



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO GÊNICA DO POTENCIAL
TÓXICO DE CIANOBACTÉRIAS NO DIQUE DO TORORÓ, SALVADOR - BAHIA**

por

CYNTIA SIZÍLIO ANICETO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal da Bahia como
exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadores:

Profa. Dra. Taiara Aguiar Caires (Orientadora - Faculdade São Salvador)

Prof. Dr. José Marcos de Castro Nunes (Co-orientador - UFBA)

Salvador, Bahia

(2018)

Data da defesa: 31/07/2018

Banca examinadora

Dr^a. Taiara Aguiar Caires – Orientadora e Presidente da banca
Faculdade São Salvador

Dr^a. Helen Michelle de Jesus Affe
Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Dr. Doriedson Ferreira Gomes
Universidade Federal da Bahia

RESUMO

As cianobactérias pertencem a um importante grupo de procariotos com grande diversidade morfológica e adaptativa, sendo organismos fotossintetizantes e produtores de metabólitos secundários com propriedades farmacológicas e biotecnológicas que beneficiam a humanidade, mas que também podem provocar graves problemas à saúde pública e ao meio ambiente devido à produção de cianotoxinas. Estas toxinas podem acumular-se na cadeia trófica e causar graves efeitos biológicos, sendo classificadas, a depender do órgão afetado, em hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas. O aumento de compostos orgânicos na água, processo chamado de eutrofização, proporciona condições para que ocorra uma proliferação de cianobactérias. Este fenômeno foi observado em um importante corpo d'água da cidade de Salvador, Bahia, o Dique do Tororó. Amostra dessa proliferação de cianobactérias foi coletada para identificação e cultivo, com o objetivo de analisar a presença de genes produtores de cianotoxinas nas espécies presente. Para esta avaliação, foi utilizada a prospecção gênica baseada em PCR e oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para detecção de genes codificadores das cianotoxinas. Os *primers* utilizados para detecção dos genes codificadores de microcistina foram *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*; para saxitoxina foram empregados *sxt1*, *sxtA* e *OCT*; e para avaliar o potencial de produção de cilindrospermopsina foi utilizado o primer *Cynsulf*. Foram identificados morfologicamente cinco gêneros de cianobactérias: *Chroococcus*, *Geitlerinema*, *Microcystis*, *Leptolyngbya* e *Phormidium*, sendo possível o isolamento e cultivo de *Geitlerinema amphibium*, *Leptolyngbya tenerrima* e *Microcystis aeruginosa*. Dentre as quatro cepas analisadas, duas apresentaram genes codificadores de microcistina, sendo elas *G. amphibium* e *L. tenerrima*. Esse estudo, além de demonstrar a diversidade de cianobactérias presentes na proliferação de cianobactérias registradas no Dique do Tororó, em outubro de 2017, também evidenciou o potencial tóxico de *Geitlerinema amphibium* e *Leptolyngbya tenerrima* ocorrentes neste ambiente, dado a sua capacidade para produzir a toxina microcistina. A presença destes organismos potencialmente tóxicos no referido corpo hídrico, serve de alerta para a tomada de decisão quanto à limpeza e monitoramento, dado ao comprometimento da qualidade da água para os usos do Dique do Tororó.

ABSTRACT

The cyanobacteria belong to an important group of prokaryotes with great morphological and adaptive diversity; they are organisms that produce secondary metabolites with pharmacological and biotechnological properties, which can benefit humanity, but they can also cause serious problems for public health and the environment due to production of cyanotoxins. These toxins can accumulate in the trophic chain and cause severe biological effects, being classified, depending on the affected organ, into hepatotoxins, neurotoxins and dermatotoxins. The increase of organic compounds in water, a process called eutrophication, provides conditions for a proliferation of cyanobacteria. This phenomenon was observed in an important water body of the city of Salvador, Bahia, the Dique do Tororó. Sample of the cyanobacteria proliferation was collected for identification and cultivation, with the objective of analyzing the presence of cyanotoxin producing genes in the present species. PCR reactions were performed with specific primers for the detection of genes encoding cyanotoxins. The primers used for microcystin detection were mcyD, mcyE and mcyG; to saxitoxin were used sxt1, sxtA and OCT; and to cylindrospermopsin was used the primer Cynsulf. We identified morphologically five genera of cyanobacteria: *Chroococcus*, *Geitlerinema*, *Microcystis*, *Leptolyngbya* and *Phormidium*, being possible the isolation and cultivation of *Geitlerinema amphibium*, *Leptolyngbya tenerrima* and *Microcystis aeruginosa*. Among the four strains analyzed, two presented genes encoding microcystin, being *G. amphibium* and *L. tenerrima*. This study, besides demonstrating the diversity of cyanobacteria presents in cell proliferation in water body, like bloom event, the results also showed the toxic potential of *Geitlerinema amphibium* and *Leptolyngbya tenerrima* to produce microcystin. The presence of these potentially toxic organisms in the aforementioned water body serves as an alert for decision making regarding cleaning and monitoring, due to the impairment of water quality for the uses of the Dique do Tororó.

AGRADECIMENTOS

Ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Bahia. Agradeço a todos os professores do Instituto de Biologia que fizeram parte da minha formação, em especial ao coordenador do curso Gilberto Cafezeiro, à Dr^a. Nádia Roque e à Dr^a Rejâne Maria Lira da Silva.

Agradeço à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (Projeto de Pesquisa em Redes – RED 006/2012).

À minha orientadora Dr^a Taiara Aguiar Caires, por ser a melhor orientadora que eu poderia ter, pelo exemplo de profissional, pela dedicação, empenho e ensinamentos. Muito obrigada por me mostrar que o caminho no universo das cianobactérias não seria fácil, mas o processo seria gratificante!

Ao Prof. Dr. José Marcos de Castro Nunes (co-orientador), que disponibilizou o acesso ao Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) para o desenvolvimento dos estudos.

Ao Dr. Eduardo Mendes da Silva, à Dr^a Suzana da Cunha Lima pela disponibilização do espaço do Laboratório Maremba/UFBA e do LaBBiotec/UFBA para o estabelecimento do cultivo de cianobactérias. À Dra. Alessandra Selbach Schnadelbch, coordenadora do LAGEV/UFBA por ter disponibilizado toda a infraestrutura para a realização das análises moleculares, e ao Dr. Doriedson Ferreira Gomes pela realização da coleta.

À Valter Loureiro, colega de curso e estagiário do Laboratório de Algas Marinhas – LAMAR, pelos ensinamentos e por ser fundamental na realização desse trabalho. Obrigada pelo tempo e dedicação.

Aos Biólogos Rosa Daltro e Jansen Gaspar pela oportunidade de conhecer alguns mananciais da Bahia, por toda atenção e ensinamentos no meu estágio supervisionado. Minha sincera gratidão!

Agradeço aos meus colegas de curso, que se transformam em bons amigos e compartilham essa trajetória, tornando esse processo muito mais divertido.

Agradeço aos meus pais, Hélio e Fátima, vocês são as pessoas mais importantes na minha vida e sem vocês nada disso seria possível. Aos meus irmãos, Hélio e Flávia e aos meus sobrinhos, Arthur e Beatriz.

À todos que os nomes não foram mencionados, mas que participaram dessa importante fase e contribuíram para meu crescimento.

Por fim, agradeço a Deus, por ser minha base e dar sentido em tudo na minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Área de estudo	2
2. OBJETIVOS	3
3. JUSTIFICATIVA	4
4. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	4
5. CAPÍTULO 1	5
6. CONCLUSÕES	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXO A – Normas de formatação da Revista	29

1. INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias pertencem a um grupo distinto de procariotos que apresentam características similares tanto às bactérias quanto às algas. Apresentam uma considerável diversidade morfológica, podendo ser unicelulares ou filamentosas, ocorrendo individualmente ou em colônias (Calijuri *et al.*, 2006). O sistema de classificação das cianobactérias mais recente foi proposto por Komárek *et al.* (2014), o qual utiliza uma abordagem polifásica e divide a Classe Cyanophyceae em oito ordens: Gloeobacterales, Synechococcales, Spirulinales, Chroococcales, Pleurocapsales, Chroococciopsidales, Oscillatoriales e Nostocales.

A ordem Gloeobacterales, representada por um único gênero é caracterizada por não possuir tilacoides. Synechococcales é um grande grupo com cepas unicelulares e filamentosas, agrupando-se pela presença de tilacoides parietais. Quanto à ordem Spirulinales, caracteriza-se por típicos tricomas espiralados sem bainhas. A ordem Chroococcales inclui formas cocoides e espécies não produtoras de baeócitos. A ordem Pleurocapsales agrupa gêneros com base em sequências de DNA disponíveis, células das espécies pertencentes a essa ordem forma baeócitos internamente. Chroococciopsidales compreende um grupo de organismos que vive principalmente em habitats extremos. Já a ordem Oscillatoriales inclui gêneros filamentosos com citologia complexa, além de morfotipos cocoides. A ordem Nostocales, por sua vez, representa as cianobactérias filamentosas com morfologia diversificada, com acinetos e heterocitos proeminentes, contendo cepas com ramificação verdadeira ou falsa (Komárek *et al.*, 2014)

A reprodução das cianobactérias ocorre de forma assexuada, por processos de fissão binária ou múltipla, brotamento e fragmentação. Sua mobilidade está relacionada à expulsão de material orgânico, pois não possuem cílios e flagelos. Algumas espécies apresentam vacúolos gasosos que permitem controlar sua flutuabilidade, além de conseguirem desempenhar a fotossíntese em ambientes de grande profundidade e inadequados para as células eucarióticas, pois possuem ficocianinas e ficoeritrina como pigmentos acessórios. Nos ecossistemas de água doce, espécies que habitam este ambiente, encontram as condições mais favoráveis para o seu desenvolvimento, como alta concentração de fósforo e nitrogênio, pH entre 6 a 9 e temperaturas entre 15°C e 30°C (Calijuri *et al.*, 2006).

As cianobactérias são excelentes colonizadoras, podem ser planctônicas ou bentônicas, e apresentam uma grande capacidade adaptativa em diversos ambientes, fato este decorrente das suas características morfológicas e fisiológicas (Calijuri *et al.*, 2006). A sua origem antiga, cerca de 2,5 bilhões de anos, estabilidade de tipos distinguíveis, capacidade de diversificação, adaptação a várias

situações ecológicas e especificidades estruturais e metabólicas, fazem das cianobactérias um dos grupos mais fascinantes de organismos (Komárek & Anagnostidis, 1998).

Pesquisadores de várias partes do mundo deram uma notória importância às cianobactérias nos últimos anos, especialmente na área biotecnológica, devido aos seus benefícios e malefícios. Esses organismos são fontes ricas de metabólitos secundários e são amplamente estudados pela sua capacidade em sintetizar compostos bioativos com potencial farmacológico para a síntese de novas drogas, com atividades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, além da produção de cianotoxinas (Singt, *et al.*, 2011; Vaz, 2014; Caires, 2017).

As cianotoxinas podem atingir um extenso conjunto de organismos, pois podem acumular-se na cadeia trófica causando graves efeitos biológicos (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003). De acordo com Calijuri *et al.* (2006), as causas para a produção de toxinas em cianobactérias são amplamente discutidas, as quais podem estar relacionada à competição por recursos, às condições de crescimento e também para proteção contra a predação. Mohamed (2013) evidenciou que espécies de cianobactérias podem sintetizar compostos alelopáticos, como o antialgal *norharmane*, que apresenta efeitos de inibição de crescimento em outras espécies de cianobactérias.

De acordo com sua origem e forma de dispersão no ambiente, as toxinas podem ser classificadas em: endotoxinas, que constituem a parede celular e são liberadas quando as células sofrem lise, sendo fatais em grandes concentrações, como exemplo o lipopolissacarídeo (LPS), considerado dermatotóxico, podendo causar inflamação, coagulação e febre. A segunda categoria é formada pelas exotoxinas, proteínas altamente específicas, são compostas pelas neurotoxinas, saxitoxinas, citotoxinas e hepatotoxinas, sendo as toxinas mais poderosas. A contaminação por cianotoxinas pode ocorrer por diversas formas: inalação, contato dermal e ingestão de água (Calijuri *et al.*, 2006). No Brasil, há relatos de contaminação por cianotoxinas, mas muitos não foram devidamente comprovados (Bittencourt-Oliveira & Molica, 2003).

1.1. Área de Estudo

O Dique do Tororó localiza-se no centro da cidade de Salvador, Bahia, (latitude: 12°59'4'' S; longitude: 38°30'21'' W), é uma lagoa com forma estreita e alongada, de dimensão correspondente a 11,5 hectares de espelho d'água e 25 mil m² de área verde (Fig. 1). De acordo com o Sistema de Áreas de Valor Cultural e Ambiental de Salvador (SAVAM) e a Resolução n. 357/2005 do CONAMA, o Dique está classificado em Espaços Abertos de Recreação e Lazer, na subcategoria de Espaços Abertos Urbanizados (EAU) e sua água é classificada como água doce de classe III, que pode ser destinada à pesca amadora à recreação de contato secundário e à dessedentação de animais.

No passado, já possuiu limites mais amplos, pois cerca de dois terços de sua área original foi aterrada pela população e pelas autoridades em função de obras públicas (Oliveira, 2007; Santos *et al.*, 2010). Uma conclusão elaborada sobre a origem de suas águas é inexistente, pois alguns autores afirmam que são provenientes de nascentes das encostas ou do fundo do seu leito, enquanto outros relatos afirmam que o Dique é obra dos holandeses para proteger a cidade de invasões (Oliveira, 2007; Dourado, 2009). O Dique assumiu diversas funções ao longo do tempo, sendo elas: práticas esportivas, via de acesso através dos barcos, receptor de esgoto doméstico, depósito de lixo e fonte de alimento, sendo fornecedor de peixes para a população de baixa renda. Apesar da sua importância, é uma área marcada por longos períodos de negligência, sendo alvo constante de estudos diversificados das mais distintas áreas do conhecimento, como a importância da vegetação na paisagem, suas nascentes, a qualidade da água, sua importância cultural e para a prática religiosa (Oliveira, 2007; Dourado, 2009; Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Um estudo realizado por Silva *et al.* (2011), revelou que as concentrações de nutrientes no Dique do Tororó apresentavam valores acima dos limites estabelecidos pela Resolução n. 357/2005 do CONAMA para água doce de classe III, estando relacionados a fontes de lançamentos de esgotos na lagoa, tornando este ambiente eutrofizado.



Fig 1. Imagem aérea do Dique do Tororó. Fonte: <https://hiveminer.com>

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial gênico para síntese de cianotoxinas nas espécies identificadas em um evento de proliferação de cianobactérias no Dique do Tororó, Salvador, Bahia.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Identificar as espécies de cianobactérias ocorrentes em um evento de proliferação de no Dique do Tororó, Salvador, Bahia;
- b. Investigar a presença dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina (*mcyD*, *mcyE* e *mcyG*), saxitoxina (*sxtA* e *sxtI*) e cilindrospermopsina (*cyrJ*) destas espécies mantidas em cultivo;
- c. Ampliar o conhecimento sobre cianobactérias em ambientes dulciaquícolas de áreas urbanas.

3. JUSTIFICATIVA

O Dique do Tororó sofreu diversas ações antrópicas negativas e se transformou em um ambiente eutrofizado de acordo com estudos anteriores, sendo assim, propício ao desenvolvimento de florações de cianobactérias e à ocorrência de eventos de intoxicação por cianotoxinas pela população e pelos animais que frequentam este local. Sendo assim, faz-se necessário identificar os eventos de florações tóxicas de cianobactérias, pois eles provocam graves problemas à saúde pública e ao meio ambiente. A detecção precoce de cianotoxina pode ser realizada através de técnicas da biologia molecular, como a PCR (reação de cadeia da polimerase), a qual utiliza oligonucleotídeos iniciadores específicos para a sequência de genes envolvidos na produção destas toxinas, sendo possível analisar se as cepas presentes são potencialmente tóxicas.

4. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho de conclusão de curso está estruturado em um capítulo no formato de artigo, intitulado “*Avaliação do potencial gênico tóxico em grandes adensamentos de cianobactérias em um corpo d’água urbano*”, que será submetido ao periódico *Rodriguésia*.

5. CAPÍTULO 1

Avaliação do potencial gênico tóxico em grandes adensamentos de cianobactérias em um corpo d'água urbano

Cyntia Sizílio Aniceto¹, Valter Loureiro¹, José Marcos de Castro Nunes¹, Taiara Aguiar Caires¹

¹ Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia. Departamento de Botânica, Laboratório de Algas marinhas (LAMAR). Rua Barão de Jeremoabo s/n – Ondina. Cep: 40.170-115 – Salvador, Bahia, Brasil.

cyntia.aniceto@gmail.com

Nome da revista: Rodriguésia (Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro)

Homepage do periódico: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br>

Avaliação do potencial gênico tóxico em grandes adensamentos de cianobactérias em um corpo d'água urbano

Cyntia Sizílio Aniceto^{1*}, Valter Loureiro¹, José Marcos de Castro Nunes¹, Taiara Aguiar Caires¹

¹ Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia. Departamento de Botânica, Laboratório de Algas marinhas (LAMAR). Rua Barão de Jeremoabo s/n – Ondina. Cep: 40.170-115 – Salvador, Bahia, Brasil.

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Projeto de Pesquisa em Redes – RED 006/2012).

Cyntia Sizílio Aniceto / cyntia.aniceto@gmail.com

Morfologia e análise de cianotoxinas

Autor para correspondência: cyntia.aniceto@gmail.com (Cyntia Sizílio Aniceto)

Resumo

Avaliação do potencial gênico tóxico em grandes adensamentos de cianobactérias em um corpo d'água urbano

O filo Cyanobacteria é constituído por um grande grupo de procariotos responsáveis pela conversão anóxica da atmosfera através da fotossíntese, liberando oxigênio. Devido à produção de cianotoxinas, algumas espécies podem causar graves efeitos a outros organismos. Alguns ambientes aquáticos que sofrem distúrbios abióticos, como a eutrofização, são propícios a ocorrência de proliferação de cianobactérias que podem causar desequilíbrios ecológicos e alterar as propriedades da água, além de representar graves riscos à saúde pública. Um fenômeno desse tipo foi verificado no Dique do Tororó, uma lagoa urbana, no centro de Salvador – BA, de uso recreativo público. Devido às implicações que esses organismos podem provocar, foram analisadas a presença de genes produtores de cianotoxinas através de extração de DNA e reações de PCR nas espécies identificadas. Cinco táxons de cianobactérias foram identificados: *Chroococcus* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Phormidium* sp., *Geitlerinema amphibium* e *Leptolyngbya tenerrima*. As duas últimas apresentaram resultados positivos quanto a detecção de genes (*mcyE* e *mcyG*) codificadores de microcistina. The presence of potentially microcystin-producing strains on the site reveals the importance of implementing projects that aim to maintain the ecological balance of the site, avoiding possible damages to public health and the environment.

Palavra-chave: cianotoxinas, espécies nocivas, prospecção gênica, saúde pública.

Abstract

Evaluation of toxic gene potential in large cyanobacterial densities in an urban water body

Phylum Cyanobacteria is constituted by a large group of prokaryotes responsible for the anoxic conversion of the atmosphere through the photosynthesis processes that release the oxygen. Due to the production of cyanotoxins, some species can cause serious effects on other organisms. Some aquatic environments suffering from abiotic disturbances, such as eutrophication, are prone to the occurrence of cyanobacterial proliferation that can cause ecological imbalances and alter the properties of water, and pose serious public health risks. A phenomenon of this type was verified in Dique do Tororó, a lagoon urban, in the center of Salvador - BA, of public use, Due to the implications that these organisms can induce, the presence of cyanotoxin-producing genes was analyzed through DNA extraction and PCR reactions in the identified species. Five taxa of cyanobacteria were identified: *Chroococcus* sp., *Geitlerinema amphibium*, *Leptolyngbya tenerrima*, *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium* sp. Two species, *G. amphibium* and *L. tenerrima* showed positive results regarding the detection of microcystin toxin.

Keywords: cyanotoxins, genetic prospection, harmful species, public health.

Introdução

O filo Cyanobacteria é constituído por um grande grupo de bactérias fototróficas oxigênicas que apresentam grande diversidade morfológica e ecológica (Madigan *et al.* 2016). Algumas espécies de cianobactérias podem causar graves danos aos animais e à saúde pública por produzirem metabólitos secundários com propriedades tóxicas, as denominadas cianotoxinas (Carneiro *et al.* 2007). De acordo com Fiore *et al.* (2011), se essas toxinas forem incorporadas pelo consumo de água ou alimentos contaminados, podem causar graves efeitos biológicos, sendo classificadas como: hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas), neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a, anatoxina (S) e homoanatoxina-a), citotoxinas (cilindrospermopsina), toxinas irritantes e gastrointestinais (aplisiatoxina, debromoaplisiatoxina e lynbyatoxina), endotoxinas e outras cianotoxinas, cujos perfis toxicológico e ecotoxicológico necessitam de maior compreensão.

Ambientes aquáticos que recebem grande aporte de nutrientes provenientes de esgotos domésticos, industriais ou fertilizantes agrícolas, se transformam em ambientes eutrofizados, propícios ao crescimento acelerado de cianobactérias (Souza 2006). Vários fatores bióticos e abióticos, que se relacionam sinérgica ou antagonicamente, favorecem a ocorrência de florações, como: disponibilidade de luz, estabilidade da coluna d'água, altas temperaturas, maior tempo de residência das águas, declínio da herbivoria devido à produção de biotoxinas e morfologia das cianobactérias (Fernandes *et al.* 2009). Algumas cianobactérias possuem aerótopos, vesículas gasosas que possibilitam a flutuação e permanência da célula na superfície da água. Quando estes organismos formam um extenso adensamento celular, podem mudar a coloração da água e formar camadas espessas na superfície. Além da produção de cianotoxinas, as florações podem causar desequilíbrios ecológicos mudando as propriedades organolépticas da água (cor, odor e sabor desagradável). (Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001; Souza 2006).

O Dique do Tororó é um lago natural, apesar da sua origem ser bastante discutida, possui uma área de 110.000 m² utilizada como espaço de recreação e lazer, localiza-se no centro da cidade de Salvador, Bahia, é um ambiente que sofreu diversas ações antrópicas, como aterramentos na sua área, também recebeu durante muitos anos, esgoto sanitário sem nenhum tratamento associado às águas pluviais (Dourado 2009; Santos *et al.* 2010). Por ser um local de acesso e uso público, faz-se necessário a detecção precoce de cianobactérias tóxicas para que ações corretivas e de controle tenham êxito, pois grandes adensamentos de cianobactérias podem causar graves inconvenientes para a população e para os animais, como: forte odor, alteração nas propriedades da água, comprometendo a importância do local como ponto turístico, riscos de intoxicação e alteração no equilíbrio ecológico do ambiente. Sendo assim, o presente trabalho avaliou, através de análises de prospecção gênica, o potencial genético para produção de cianotoxinas de populações de cianobactérias coletadas em um evento de grande adensamento celular no Dique do Tororó, tendo como finalidade inferir se as espécies identificadas apresentam riscos para a saúde pública quanto ao seu potencial tóxico.

Material e Métodos

As cianobactérias foram coletadas no mês de outubro de 2017, na superfície da coluna de água do Dique do Tororó, Salvador – Bahia. A amostra continha um grande adensamento de cianobactérias, característico de uma floração, entretanto, a densidade celular não foi realizada para corroborar a ocorrência desta. Uma alíquota desta amostra foi acondicionada para cultivo.

Identificação, isolamento e cultura

As cepas foram analisadas sob um microscópio de luz, equipado com uma câmera digital QImaging GO-3 (Olympus CX31RTS5®, Tóquio, Japão), realizou-se a análise morfométrica de 20 células por colônia ou filamentos de cada cepa, através do software AxioVision 4.8®. Após a identificação morfológica, as cepas foram isoladas para cultura através

do método de seleção por capilar, para os exemplares cocoides, e pescaria, para os organismos filamentosos. Todas as etapas foram realizadas em câmara de fluxo laminar. Os exemplares isolados foram inoculados em meio líquido BG-11 (Rippka 1979). Cada cultura uniespecífica foi mantida em tréplicas, cultivadas sob fotoperíodo de 14:10 h (claro:escuro), com irradiação de $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de acordo com Jacinavicius *et al.* (2012). As cepas foram preservadas no Laboratório de Monitoramento, Avaliação e Reabilitação de Ecossistemas Naturais e Artificiais do Estado da Bahia (MARENBA – IBIO/UFBA) e as alíquotas foram depositadas e preservadas em formol 4% no herbário Alexandre Leal Costa (ALCB - UFBA).

Prospecção gênica de cianotoxinas

A detecção dos agrupamentos gênicos codificadores de cianotoxinas foi baseada em PCR utilizando o DNA genômico extraído das cepas. Para esta extração, as cepas mantidas em cultivo foram maceradas de acordo com Fiore *et al.* (2000) para *Microcystis aeruginosa*, e pelo método CTAB (Doyle & Doyle 1987), para as cepas filamentosas. A detecção dos agrupamentos gênicos para a produção de microcistina foi realizada pela investigação da presença dos genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* (Rantala *et al.* 2004). O marcador *mcyD* codifica para uma enzima do grupo PKS (policetídeo sintase tipo 1), responsável pela reação da síntese da microcistina, enquanto os marcadores *mcyE* e *mcyG* codificam para enzimas do grupo NRPS (Peptídeo Sintetase Não Ribossômica) e PKS, sendo consideradas híbridas (Tillet *et al.* 2000).

O fragmento gênico *mcyD* foi amplificado através do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores *mcyDF/mcyDR* (5' -GATCCGATTGAATTAGAAAG - 3'/5' - GTATTCCCAAGATTGCC- 3'), cujo tamanho do produto estimado é 818 pb. Para o gene *mcyE* utilizou-se *mcyEF2/mcyER4* (5' -GAAATTTGTGTAGAAGGTGC- 3'/5' - AATTCTAAAGCCCAAAGACG- 3'), com tamanho estimado de amplificação entre 809 pb a 812 pb, (Rantala *et al.* 2004). Para o agrupamento gênico *mcyG*, foi utilizado o conjunto de

oligonucleotídeos mcyGF/mcyGR (5' -GAAATTGGTGCGGGAAGTGGAG- 3'/5' -TTTGAGCAACAATGATA- 3'), cujo produto de amplificação possui tamanho estimado entre 385 pb e 560 pb (Fewer *et al.* 2007). A amplificação dos três conjuntos de primers ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 3 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C e 1 min a 72°C, e extensão final de um ciclo de 10 min a 72°C.

O potencial de produção da saxitoxina foi verificado através do gene *sxtA*, que foi amplificado pelos primers *sxtA*-F (5' -GGACTCGGCTTGTTGCTTC- 3') e *sxtA*-R (5' -CCAGACAGCACGCTTCATAA- 3'), com as seguintes condições: um ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60,2°C, 30 s a 72°C, e extensão final de 7 min a 72°C. O tamanho estimado do produto amplificado é de 200 pb (Hoff-Risseti *et al.* 2013). O marcador genético *sxtA* codifica para uma enzima do grupo PKS (Moustafa *et al.* 2009). O gene *sxtI*, considerado exclusivo para cepas produtoras de saxitoxinas, foi amplificado pelo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores *sxtI*-F/*sxtI*-R (5' -GCTTACTACCACGATAGTGCTGCCG- 3'/5' -GGTTCGCCGCGGACATTTAAA- 3'). As etapas da amplificação para este primer foram: um ciclo de 34 min a 94°C; 30 ciclos de 10 s a 94°C, 20 s a 55°C, 1 min a 72°C, e extensão final de 7 min a 72°C, com produto de amplificação estimado em 1.669 pb. Para amplificar esta região gênica, também foi utilizado o conjunto iniciador OCT-F/OCT-R (5' -TGCCGTTTTGTGCTTAGATG- 3'/5' -GGACGGAAGGACTCACGATA- 3'), cujo produto de amplificação possui tamanho estimado de 923 pb. As etapas para a amplificação foram as seguintes: um ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 61°C, 90 s a 72°C e extensão final de 7 min a 72°C (Kellmann *et al.* 2008).

O potencial de produção da cilindrospermopsina foi verificado pela presença do agrupamento gênico *cyrJ*, utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores Cynsulf-F (5' -ACTTCTTCTCCTTTCCCTATC- 3') e Cynsulf-R (5' -GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG- 3'), com as seguintes condições: um ciclo de 4 min a

94°C; 30 ciclos de 20 s a 94°C, 1 min a 54°C, 2 min a 72°C, com extensão final de 7 min a 72°C, cujo produto de amplificação possui tamanho estimado de 780 pb. A biossíntese da cilindrospermopsina é, provavelmente, realizada pela ação de uma sulfotransferase codificada pelo gene *cyrJ*, justificando-se a escolha do marcador genético para investigar a produção da toxina (Mihali *et al.* 2008).

As reações de PCR foram realizadas com 10 ng de DNA genômico, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 1 X PCR de 1,5 U Taq DNA polimerase (Applied Biological Materials, Richmond, Canadá) em um volume total de 25 µL. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti® 96 (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA). Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose (1% w / v), usando marcador de peso molecular (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para comparação com o tamanho dos fragmentos amplificados. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética e Evolução de Plantas (LAGEV – IBIO/UFBA).

Resultados e Discussão

Identificação e caracterização das cianobactérias isoladas

Foram identificados cinco gêneros de cianobactérias através de suas características morfológicas, hábito e habitat de acordo com bibliografias especializadas: *Chroococcus* sp., *Geitlerinema* sp., *Leptolyngbya* sp., *Microcystis* sp. e *Phormidium* sp. (Fig. 1a-g). O gênero *Chroococcus*, é unicelular e colonial. Poucas células mais ou menos esféricas de colônias microscópicas foram verificadas, são amplamente distribuídas em água doce, principalmente em metafíton. *Geitlerinema* foi identificada por possuir células com grânulos nas paredes, tricomas carentes de bainha e células terminais curvadas. O gênero *Leptolyngbya* é filamentosos, apresentando filamentos longos e enrolados em grupos, bainhas incolores unidas aos tricomas. São muito comuns em perifíton e metafíton de ambientes de água doce. *Microcystis* é um gênero

unicelular e colonial. Colônias densamente aglomeradas foram identificadas com mucilagem incolor e células com números aerótopos. São observados flutuando livremente em plâncton de reservatórios de água doce, relativamente eutrofizados. Por fim, o gênero *Phormidium* foi identificado por possuir filamentos não ramificados, com bainhas firmes, incolores e unidas aos tricomas retos. Suas células terminais são arredondadas e atenuadas, ocorrendo em águas estagnadas (Komárek & Anagnostidis 1998; Komárek & Anagnostidis 2005).

Cepas que obtiveram resultado do isolamento e cultivo bem sucedido foram analisadas para identificação específica: uma cepa da espécie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, três cepas de *Geitlerinema amphibium* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis, e quatro cepas de *Leptolyngbya tenerrima* (Kützing ex Hansgirg) Komárek. Não obtivemos sucesso com o isolamento dos gêneros *Chroococcus* e *Phormidium*.

Microcystis aeruginosa (Chroococcales) apresentou colônias com células esféricas, agregadas e imersas em mucilagem incolor, como descrito por Komárek & Anagnostidis (1998) para esta espécie. Células medindo 2 -5 µm de diâmetro, com presença de inúmeros aerótopos. De acordo com Bicudo *et al.* (2005), em ambientes eutrofizados é comum a formação de floração pelo gênero *Microcystis* e a produção da hepatotoxina microcistina.

Geitlerinema amphibium (Oscillatoriales) apresentou tricomas com células entre 1 – 2,06 µm de diâmetro e 2,76 – 4,69 µm de comprimento, retos, raramente curvados, não constrictos, sem bainha, com célula apical arredondada, e geralmente com grânulos solitários nas paredes transversais. Esta espécie é comumente encontrada em corpos de água doce estagnados com plantas aquáticas (Komárek & Anagnostidis 2005; Silva *et al.* 2009).

Leptolyngbya tenerrima (Synechococcales) apresentou tricomas com células entre 1,35 – 2,17 µm de diâmetro e 1,15 – 2,7 µm de comprimento. Os filamentos apresentam-se aglomerados, com tricomas constrictos e bainhas inconspícuas. De acordo com Komárek &

Anagnostidis (2005), é uma espécie encontrada em locais com muita matéria orgânica, como áreas mesotróficas.

Deteccção dos genes codificadores de cianotoxinas

As análises dos agrupamentos gênicos das três espécies de cianobactérias mantidas em cultivo, possibilitou que fossem detectados genótipos com potencial para produção de cianotoxina em duas delas (Tab. 1). *Leptolyngbya tenerrima* apresentou amplificação para duas regiões gênicas relacionadas à biossíntese da microcistina, *mcyE* e *mcyG*, corroborando os resultados de Pineda-Mendoza *et al.* (2012), que avaliaram a referida espécie coletada em um lago urbano do México em eutrofização utilizando as regiões *mcyA-Cd* e confirmaram a presença de agrupamentos gênicos codificadores de microcistina.

Outra espécie que demonstrou potencial genético para produção de microcistina foi *Geitlerinema amphibium*, apresentando amplificação para *mcyG*. Dogo (2010), em testes com camundongos, identificou que *G. amphibium* causou sinais diferentes de intoxicação promovidos por cianotoxinas, indicando que a espécie possui substâncias tóxicas desconhecidas produzidas por outros metabólitos secundários. Sendo assim, há necessidade de maiores estudos sobre a toxicidade da referida espécie, pois sua frequência é constante em corpos d'água destinados ao abastecimento público.

As cepas de *Microcystis aeruginosa* analisadas não demonstraram a presença dos conjuntos gênicos testados. No entanto, há estudos que demonstram a produção de microcistina na espécie (Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001; Lorenzi 2004; Carneiro 2005; Sant'Anna *et al.* 2010). Bittencourt-Oliveira *et al.* (2001) também confirmaram que a toxidade de *M. aeruginosa* é uma característica intra-populacional, demonstrando que isolados da espécie de uma mesma população apresentaram genótipos diferenciados quanto à presença ou ausência do gene que codifica para a microcistina sintetase.

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos, com várias isoformas, sendo classificadas como hepatotoxinas, cujo mecanismo de ação é a inibição específica das proteínas fosfatases da família serina/treonina de células eucarióticas. Danos severos são causados ao fígado dos animais vertebrados devido à concentração da toxina no órgão como uma tentativa de degradá-la, causando sua morte por choque hemorrágico (Calijuri *et al.* 2006; Fiore *et al.* 2011).

Apesar da contagem da densidade celular não ter sido realizada para corroborar quantitativamente a floração do Dique do Tororó, o grande adensamento celular de cianobactérias ocorrente nas suas águas apresentaram sinais visíveis de floração, como aspecto esverdeado, formação de massas espessas e forte odor, o que acarretou grande desconforto na população local.

Florações de cianobactérias são fenômenos que ocorrem por causas naturais, mas também são recorrentes em ambientes eutrofizados decorrente da ação antrópica. Esse evento altera as condições da água, pode ocasionar um desagradável odor além do risco de intoxicação por cianotoxinas.

A técnica de prospecção gênica empregada neste trabalho auxilia na detecção precoce de uma possível floração tóxica de cianobactérias, pois verifica se as cepas presentes no local são potencialmente produtoras de cianotoxinas antes que ocorra o aumento da sua densidade. Outras técnicas, como bioensaios com mamíferos, análises imunoenzimáticas específicas e detecção de toxinas através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) só podem ser realizadas após a ocorrência do fenômeno (Bittencourt-Oliveira *et al.* 2001), acarretando em desvantagem.

Sendo assim, a presença de cepas potencialmente produtoras da toxina no corpo d'água em estudo serve de alerta para os riscos de intoxicação e morte por ingestão da água pelos animais e pela população local que não são orientadas sobre o uso correto da água no local.

É importante ressaltar que os resultados apresentados aqui não são conclusivos para inferir a presença da toxina no ambiente, pois indicam apenas a presença dos genes responsáveis pela codificação da microcistina. Faz-se necessário sequenciar os produtos da PCR e análises químicas são recomendadas para confirmar se os genes amplificados estão sendo expressos no ambiente, pois esta cianotoxina causa graves problemas de saúde pública e desequilíbrios ambientais.

Conclusão

Este trabalho demonstrou a diversidade de cianobactérias presentes em um evento de grande adensamento celular em um corpo d'água urbano, sendo identificados os gêneros *Chroococcus*, *Geitlerinema*, *Leptolyngbya*, *Microcystis* e *Phormidium*. As análises de prospecção gênica, permitiu identificar a presença de cepas potencialmente produtoras de microcistina no local. Este estudo mostra a importância de se implantar projetos que visam a mitigação de impactos antrópicos, com a finalidade de manter o equilíbrio ecológico do Dique do Tororó . Novos estudos quanto à toxicidade dessas espécies devem ser realizados, assim como a implantação de programas de monitoramento de cianobactérias, cianotoxinas, de modo a evitar que novos eventos de proliferação ocorram no local.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Eduardo Mendes da Silva, à Dr^a Suzana da Cunha Lima, à Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach pelo uso de suas instalações laboratoriais. Agradecemos também ao Dr. Doriedson Ferreira Gomes pela realização da coleta e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Projeto de Pesquisa em Redes –RED 006/2012). JMCN agradece ao CNPq pela Bolsa Produtividade (Processo no. 307368/2015-7).

Referências

- Bicudo, C.E. de M. & Menezes, M. 2005. Gêneros de algas continentais do Brasil. Editora RiMa. São Carlos. 508p.
- Bittencourt-Oliveira, M.do C.; Oliveira, M.C.de. & Yunes, J.S. 2001. O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética. *Revista Biotecnologia* 23: 44-47.
- Carneiro, R.L. 2005. Otimização de cultivo de *Microcystis aeruginosa* Kütz Emend. Elekin e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 113p.
- Carneiro, T.G. & Leite, F. 2007. Cianobactéria e suas toxinas. *Revista Analytica* 32: 36-41.
- Dogo, C.R. 2010. Caracterização dos efeitos tóxicos da fração ativa da cepa CCIBt920 *Geitlerinema amphibium* (Cyanophyceae, Oscillatoriales) na microcirculação e em fibras musculares: análise por microscopia intravital. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo. 117p.
- Dourado, C.M. 2009. Orixás do Dique do Tororó: Simbologia e problemática cultural da população afrodescendente baiana. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Bahia. 156p.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fernandes, V.O.; Cavati, B.; Oliveira, L.B.de. & Souza, B.D.de. 2009. Ecologia de cianobactéria: fatores promotores e consequências das florações. *Oecologia brasiliensis* 13(2): 247-258.

Fewer, D.P.; Rouhiainen, L.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Laakso, K.; Wang, H. & Sivonen, K. 2007. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evolutionary Biology* 7:1-11.

Fiore, M.F., Moon, D.H., Tsai, S.M., Lee, H. & Trevors, J.T. 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods* 39: 159-169.

Fiore, M.F.; Alvarenga, D.O. & Silva-Stenico, M.E. 2011. Genética de cianotoxinas. *Ciência in foco*. 24-35.

Hoff-Rissetti, C. Dörr, F.A.; Schaker, P.D.C.; Pinto, E.; Werner, V.R. & Fiore, M.F. 2013. *Cylindrospermopsin* and *Saxitoxin* Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian Freshwater. *PLoS ONE* 8(8):1-14.

Jacinavicius, F.R.; Gama Júnior, W.A.; Azevedo, M.T.P. & Sant'Anna, C.L. 2012. Manual para cultivo de cianobactérias. 1ed. Publicações Online do Instituto de Botânica de São Paulo. São Paulo. 28p.

Kellmann, R.; Mihali, T.K.; Jeon, Y.J.; Pickford, R.; Pomati, F. & Neilan, B.A. 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 74(13): 4044-4053.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1998. Cyanoprokaryota-1. Teil: Chroococcales, in Ettl, H.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Hrsg.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1. Gustav Fischer/Jena Stuttgart Lübeck Ulm. 548p.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota-2. Teil/2nd part: Oscillatoriales, in: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/778 2. Elsevier/Spektrum, Heidelberg. 759p.

Lorenzi, A.S. 2004. Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 92p.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D.H. & Stahl, D.A. 2016 Microbiologia de Brock. 14ed. Editora Artmed, Porto Alegre. 1006p.

Mihali, T.K.; Kellmann, R.; Muenchhoff, J.; Barrow, K.D. & Neilan, B.A. 2008. Characterization of the Gene Cluster Responsible for Cylindrospermopsin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3): 716–722.

Moustafa, A.; Loram, J.E.; Hackett, J.D.; Anderson, D.M.; Plumley, F.G. & Bhattacharya, D. 2009. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. *PLoS ONE* 4: 57-58.

Pineda-Mendoza, R.M.; Olvera-Ramírez, R. & Martínez-Jerónimo, F. 2012. Microcystis produced by filamentous cyanobacteria in urban lakes. A case study in Mexico City. *Hidrobiológica* 22(3): 290-298.

Rantala, A.; Fewer, D.P.; Hisbergues, M.; Rouhiainen, L.; Vaitomaa, J.; Börner, T. & Sivonen, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(2): 568-73.

Sant'Anna, C.L.; Carvalho, L.R.de; Fiore, M.F.; Silva-Stenico, M.E.; Lorenzi, A.S.; Rios, F.R.; Konno, K.; Garcia, C. & Lagos, N. 2010. Highly Toxic *Microcystis aeruginosa* Strain, Isolated from São Paulo, Brazil, Produce Hepatotoxins and Paralytic Shellfish Poison Neurotoxins. Springer.

Santos, E.; Pinho, J. A. G.; Moraes, L. R. S. & Fisher, T. 2010. O Caminho das águas em Salvador: Bacias hidrográficas, bairros e fontes. Disponível em

<www.meioambiente.ba.gov.br/publicacoes/livros/caminho_das_aguas.pdf> Acesso em 18 abril 2018.

Silva, C. P., Lorenzi, A. S., Fiore, M. F. & Oshima-Franco, Y. 2012. Detecção molecular e remoção de microcistinas nos processos de tratamento de água. *Saúde em Revista* 12 (31): 61-68.

Singh, R.K.; Tiwari, S.P.; Rai, A.K. & Mohapatra, T.M. 2011. Cyanobacteria an emerging source for drug discovery. *The Journal of Antibiotics* 64: 401-412.

Souza, R.C.R.de. 2006. Introdução. *In: Sant'Anna, C.L.; Azevedo, M.T.de P.; Agujaro. L.F.; Carvalho, M. do C.; Carvalho, L.R. de. & Souza, R.C.R. Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Plânctônicas de Águas Continentais Brasileiras*. Editora Interciência. Pp. 1-4.

Tillet, D.; Dittman, E.; Erhard, M.; Von Dohren, H.; Borner, T. & Neilan, B.A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: as integrated peptide-polyketide synthetase system. *2000 Chemical Biology* 7: 753-764.

Tabela 1. Avaliação do potencial gênico para produção de microcistina, saxitoxina e cilindrospermopsina em cianobactérias coletadas no Dique do Tororó, Salvador, Bahia.

Table 1. Evaluation of genetic potential for production of microcystin, saxitoxin and cylindrospermopsin in strains collected on Dique do Tororó, Salvador, Bahia

Espécies	Biotoxinas e seus respectivos primers						
	Microcistina			Saxitoxina		Cylindrospermopsina	
	mcyD	mcyE	mcyG	sxtA	sxtI	OCT	Cynsulf
<i>Microcystis aeruginosa</i> (ALCB 132752)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leptolyngbya tenerrima</i> (ALCB 132751)	-	+	+	?	-	-	-
<i>Geitlerinema amphibium</i> (ALCB132750)	-	-	+	-	-	-	-
<i>Geitlerinema amphibium</i> (ALCB132749)	-	-	-	-	-	-	-
Total	0	1	2	?	0	0	0

+ Resultado positivo; - Resultado negativo; ? Resultado não conclusivo.

Figura

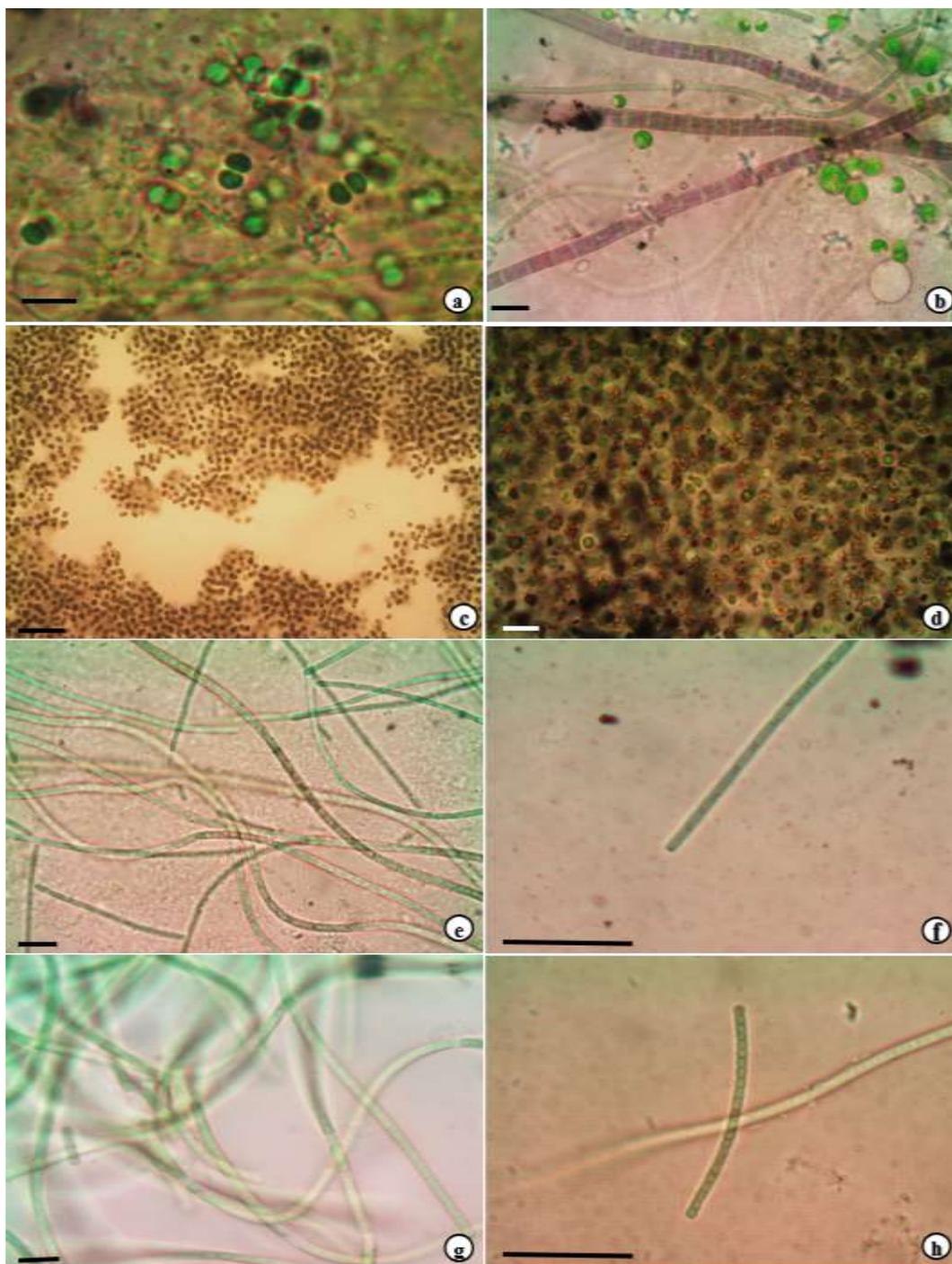


Figura 1 – Cianobactérias ocorrentes na floração do Dique do Tororó, Salvador-Ba – a. *Chroococcus* sp. (não mantida em cultivo). b. *Phormidium* sp. (não mantida em cultivo). c-d. *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing. c. Aspecto geral da colônia. d. Detalhe das células contendo aerótopos. e-f. *Geitlerinema amphibium* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis. e. Aspecto dos filamentos. f. células com grânulos. g-h. *Leptolyngbya tenerrima* (Hansgirg)

Komárek. g. Aspecto dos filamentos. h. Célula apical ligeiramente estreita e arredondada.

Barras de escalas: a,b,d,e,f,g,h = 10µm; c = 30µm.

Figure 1 – Cyanobacteria present in the bloom of the Dique do Tororó, Salvador-Ba– a. *Chroococcus* sp. (not isolated) b. *Phormidium* sp. (not isolated). c-d. *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing. c. Aspect general of the colony. d. Detail of cells containing aerotopes. e-f. *Geitlerinema amphibium* (Agardh ex Gomont) Anagnostidis, e. Aspect of the filaments. f. Cells with granules g-h. *Leptolyngbya tenerrima* (Hansgirg) Komárek. g. Aspect of the filaments. h. Apical cell slightly narrow and rounded. Scale bars: a,b,d,e,f,g,h = 10 µm; c = 30µm.

6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho constatou a presença dos seguintes táxons: *Chroococcus* sp., *Phormidium* sp., *Geitlerinema amphibium*, *Leptolyngbya tenerrima* e *Microcystis aeruginosa* em um evento de grande proliferação de cianobactérias ocorrida no Dique do Tororó, Salvador, Bahia;
- *Geitlerinema amphibium* e *Leptolyngbya tenerrima* apresentaram resultados positivos quanto ao potencial genético tóxico, apresentando amplificação para as regiões *mcyE* e *mcyG*, responsáveis pela síntese de microcistina;
- Para as cepas que apresentaram resultados negativos quanto à sua toxicidade, recomenda-se uma reavaliação, pois a amplificação das regiões específicas é influenciada pela qualidade e quantidade do DNA extraído para análise;
- Novos estudos quanto à toxicidade das cepas analisadas devem ser realizados, incluindo a análise química da água, além da implantação de programas de monitoramento de cianotoxinas e mitigação de impactos antrópicos, de modo a evitar que novos eventos de proliferação de cianobactérias potencialmente tóxicas ocorram neste local de importância histórica e de uso recreativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAIRES, T. A.; SILVA, A. M. S. DA.; VASCONCELOS, V. M.; AFFE, H. J.; NETA, L. C. DE S.; SANT'ANNA, C. L.; NUNES, J. M. C. **Biotechnological potencial of marine benthic filamentous cyanobacteria from Brazil**. In: Caracterização Polifásica e avaliação do Potencial Biotecnológico do complexo *Lyngbya* (Cyabobacteria) em ambientes marinhos costeiros do Brasil. 2017. 172 f. Tese (Pós-Graduação em Botânica) - Universidade Federal de Feira de Santana, Bahia, 2017.

CALIJURI, M. DO C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A.DOS. **Cianobactéria e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Carlos: Editora Rima. 2006.109p.

RESOLUÇÃO CONAMA 357, de 18/03/2005. Dispõe sobre a classificação das águas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>>. Acesso em: 06 de ago. 2018.

DOURADO, C. M. **Orixás do Dique do Tororó: Simbologia e problemática cultural da população afrodescendente baiana**. 2009. 153 f. Dissertação (Pós-Graduação em Estudos Étnicos e Africanos) - Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2010.

JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JÚNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L. **Manual para cultivo de cianobactérias**. 1 ed. São Paulo: Publicações Online do Instituto de Botânica de São Paulo, 2012.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota-1. Teil: Chroococcales**, in Ettl, H.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Hrsg.), Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Gustav Fischer/Jena Stuttgart Lübeck Ulm. 1998. 548p.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J. & JOHANSEN, J.R. **Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera)**, Preslia, 86: 295-335, 2014

2014, using a polyphasic approach

MOHAMED, Z. A. **Allelopathic activity of the norharmane producing cyanobacterium *Synechocystis aquatilis* against cyanobacteria and microalgae**. Oceanological and Hydrobiological Studies, Poland, v. 42, p. 1-7, 2013.

- OLIVEIRA, E. E. R. DE. **A vegetação na transformação da paisagem do Dique do Tororó**. 2007. 160 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal da Bahia, Bahia. 2007.
- SANT’ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. DE P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. DO C.; CARVALHO, L. R. DE.; SOUZA, R. C. R. DE. **Manual Ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência, 2006. 58p.
- SANTOS, E.; PINHO, J. A. G.; MORAES, L. R. S.; FISHER, T. O. **Caminho das águas em Salvador: Bacias hidrográficas, bairros e fontes**. 2010. Disponível em: <www.meioambiente.ba.gov.br/publicacoes/livros/caminho_das_aguas.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2018.
- SISTEMA DE ÁREAS DE VALOR AMBIENTAL E CULTURAL. Salvador: SAVAM, 2007. Lei nº 7.400/2008 de 27 de fevereiro de 2007.
- SILVA, M. DE J.; GARCIA, K. S.; CELINO, J. J.; PINHEIRO, L.B.; PALMEIRA, J. B. A. **Indicadores primários da Qualidade da água do Dique do Tororó**. Cadernos de Geociências, Bahia, v. 8, n. 2, p. 92-98, 2011.
- SINGH, R. K.; TIWARI, S. P.; RAI, A. K.; MOHAPATRA, T. M. **Cyanobacteria an emerging source for drug discovery**. The Journal of Antibiotics, 64, p. 401-412, 2011.
- VAZ, M. G. M. V. **Cianobactéria de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas**. 2014. 136 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, 2014.

ANEXO

ANEXO A

Norma de formatação da revista

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Escopo

A *Rodriguésia* é uma publicação trimestral do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, que publica artigos e notas científicas, em Português, Espanhol ou Inglês em todas as áreas da Biologia Vegetal, bem como em História da Botânica e atividades ligadas a Jardins Botânicos.

Encaminhamento dos manuscritos

Os manuscritos devem ser enviados em 3 vias impressas e em CD-ROM à: Revista *Rodriguésia* Rua Pacheco Leão 915 Rio de Janeiro - RJ CEP: 22460-030 Brasil e-mail: rodriguesia@jbrj.gov.br

Os artigos devem ter no máximo 30 páginas digitadas, aqueles que ultrapassem este limite poderão ser publicados após avaliação do Corpo Editorial. O aceite dos trabalhos depende da decisão do Corpo Editorial.

Todos os artigos serão submetidos a 2 consultores ad hoc. Aos autores será solicitado, quando necessário, modificações de forma a adequar o trabalho às sugestões dos revisores e editores. Artigos que não estiverem nas normas descritas serão devolvidos.

Serão enviadas aos autores as provas de página, que deverão ser devolvidas ao Corpo Editorial em no máximo 5 dias úteis a partir da data do recebimento. Os trabalhos, após a publicação, ficarão disponíveis em formato digital (PDF, Adobe Acrobat) no site do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (<http://rodriguesia.jbrj.gov.br>).

Formato dos manuscritos

Os autores devem utilizar o editor do texto Microsoft Word, versão 6.0 ou superior, fonte Times New Roman, corpo 12, em espaço duplo.

O manuscrito deve ser formatado em tamanho A4, com margens de 2,5 cm e alinhamento justificado, exceto nos casos indicados abaixo, e impresso em apenas um lado do papel. Todas as

páginas, exceto a do título, devem ser numeradas, consecutivamente, no canto superior direito. Letras maiúsculas devem ser utilizadas apenas se as palavras exigem iniciais maiúsculas, de acordo com a respectiva língua do manuscrito. Não serão considerados manuscritos escritos inteiramente em maiúsculas.

Palavras em latim devem estar em *itálico*, bem como os nomes científicos genéricos e infragenéricos. Utilizar nomes científicos completos (gênero, espécie e autor) na primeira menção, abreviando o nome genérico subsequente, exceto onde referência a outros gêneros cause confusão. Os nomes dos autores de táxons devem ser citados segundo Brummitt & Powell (1992), na obra “Authors of Plant Names”.

Primeira página – deve incluir o título, autores, instituições, apoio financeiro, autor e endereço para correspondência e título abreviado. O título deverá ser conciso e objetivo, expressando a idéia geral do conteúdo do trabalho. Deve ser escrito em **negrito** com letras maiúsculas utilizadas apenas onde as letras e as palavras devam ser publicadas em maiúsculas.

Segunda página – deve conter Resumo (incluindo título em português ou espanhol), Abstract (incluindo título em inglês) e palavras-chave (até 5, em português ou espanhol e inglês). Resumos e abstracts devem conter até 200 palavras cada. O Corpo Editorial pode redigir o Resumo a partir da tradução do Abstract em trabalhos de autores não fluentes em português.

Texto – Iniciar em nova página de acordo com seqüência apresentada a seguir: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. Estes itens podem ser omitidos em trabalhos sobre a descrição de novos táxons, mudanças nomenclaturais ou similares. O item Resultados pode ser agrupado com Discussão quando mais adequado. Os títulos (Introdução, Material e Métodos etc.) e subtítulos deverão ser em **negrito**. Enumere as figuras e tabelas em arábico de acordo com a seqüência em que as mesmas aparecem no texto. As citações de referências no texto devem seguir os seguintes exemplos: Miller (1993), Miller & Maier (1994), Baker et al. (1996) para três ou mais autores ou (Miller 1993), (Miller & Maier 1994), (Baker et al. 1996).

Referência a dados ainda não publicados ou trabalhos submetidos deve ser citada conforme o exemplo: (R.C. Vieira, dados não publicados). Cite resumos de trabalhos apresentados em Congressos, Encontros e Simpósios se estritamente necessário.

O material examinado nos trabalhos taxonômicos deve ser citado obedecendo a seguinte ordem: local e data de coleta, fl., fr., bot. (para as fases fenológicas), nome e número do coletor (utilizando et al. quando houver mais de dois) e sigla(s) do(s) herbário(s) entre parêntesis, segundo o Index Herbariorum. Quando não houver número de coletor, o número de registro do espécime, juntamente com a sigla do herbário, deverá ser citado. Os nomes dos países e dos estados/províncias deverão ser citados por extenso, em letras maiúsculas e em ordem alfabética, seguidos dos respectivos materiais estudados. Exemplo: BRASIL. BAHIA: Ilhéus, Reserva da CEPEC, 15.XII.1996, fl. e fr., R. C. Vieira et al. 10987 (MBM, RB, SP). Para números decimais, use vírgula nos artigos em Português e Espanhol (exemplo: 10,5 m) e ponto em artigos em Inglês (exemplo: 10.5 m). Separe as unidades dos valores por um espaço (exceto em porcentagens, graus, minutos e segundos).

Use abreviações para unidades métricas do Systeme International d'Unités (SI) e símbolos químicos amplamente aceitos. Demais abreviações podem ser utilizadas, devendo ser precedidas de seu significado por extenso na primeira menção.

Referências Bibliográficas – Todas as referências citadas no texto devem estar listadas neste item. As referências bibliográficas devem ser relacionadas em ordem alfabética, pelo sobrenome do primeiro autor, com apenas a primeira letra em caixa alta, seguido de todos os demais autores. Quando houver repetição do(s) mesmo(s) autor(es), o nome do mesmo deverá ser substituído por um travessão; quando o mesmo autor publicar vários trabalhos num mesmo ano, deverão ser acrescentadas letras alfabéticas após a data. Os títulos de periódicos não devem ser abreviados. Exemplos: Tolbert, R. J. & Johnson, M. A. 1966. A survey of the vegetative shoot apices in the family Malvaceae. *American Journal of Botany* 53(10): 961-970. Engler, H. G. A. 1878. Araceae. In: Martius, C. F. P. von; Eichler, A. W. & Urban, I. *Flora brasiliensis*. Munchen, Wien, Leipzig, 3(2): 26-223. _____. 1930. Liliaceae. In: Engler, H. G. A. & Prantl, K. A. E. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. Aufl. Leipzig (Wilhelm Engelmann). 15: 227-386. Sass, J. E. 1951. *Botanical microtechnique*. 2ed. Iowa State College Press, Iowa, 228p.

Cite teses e dissertações se estritamente necessário, isto é, quando as informações requeridas para o bom entendimento do texto ainda não foram publicadas em artigos científicos.

Tabelas - devem ser apresentadas em preto e branco, no formato Word for Windows. No texto as tabelas devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo: “Apenas algumas espécies apresentam indumento (Tab. 1)...” “Os resultados das análises fitoquímicas são apresentados na Tabela 2...”

Figuras - não devem ser inseridas no arquivo de texto. Submeter originais em preto e branco e três cópias de alta resolução para fotos e ilustrações, que também podem ser enviadas em formato eletrônico, com alta resolução, desde que estejam em formato TIF ou compatível com CorelDraw, versão 10 ou superior. Ilustrações de baixa qualidade resultarão na devolução do manuscrito. No caso do envio das cópias impressas a numeração das figuras, bem como textos nelas inseridos, devem ser assinalados com Letraset ou similar em papel transparente (tipo manteiga), colado na parte superior da prancha, de maneira a sobrepor o papel transparente à prancha, permitindo que os detalhes apareçam nos locais desejados pelo autor. Os gráficos devem ser em preto e branco, possuir bom contraste e estar gravados em arquivos separados em disquete (formato TIF ou outro compatível com CorelDraw 10). As pranchas devem possuir no máximo 15 cm larg. x 22 cm comp. (também serão aceitas figuras que caibam em uma coluna, ou seja, 7,2 cm larg.x 22 cm comp.). As figuras que excederem mais de duas vezes estas medidas serão recusadas. As imagens digitalizadas devem ter pelo menos 600 dpi de resolução. No texto as figuras devem ser sempre citadas de acordo com os exemplos abaixo: “Evidencia-se pela análise das Figuras 25 e 26....” “Lindman (Fig. 3) destacou as seguintes características para as espécies...”

Após feitas as correções sugeridas pelos assessores e aceito para a publicação, o autor deve enviar a versão final do manuscrito em duas vias impressas e em uma eletrônica.

