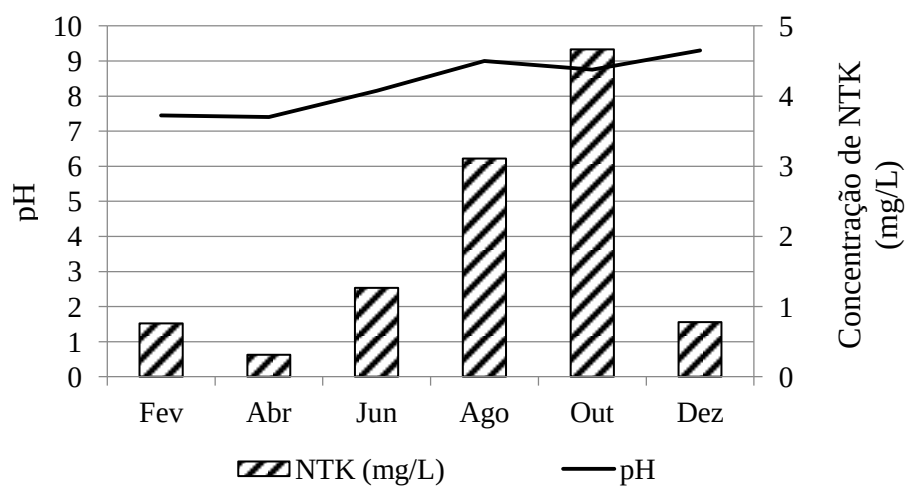


Figura 25 – Monitoramento da concentração de NTK (nitrogênio orgânico e amoniacal) na lagoa Juara (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013.

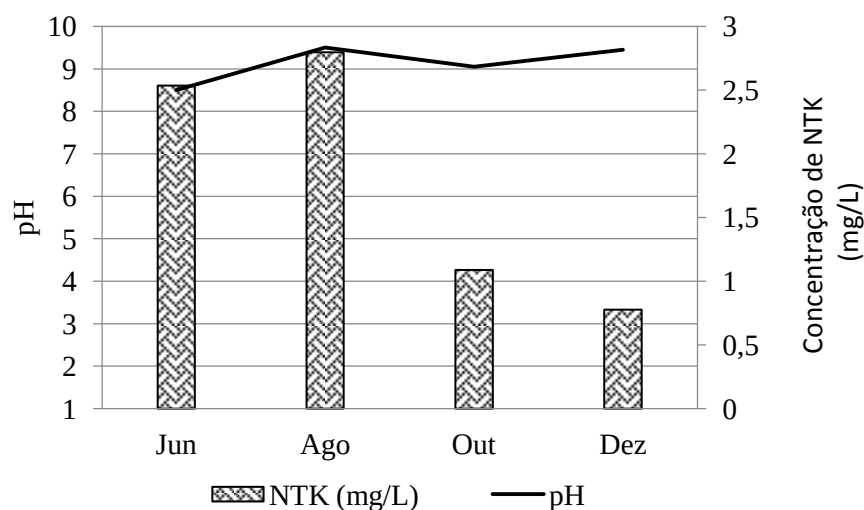


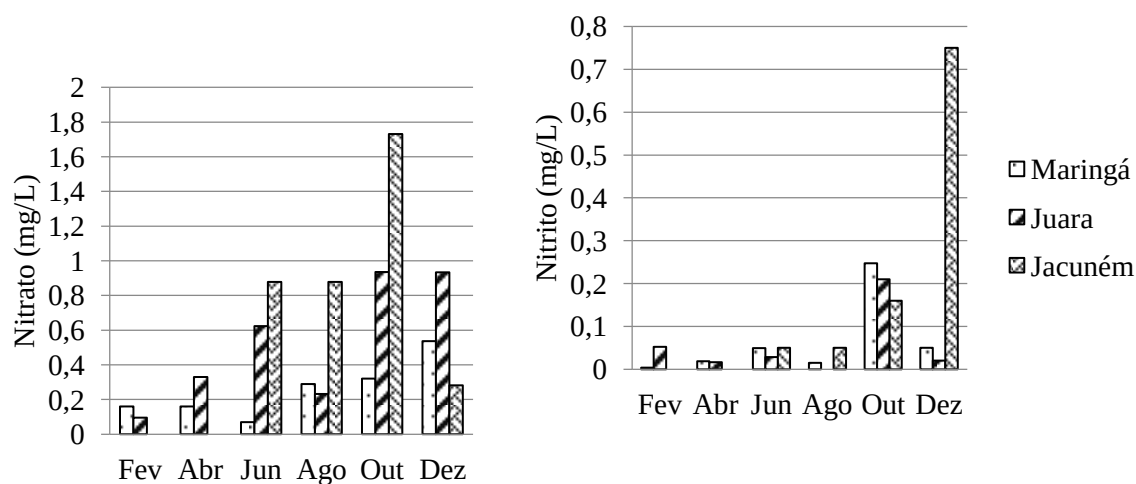
Figura 26 – Monitoramento da concentração de NTK (nitrogênio orgânico e amoniacal) na lagoa Jacuném (Serra, ES) no período de junho a dezembro de 2013.

Tabela 4 – Valor máximo permitido (VMP) dos padrões de nitrogênio orgânico e amoniacal (NTK) para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções nº410/2009 e 430/2011).

VMP (mg/L) de NTK (CONAMA 357)			
Faixa de pH	Classe 1	Classe 2	Classe 3
$\text{pH} \leq 7,5$	3,70	3,70	13,30
$7,5 < \text{pH} \leq 8$	2,00	2,00	5,60
$8 < \text{pH} \leq 8,5$	1,00	1,00	2,20
$\text{pH} \geq 8,5$	0,50	0,50	1,00

5.1.7 Nitrato e Nitrito

Foram detectadas baixas concentrações de nitrato e nitrito nas amostras de água analisadas (Figura 27). As concentrações variaram de 0,10 a 0,90 mg/L para nitrato e 0,004 a 0,75 mg/L para nitrito. O CONAMA estabelece o valor máximo permitido e de 10,00 mg/L e 1,00mg/L para nitrato e nitrito, respectivamente para a classes 1, 2 e 3 dos

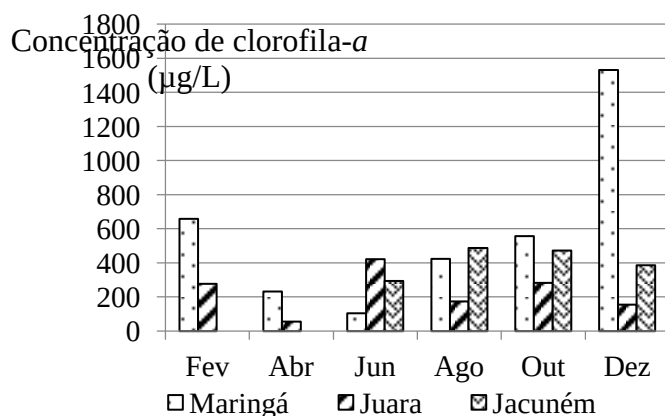


corpos hídricos.

Figura 27 – Monitoramento do nitrato e nitrito das lagoas Maringá, Juara e Jacuném (Serra, ES) no período de fevereiro a dezembro de 2013.

5.1.8 Clorofila-*a*

A concentração de clorofila-*a* apresentou variação de 56,20 a 1532,50 µg/L (Figura 28). Os níveis de concentração de clorofila foram superiores aos valores máximos permitidos estabelecidos pela resolução CONAMA 357 para a classificação de corpos d'águas, exceto no mês de abril na lagoa Juara que apresentou 56,20 µg/L de clorofila-



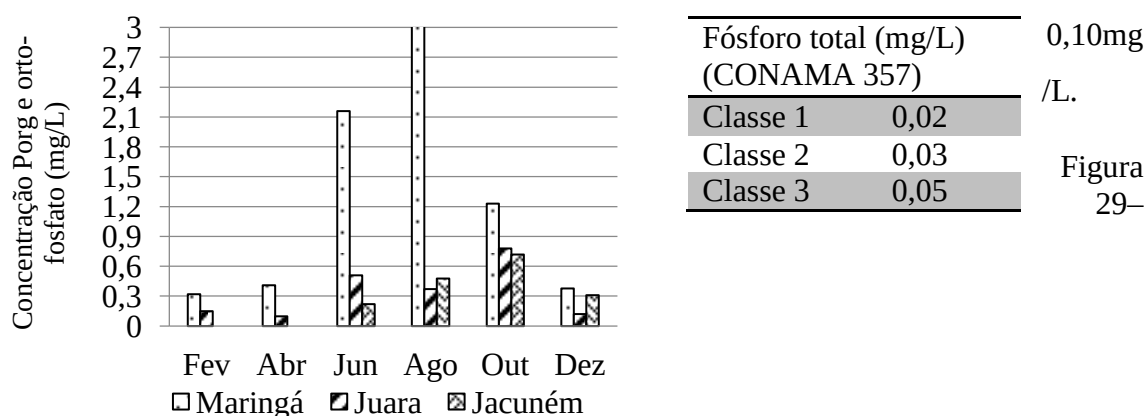
a.

Figura 28 – Monitoramento da clorofila-*a* das lagoas Maringá, Juara e Jacuném, Serra, ES no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela dos valores máximo permitido (VMP) de clorofila-*a* para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções nº410/2009 e 430/2011).

Limite de clorofila- <i>a</i> (µg/L) (CONAMA 357)	
Classe 1	10,00
Classe 2	30,00
Classe 3	60,00

5.1.9 Fósforo total e orto-fosfato

A concentração de fósforo orgânico e orto-fosfato apresentou entre 0,05 a 1,00mg/L (Figura 29). O menor valor detectado foi referente à amostra do mês de abril da lagoa Juara, única amostra que pode ser enquadrada na classe 3 da resolução CONAMA 357. Todas as outras amostras de água apresentaram concentrações de fósforo superior a



Monitoramento do fósforo orgânico e orto-fosfato nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném, Serra, ES no período de fevereiro a dezembro de 2013 e a tabela dos valores máximo permitido (VMP) de fósforo para classes de água doce segundo CONAMA nº357/2005 (Alterada e complementada pelas resoluções nº410/2009 e 430/2011).

5.1.10 Índice do Estado Trófico (IET)

A avaliação do nível trófico das lagoas é feita pelo índice de Carlson modificado (CETESB) utilizando-se as concentrações de fósforo e clorofila-*a* de acordo com a classificação apresentada na tabela 5. De acordo com este índice todas as lagoas encontram-se hipereutrofizadas (tabela 6).

Tabela 5 – Classificação do nível trófico de acordo com o índice de Carlson modificado (CETESB)

Categoria de estado trófico	Ponderação
Ultraoligotrófico	$IET \leq 47$
Oligotrófico	$47 < IET \leq 52$
Mesotrófico	$52 < IET \leq 59$

Eutrófico	$59 < \text{IET} \leq 63$
Supereutrófico	$63 < \text{IET} \leq 67$
Hipereutrófico	$\text{IET} > 67$

Tabela 6 – Resumo dos resultados das avaliações do índice de estado trófico e classificação das lagoas Maringá, Juara e Jacuném no período de fevereiro a dezembro de 2013.

Lagoas	Coletas	Concentração de Clorofila- <i>a</i> (µg/L)	Valor IET (Cla)	Concentração de Fósforo (µg/L)	Valor IET (PT)	IET	Classificação
Maringá	Fev	659,2	82,6	300	76,9	79,8	Hipereutrófico
	Abr	232	77,5	330	77,4	77,5	
	Jun	105,8	73,7	216	74,9	74,3	
	Ago	423,3	80,5	298	76,8	78,6	
	Out	557,5	81,8	1000	84,2	83,0	
	Dez	1532,5	86,8	340	77,6	82,2	
Juara	Fev	277,6	78,4	140	72,2	75,3	Hipereutrófico
	Abr	56,2	70,6	50	66,0	68,3	
	Jun	422,8	80,5	510	80,1	80,3	
	Ago	173,6	76,1	360	78,0	77,0	
	Out	283	78,5	750	82,4	80,5	
	Dez	156,4	75,6	100	70,2	72,9	
Jacuném	Jun	294,5	78,7	220	75,0	76,8	Hipereutrófico
	Ago	488,8	81,2	472	79,6	80,4	
	Out	473,8	81,0	700	82,0	81,5	
	Dez	386,3	80,0	300	76,9	78,4	

5.2 Análise de microcistinas

Os resultados de detecção e quantificação de microcistinas por CLAE podem ser visualizados na tabela 7. As microcistinas foram detectadas em 56,25% (9/16) das amostras de água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném. Todas as amostras do mês de junho apresentaram concentração de microcistinas superior ao recomendado pela portaria MS 2914/ 2011, que estabelece o limite máximo de 1,00 µg/L para corpos d'água de abastecimento público.

Em relação as variantes de microcistinas detectadas; a LR esteve presente em 62,50% (5/8), a RR em 50% (4/8) e a YR em 25% (2/8) das microcistinas detectadas das amostras de água das lagoas, sendo que na lagoa Jacuném as amostras de água dos meses de junho e agosto apresentaram mais de uma variante de microcistina.

Tabela 7 – Detecção e quantificação de microcistinas nas lagoas Maringá, Juara e Jacuném no período de fevereiro a dezembro de 2013.

Lagoa	Data	Detecção	Quantificação (µg/L)
Maringá	Fev	MC LR	nq
	Abr	ND	nq
	Jun	MC LR	1,13
	Ago	ND	nq
	Out	ND	nq
	Dez	ND	nq
Juara	Fev	MC LR	nq
	Abr	MC YR	nq
	Jun	MC RR	18,80
	Ago	MC RR	0,76
	Out	MC LR	nq
	Dez	ND	nq
Jacuném	Jun	MC RR, YR e LR	8,94 (LR)
	Ago	MC RR e YR	nq
	Out	ND	nq
	Dez	ND	nq

Legenda: MC – microcistina; ND – não detectado (abaixo do limite de detecção, 0,25µg/L); nq - não quantificado (abaixo do limite de quantificação, 0,7µg/L por CLAE).

5.3 Análises de Detecção Gênica de Cianobactérias

Os resultados da amplificação gênica das amostras de água das lagoas podem ser visualizados na tabela 8. A presença do gene da ficocianina foi detectada em 14 das 16 amostras analisadas, indicando a presença de cianobactérias no ambiente. O gene *mcyB* apresentou positividade de 81,25% (13/16) e o gene *mcy D* positividade de 87,5% (14/16) das amostras analisadas, indicando a potencialidade de produção de MCs. Das 14 amostras em que foi detectada a presença do gene *mcy*, nove destas apresentaram a presença de microcistinas.

Tabela 8 – Presença ou ausência do fragmento genômico detectado com iniciadores para a região de síntese de ficocianina e microcistina para as regiões *mcyB* e *D* e resultado de detecção e quantificação por CLAE de microcistinas.

Lagoa	Coleta	Região/ Iniciadores					MC (µg/L)
		Ficocianina	<i>mcy B</i>		<i>mcy D</i>		
		PCβF/ aR	BF/BR	BF/BRA	BF/BRB	cmcyDF/qmcyDR	
Maringá	Fev	+	+	+	+	+	+ (nq)
	Abr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Jun	+	ND	+	ND	+	+(1,13)
	Ago	+	ND	ND	+	+	ND
	Out	+	ND	ND	ND	+	ND
	Dez	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Jura	Fev	+	+	+	+	+	+ (nq)
	Abr	+	+	ND	+	+	+ (nq)
	Jun	+	+	+	+	+	+(18,80)
	Ago	+	+	+	+	+	+(0,76)
	Out	+	+	+	+	+	+ (nq)
	Dez	+	+	+	+	+	ND
Jacuném	Jun	+	+	+	+	+	+ (8,94)
	Ago	+	+	+	+	+	+ (nq)
	Out	+	+	+	+	+	ND
	Dez	+	+	+	+	+	ND

Legenda: + positivo; ND Não detectado; MC microcistina; nq - não quantificado (abaixo do limite de quantificação, 0,7µg/L por CLAE).

6 DISCUSSÃO

As lagoas costeiras apresentam grande importância ecológica e socioeconômica com múltiplas finalidades, como pesca, recreação, abastecimento público e harmonia paisagística. Esses ecossistemas vêm sendo altamente impactados, devido a ocupação desordenada de suas margens e o lançamento de esgotos (GONÇALVES, 2005).

No estado do Espírito Santo as lagoas costeiras Maringá, Juara e Jacuném localizadas na Serra, região metropolitana são importantes ecossistemas utilizados pela população. Essas lagoas são usadas como corpos receptores de efluentes, fins paisagísticos, turismo, pesca e recreação. Alguns estudos de qualidade de água, análise do fitoplâncton e presença de cianotoxinas tem sido realizado nestas lagoas. As variáveis ambientais encontradas neste estudo e em outros estudos podem ser visualizadas nas tabelas 9, 10 e 11 (SERRA, 2007; MARTINS, 2010; ALMEIDA, 2011; OLIVEIRA, 2011; SCHADE et al., 2011; DUARTE et al., 2012; ANTUNES, 2013).

Tabela 9 – Comparações dos valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas detectadas no presente estudo e dados da literatura para a lagoa Maringá (Serra, ES).

Lagoa Maringá		
Variáveis	Schade et al. (2011)	Presente estudo
Período de coleta	Março e Julho (2010)	Fev - Dez (2013)
n° coletas	2	6
Parâmetros:	mín - máx	mín - máx
Temperatura água (°C)	25,6 - 28,9	21 - 30
pH	3,3 - 4,2	6,8 - 8,9
Turbidez (uT)	13,4 - 31,7	15,7 - 916
O.D (mg/L)	1,1 - 7,9	ND - 7,2
DBO (mg/L)		13 - 81
DQO (mg/L)		57,1 - 353,9
NTK (mg/L)		3,2 - 19,9
Clorofila -a (µg/L)	13,9 - 39,1	105,75 - 1532,5
P total (mg/L)		0,32 - 3,02

Tabela 10 – Comparações dos valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas detectadas no presente estudo e dados da literatura para a lagoa Juara (Serra, ES).

Lagoa Juara						
Variáveis	Presente estudo	SERRA, (2007)	Antunes, (2013)	Almeida, (2011)	Oliveira, (2011)	Martins, (2010)
Período de coleta	Fev - Dez (2013)	1999 – 2007	Mar (2011) - Mai (2012)	Dez (2009) - Jan (2010)	Set (2009) - Mar (2010)	Out e Nov (2009)
n° coletas	6	11	15	31	6	2
Parâmetros:	mín - máx	mín - máx	mín - máx	mín - máx	mín - máx	mín - máx
Temperatura água (°C)	22 - 31	24,9 -30,7	12 - 22	31,4 - 32,5		29,7
pH	7,4 - 9,3	6,5 - 9	6,5 - 10,2	7,2 - 7,7	6 - 7,5	6,7 - 6,8
Turbidez (uT)	9 - 85	8 - 60	3,6 - 54,2	6,7 - 8,5	5 - 35	7 - 11
O.D (mg/L)	4 - 12	2,8 - 14,7	2,9 - 14,4	5,8 - 7,3		
DBO (mg/L)	16 - 49	2 - 20				2 - 2,5
DQO (mg/L)	38 - 1167					0 - 32
NTK (mg/L)	0,3 - 4,6	0,06 - 9,9	0,3 - 4,7	0,25 - 0,6	0,3 - 1,35	0,5 - 0,8
Clorofila- <i>a</i> (µg/L)	56,2 - 422,5		22 - 611		10 - 230	7,8 - 7,9
P total (mg/L)	0,1 - 0,8	<0,1 - 0,4	0,01 -1,09	0,01 - 0,04	0,02 - 0,2	0 - 0,01

Tabela 11 – Comparações dos valores mínimos e máximos das variáveis físico-químicas detectadas no presente estudo e dados da literatura para a lagoa Jacuném (Serra, ES).

Lagoa Jacuném					
Variáveis	Presente estudo	SERRA, (2007)	Antunes, (2013)	Duarte <i>et al.</i> (2012)	Martins, (2010)
Período de coleta	Fev - Dez (2013)	2000 - 2007	Mar (2011) – Mai (2012)	Ago e Set (2010)	Out e Nov (2009)
n° coletas	6	11	15	2	2
Parâmetro	mín - máx	mín – máx	mín - máx	mín - máx	mín - máx
Temperatura água (°C)	23 - 31	21,9 - 33,3	22 - 32	24,1 - 24,9	25,3 - 27,2
pH	8,5 - 9,5	5,7 – 10	6,5 - 10,2	6 - 6,2	6,9
Turbidez (uT)	51,8 - 89,6	8 – 102	14 - 378,8	6 - 46	13-42
O.D (mg/L)	7,3 - 15,9	3,2 -11,2	2,9 - 15,4	3,7 - 6,8	
DBO (mg/L)	10,7 - 33,5	3,8 – 50		5,1 - 38	5 - 20
DQO (mg/L)	50,1 - 248,5			28 - 57	23 - 31
NTK (mg/L)	0,8 - 2,8	0,04 - 8,9	0,9 - 7,1	0,1 - 2,4	1,4 - 2,5
Clorofila- <i>a</i> (µg/L)	294,5 - 488,7		83 - 1099	50 - 309	65,4 - 84,2

P total (mg/L)	0,2 - 0,7	>0,05 - 0,8	0,04 - 0,8	<0,1 - 0,5	0 - 0,3
----------------	-----------	-------------	------------	------------	---------

6.1 Parâmetros de qualidade de água

A temperatura é um importante parâmetro na avaliação da qualidade da água, pois influência nos processos biológicos, como a produtividade de biomassa, e nos processos químicos que ocorrem na coluna d'água, como dissolução do oxigênio dissolvido e de nutrientes. A temperatura superficial da água é influenciada por diversos fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade (ESTEVEES, 1998; CETESB, 2008).

Os ambientes aquáticos brasileiros apresentam em geral temperaturas na faixa de 20 °C a 30 °C (BRASIL, 2006). No presente estudo essa faixa de variação foi encontrada. As lagoas Maringá, Juara e Jacuném apresentaram temperaturas médias de 25°C. No estudo Chorus & Bartram, 1999 verificaram que em temperaturas superiores a 25°C as cianobactérias apresentam altas taxas de crescimento. Jöhnk *et al.* (2008) constataram que *Microcystis sp.* obtém maior taxa de crescimento em temperaturas acima de 23°C e quando comparadas com algas verdes e diatomáceas apresentam maior competitividade e sucesso na competição ecológica. Estudos prevendo o aumento de temperatura devido ao aquecimento global revelam grande preocupação no desenvolvimento acelerado de cianobactérias formando florações e a produção de cianotoxinas nos corpos d'água (NICKLISCH *et al.*, 2008; EL-SHEHAWY *et al.*, 2012).

A turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la, devido à presença de sólidos em suspensão, tais como partículas inorgânicas (areia, silte e argila) e detritos orgânicos (algas e bactérias, plâncton em geral). De acordo com CETESB, 2009 altos valores de turbidez estão relacionados com períodos chuvosos, pois pode ocorrer erosão do solo aumentando o material particulado via escoamento superficial e a força da chuva pode ressuspender o sedimento do fundo da lagoa e o aumento da turbulência. Este fato pode ser observado nas lagoas Juara e Jacuném, em que houve o aumento dos valores de turbidez nos meses de maior precipitação pluviométrica. No entanto na lagoa Maringá os altos valores de turbidez nos meses de abril e junho, período de pouca chuva, pode ser explicado pela presença de macrófitas e pelo alto teor de matéria orgânica. Sabe-se que o despejo de esgoto doméstico e industrial também contribui para o aumento da turbidez.

Em geral, os corpos d'água continentais apresentam pH entre 6,00 e 8,50. O pH da água interfere de diversas maneiras no metabolismo dos organismos, tendo como exemplo a alteração da permeabilidade celular. As comunidades aquáticas também interferem nos valores de pH, exemplo; o processo de fotossíntese, pode elevar o pH da água devido a assimilação do íon carbonato (ESTEVES, 2011). No presente estudo, a lagoa Maringá apresentou elevação do pH no mês de dezembro, mesmo período em que a concentração da clorofila-*a* atingiu o maior nível (1532,00 µg/L) e maior concentração de oxigênio dissolvido. O pH da água pode apresentar diferenças significativas ao longo do dia devido as reações bioquímicas (ESTEVES, 2011). Os valores de pH básicos encontrados na lagoa Jacuném pode estar associado a alta atividade fotossintética no momento da coleta devido ao horário (11h30min) e as altas concentrações de oxigênio dissolvido.

De acordo com CETESB, 2006 geralmente florações tóxicas ocorrem nas seguintes condições: pH elevado, oxigênio dissolvido em valores próximos à saturação ou acima e a temperatura da água elevada. Essas condições foram encontradas no mês de dezembro na lagoa Maringá, nos meses de agosto e outubro na lagoa Juara e em todo o estudo na lagoa Jacuném. Na última coleta pôde ser observado a formação de uma camada verde próximo às margens da lagoa Jacuném, indicativo de grande proliferação de cianobactérias.

A DBO é o parâmetro utilizado para medir o consumo de oxigênio dissolvido requerido por bactérias nas reações de oxidação da matéria orgânica, bem como quantificar a matéria orgânica biodegradável presente nos corpos d'água e esgotos. Altos valores de DBO indicam contaminação por poluentes de origem doméstica. A DQO quantifica toda a matéria orgânica presente nas amostras através da oxidação por um agente químico. A relação DBO e DQO indica quanto à matéria orgânica presente na amostra é biodegradável (LACERDA, 1999; VON PERLING, 2005; CETESB, 2006). No presente estudo foi encontrada grande variação de biodegradabilidade nas amostras de água das lagoas, indicando que a matéria orgânica presente pode ser de origem de esgoto doméstico e industrial.

O alto teor de matéria orgânica pode levar à completa depleção do oxigênio na água, provocando sérias alterações sobre a comunidade aquática (CETESB, 2011). Foram observados altos índices de DBO e níveis baixíssimos de oxigênio dissolvido nos meses

de abril e junho na lagoa Maringá, período em que a lagoa estava coberta por macrófitas. A proliferação de macrófitas nesta lagoa tem sido constantemente relatada pelos estudos de Machado *et al.* (2007) e Schade *et al.* (2011). Os baixos valores de oxigênio dissolvido decorrem do aporte de grandes cargas de matéria orgânica e resíduo industrial. O processo de decomposição da matéria orgânica por oxidação consome o oxigênio dissolvido na água, influenciando no crescimento microbiano e no crescimento das algas, fazendo com que diminua o oxigênio dissolvido (GERTEL *et al.*, 2003; BIRUNGI *et al.*, 2007; CETESB 2011; ESTEVES, 2011).

No estudo de Gomes, 2012 não foi observada correlação direta entre os valores de DBO e DQO com florações de cianobactérias. Porém sabe-se que altos índices desses parâmetros, contudo, estão relacionados à degradação de matéria orgânica e consumo de nutrientes (LACERDA, 1999; VON SPERLING, 2005), que por sua vez possuem possível relação com a floração das cianobactérias (FALCONER & HUMPAGE, 2006; WIEDNER *et al.*, 2007, VIDAL & KRUK, 2008).

O nitrogênio é um nutriente que pode limitar o crescimento microbiológico em ambientes naturais ou artificiais. As principais fontes de nitrogênio são os íons nitrato, nitrito, amônio e muitos compostos nitrogenados orgânicos dissolvidos (ureia, aminoácidos e peptídeos), estes são utilizados pelos organismos para sintetizar aminoácidos e proteínas (LUQUE *et al.*, 1994; MURO-PASTOR & FLORÊNCIO, 2003; HORNES *et al.*, 2010).

A lagoa Maringá apresentou grande concentração de NTK, valores variando de 3,26 a 19,90 mg/L. Sabe-se que o efluente tratado pela ETE CIVIT II é lançado no córrego Maringá e este desagua na lagoa Maringá. Os altos valores de NTK podem ser ocasionados pela ineficiência do tratamento do efluente e pelo lançamento de esgoto clandestino.

A lagoa Juara apresentou concentrações de NTK variando de 0,06 a 4,65 mg/L. Variações semelhantes foram observados nos estudos de Serra, (2007) e Antunes (2013) e superiores ao que foi encontrado nos estudos de Almeida, (2011) e Oliveira, (2011) (tabela 10).

A lagoa Jacuném apresentou concentrações de NTK variando de 0,80 - 2,80 mg/L em pH alcalino. Comparado com o presente estudo, SERRA, (2007) e Antunes, (2013)

apresentaram maior variação de NTK e pH. Enquanto que os estudos de Martins, (2010) e Duarte *et al.* (2012), apresentaram valores menores de NTK para pH levemente ácido (Tabela 11).

O nitrogênio e o fósforo são elementos essenciais para vida dos organismos sendo considerados nutrientes limitantes para a produtividade primária em sistemas de água doce. Algumas espécies de cianobactérias possuem estruturas com capacidade de assimilar nitrogênio da atmosfera (heterocitos), neste grupo de organismos o fósforo torna-se o nutriente limitante do crescimento. Concentrações de fósforo inferiores a 0,10 mg/L são suficientes para induzir florações de cianobactérias, portanto a forma de contenção de florações está no controle da origem do fósforo no ambiente (BARTRAM *et al.*, 1999; HAVENS *et al.*, 2003).

No presente estudo todas as concentrações de fósforo encontradas foram iguais ou superiores a 0,10mg/L, alcançando o valor máximo na lagoa Maringá de 3,02 mg/L. De acordo com os resultados expostos na tabela 9, as concentrações de fósforo encontrada na lagoa Juara foi similar aos estudos de Serra, (2007) e Antunes, (2013) e muito superior aos valores detectados por Martins, (2010), Almeida, (2011) e Oliveira, (2011). O estudo de Martins, (2010) sugere que a baixa concentração detectada foi devido ao período de coleta em época de chuva. A concentração de fósforo na lagoa Jacuném esteve dentro das variações descritas nos estudos de Serra, (2007), Martins, (2010), Duarte *et al.* (2012) e Antunes (2013).

A eutrofização dos corpos d'águas pode ser classificada pelo IET, que possui por finalidade avaliar a qualidade da água quanto ao enriquecimento por nutrientes, principalmente o fósforo, e seu efeito relacionado à proliferação excessiva de algas e/ou macrófitas aquáticas (CARLSON, 1977; TOLEDO Jr. *et al.*, 1983). Todas as amostras estudadas apresentaram altas concentrações de fósforo e clorofila, e de acordo com o IET foram classificadas como hipereutróficas. Atividades antrópicas, tais como despejos de esgoto doméstico ou industrial e insumos agrícolas nos recursos hídricos, vêm causando perda da qualidade da água e aumentando do grau de eutrofização (ESTEVES, 1988).

De acordo com o estudo de Léllis *et al.* (2013), no ano de 2000 a lagoa Juara foi classificada como oligo-mesotrófica em quase a toda sua extensão, exceto na porção final, classificada como eutrófica. Esta porção eutrofizada é devida o elevado aporte de

nutrientes e matéria orgânica aos córregos Dr. Robson que recebe efluente da ETE Serra Dourada e o córrego Laranjeiras, que drena bairros com grande precariedade de saneamento básico. Já no ano 2009 a lagoa apresenta grande mudança em seu estado trófico, observando-se inclusive condições hipereutróficas na porção final da lagoa, bem como um aumento significativo do estado trófico em toda sua extensão (LÉLLIS, 2010). A lagoa Jacuném serviu de manancial para o abastecimento público até fins de 1983, ano em que foram desativados os sistemas de captação e tratamento convencional, devido o seu alto grau de eutrofização.

6.2 Análise de microcistinas

Dentro da legislação brasileira há somente limites de cianotoxinas para os corpos d'águas destinadas ao abastecimento público, as lagoas Maringá, Juara e Jacuném que foram estudadas não são utilizadas para captação de água para abastecimento, porém são utilizadas para recreação, fim paisagístico, pesca, criação de tanques de peixe (Juara) e turismo.

A presença de microcistinas nas lagoas estudadas pode provocar danos à saúde das pessoas que a utilizam. O contato de banhistas com cianobactérias das lagoas pode provocar irritação de pele e aumento da probabilidade de problemas gastrointestinais (PILOTTO *et al.*, 1997; EPA, 2012). Mesmo em baixas concentrações de MCs, há o risco de exposição através da acumulação em peixes; a bioacumulação é uma rota potencialmente importante para os seres humanos (MAGALHÃES *et al.*, 2001; FERRÃO-FILHO & KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011).

Na lagoa Maringá foi observado a presença de microcistinas nos meses de fevereiro e junho, sendo que em junho a concentração foi maior de 1,00µg/L. Na literatura pesquisada não houve estudos investigando a presença de microcistinas nesta lagoa.

Na lagoa Juara foi detectada a presença de MCs em todo o período amostral, exceto no mês de dezembro, sendo que a maior concentração encontrada foi de 18,80µg/L. Estudos de Martins, (2010) e Antunes, (2013) também detectaram a presença de microcistinas nesta lagoa, de níveis indetectáveis a concentrações superiores a 2,00 µg/L pelo método de CLAE. Antunes, (2013) encontrou a toxina em 67% das 15

amostras analisadas para a lagoa Juara, sendo que 40% destas apresentavam concentrações superiores a 1,00 µg/L de microcistinas.

Das quatro amostras de água analisadas da lagoa Jacuném duas apresentaram a presença de microcistinas, sendo a maior concentração detectada de 8,94 µg/L. O estudo de Martins, (2010) detectou concentrações de 0,41 e 4,78 µg/L para a mesma lagoa. Antunes, (2013) detectou a presença de MCs em 83% das 15 amostras analisadas, sendo que cerca de 50% das amostras positivas estavam em concentração acima de 1,00 µg/L.

No Brasil existem alguns estudos que avaliam a presença de MC em reservatórios d'águas, principalmente aos que servem para o abastecimento público. Os estudos variam de níveis não detectáveis a 223,60 µg/L de microcistinas. No Paraná foi detectado concentrações que variaram de 0,20 a 6,60 µg/L (HIROOKA *et al.*, 1999), 0,50 a 100,00 µg/L em São Paulo (NOBRE, 1997), 0,50 a 1,11 µg/L em Minas Gerais (JARDIM, 1999), níveis não detectáveis a 1,25 µg/L no Pará (VIEIRA *et al.*, 2005), níveis não detectáveis a 8,80 µg/L no Rio grande do Norte (COSTA, 2003) e 28 a 45 µg/L, São Paulo (SOTERO-SANTOS *et al.*, 2006) e no Rio de Janeiro 1,20 e 4,50 µg/L (FERRÃO FILHO *et al.*, 2009); São Paulo e Pernambuco níveis não detectados a 223,60 µg/L (OLIVEIRA *et al.*, 2010a).

Estudo realizado em lagos eutróficos a hipereutróficos em Singapura encontraram concentrações de MCs variando >0,15 a 14,40 µg/L (TE *et al.*, 2011), variação de concentração de microcistinas similar ao detectado nas amostras de água do presente estudo. Já o estudo de Xie *et al.* (2012) em lagos hipereutróficos detectaram uma variação de concentração de MCs menor do que o presente estudo, > 0,01 a 0,08 µg/L.

Com relação à presença das variantes de microcistinas -RR, -YR, -LR e -LA nas amostras, observou-se a LR como a mais prevalente. Das mais de 90 isoformas de microcistinas a variante LR é caracterizada como a mais frequente em amostras ambientais e também a mais tóxica (SIVONEN e JONES, 1999; GUPTA *et al.*, 2003; PEARSON *et al.*, 2010). A LR já foi identificada em estudos de vários países do mundo, como em Marrocos (OUDRA *et al.*, 2001; OUDRA *et al.*, 2002), França (MAATOUK *et al.*, 2002), Estados Unidos (GRAHAM *et al.*, 2004), Espanha (ABOAL & PUIG, 2005), Brasil (CARVALHO *et al.*, 2007), China (DAI *et al.*, 2008), Turquia (GURBUZ *et al.*, 2009) e Itália (MESSINEO *et al.*, 2009). Outra variante presente foi a

RR, detectada nas amostras de água das lagoas Juara e Jacuném. A variante RR é cinco vezes menos tóxica comparada com a LR (GUPTA *et al.*, 2003) e embora não tão frequente a variante RR tem sido detectada por outros estudos no Brasil, como relatado por Guedes, (2013) no reservatório do Rio de Janeiro, Anjos *et al.* (2006) no reservatório em São Paulo e Amé *et al.* (2010) em um lago na Argentina.

6.3 Detecção gênica de cianobactérias

A avaliação da presença de cianobactérias nas amostras de água foi realizada pela amplificação gênica da região PC-IGS, responsável pela produção de pigmento fotossintético ficocianina, característico de cianobactérias. O operon PC possui uma região de espaço intergênico entre dois genes, *cpcB* e *cpcA*, que é uma região hipervariada e auxilia na identificação de diferentes linhagens de cianobactérias (NEILAN *et al.*, 1995). No presente estudo foi detectado o gene para a ficocianina em todas as amostras, exceto nos meses de abril e dezembro na lagoa Maringá. O iniciador molecular utilizado foi desenhado por Neilan *et al.* (1995) e tem sido amplamente utilizado na detecção de cianobactérias, como nos estudos de Oliveira *et al.* (2001) e Anjos *et al.* (2006) em amostras de reservatórios d'água em São Paulo, por Pimentel, (2009) em um reservatório em Minas Gerais, por Krienitz *et al.* (2013) em um lago no Kênia e por Beversdorf *et al.* (2013) em um lago eutrofizado nos EUA.

A identificação de cianobactérias potencialmente tóxicas foi realizada pela amplificação da região do genoma *mcvB* e *mcvD*. Os iniciadores moleculares escolhidos neste trabalho foram desenhados a partir de sequências gênicas de cepas potencialmente tóxicas brasileiras (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PIMENTEL *et al.*, 2013). De acordo com Oliveira *et al.* (2010) as cianobactérias apresentam grande variabilidade genética e iniciadores moleculares desenhados para cepas de ambientes temperados podem subestimar cepas tóxicas brasileiras.

O gene *mcvB* foi identificado em 81,2% (13/16) das amostras de água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném. A determinação de potencialidade de produção de toxina pela detecção do gene *mcvB* é bastante utilizando em vários trabalhos pelo mundo. No Brasil, Oliveira *et al.* (2010 a e b) utilizando os mesmos iniciadores genômicos detectaram 92,6 - 100% de cianobactérias potencialmente tóxicas nas amostras de água

dos reservatórios de São Paulo e Pernambuco. Oliveira *et al.* (2003) utilizando outros iniciadores para a região do gene *mcyB*, nos reservatórios de água do sul, sudeste e nordeste do Brasil observaram que 30% (18/60) das amostras apresentaram cianobactérias potencialmente tóxicas. Anjos *et al.* (2006) também detectaram a presença de MCs e o gene *mcyB* em um evento de floração de cianobactérias na represa Billings em São Paulo. Estudos de Mankiewicz-Boczek *et al.* (2006) e Głowacka *et al.* (2011) em lagos poloneses detectaram 96% e 77,8%, respectivamente, Dyble *et al.* (2008) encontraram 71,5% em dois lagos nos EUA, nos estudos de Te *et al.* (2011) e Fathalli *et al.* (2011) este gene esteve presente em todas as amostras analisadas provenientes de reservatórios na Tunísia e Singapura, respectivamente.

Foram detectadas 87,5% (14/16) do gene *mcyD* das amostras de água das lagoas Maringá, Juara e Jacuném. Pimentel *et al.*, (2013) encontraram a presença do gene *mcyD* em todas as amostras de água provenientes de um reservatório em Minas Gerais. Outros estudos realizados com iniciadores desenhados para *mcyD* detectaram 84% a 100% de cianobactérias potencialmente tóxicas (MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2006; FATHALLI *et al.*, 2011, TE *et al.*, 2011).

As cianobactérias apresentam grande variabilidade genética e muitos estudos utilizaram iniciadores genômicos para mais de uma região do gene *mcy* para detectar cepas potencialmente tóxicas (MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2006; HOTTO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FATHALLI *et al.*, 2011, GŁOWACKA *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011; TE *et al.*, 2011; CONRADIE *et al.*, 2012). No presente estudo, todas as amostras de água que apresentaram o fragmento do gene *mcyD* também apresentaram o fragmento do gene *mcyB*, exceto uma que apresentou somente o *mcy D*. Os iniciadores para *mcyB* utilizados neste trabalho foram desenhados a partir de sequências gênicas de cepas do gênero *Microcystis* enquanto que os iniciadores para a região *mcyD* foram para os gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*. Talvez, a diferença do resultado entre essas duas regiões do genoma desta amostra de água possa ser cepas pertencentes aos gêneros *Anabaena* e/ou *Planktothrix*, pela diferença de especificidade do próprio iniciador genômico ou pela alta diversidade genômica das cianobactérias.

O estudo de RINTA-KANTO *et al.* (2005) em amostras de água do lago Erie nos EUA utilizando iniciadores para as regiões genes *mcyB* e *D* do genoma também encontram diferença de positividade entre as regiões. Hotto *et al.* (2007) utilizaram marcadores

moleculares para os genes *mcyB* e *D* e algumas amostras foram somente positivas para a região B ou D. Te *et al.* (2011) encontraram a mesma positividade para os genes *mcyB* e *D*, porém outras regiões analisadas apresentam diferentes níveis de detecção (96,3% *mcy A*, 41% *mcy C* e 98,1% *mcy E*).

No presente estudo 14 amostras apresentaram a presença do gene *mcy* por PCR e destas somente nove foram detectadas microcistinas por CLAE. Por outro lado, nenhuma amostra negativa para os genes *mcyB* e *mcyD* por PCR foi detectada a toxina. Outros estudos também detectaram o gene *mcy*, e este nem sempre estaria sendo expresso. O estudo de Fathalli *et al.* (2011) em corpos d'água na Tunísia identificaram a presença do gene *mcyA* por PCR em amostras de cianobactérias filamentosas e não detectaram microcistinas pelo método MALD-TOF. Fortin *et al.* (2010) detectaram cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas por PCRq e nem em todas essas amostras foram detectadas microcistinas por CLAE, em um lago no Canadá. O estudo de Regueiras, (2009) também encontrou o gene *mcy* em amostras de água do rio Tâmega em Portugal por PCR e nem em todas as amostras foram detectadas microcistinas pelos métodos MALDI-TOF, Elisa e HPLC.

O método de detecção gênica de cianobactérias potencialmente tóxicas mostrou-se efetiva no monitoramento da qualidade das águas nessas lagoas. A presença do gene *mcy* prevê o potencial de produção da microcistinas e esta informação pode ser utilizada para tomadas de medidas de prevenção aos problemas de saúde pública, uma vez que permite a aplicação de medidas corretivas antecipadamente. O uso de técnicas moleculares em combinação com a quantificação da toxina providencia uma informação completa para proteção da população de riscos para a saúde.

7 CONCLUSÕES

- As lagoas Maringá, Juara e Jacuném apresentaram-se hipereutróficas durante todo o período de estudo e apresentaram condições ambientais (temperatura, pH, fósforo, nitrogênio e clorofila *a*) favoráveis para o desenvolvimento de florações de cianobactérias.
- Foram detectadas as variantes LR, YR e RR de microcistinas. Dentre essas a variante LR foi a mais frequente, seguida da RR e YR. A concentração de microcistinas nas lagoas variou de níveis não quantificáveis ($>0,70 \mu\text{g/L}$) a $18,80 \mu\text{g/L}$.
- Foi verificada a presença de cianobactérias em todo o período de estudo nas lagoas, exceto nos meses de abril e dezembro na lagoa Maringá. Em todas as amostras que apresentaram cianobactérias também foi detectado a presença do gene *mcy*, responsável pela codificação de microcistinas.
- A presença de cianobactérias potencialmente tóxicas e a ocorrência de microcistinas, indicam que estes corpos d'água oferecem riscos à saúde da população. A contaminação humana por microcistinas pode ocorrer por exposição direta via recreação ou por exposição indireta pelo consumo de pescado provenientes destes mananciais.

8 RECOMENDAÇÕES

- Analisar a diversidade de gêneros de cianobactérias e quantificar genótipos potencialmente tóxicos presentes nas lagoas correlacionando com a concentração de microcistinas no ambiente
- Avaliar o potencial de bioacumulação de microcistinas em peixes com a finalidade de averiguar se o consumo do pescado oferece risco a saúde da população.
- Verificar se as microcistinas detectadas no presente estudo são moléculas ativas e se oferecem risco à saúde da população, através de testes toxicológicos.

9 REFERÊNCIAS

- ABOAL, M.; PUIG, M. Intracellular and dissolved microcystin in reservoirs of the river Segura basin, Murcia, SE Spain. *Toxicon*, v. 45, p. 509–518, 2005.
- ALMEIDA, S.Z. Ecologia de algas perifíticas em uma lagoa costeira com múltiplos usos (lagoa Juara, Serra, ES). Dissertação de mestrado. *Biologia Vegetal*. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, p. 79, Vitória 2011.
- AMÉ, M.V; NICOLA, L.S.; MENOME, M.L., GERPE, M.S. MORENO, V.J., WUNDERLIN, D.A. Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae*, v. 9, p. 66–73, 2010.
- ANDRADE, W.C. Análise dos teores de fenóis presentes na coluna d’água da lagoa maringá, Serra-ES. Monografia de oceanografia. Universidade Federal do Espírito Santo, p. 43, 2011.
- ANJOS, F.M.; OLIVEIRA, M.C.B.; ZAJAC, M.P.; HILLER,S.; CHRISTIAN, B.; ERLER, K.; LUCKAS, B.; PINTO, E. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon*, v. 48, p.239–245, 2006.
- ANTUNES, P.W.P. Otimização e desenvolvimento de sistemas de detecção de microcistinas em amostras de águas. Tese de doutorado. Engenharia Ambiental. UFES, p. 150, Vitória 2013.
- APELDOORN, M.E.V.; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS¹, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Review Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res*, v.51, p.7 – 60, 2007.
- APHA (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th Edition. American Public Health Association, Washington, DC.

- BARROSO, G. F. Lagoas costeiras do Espírito Santo: perspectiva para conservação. In: MENEZES, L. F. T, PIRES, F.R. e PEREIRA. O. J. Ecossistemas costeiros do Espírito Santo: conservação e restauração. Vitória: EDUFES, p. 71-86, 2007.
- BARTRAM J, CARMICHAEL WW, CHORUS I, JONES G, SKULBERG OM. Introduction. In: Chorus I, Bartram J, editors. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: WHO & E&FN Spon, p. 1–14, 1999.
- BEVERSDORF, L.J.; MILLER, T.R.; MCMAHON, K.D. The Role of Nitrogen Fixation in Cyanobacterial Bloom Toxicity in a Temperate, Eutrophic Lake. *Plos One*, v. 8, n.2, 2013.
- BIRUNGI, Z., MASOLA, B., ZARANYIKA, M.F., NAIGAGA, I. & MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case os Nakiubo wetland along Lake Victoria. *Physics and Chemistry of the Earth*, v. 32, p.1350-1358, 2007.
- BRANDÃO, L.H.; DOMINGOS, P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. *Saúde & Ambiente em Revista*, Duque de Caxias, v.1, n.2, p.40-50, jul-dez 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 212 p, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde (MS). Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, n. 239, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-52.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.
- CAI, Y.; KONG, F.; SHI, L.; YU, Y. Spatial heterogeneity of cyanobacterial communities and genetic variation of *Microcystis* populations within large, shallow

- eutrophic lakes (Lake Taihu and Lake Chaohu, China). *Journal of Environmental Sciences*, v.24, n.10, p. 1832–1842, 2012.
- CALIJURI, M. do C.; ALVES, M.S.A.; DOS SANTOS, A.C.A. *Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais*. São Carlos: RiMa, 2006.
- CARMICHAEL, W.W. A world view—One-hundred twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria—Where do we go from here? Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 619, p. 105–120, 2008.
- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, v.72, n.6, p.445-459, 1992.
- CARMICHAEL, W.W. Health effects of toxin-producing cyanobacteria: “The CyanoHABS”. *Hum. Ecol. Risk Assess*, n. 7, p. 1393–1407, 2001.
- CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.I.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M.J.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, v. 26, p. 971-973, 1988.
- CARVALHO, L. R.; SANT’ANNA, C. L.; GEMELGO, M. C.P.; AZEVEDO, M. T. P. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. *Revista Brasil. Bot.*, v.30, n.1, p.141-148, 2007.
- CASSINI, S.T.; ANTUNES, P.W.; KELLER, R. Validação de metodologia analítica livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, 2013.
- CATHERINE, Q.; SUSANNA, W.; ISIDORA, E.S.; MARK, H.; AURE’LIE, V.; JEAN-FRANÇOIS, H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria e Ecology, toxin production and risk management. *Water research*, v.47, p. 5464 - 5479, 2013.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias

- analíticas e de amostragem. Série relatórios, qualidade das águas interiores no estado de São Paulo, 2008.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Alterações físico-químicas, 2006. Disponível: http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_materia.php. Último acesso: 04/05/2014.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Alterações físico-químicas, 2011. Disponível: http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/_materia.php Último acesso: 10/05/2012.
- CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental Qualidade das águas interiores de São Paulo, 2009. Disponível: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>. Último acesso: 10/04/2013.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon, p.369-405, 1999.
- CHU, W.; LU, F.; ZHU, W.; KANG, C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. J. Appl. Microbiol., v. 110, n. 1, p. 202-208, 2010.
- CHURRO, C.; DIAS, E.; VALÉRIO, E. Risk Assessment of Cyanobacteria and Cyanotoxins, the Particularities and Challenges of Planktothrix spp. Monitoring - Novel Approaches and Their Applications in Risk Assessment, 2013.
- COLE, J. F. & JONES, C. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. Journal of Phycology, v. 36, p. 7-16, 2000.
- CONRADIE K. R.; BARNARD, S. The dynamics of toxic Microcystis strains and microcystin production in two hypertrophic South African reservoirs. Harmful Algae, v. 20, p. 1- 10, 2012.
- COSTA, I. Ecotoxicologia de cianobactérias em um reservatório eutrofizado do semiárido nordestino brasileiro. 179p. Tese (Doutorado) – UFSCAR, São Carlos, 2003.

- CYBIS, L.F.; BENDATI, M.M.; MAIZONAVE, C.R.M.; WERNER, V.R.; DOMINGUES, C.D. Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso da represa Lomba de Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico, 2006.
- DAI, R.; LIU, H.; QU, J.; RU, J. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. *Journal of Hazardous Materials*, v. 153, p. 470–477, 2008.
- De OLIVEIRA, M.M.; FILHO, M.V.S.; BASTOS, J.C.; NEVES, M.H.C.B. Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática. *Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego, Campos dos Goytacazes/RJ*, v. 4 n. 1, p. 57-80, jan. / jun. 2010.
- DITTMANN E, NEILAN BA, ERHARD M, VON DOHREN H & BORNER T Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol Microbiol*, v.26, p. 779–787, 1997.
- DITTMANN, E.; ERHARD, M.; KAEBERNICK, M.; SCHELER, C.; NEILAN, B.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER T. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*, v. 147, p. 3119-3133, 2001.
- DITTMANN, E.; FEWER, D.P.; NEILAN, B.A. Review article Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Rev* , v.37, p.23–43, 2013.
- DUARTE, I.D.; DIAS, M.C.; DAVID, O.J.A.; MATSUMOTO, S.T. A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 211-219, abr./jun. 2012.
- DYBLE, J.; FAHNENSTIEL, G.L.; LITAKER, R.W.; MILLIE, D.F.; TESTE, P.A. Microcystin Concentrations and Genetic Diversity of *Microcystis* in the Lower Great Lakes. *Environ Toxicol*, v.23, p. 507–516, 2008.

- ELLIOTT, J.A. Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n. 5, p. 1364-1371, 2012.
- EL-SHEHAWY, R.; GOROKHOVA, E.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F.; DEL CAMPO, F.F. Global warming and hepatotoxin production by cyanobacteria: What can we learn from experiments? *Water Research*, v. 46, p. 1420 e 1429, 2012.
- EPA (Environmental Protection Agency). *Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems*. United States, July-2012.
- ESTEVES, F.A. *Fundamentos de Limnologia* (Segunda edição). Ed. Interciência, Rio de Janeiro. 602p, 1998.
- ESTEVES, F.A. *Fundamentos de limnologia*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 3ª edição, p. 790, 2011.
- ESTEVES, Francisco A. **Fundamentos de Limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- FALCONER I. R., HUMPAGE A. R. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins in Water Supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology*. v. 21, p.299 – 304, 2006.
- FALCONER, I.R. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia*, v. 35, n.6, p. 6-11, 1996.
- FATHALLI, A.; JENHANIA, A.B.R.; MOREIRA, C.; WELKER, M.; ROMDHANE, M.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V. Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. *Systematic and Applied Microbiology*, v.34, p.303–310, 2011.
- FERRÃO-FILHO, A. S., SOARES M. C., ROCHA, M. I. A., MAGALHÃES, V. F., AZEVEDO S. M. F. O. Florações de Cianobactérias tóxicas no Reservatório do Funil: dinâmica sazonal e consequências para o zooplâncton. *Oecologia Australis*, v.13, n.2, p. 346-365, 2009.
- FERRÃO-FILHO, A.S. & KOZLOWSKY-SUZUKI, Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Mar. Drugs*, v. 9, p. 2729-2772, 2011.

- FERRÃO-FILHO, A.S.; MOLICA, R.; AZEVEDO, S.M.F.O. Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. *Oecologia Brasiliensis*, v.13, n. 2, p. 225-8, 2009.
- IORE, MF; GENUÁRIO, D.B.; SILVA, C.S.P. *et al.*; Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. *Toxicon*, v.53, p. 754–761, 2009.
- FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; ATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.203, p.257–263, 2005.
- FORTIN N, ARANDA-RODRIGUEZ R, JING H, PICK F, BIRD D, GREER CW. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. *Appl Environm Microbiol*, v.76, p.5105–5112, 2010.
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). *Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano*. Ministério da Saúde, Brasília, 2003.
- GERTEL, P.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; MALAGUTTI, E.N. Qualidade das águas dos córregos São Joaquim e ribeirão Claro, bacia do rio Corumbataí-SP, Brasil. *Holos Environment*, v.3, n.2, p.103-119, 2003.
- GŁOWACKA, J.; SZEFEL-MARKOWSKA, M.; WALERON, M.; ŁOJKOWSKA, E.; WALERON, K. Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies. *ABP – Acta Biochimica Polonica*, v. 58, n. 3, p. 321–333, 2011.
- GOLUBIC, S.; SEONG-JOO, L. Early cyanobacterial fossil record: preservation, palaeoenvironments and identification. *Eur. J. Phycol*, v. 34, p. 339-348, 1999.
- GOMES, J. Avaliação da floração da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* na represa de alagados, ponta grossa, Paraná. Dissertação de Mestrado, Meio Ambiente Urbano e Industrial, UFPR, Curitiba, 2012.
- GONÇALVES, M. A. Algas fitoplanctônicas na lagoa Juparanã (Linhares – ES): Variação espacial, temporal e bioindicadores do estado trófico. Dissertação de

- mestrado. *Biologia Vegetal*. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, p.120, Vitória 2005.
- GORHAM, P.R.; MACLACHLAN, J.R.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen - Internationale Vereinigung Theoretische und Angewandte Limnologie*, v. 15, p. 796-804, 1964.
- GRAHAM, J. L.; JONES, J.R.; JONES, S.B.; DOWNING, J.A.; CLEVINGER, T.E. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. *Water Research*, v.38, p. 4395–4404, 2004.
- GUEDES, I.A. diversidade e dinâmica de cianobactérias e produção de microcistinas no reservatório do Funil-RJ. Dissertação de mestrado. Instituto de biofísica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.
- GUPTA N, PANT SC, VIJAYARAGHAVAN R, LAKSHMANA RPV. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystins variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, v. 188, n.2-3, p. 285–296, 2003.
- GURBUZ, F.; METCALF, J.S.; KARAHAN, A.G.; CODD, G.A. Analysis of dissolved microcystins in surface water samples from Kovada Lake, Turkey. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 4038–4046, 2009.
- HAVENS, K.E., JAMES, R.T., EAST, T.L., SMITH, V.H. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution*, v. 122, p.379-390, 2003.
- HIROOKA, E.Y., PINOTTI, M.H.P., TSUTSUMI, T., YOSHIDA, F., UENO, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. *Natural Toxins*, v.7, p.103-109, 1999.
- HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, G. C. L.; SIVONEN, K.; BORNER, T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology*, v. 180, n. 6, p. 402-410, 2003.
- HORNES, M.; SILVA, A.G.; MITTERER, M.L.; QUEIROZ, M.I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece*

- microscopica Nägeli. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 30, n.2, p. 364-371, 2010.
- HOTTO, A.M.; SATCHWELL, M. F.; BOYER, G. L. Molecular Characterization of Potential Microcystin-Producing Cyanobacteria in Lake Ontario Embayments and Nearshore Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n14, 2007.
- HOTTO, A.M.; SATCHWELL, M.F.; BERRY, D.J.; GOBLRT, C.J.; BOYER, G.L. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 7, 671–681, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Características da População e dos Domicílios. Censo 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico de 2008, p. 40, Rio de Janeiro, 2010.
- IZYDORCZYK, K.; JURCZAK, T.; FRANKIEWICZ, A.W.; SKOWRON, A.; MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; TARCZYNSKA, M. Influence of abiotic and biotic factors on microcystin content in *Microcystis aeruginosa* cells in a eutrophic temperate reservoir. *Journal of plankton research*, v. 30, n. 4, p. 393–400, 2008.
- JIANG, Y.; BI, B.; WONG, R.N.S.; WONG, M.H. Statistical study on the effects of environmental factors on the grow and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium - *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*, v.7, p. 127-136, 2008.
- JÖHNK, K.D.; HUISMAN, J.; SHARPLES, J.; SOMMEIJER, B.; VISSER, P.M. & STROOM, J.M. Summer heatwaves promote florações of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*, v.14, p. 495-512, 2008.
- KHREICH, N.; LAMOURETTE, P.; RENARD, P. Y.; CLAVÉ, G.; FENAILLE, F.; CRÉMINON, C.; VOLLAND, H. A highly sensitive competitive enzyme immunoassay of broad specificity quantifying microcystins and nodularins in water samples. *Toxicon*, v. 53, p.551-559, 2009.
- KOKSHAROVA, O.A. Application of Molecular Genetic and Microbiological Techniques in Ecology and Biotechnology of Cyanobacteria. *MicrobiologY*, v. 79, n. 6, 2010.

- KRIENITZ, L.; DADHEECH, P.K.; FASTNER, J.; KOTUT, K. The rise of potentially toxin producing cyanobacteria in Lake Naivasha, Great African Rift Valley, Kenya. *Harmful Algae*, v. 27, p. 42 – 51, 2013.
- KUMAR, A; KUMAR, A.; RAI, A.K.; TYAGI, M.B. PCR-based detection of *mcy* genes in blooms of *Microcystis* and extracellular DNA of pond water. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, n. 4, p. 374-381, 2011.
- KURMAYER, R. & KUTZENBERGER, T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacteria *Microcystis* sp. *Appl Environ Microbiol*, v.69, p.6723–6730, 2003.
- LACERDA, L. D. *Ciencia Hoje na Escola 4 - Meio Ambiente – Águas*. Sbpcc Soc Bras Para O Progresso Da Ciência. Rio de Janeiro, 1999.
- LAMPARELLI, M. C. (2004). Grau de trofia em corpos d'água do estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento. *Apud: Variáveis de qualidade das águas*. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 08 dezembro de 2012.
- LANZER, R.M. lagoas costeiras: patrimônio ambiental do Rio Grande do Sul. *Cadernos do LEPAARQ - Textos de Antropologia, Arqueologia e Patrimônio*. Editora da UFPEL, v.2, n. 3. Pelotas, RS, Jan/Jul 2005.
- LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. Extraction and highperformance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. *Analyst*, v. 119, p. 1525-1530, 1994.
- LEAL, P. R. Avaliação de indicadores do estado trófico de uma lagoa Costeira: Lagoa Jacuném. 2006. 65f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.
- LÉLLIS, F.S. & BARROSO, G.F. Variação espaço-temporal do Índice de Estado Trófico (IET) em uma lagoa costeira tropical por meio de técnicas de geoprocessamento. *Geotecnologias para a Gestão de Áreas Marinhas e Costeiras: Integração e Compartilhamento*. Santos-SP, Brasil, maio 2013.

- LÉLLIS, F.S. Análise Ambiental de uma bacia hidrográfica como subsídio ao planejamento costeiro. Bacia da Lagoa Jacuném, Serra, Espírito Santo, Brasil. 2006. 91f. Monografia (Bacharelado em Oceanografia) – Graduação em Oceanografia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.
- LÉLLIS, F.S. Aplicação da abordagem DPSIR como estrutura para avaliação integrada da eutrofização e da qualidade da água das lagoas Jacuném e Juara, bacia do rio Jacaraípe, Serra (ES). Dissertação de Mestrado. Oceanografia e Ecologia. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo. 186p, 2010.
- LI, D.; KONG, F.; SHI, X.; YE, L.; YU, Y.; YANG, Z. Quantification of microcystin-producing and non-microcystin producing *Microcystis* populations during the 2009 and 2010 blooms in Lake Taihu using quantitative real-time PCR *Journal of Environmental Sciences*, v.24, n.2, p. 284–290, 2012.
- LORENZI, A.S. Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil. Dissertação de mestrado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo, 2004.
- LOURENÇO, L. Estudo aponta contaminação em 70% das águas superficiais do Brasil. Disponível em: <http://laurocampos.org.br/2008/03/estudo-aponta-contaminacao-em-70-das-aguas-superficiais-do-brasil/>. Último acesso 04/05/2014.
- LUQUE, I.; FLORES, E.; HERRERO, A. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *The EMBO Journal*, v. 13, n. 12, p. 2862-2869, 1994.
- MAATOUK, I.; BOUAÏCH, N.; FONTAN, D.; LEVI, Y. Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant. *Water Research*, v. 36, p. 2891–2897, 2002.
- MACHADO, L.P.; GARÇÃO, H.F.; FONTANA, G.H. DIAGNÓSTICO DA PROLIFERAÇÃO E DO NÍVEL DE INFESTAÇÃO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS NA LAGOA MARINGÁ, MUNICÍPIO DE SERRA (ES, BRASIL). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG, 2007.

- MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, v. 39, n. 7, p. 1077-85, 2001.
- MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; IZYDORCZYK, K.; ROMANOWSKA-DUDA, Z.; JURCZAK, Z.; STEFANIAK, K.; KOKOCINSKI, M. Detection and Monitoring Toxigenicity of Cyanobacteria by Application of Molecular Methods. *Environmental Toxicology*, p. 380 – 387, 2006.
- MARIANI, M.A., PADEDDA, B.M., Di CORCIA, A., MAZZA, R., CARLONI, E., BRUNO, M. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica*. v.39, n.2, p.95–106, 2009.
- MARTINS, C.F. Avaliação da presença de microcistina-LR por HPLC-PDA em amostras de mananciais da Região da Grande Vitória. Dissertação de Mestrado, Engenharia Ambiental, UFES, Vitória, 2010.
- MCELHINEY, J. & LAWTON, L.A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.219– 230, 2005.
- MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. Review State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, v.59, p.303–327, 2013.
- MESSINEO, V., BOGIALLI, S., MELCHIORRE, S., SECHI, N., LUGLIE, A., CASIDDU, P., MARIANI, M.A., PADEDDA, B.M., Di CORCIA, A., MAZZA, R., CARLONI, E., BRUNO, M. (2009). Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. *Limnologica*. v.39, n.2, p.95–106.
- MOHEBBI, F.; MOHSENPOUR- AZARI, A.; HEIDARI, M.; ASEM, A. Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Bloom in Aras Dam Reservoir. *Int. J. Environ. Res.*, v.6, n.1, p.309-312, Winter 2012.
- MOLICA, R.; AZEVEDO, S.M.F.O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. *Oecologia Brasiliensis*, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.
- MORELLI, L. Aumenta a poluição da água. Disponível em: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua doce/aumenta a poluicao da agua.html. Último acesso 04/05/2014.

- MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Review Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*, v. 78, p.382–397, 2006.
- MURO-PASTOR, M. I.; FLORENCIO, F. J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, n. 6-7, p. 595-603, 2003.
- NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol*, v. 65, p.3875–3883, 1995.
- NETTO, O.M.C. & TUCCI, C.E.M. Os desafios em ciência, tecnologia & inovação – resultados alcançados com o fundo setorial de recursos hídricos. *Cienc Cult*, v.55, n.4 São Paulo Oct./Dec. 2003.
- NICHOLSOM, B.C.; BURCH, M.D. Evaluation of analytical methods for detection e quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines.Cooperative Research. Autralia: Commonwealth of Australia, 2001.
- NICKLISCH, A.; SHATWELL, T. & KÖLLER, J. Analysis and modeling of the interactive effects of temperature and light on phytoplankton growth and relevance for the spring bloom. *Journal of Plankton Research*, v. 30, n.1, p. 75-91, 2008.
- NOBRE, M.M.Z.A. Detecção de toxinas (microcistinas) produzidas por cianobactérias (algas azuis) em represas para abastecimento público, pelo método de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) e identificação química. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 154p, 1997.
- OLIVEIRA, L.B. variação espaço-temporal das respostas ecofisiológicas da comunidade fitoplanctônica em uma lagoa costeira tropical com múltiplos usos: lagoa Juara (Serra, ES). Dissertação de mestrado. *Biologia Vegetal*. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, p.145, Vitória 2011.
- OLIVEIRA, M. C.B. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a mcyB molecular marker. *Harmful Algae*, n. 2, p. 51–60, 2003.
- OLIVEIRA, M. C.B.; OLIVEIRA, M.C.; BOLCH, C.J.S. Genetic variability of brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex

- (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). *J. Phycol.*, v.37, p.810–818, 2001.
- OLIVEIRA, M. C.B; SANTOS, D.M.S.; Toxic cyanobacteria in reservoirs in northeastern Brazil: detection using a molecular method. *Braz. J. Biol.*, v.70, n.4, p.1005-1010, 2010.
- OLIVEIRA, M. C.B; SANTOS, V.P.; BARROS, S.G. Microcystin-Producing Genotypes from Cyanobacteria in Brazilian Reservoirs. *Environmental Toxicology*, 2010.
- LOUDRA, B.; Loudiki, M.; Sbiyyaa, B.; Martins, R.; Vasconcelos, V.; Namikoshi, N. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated bloom of Lalla Takerkoust lake reservoir (Morocco). *Toxicon*, v. 39, n. 9, p. 1375 -1381, 2001.
- LOUDRA, B.; LOUDI KI, M.; SBY YAA, B.; SABOUR, B.; MARTINS, R.; AMORI, A.; VASCONCELOS, V. Detection and variation of microcystin contents of *Microcystis* blooms in eutrophic Lalla Takerkoust Lake, Morocco. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, v. 7, p. 35–44, 2002.
- PAERL, H.W.; FULTON, R.S.; MOISANDER, P.H.; DYBLE, J. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The scientific world*, v.1, p. 76-113, 2001.
- PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar. Drugs*, 8, 1650-1680, 2010.
- PEARSON, L.; NEILAN, B.A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Current Opinion in Biotechnology*, v.19. p.281-288, 2008.
- PEREIRA-JÚNIOR, Recursos hídricos - conceituação, disponibilidade e usos. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados, 2004.
- PILOTTO, L.S.; DOUGLAS, R.B.; BURCH, M.D.; CAMERON, S.; BEERS, M.; ROUCH, G.J.; ROBINSON, P.; KIRK, M.; COWIE, C.T.; HARDIMAN, S.; MOORE, C.; ATTEWELL, R.G. Health effects of recreational exposure to

- cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. Zealand J. Public Health*, n. 21, p. 562-566, 1997.
- PIMENTEL, J.S.M. Quantificação de cianobactérias produtoras de microcistinas no reservatório de Furnas (MG) através da PCR em tempo real, e sua relação com os fatores ambientais. Dissertação de mestrado. *Biologia Vegetal*. UFMG Universidade Federal do Espírito Santo, p. 95, 2009.
- PIMENTEL, J.S.M.; GIANI, A. Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. *J Appl Phycol*, 2013.
- PMS - Prefeitura Municipal da Serra (2009). Recursos Naturais: Bacias Hidrográficas. Disponível em: <<http://app.serra.es.gov.br/semma/>>. Acesso em: 15 de outubro de 2012.
- PROSAB - Edital 4. Tema Água. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 2006.
- RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. *Analytica Chinica Acta*. n.466, p.213-231, 2002.
- REGUEIRAS, A.V.B. Comparação de métodos de identificação e quantificação de cianobactérias e suas toxinas na Albufeira do Torrão (Rio Tâmega). Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, P. 127, 2009.
- RINTA-KANTO, J.M.; KONOPKO, E.A.; DEBRUYN, J.M.; SMITH, J.L.; MARVIN, C.H.; KRIEGER, K.A.; SAYLER, J.S.; BOYER, G.L.; WILHELM, S.W. Lake Erie Microcystis: relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae*, v.8, p.665–673, 2009.
- RUNNEGAR, M.T.; FALCONER, L.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. 268-272, 1981.

- SANGOLKAR, L.N.; MASKE, S.S; CHAKRABARTI, T. Review Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research*, v. 40, p.3485 – 3496, 2006.
- SANT’ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, v. 71, n. 3/4, p. 359-385, 2000.
- SANTOS, V.P. Filogenia molecular de cianobactérias baseada em sequências do 16S-23S-ITS rDNA e PC-IGS: investigação de transferência lateral do PC. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.
- SAQRANE, S. & OUDRA, B. CyanoHAB Occurrence and Water Irrigation Cyanotoxin Contamination: Ecological Impacts and Potential Health Risks (A Review). *Toxins*, v.1, n.2, p. 113-122, 2009.
- SAQRANE, S. & OUDRA, B. Review: Cyanobacterial toxins: A short review on phytotoxic effect in an aquatic environment. *African Journal of Environmental Science and Technology*, v. 5, n.13, p. 1146-1151, December, 2011.
- SCHADE, B.S.; CÓ, D.N.S.C; DELAZARI-BARROSO, A. Aspectos da qualidade da água na lagoa Maringá, Serra, ES: Potenciais usos do ecossistema lacustre. *Revista científica FAESA*, v. 7, n. 1, p. 7-22, 2011.
- SCHÄFER, A., ARAÚJO, M. E., PINEDA, M. D., SCHWARZBOLD, A. Estudo comparativo da variação diária de oxigênio em lagoas do Banhado do Taim, RS. *Nideco*, Ser. Taim, n° 4/5, pp. 1-38, 1980.
- SCHÄFER, A.; ERDELEN, W.; ISHWARAN, N.; MÜLLER, P. System Characteristics and Ecological Classification of Subtropical Coastal Lakes in South Brazil. *Tropical Ecosystems. Proceedings of the International and Tnterdisciplinary Symposium*, Saarbrücken, p11-21, 1991.
- SCHWARZBOLD, A. Influência da Morfologia no Balanço de Substâncias e na Distribuição de Macrófitos Aquáticos nas Lagoas Costeiras do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado) Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p 95, 1982.

- SERRA, Prefeitura. Secretaria de Meio Ambiente (SEMMA) –Disponível em: <http://www.ideiasonline.com.br/semma/index.php?tipo=institucional&id_cat=42&id_noticia=51http://www.ideiasonline.com.br/semma/index.php?tipo=institucional&id_cat=41http://www.ideiasonline.com.br/semma/index.php?tipo=institucional&id_cat=40&id_noticia=61 >. Acesso em: 12/10/2012.
- SERRA. Prefeitura. Estudo temático V.7 meio ambiente e humanização da cidade, Serra, 2000.
- SERRA. SERRA AGENDA 21: 2007- 2027, Caminhos para o Futuro. Volume I – diagnóstico, 2007.
- SILVA L. H. Avaliação qualitativa da Lagoa Jacuném com ênfase à eutrofização. Dissertação de Mestrado, Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Fevereiro de 1998.
- SILVA, L. H. S. Fitoplâncton de um reservatório eutrófico (lago Monte Alegre), Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Biol., São Carlos, v. 59, n. 2, maio 1999.
- SILVA-STENICO, M.E.; CANTÚSIO NETO, R.; ALVES, I.R.; ALVES, I.R.; MORAES, L.A.B.; SHISHIDO, T.K.; FIORE, M.F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. J. Braz. Chem. Soc., v. 20, n. 3, p. 535-542, 2009.
- SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. Londres: E & FN Spon., p. 42-111; 369-405, 1999.
- SIVONEN, K.; NIEMELA, S.I.; NIEMI, R.M.; LEPISTO, L.; LUOMA, T.H.; RASAMEN, L.A. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. Hydrobiologia, v.190, p.267-275, 1990.
- SMITH, V.H.; SCHINDLER, D.W. Eutrophication science: where do we go from here? Trends in Ecology and Evolution, v.24, n.4, 2009.
- SOTERO-SANTOS, R.B.; SILVA, C.R.S.E.; VERANI, N.F.; NONAKA, O.K.; ROCHA, O. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, p.163–170, 2006.

- SRIVASTAVA, A.; SINGH, S.; AHN, C.Y.; OH, H.M.; ASTHANA, R.K. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environ Sci Technol*, v.47, n.16, 2013.
- Standard Methods of Chemical Analysis, 6th Ed., Vol. 2, Part B, Vol. 3, Part B, Robert E. Krieger Publishing Comp., Florida, 1975, p. 2445, 1890
- STRICKLAND, J.D.H.; PARSONS, T.R. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, v.2, p.167, 1972.
- SVIRČEV, Z.; KRSTIĆ, S.; MILADINOV-MIKOV, M.; VIDOVIĆ, M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia (Review). *J. Environ. Sci. Heal. C*, v. 27, n.1, p. 36-55, 2009.
- TE, S.H., GIN, K.Y. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmful Algae*, v.10, p. 319-329, 2011.
- TILLET, D.; DITTMAN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthase system. *Chemistry & Biology*, v.7, n.10, p. 753-765, 2000.
- TRIANANTIS, T.; TSIMELI, K.; KALOUDIS, T.; THANASSOULIAS, N.; LYTRAS, E.; HISKIA, A. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon*, v.55, p.979-989, 2010.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press, 1995.
- VIDAL L. & KRUK C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34 53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 3, n.2, p. 142 –151, 2008.
- VIEIRA, J. M. S.; AZEVEDO, M. T. P.; AZEVEDO, S. M. F. O.; HONDA, R. Y.; CORREA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon*, v. 45, n. 7, p. 901-909, Jun 2005.

- VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Vol. 1. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG. 3a ed. 456 p., 2005.
- WHITTON, B.A. & POTTS, M. Ecology of cyanobacteria II – Their diversity in Space and time. Springer, 2012.
- WHITTON, B.A. & POTTS, M. The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Klumer Academic Publishers, 2000.
- WIEDNER, C.; RÜCKER J., WEIGERT, B. *Cylindrospermopsis raciborskii* and cylindrospermopsin in Lakes of the Berlin Area: Occurrence, Causes and Consequences. Kompetenzzentrum Wasser Berlin Publication Series. v. 6, p. 95, 2007.
- XIE, L.; REDISKE, R.R.; HONG, Y.; O'KEEFE, J.; GILLET, N.D.; DYBLE, J.; STEINMAN, A.D. The role of environmental parameters in the structure of phytoplankton assemblages and cyanobacteria toxins in two hypereutrophic lakes. *Hydrobiologia*, v. 691, p. 255–268, 2012.
- XU, Y.; WANG, G.; YANG, W.; LI, R. Dynamics of the water bloom-forming *Microcystis* and its relationship with physicochemical factors in Lake Xuanwu (China). *Environ Sci Pollut Res*, v. 17, P.1581–1590, 2010.
- YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins—a resource guide. Denver, Colorado, American Water Works Association Research Foundation, p.229, 1995.
- YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; HOSODA, N.; HIROISHI, S. Dynamics of microcystin-producing and non microcystin producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Lett* 266, p. 49–53, 2007.
- YOSHIDA-TAKASHIM, Y.; YOSHIDA, M.; OGATA, H.; NAGASAKI, K.; HIROISHI, S.; YOSHIDA, T. Minireview Cyanophage Infection in the Bloom-Forming Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* in Surface Freshwater. *Microbes Environ*, v 27, n. 4, p. 350 – 355, 2012.

- ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutation Research*, v. 727, p.16–41, 2011.
- ZHOU, L.; YU, H.; CHEN, K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed Environ Sci*, v.15, p. 166-171, 2002.
- ZHU, M.; XU, Y.; LI, R. Genetic Diversity of Bloom-Forming Microcystis (Cyanobacteria) Populations in a Hyper-Eutrophic Pond in Central China. *Curr Microbiol*, v.65, p.219–224, 2012.