



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



Cianobactérias no Rio Amazonas e o abastecimento em Macapá, Amapá:
análises moleculares, ecologia, filogenia, taxonomia e potencial tóxico

ELANE DOMÊNICA CUNHA DE OLIVEIRA

Macapá-AP
Dezembro/ 2018

ELANE DOMÊNICA CUNHA DE OLIVEIRA

Cianobactérias no Rio Amazonas e o abastecimento em Macapá, Amapá:
análises moleculares, ecologia, filogenia, taxonomia e potencial tóxico

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação – Conhecimento da Biodiversidade.

Orientador: Dr. Alan Cavalcanti da Cunha

Coorientadora: Dra. Silvia Maria Mathes Faustino

Macapá-AP
Dezembro/ 2018

Dados Internacionais de Catalogação de Publicação (CIP)
Biblioteca da Embrapa

O48c Oliveira, Elane Domênica Cunha de

Cianobactérias no Rio Amazonas e o abastecimento em Macapá, Amapá: análises moleculares, ecologia, filogenia, taxonomia e potencial tóxico/ Elane Domênica Cunha de Oliveira; Orientador, Alan Cavalcanti da Cunha; Coorientadora, Silvia Maria Mathes Faustino. – 2018.

157 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amapá, Departamento de Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Macapá, 2018.

1. Cianotoxinas. 2. Microcistina. 3. *Limnothrix planctonica*. 4. Qualidade da Água. 5. Estuário amazônico. I. Cunha, Alan Cavalcanti da, orientador. II. Faustino, Silvia Maria Mathes, coorientadora. III. Título.

CDD 21. ed.363.61098116

Bibliotecária Adelina do Socorro Serrão Belém CRB₂985

ELANE DOMÊNICA CUNHA DE OLIVEIRA

Cianobactérias no Rio Amazonas e o abastecimento em Macapá, Amapá:
análises moleculares, ecologia, filogenia, taxonomia e potencial tóxico

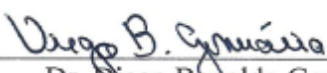
Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amapá, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

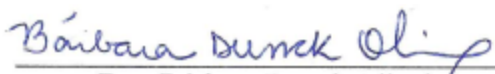
Orientador: Orientador: Dr. Alan Cavalcanti da Cunha

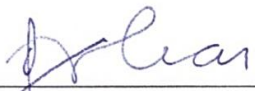
Coorientadora: Dra. Silvia Maria Mathes Faustino

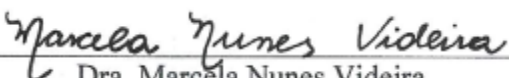
Banca examinadora


Dr. Alan Cavalcanti da Cunha
Universidade Federal do Amapá (Presidente)


Dr. Diego Bonaldo Genuário
Embrapa Meio Ambiente (CNPMA)


Dra. Bárbara Dunck Oliveira
Universidade Federal do Pará (UFPA)


Dr. Marcos Tavares Dias
Embrapa Amapá (CPAFAP)


Dra. Marcela Nunes Videira
Universidade do Estado do Amapá (UEAP)

Macapá- AP
Dezembro/ 2018

Dedico este trabalho à minha avó Domenica Iúdice e aos meus pais,
Maria Eleonora de Souza Cunha e Raimundo Silas Leal Cunha, por
todo carinho, apoio e incentivo nos estudos desde sempre.

AGRADECIMENTOS

Essa tese é resultado de muita cooperação, uso de vários laboratórios, instituições, equipamentos, conhecimentos variados vindo de boas pessoas de muitos lugares. O objetivo era conhecer as cianobactérias da captação do Rio Amazonas em todas as esferas possíveis: análises morfológicas, contagens, isolamento, cultivo, biologia molecular, detectar toxinas, capacidade de produção de toxinas, clima, variáveis ambientais, correlacionar essas variáveis, avaliar a estação de tratamento. Para tal, e em meio à crise política e financeira que instalou-se no Brasil, tive que contar com ajuda financeira, intelectual, empréstimo de equipamentos, disponibilidade de servidores e laboratórios, e etc. Esse agradecimento vai para todos que contribuíram de alguma forma para a construção deste trabalho.

A Deus pela oportunidade de cursar o doutorado na minha cidade de Macapá, estudando o maior rio do mundo, o qual admiro desde criança; e ainda ter a oportunidade de aprender mais e mais sobre estes seres apaixonantes, as cianobactérias.

Ao meu orientador, prof. Alan Cunha, pela orientação, infraestrutura de laboratório para as análises de água, contagens e pela ajuda nas discussões e correções da tese. À minha coorientadora, Silvia Faustino, pela orientação, e pelos recursos e contatos valiosos para a execução deste trabalho. Entre eles, a profa. Paula Schneider que possibilitou a realização das primeiras confirmações de identificação por biologia molecular e me apresentou o querido prof. Vitor Vasconcelos.

Agradeço ao prof. Vitor Vasconcelos por me ajudar a montar o planejamento de amostragem e pela oportunidade de frequentar o seu laboratório (BBE) e fazer todas as análises necessárias sem a cobrança de nenhuma taxa de bancada. Além de professor, foi também amigo e guia turístico, nos acolheu muito bem em Portugal. Ainda, agradeço a equipe que me apoiou durante o estágio de doutorado sanduíche: Raquel Castelo-Branco, Ana Luís, João Morais, Joana Passos, Micaela Vale, e Vitor Ramos. Agradeço especialmente à Raquel que foi muito paciente e prestativa e me ensinou muito sobre biologia molecular de cianobactérias; e ao Vitor Ramos que fez várias revisões críticas do artigo sempre enriquecendo a discussão.

À minha equipe de coleta composta por Natalina Borges, Jéssica Lopes e Paulo Gibson por possibilitar a coleta de material durante 13 meses sempre dispostos a ajudar em campo e no laboratório. Natalina Borges e Jéssica Lopes, foram minhas primeiras alunas e estagiárias, e me ajudaram grandemente tanto nos trabalhos referente ao doutorado, como em outras pesquisas desenvolvidas nestes anos, agradeço a elas pela disponibilidade e também pela oportunidade de ensinar.

Agradeço também aos técnicos Paulo Gibson e Geison Xisto que sempre deram suporte no laboratório de Saneamento e Química Ambiental da UNIFAP, especialmente ao Paulo que participou de todas as coletas e das análises físico-químicas. Ainda sobre a UNIFAP, não posso deixar de agradecer às técnicas Luciana e Gemima que auxiliaram na esterilização dos materiais e meios para o isolamento e cultivo das cianobactérias.

À CAESA, na pessoa do sr. César, Claudinaldo e Márcio, que nunca criaram impedimentos às amostragens, e ainda forneciam auxílio nas coletas e eventualmente até emprestaram o laboratório da CAESA para a realização de algumas análises. Agradeço ainda ao sr. Carlos Filho pela celeridade para disponibilizar os dados da ETAm. Aproveito para parabenizá-los, assim como os demais servidores desta instituição que buscam melhorias para os serviços de tratamento de água no estado do Amapá.

Também agradeço à UFPA, em nome da profa. Paula Schneider, e sua equipe do Laboratório de Genômica e Biotecnologia da UFPA- Roberta Rezende, Sônia Robledo, Jardecicleia Patricia, David César e Mariana Pureza, que me auxiliaram nas primeiras análises de biologia molecular deste trabalho. Este laboratório foi muito importante também, pois passaram a produzir conhecimento sobre cianobactérias e atrair especialistas para ministrar cursos na região Norte do país, e eu aproveitei e participei sempre que possível.

Aos amigos do LACAL e LABSAN, especialmente ao Arialdo Silveira-Junior, e Jéssica Vilhena, que também trabalham com análises biológicas e químicas da água, meus companheiros de doutorado, de limpeza do laboratório, confecção de meios de cultura, lanches e choros... e aos demais que contribuíram de forma direta ou indireta, Eldo Santos, Mayara, entre outros.

À minha família por dar todo o suporte necessário para cursar o doutorado. À minha mãe Maria Eleonora pelas inúmeras revisões do inglês e de outras revisões também; à minha maninha Camila Cunha pelas idas ao laboratório para me fazer companhia em horários mais desertos e por todo o carinho e auxílio; ao meu pai Raimundo Silas, pela ajuda sempre que necessário. Enfim, nos momentos de loucura vocês estiveram sempre ao meu lado e me ajudaram a manter a calma, continuar escrevendo e tentando ir mais longe. Neste agradecimento também incluo a minha avó Domenica Lúdice que sempre estimulou toda a família a seguir nos estudos, e me deu apoio em toda a caminhada desde a graduação.

Ao meu marido, Elias Silva de Oliveira, pela companhia em congressos, no doutorado sanduíche, na escrita da tese pelas madrugadas, e até em algumas análises no laboratório quando eu tinha que ficar até tarde da noite ou em finais de semana. Nestes anos ele quase tornou-se biólogo rsrs. Agradeço muito pelo amor, companhia e compreensão.

Aos meus colegas de trabalho do IEPA, agradeço o apoio e a constante preocupação em saber como estava o andamento da tese: Francisco Junior, Raullyan Borja, João Freitas, Patrick Cantuária, Tonny Santiago, Karla Nascimento, José Renan e Amanda Ferreira. Agradeço especialmente aos dois últimos que me substituíram várias vezes na chefia da Divisão de Botânica, cargo que ocupava no início do doutorado. Agradeço também ao Laboratório de Cultivo de Tecidos Vegetais, em nome do técnico Augusto por me ajudar na esterilização dos materiais quando a UNIFAP estava em greve. E ao Madson Gama que era meu chefe na época e não criou problemas com o meu ingresso no doutorado.

Agradeço também aos amigos Mariano Rocha pela força na confecção dos mapas; Luís Maurício Abdon pelo suporte crucial nas discussões estatísticas e por orientar minha aluna quando estive no doutorado sanduíche; Renan Guimarães que sempre ajudou quando era preciso, seja para esterilizar material ou conseguir algum reagente ou artigo. Aos colegas Sérgio e Dinaldo do laboratório de águas do IEPA que eventualmente ajudaram na coleta ou análise de algum parâmetro, emprestavam redes, entre outras coisas. Ainda, não posso esquecer de agradecer ao Patrick Cantuária pela ajuda nas fotos dos cultivos com estúdio e tudo mais; e a Raullyan Borja pelas dicas sobre formatação da tese e metodologia. Agradeço também à Natália Castelo do Laboratório de Virologia do Lacen pelo auxílio nas análises de ELISA. E, por fim, agradeço aos amigos que me deram força fazendo-se presentes e que souberam compreender minhas ausências em vários momentos ao longo deste período: Brenda, Francisco, Carol, Aline, Êmilie, Igor, Nívea, Rúbia, Gabi, entre outros.

Agradeço às pessoas que transmitiram conhecimento sobre cianobactérias durante esses quatro anos: Denise Amazonas e Maria do Carmo Carvalho no curso de “Identificação e contagem de cianobactérias” da CETESB; profª. Célia Sant’Anna, Diego Genuário, Camila Malone e Watson Arantes na disciplina de “Biologia de Cianobactérias: taxonomia, ecologia e toxicologia” no Ibot; prof. Carlos Bicudo e Andrea Tucci pelos conhecimentos repassados sobre algas e coleções durante o curso de “Taxonomia de algas eucariontes de águas continentais”, novamente ao prof. Vitor Vasconcelos, Dra. Kaarina Sivonen e David Fewer pelos conhecimentos adquiridos no workshop “Genomic Applications in Biotechnology (natural products)” na universidade do Porto. Aprendi muito nesse período também graças a vocês.

Jeito Tucujú (Música popular amapaense, composição: Joãozinho Gomes e Val Milhomem)

Quem nunca viu o Amazonas
Nunca irá entender a vida de um povo
De alma e cor brasileiras
Suas conquistas ribeiras
Seu ritmo novo

Não contará nossa história
Por não saber e por não fazer jus
Não curtirá nossas festas tucujú
Quem avistar o Amazonas nesse momento
E souber transbordar de tanto amor
Esse terá entendido o jeito de ser do povo daqui

Quem nunca viu o Amazonas
Jamais irá compreender a crença de um povo
Sua ciência caseira
A reza das benzedeiras
O dom milagroso

PREFÁCIO

Esta tese será apresentada em formato alternativo, isto é, foi dividida em capítulos, cada qual correspondendo a um artigo. Devido à escolha desse formato, algumas informações poderão aparecer repetidas, como exemplo a seção “Material e Métodos”, além de algumas conclusões, e uma parte da introdução.

O primeiro capítulo intitula-se “Caracterização morfológica e molecular de isolados de cianobactérias da foz do Rio Amazonas” e teve como objetivo identificar e caracterizar as linhagens de cianobactérias isoladas do Rio Amazonas por meio de taxonomia polifásica com o auxílio de técnicas de morfologia, biologia molecular, filogenia e observações em cultivo. O conteúdo deste capítulo consta no artigo “Morphological and molecular characterization of cyanobacterial isolates from the mouth of the Amazon River” que foi publicado na edição 387 (4) da revista *Phytotaxa*. Portanto, apenas as citações e referências deste capítulo seguiram as normas da revista *Phytotaxa*. É importante ressaltar que o conteúdo do capítulo da tese está um pouco mais aprofundado que o do artigo, com um maior detalhamento da seção de material e métodos, por exemplo.

O segundo capítulo intitula-se “Dinâmica de cianobactérias e primeira detecção de microcistina-LR em captação para água de consumo no Rio Amazonas (Brasil)” e objetivou investigar a dinâmica de cianobactérias no seu ambiente natural, que neste caso foi a área da captação de água para abastecimento do município de Macapá. Este capítulo mostra os resultados de um monitoramento anual com contagem das células de cianobactérias, cálculo de biovolume, caracterização morfológica das espécies registradas no monitoramento; análise de toxinas na água e também busca por genes relacionados a produção de toxinas em amostras ambientais. Em resumo, foi estudado sobre o potencial tóxico destas espécies e a presença de cianotoxinas na área de influência da captação de água. Os resultados deste capítulo ainda não foram submetidos para publicação.

RESUMO

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes que podem se proliferar em corpos d'água, ocasionando as chamadas florações. Esses eventos estão relacionados à produção de cianotoxinas que comprometem a qualidade da água, uma vez que tais toxinas podem afetar a saúde do homem. Há registros de intoxicações por cianotoxinas em muitos países, incluindo o Brasil, onde já houve casos fatais. O objetivo geral deste estudo foi verificar o potencial tóxico das cianobactérias e a presença de cianotoxinas no Rio Amazonas na área de influência da captação de água para abastecimento do município de Macapá, estado do Amapá. Para tal, o trabalho foi dividido em duas partes. A primeira teve como objetivo isolar linhagens de cianobactérias do Rio Amazonas e cultivá-las em laboratório para caracterização das cepas por taxonomia polifásica com o auxílio de técnicas de morfologia, comportamento em condições de cultivo, sequenciamento do RNAr 16S, análise filogenética e potencial para a produção de cianotoxinas. A segunda parte deste estudo investigou a dinâmica de cianobactérias no Rio Amazonas, por meio de um monitoramento anual com contagem das células de cianobactérias, cálculo de biovolume, caracterização morfológica das espécies, análise de toxinas na água e também busca por genes relacionados à produção de toxinas nas amostras ambientais. Foram realizadas amostragens mensais na água bruta e na água tratada da Estação de Tratamento de Água de Macapá (ETAm) durante o período de abril de 2015 a abril de 2016. Como resultados do primeiro capítulo, 14 linhagens de cianobactérias foram isoladas e caracterizadas. Os isolados pertencem aos gêneros *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Limnothrix*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* e uma cepa de Nostocales não identificada. Nenhuma das cepas apresentou potencial para a produção de microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina. Por outro lado, o monitoramento do rio Amazonas (realizado como parte do capítulo 2) revelou a primeira detecção de microcistina-LR neste rio, que é considerado o maior do mundo. A densidade de cianobactérias e concentração de microcistina-LR observadas foram baixas ao longo do período de estudo. Apenas no trimestre junho a agosto de 2015 ocorreu pico de *Limnothrix planctonica* (± 1000 cels. mL⁻¹) e detecção de microcistina-LR (máx 2,1 µg.L⁻¹), porém ambos os parâmetros apresentaram-se em conformidade com os limites recomendados pela Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde. As análises estatísticas indicaram fortemente que linhagens da espécie *L. planctonica* produziram a toxina microcistina-LR detectada neste estudo. Porém não foi possível confirmar essa informação, uma vez que a detecção pelos métodos químicos (ELISA e LC/MS) e moleculares (amplificação do marcador *mcyE*) ocorreu em amostras ambientais com a presença de várias espécies. Os parâmetros que mostraram maior associação com a produção de microcistina-LR e com o aumento da densidade de *L. planctonica* foram o aumento da transparência da água e vazão do rio. Tais resultados reforçam que *L. planctonica* produziu as toxinas detectadas, uma vez que esta espécie é bem adaptada às condições do Rio Amazonas e sua densidade se eleva mesmo no ápice da vazão, com o rio mais turbulento. Foram observados 10 táxons na água bruta ao longo do ano, sendo praticamente os mesmos, e todos com formato filamentoso. As cianobactérias com maior abundância no Rio Amazonas foram *L. planctonica*, *Leptolyngbya* sp. e *Alkalinema pantanalense*.

Palavras-chave: ETAm, *Limnothrix planctonica*, *mcyE*, microcistina-LR, taxonomia polifásica

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that can proliferate in water bodies, causing blooms. These events are related to the production of cyanotoxins that affect the quality of water, since such toxins can harm human health. There are records of cyanotoxin poisonings in many countries, including Brazil, where fatal cases have already occurred. This study aimed to verify the toxic potential of cyanobacteria and the presence of cyanotoxins in the Amazon River, near the inlet site of the drinking water supply of the municipality of Macapá, Amapá. For that purpose the study was divided in two parts. The first aimed at isolating cyanobacterial strains from the Amazon River and cultivate these strains to proceed polyphasic characterization based on morphology, behavior in culture, 16S rRNA gene sequencing, phylogenetic analysis and potential for toxin production. The second part of the study investigated the cyanobacteria dynamics in their natural habitat, the Amazon River, and cyanotoxins by means of morphological identification, counting, biovolume calculation of cyanobacteria, toxin analyses in water samples and a molecular screening for genes involved in the production of cyanotoxins. The sampling was carried out monthly from April 2015 to April 2016 at the raw water intake and at the exit from the water treatment plant. As a result of the first chapter, 14 cyanobacterial strains were isolated and identified by the polyphasic approach. The isolated strains belong to seven different genera, namely, *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Limnothrix*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* and an unidentified Nostocales taxa that may represent a new genus. None of the strains isolated in the present study were shown to possess genes associated with the production of microcystin, saxitoxin, anatoxin, or cylindrospermopsin. On the other hand, the water sampling monitoring realized in the second part of this study revealed the first detection of microcystin-LR in the Amazon River, the world's largest river. Cyanobacteria mean density and microcystin-LR concentration were both low during the monitoring. However, *Limnothrix planctonica* (± 1000 cells mL⁻¹) density showed a peak in the quarter June-August 2015, when Microcystin-LR (2.1 µg L⁻¹) was detected. Despite this, the treated water was in accordance with the values recommended by the Brazilian government available in Consolidation Ordinance No. 5. Statistical analyzes strongly indicate that the species *L. planctonica* produced the microcystin detected in this study. Nevertheless, it is not possible to confirm this information, once the detection by ELISA, LC/MS and *mcyE* occurred in environmental samples with many species. Higher transparency and high river discharge were associated with greater microcystin-LR concentration and rising in *L. planctonica* densities. Such results reinforce the hypothesis that *L. planctonica* might have produced the toxins detected in the present study, once this species is well adapted to the Amazon River environmental conditions, showed by the higher densities of this taxon even in the high river discharge, when the river is more turbulent. Ten cyanobacteria taxa were identified on the microscopic monitoring of the raw water from the Amazon River, all of them are filamentous forms. The most abundant cyanobacteria in the Amazon River were *Limnothrix planctonica*, *Leptolyngbya* sp., and *Alkalinema pantanalense*.

Keywords: WTP, *Limnothrix planctonica*, *mcyE*, microcystin-LR, Polyphasic approach.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional de Águas
BBE	Biotecnologia Azul e Ecotoxicologia/ <i>Blue Biotechnology and Ecotoxicology</i>
BI	Inferência Bayesiana/ <i>Bayesian Inference</i>
BLASTn	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local – Nucleotídeos/ <i>Basic Local Alignment Search Tool- Nucleotide BLAST</i>
BLASTx	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local – Proteínas/ <i>Basic Local Alignment Search Tool- Protein BLAST</i>
BSA	Albumina Bovina/ <i>Bovine Serum Albumine</i>
CAESA	Companhia de Águas e Esgoto do Estado do Amapá
CCA	Análise de Correspondência Canônica
Chao2	Estimador de riqueza Chao 2
CIIMAR	Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático/ <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Ionização por Electrospray/ <i>Electrospray Ionization</i>
ETAm	Estação de Tratamento de Água de Macapá
GF/F	Filtro de microfibra de vidro/ <i>Glass Microfiber Filter</i>
GenBank	Banco de dados de sequências genéticas do governo dos Estados Unidos/ <i>Genetic Sequence Database</i>
HAMAB	Herbário Amapaense, fiel depositário do Estado do Amapá
H0	Índice de diversidade de Shannon–Wiener
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
J	Uniformidade de Pielou
LACEN-AP	Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá
LC-MS	Cromatografia líquida com espectrômetro de massa
LEGE CC	Coleção de Cultivo do Laboratório Biotecnologia Azul e Ecotoxicologia/ <i>Blue Biotechnology and Ecotoxicology Culture Collection</i>
MC-LR	Microcistina L-R

MP	Máxima parcimônia
MV	Máxima verossimilhança
m/z	Razão massa-carga/ <i>Mass-Charge-Ratio</i>
MS	Espectrometria de Massas/ <i>Mass Spectrometry</i>
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (EUA) / <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial de Saúde/ <i>WHO- World Health Organization</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Detector de Arranjo de Diodos/ <i>photoelectric diodearray</i>
ppb	Parte por bilhão ($\mu\text{m/L}$)
R	Programa estatístico com código aberto
RNAr	RNA ribossomal ou ácido ribonucleico ribossômico
RNAr 16S	Molécula amplamente empregada em estudos filogenéticos de procariotos. Componente da pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos.
SPE	Extração em fase sólida/ <i>Solid Phase Extraction</i>
TDS	Sólidos Totais Dissolvidos
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
VIF	Fator de inflação da variância/ <i>Variance Inflation Factor</i>
VMP	Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 CIANOBACTÉRIAS	20
1.2 CIANOTOXINAS	21
1.2.1 Cianotoxinas e abastecimento	22
1.2.2 Fatores que induzem a produção de cianotoxinas	23
1.3 REGULAMENTAÇÃO PARA CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS	24
1.4 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS NA AMAZÔNIA	26
REFERÊNCIAS	29
2 PERGUNTA E HIPÓTESE	37
2.1 OBJETIVOS	38
2.1.1 Objetivo geral	38
2.1.2 Objetivos específicos	38
3 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE CIANOBACTÉRIAS DA FOZ DO RIO AMAZONAS	39
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	44
2.2 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL	45
2.3 ISOLAMENTO DE CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS	46
2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	49
2.4.1 Identificação morfológica	49
2.4.2 Identificação por biologia molecular (RNAr 16 S)	49
2.4.3 Filogenia	50
2.4.4 Potencial dos isolados para a produção de toxinas	51
3 RESULTADOS	53
3.1 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL	53
3.2 CEPAS ISOLADAS	54
3.2.1 Identificação morfológica e comportamento em cultivo	55
3.2.2 Análises moleculares e filogenia	61
3.2.3 Potencial tóxico	68

4 DISCUSSÃO	68
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77

4 CAPÍTULO 2: DINÂMICA DE CIANOBACTÉRIAS E PRIMEIRA DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR EM SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE ÁGUA PARA CONSUMO NO RIO AMAZONAS (BRASIL)

1 INTRODUÇÃO	87
2 MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1 ÁREA DE ESTUDO	90
2.2 DELINEAMENTO AMOSTRAL	92
2.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA E ANÁLISE	94
2.3.1 Fatores ambientais	94
2.3.2 Contagem e identificação de cianobactérias	96
2.3.3 Biovolume	98
2.3.4 Detecção de cianotoxinas	99
2.3.5 Análises estatísticas	105
3 RESULTADOS	106
3.1 Parâmetros ambientais	106
3.2 Contagem e identificação de cianobactérias	110
3.3 Biovolume	120
3.4 Toxinas	122
3.4.1 Quantificação de cianotoxinas pelo método de ELISA	122
3.4.2 Detecção de genes relacionados a cianotoxinas	124
3.4.3 Quantificação de MC-LR por LC-ESI-MS/MS	125
3.5 Associações entre cianobactérias, cianotoxinas e fatores ambientais	126
4. DISCUSSÃO	131
4.1. DINÂMICA DE CIANOBACTÉRIAS NA CAPTAÇÃO DE ÁGUA PARA CONSUMO	132
4.2 PRIMEIRA DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR NO RIO AMAZONAS	137
5 CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS	145

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

155

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Rio Amazonas é utilizado como fonte de água superficial para consumo humano no município de Macapá-AP. Suas águas são captadas a 500 m de distância da margem esquerda do rio, no centro comercial da cidade, e seguem para a Estação de Tratamento de Água de Macapá (ETAm) que fica a 1000 m de distância da adutora. Após a chegada na ETAm, ocorre o tratamento convencional da água, que é distribuída à população. A rede de abastecimento local atende a 40,6% da população urbana, que corresponde a aproximadamente 46.903 domicílios (CAESA, 2018). O restante da população (44,04%) utiliza água para consumo diretamente de fontes subterrâneas (água de poço) (GROTT et al., 2018; IBGE, 2011) ou não possui acesso à água.

É de conhecimento geral que o Rio Amazonas é o maior rio do mundo em volume (SIOLI, 1984). Entre suas principais características estão a alta concentração de sólidos dissolvidos que torna a água turbida, com baixa transparência e com coloração barrenta, uma das características principais de classificação do Amazonas como um rio de águas brancas (JUNK et al., 2011; SIOLI, 1984).

Nas proximidades de Macapá, o Rio Amazonas está perto da foz, mas não apresenta influência salina oceânica (WARD et al., 2013). Apesar desta relativa distância da zona salina (≈ 180 km), trata-se de um rio hidrodinamicamente muito turbulento (com velocidades médias acima de 1m/s ou maior), transferindo enorme quantidade de movimento para o fundo e margens (WARD, 2015). Esta dinâmica tende a ser exacerbada pelo efeito das marés semidiurnas influenciadas pelo Oceano Atlântico, com oscilações de sentido do escoamento e recirculações (CUNHA et al., 2012; CUNHA; STERNBERG, 2018). O nível da água varia ao longo dos ciclos de marés diariamente, sendo possível observar o fundo do rio próximo à captação de água.

Outra característica observada neste trecho é o despejo de fontes de poluição pontuais e difusas diretamente no Rio Amazonas, como exemplo o canal da rua Mendonça Júnior, que apresenta aspecto eutrofizado, cruza o centro comercial da cidade e desagua na orla, a poucos quilômetros da captação. Estudos prévios mostram que plumas de poluentes na orla de Macapá e Santana alcançam, em média durante o ciclo de maré, uma distância de aproximadamente 800 m a frente da margem da cidade de Macapá, sendo que o ponto de captação da ETAm está a apenas 500 m de distância da margem (CUNHA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2008). Problemas relacionados à poluição da água tem sido reportados nesta área, especialmente de

cunho microbiológico (CUNHA et al., 2004; CUNHA et al., 2005; CUNHA, 2012; DAMASCENO et al., 2015).

Um dos estudos que desperta atenção é o de Silveira-Júnior (2012), no qual realizou análise qualitativa do fitoplâncton e observou a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas como *Dolichospermum* sp., *Microcystis* sp. e *Oscillatoria* sp. com alta frequência de ocorrência no Rio Amazonas, na orla de Santana (município vizinho à Macapá). A presença de tais organismos próximo à orla de Macapá é preocupante devido a ameaça que as cianobactérias podem apresentar à segurança da qualidade da água para consumo (LI et al., 2017).

As cianobactérias são bactérias fotossintetizantes amplamente adaptadas e distribuídas em quase todos os ambientes. No meio aquático atuam como produtoras primárias, fornecendo oxigênio e energia para o ecossistema (WHITTON; POTTS, 2012). Estes organismos produzem metabólitos secundários de grande interesse biotecnológico e industrial com atividades anticâncer, antiviral, anti-inflamatória, fotoprotetora, inseticida, entre muitas outras (RASTOGI; SINHA, 2009, GREWE; PULZ, 2012). Por outro lado, as cianobactérias também produzem toxinas prejudiciais à saúde, popularmente conhecidas como cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999).

A taxa de crescimento de cianobactérias é lenta ($\pm 0,65$ duplicações por dia) comparada à de outros organismos fitoplanctônicos, como as clorofíceas ($\pm 0,93$ duplicações por dia) (LÜRLING et al., 2013). Tal crescimento lento normalmente dificulta a ocorrência de cianobactérias em altas densidades em ambientes com forte fluxo, como o Rio Amazonas. No entanto, em condições de pouca disponibilidade de luz (alta turbidez) apresentam taxas de crescimento superior a de outros organismos fotossintetizantes. Portanto, apresentam vantagens competitivas em águas túrbidas (MUR et al., 1999). Além disso, as cianobactérias que são adaptadas à vida em ambiente com poucos nutrientes, tendem a desenvolver florações em ambientes com enriquecimento de nutrientes (N e P) (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Floração é o nome dado aos eventos de elevada densidade de microalgas ou cianobactérias, nos quais estes organismos costumam produzir toxinas perigosas à saúde do homem. As cianotoxinas já provocaram acidentes fatais, como o ocorrido em Caruaru (PE) em 1996, com morte de 52 pessoas devido a intoxicação por microcistinas durante o processo de hemodiálise (AZEVEDO et al., 2002). Por este motivo, o Ministério da Saúde exige o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas na água fornecida pelas companhias de abastecimento (BRASIL, 2017). Porém, infelizmente, tal monitoramento ainda não é realizado no estado do Amapá (BRASIL, 2012).

Paralelo a isso, uma das cianotoxinas mais comuns (microcistina) é produzida no interior das células (endotoxinas) e podem ser liberadas para o meio exterior durante o tratamento da água como consequência da adição de algicidas como o sulfato de cobre (SIVONEN; JONES, 1999), da pré-oxidação por cloro ou ozônio (ZAMYADI et al., 2012; MEREL et al., 2013) ou pela permeabilização e quebra das células durante o tratamento (CODD et al., 2005). É importante mencionar que as cianotoxinas não são removidas facilmente por fervura, por exemplo (LI et al., 2017). Um dos materiais destinados à sua remoção é o carvão ativado (CHORUS; BARTRAM, 1999).

A vigilância de cianobactérias em corpos d'água usados para abastecimento é importante para evitar problemas de saúde pública. Para isso, é necessário monitorar as concentrações de células para detectar episódios em que atinjam elevada biomassa, nos quais costuma ocorrer a produção de cianotoxinas (FALCONER, 1999). Este trabalho visa gerar informações importantes para o estado do Amapá nas áreas de saneamento ambiental e saúde pública, resultando em melhorias na qualidade e segurança dos serviços de abastecimento de água fornecidos à população. Além disso, é um passo importante no estudo de cianobactérias e cianotoxinas na Amazônia, que é reconhecida como bioma que abriga grande diversidade de espécies, mas que possui condições precárias de saneamento e poucos especialistas.

1.1 CIANOBACTÉRIAS

Cianobactérias são bactérias que desenvolveram a capacidade de realizar fotossíntese, sendo os primeiros organismos a produzir oxigênio por meio desse processo (SCHOPF, 2012). Por apresentarem características comuns às algas e plantas, como o pigmento clorofila-a e os dois tipos de fotossistemas (KOMÁREK, 2006), no passado foram estudadas juntamente com as algas, e já foram nomeadas “algas azuis”, “cianofíceas” e “Cyanophyta” (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Existem registros destes organismos em fósseis estromatólitos datados de aproximadamente 3,5 bilhões de anos. O surgimento das cianobactérias neste período provocou grande impacto na vida do Planeta Terra e na sua história biótica, pois foram as responsáveis por produzir oxigênio biologicamente utilizável, necessário para a respiração aeróbia (SCHOPF, 2012; SOO et al., 2017). Deste modo, foram fundamentais para a oxigenação da atmosfera terrestre, e para o desenvolvimento dos seres aeróbios.

Além de atuarem como produtores primários, participam de vários ciclos biogeoquímicos como o do nitrogênio (CODD et al., 2005) e apresentam potencial para

utilização na produção de biocombustíveis (PARMAR et al., 2011). Desde seu surgimento, habitam diversos tipos de ambientes terrestres e aquáticos, incluindo habitats extremos (WHITTON; POTTS, 2012). Na água, podem viver no sedimento, plâncton ou no perífiton (SANT'ANNA et al., 2006). As espécies planctônicas ficam livres na superfície da água e, em situações favoráveis, como o enriquecimento nutricional (eutrofização) do corpo d'água ou condições hidrológicas estáveis podem se proliferar dando origem a florações (CHORUS; BARTRAM, 1999).

As florações são caracterizadas pela existência de elevada biomassa de cianobactérias em relação às condições normais do ecossistema aquático. Geralmente, nessas situações, uma ou duas espécies predominam. Essas proliferações podem provocar impactos ecológicos (PAERL et al., 2001), econômicos, e à saúde (CHORUS & BARTRAM, 1999).

Ecologicamente, florações podem ser não palatáveis ou tóxicas às espécies consumidoras, causando alterações nas cadeias alimentares com potenciais efeitos na ciclagem de nutrientes e biodiversidade (PAERL et al., 2001). Além disso, como não são consumidas, ao se decompor, as densas massas de cianobactérias causam excessivo consumo de oxigênio do corpo d'água, causando declínio ou eliminação de peixes e outros organismos (PAERL, 2008). Outro problema ecológico é decorrente das florações de cianobactérias fixadoras de nitrogênio, pois estas podem constituir novas fontes de nitrogênio promovendo potencialmente o enriquecimento deste nutriente (PAERL, 2008), através de retroalimentação do sistema.

Quanto aos impactos econômicos e à saúde, as florações podem comprometer o uso da água para abastecimento (LI et al., 2017), dessedentação animal, recreação de contato primário, irrigação de hortaliças, aquicultura e pesca (WHO, 2003).

1.2 CIANOTOXINAS

As toxinas produzidas por cianobactérias, denominadas genericamente por cianotoxinas, são metabólitos secundários que podem causar sérios danos a mamíferos e diversos organismos da biota aquática (CARMICHAEL 1992; SOARES, 2009). Estes metabólitos podem ser classificados em função do alvo de sua toxicidade em: neurotoxinas, hepatotoxinas (CARMICHAEL, 1992), citotoxinas (FALCONER, 1999), dermatotoxinas (SIVONEN; JONES, 1999).

As hepatotoxinas são as mais estudadas. Elas provocam injúrias no fígado, onde inibem enzimas fosfatases, que atuam na estrutura e funcionamento das células hepáticas. Esta inibição pode provocar deformação das células, hemorragia, câncer hepático e morte (FALCONER,

1999). Microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina são as toxinas que fazem parte deste grupo (SIVONEN; JONES, 1999).

Entre as toxinas mais comuns, estão as microcistinas, que possuem uma estrutura peptídica cíclica, sendo estável à hidrólise química e oxidação (MSAGATI et al., 2006; DJEDIAT et al., 2010). As microcistinas são resistentes a altas temperaturas e sua toxicidade permanece mesmo após a fervura, podendo levar indivíduos a uma maior incidência de câncer hepático (CHEN et al., 1996; SANCHES et al., 2007). Apesar de ser tóxica ao fígado, as microcistinas podem induzir necrose e/ ou apoptose em células de outros órgãos. Estudos *in vitro* demonstraram os efeitos citotóxicos da microcistina-LR em células humanas como eritrócitos, linfócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos (McDERMOTT et al., 1998; LANKOFF et al., 2004; SICINSKA et al., 2006).

Registros de intoxicações humanas por cianotoxinas têm sido documentados em muitos países, incluindo o Brasil. Em 1996, aproximadamente 60 pacientes renais crônicos faleceram após terem sido submetidos à sessões de hemodiálise, em uma clínica da cidade de Caruaru (PE), em decorrência da água utilizada para tratamento dos pacientes ter sido fornecida por um reservatório onde havia uma floração de cianobactérias tóxicas (AZEVEDO et al., 2002).

1.2.1 Cianotoxinas e abastecimento

Uma das principais vias de intoxicação por cianotoxinas é pelo consumo oral da água, por isso existe uma preocupação crescente quanto aos mananciais de abastecimento de água, que necessitam de monitoramento e tratamento adequado para remoção dessas toxinas (FUNASA, 2003).

As cianotoxinas mais comuns são as microcistinas (PEARSON et al., 2010), as quais são endotoxinas, isto é, são produzidas nas cianobactérias e ficam retidas até que ocorra a lise celular (ROSS et al., 2006) devido ao envelhecimento ou morte natural (CARVALHO, 2006). Além dessas situações, alguns autores afirmam que elas também podem ser liberadas por situações induzidas pelo meio (MEREL et al., 2013).

Durante o tratamento da água pode ocorrer lise ou permeabilização da parede celular de cianobactérias com a liberação de toxinas (CODD et al., 2005). Por esse motivo, a água destinada ao abastecimento deve ser monitorada constantemente para aplicação do tratamento mais adequado visando à remoção das células de cianobactérias sem comprometer sua integridade, evitando o lançamento de toxinas na água para consumo (MEREL et al., 2013).

Entre os fatores que induzem este processo no tratamento, podemos citar a adição de algicidas como o sulfato de cobre (SIVONEN; JONES, 1999) e de outras substâncias na etapa de pré-oxidação, como a aplicação de permanganato (PIETSCH et al., 2002) e de cloro (ZAMYADI et al., 2012; FUNASA, 2007).

Pietsch et al. (2002) realizaram um experimento em escala piloto para verificar em que fases do tratamento convencional da água ocorre a liberação de cianotoxinas. Eles concluíram que o lançamento de toxinas para o meio extracelular se dá na pré-oxidação, o que já era conhecido, e também na floculação e filtração possivelmente devido ao estresse hidráulico (turbulência) e aos gradientes de pressão nos canos e filtros. Ross et al. (2006) também observaram que o estresse físico induz ao lançamento de cianotoxinas.

Outras partes do tratamento que oferecem riscos são a flotação e a sedimentação. Ambas removem as cianobactérias de forma eficiente, entretanto, ao serem transferidas para o lodo resultante do processo, até 90% das cianobactérias sofrem lise e liberam toxinas em menos de 24hs (MEREL et al., 2013). Logo, o lodo deve ser rapidamente removido para evitar a contaminação da água (WHO, 2015).

Além do risco das toxinas, as cianobactérias podem produzir compostos que conferem sabor e odor à água (de terra e mofo), como a geosmina e o 2-methylisoborneol (2-MIB). Esses não estão relacionados com a produção de toxinas, mas são indesejáveis na água para consumo (FUNASA, 2007; ZAMYADI et al., 2012).

Outro problema que pode surgir é a geração de subprodutos da cloração, como os trialometanos (THMs), entre eles o clorofórmio, que são prejudiciais à saúde e apresentam efeitos carcinogênicos (TOMINAGA; MIDIO, 1999). Eles são formados quando o cloro adicionado na pré-oxidação (um pré-tratamento) reage com a matéria orgânica das cianobactérias e produtos do seu metabolismo (ZAMYADI et al., 2012; FUNASA, 2007; WHO, 2015). Os subprodutos da cloração podem originar-se da interação com ácidos húmicos e fúlvicos da decomposição da vegetação terrestre, de vegetais aquáticos, algas e cianobactérias (FUNASA, 2007).

1.2.2 Fatores que induzem a produção de cianotoxinas

Em condições naturais, as cianobactérias vivem em equilíbrio com os demais grupos de algas. Entretanto, em situações favoráveis, como o enriquecimento nutricional (eutrofização) do corpo d'água ou em condições hidrológicas estáveis pode ocorrer o aumento significativo da biomassa de cianobactérias dando origem a florações (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Nesses episódios de elevada biomassa de cianobactérias pode ocorrer a produção de cianotoxinas. Apesar de geralmente associadas às condições eutróficas, existem registros dessas proliferações também em ambientes oligotróficos (com poucos nutrientes) (FERNANDES et al., 2009). Embora as florações apresentem riscos, estas podem ser de cepas tóxicas e não tóxicas.

Os fatores que levam a produção de cianotoxinas estão sendo investigados atualmente e ainda não são bem conhecidos. Contudo, há fortes indícios de correlação entre a produção destas com a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio (BEASLEY et al., 1989; CARMICHAEL, 1992; HAIDER et al., 2003).

Foi constatado que a temperatura da água possui forte relação com a produção de toxinas. Quanto mais alta a temperatura, maiores as concentrações de cianotoxinas, especialmente microcistina (DAVIS et al., 2009; JOUNG et al., 2011). Além da temperatura, Utkilen e Gjølme (1995) verificaram que o aumento na concentração de ferro intracelular de *Microcystis aeruginosa* associado a intensidades luminosas mais elevadas seriam responsáveis pelo aumento na produção de microcistinas por esta espécie (NASCIMENTO, 2012).

1.3 REGULAMENTAÇÃO PARA CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

Após o acidente de Caruaru em 1996 e outros incidentes, limites para cianobactérias e cianotoxinas começaram a ser inseridos em normas relacionadas à saúde e qualidade ambiental no mundo todo, sendo motivo de preocupação constante de órgãos ambientais e de saúde, institutos de pesquisa e companhias de saneamento (DEBERDT, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou em 1998 um adendo à segunda edição do guia “Guidelines for Drinking-water Quality- volume 1” que reúne o conhecimento científico sobre a qualidade da água para consumo e o divulga para que cada país possa criar seus padrões e regulamentos. Neste adendo, foi feita pela primeira vez a recomendação para concentração limite de uma cianotoxina na água para consumo, no caso a microcistina, de $1\mu\text{g/L}^{-1}$ da fração intracelular+extracelular (WHO, 1998; IBELINGS et al., 2014). Na publicação de 1993, antes do adendo, as microcistinas foram mencionadas, porém nesta ocasião não havia dados suficientes para se fazer recomendações sobre limites permitidos para o consumo (WHO, 1998).

Na edição posterior e na mais recente do “Guidelines for Drinking-water Quality” da OMS, a microcistina continua sendo a única cianotoxina com dados disponíveis suficientes para

gerar um valor de referência de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, 2011, 2017). Este valor foi estimado com base em um indivíduo adulto de 60kg que consome em média 2 litros de água diariamente (Codd et al., 2005). Apesar da OMS não ter fornecido limite para as demais cianotoxinas, alguns países utilizam valores padrões para definir suas concentrações máximas permitidas (WHO, 2015).

No Brasil, foi implementada em 2000 a Portaria 1.469 do Ministério da Saúde, que exigia o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas pelo responsável pelo abastecimento de água para consumo humano. Esta também estabeleceu valor máximo de microcistina ($1,0\mu\text{g.L}^{-1}$) e posteriormente foi substituída pelas portarias 518/2004, 2.914/2011 e nº5/2017 que continuaram com as mesmas exigências com relação à microcistina e tratam sobre a vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2000; 2004; 2011; 2017).

A portaria mais recente (Portaria de consolidação nº5/2017) exige ainda o monitoramento de saxitoxinas, para a qual foi determinado o valor máximo permitido de $3,0\mu\text{g.L}^{-1}$. Além disso, recomenda a análise de cilindrospermopsina e anatoxina-a(s) quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores destas toxinas (BRASIL, 2017). No tocante a quantidade de células, o monitoramento deve ser mensal quando a densidade for $\leq 10.000,00$ células/ml e semanal quando for acima deste valor. Sobre este valor para a densidade de cianobactérias, estudo de Vasconcelos et al. (2011) sugere que o limite para análises adicionais deve baixar para 5.000 células/ml, pois 10.000 células/ml pode não ser suficiente para garantir a segurança da água para consumo.

Com relação aos demais usos da água, a OMS também possui publicou orientações para a segurança em águas de recreação na qual foram definidos os níveis de alerta à saúde de acordo com as concentrações de cianobactérias (WHO, 2003).

Um alerta de baixo risco à saúde está relacionado à reações adversas de curta duração, como irritação na pele e problemas gastrointestinais, na presença de 20.000 células/ml de cianobactérias. Nesta densidade, espera-se uma concentração de $2-4\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas se as espécies produtoras de microcistinas forem dominantes (WHO, 2003). Pesquisa realizada em praias na Austrália demonstrou que os limites de 20.000 células/mL podem ser muito altos, visto que observaram aumento de sintomas em concentrações de 5.000 células/mL (PILOTTO et al., 1997).

Já o alerta de risco moderado está relacionado à reações adversas de curta duração e também de longa duração na presença de algumas espécies de cianobactérias e concentração de 100.000 células/ml, na qual é esperada $20\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas se a floração for de *Microcystis* ou de *Planktothrix agardhii*. Por fim, o alerta de alto risco ocorre em situações com

formação de espumas de cianobactérias, onde há contato com todo o corpo e risco de ingestão/inalação. Neste caso, as cianobactérias podem estar em populações de milhares ou milhões de células e podem provocar as situações descritas nos itens anteriores e ainda envenenamento agudo (WHO, 2003).

O Brasil seguiu as orientações da Organização Mundial de Saúde e em 2005 o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) publicou a resolução CONAMA 357/2005, que estabelece valores máximos para o número de células de cianobactérias para as diferentes classes de água, evidenciando também a necessidade de monitoramento desses organismos em águas superficiais (BRASIL, 2005).

A resolução CONAMA 357 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes para o seu enquadramento e institui que as águas doces de classe I devem apresentar valores máximos de cianobactérias de $20.000 \text{ cel.mL}^{-1}$ ou $2\text{mm}^3.\text{L}$. Já as de classe II devem apresentar densidade de cianobactérias de até $50.000 \text{ cel.mL}^{-1}$ ou $5\text{mm}^3.\text{L}$ e, por fim, as águas de classe III deve ter até $100.000 \text{ cel.mL}^{-1}$ ou $10\text{mm}^3.\text{L}$ (BRASIL, 2005).

A classificação do CONAMA 357 baseia-se na qualidade da água exigida para usos atuais e futuros. As águas de classe I destinam-se ao abastecimento, após tratamento simplificado; proteção de comunidades aquáticas; recreação de contato primário, irrigação de hortaliças, entre outros. As de classe II são destinadas também ao abastecimento, após tratamento convencional; aquicultura, pesca e demais atividades da classe I. Finalmente, as de classe III exigem tratamento convencional ou avançado para abastecimento e destinam-se à irrigação de culturas arbóreas, pesca amadora, recreação de contato secundário e dessedentação de animais (BRASIL, 2005).

1.4 CIANOBACTERIAS E CIANOTOXINAS NA AMAZÔNIA

A maioria dos trabalhos sobre cianobactérias no Brasil concentra-se nas regiões sul e sudeste, sendo conhecidos poucos trabalhos na Amazônia (GENUÁRIO et al., 2017; MENEZES et al., 2015, RIGONATO et al., 2017), dentre eles, os de Fiore et al. (2005), Vieira et al. (2003, 2005), Sá et al. (2010), Genuário et al. (2017, 2018), Silva et al. (2018), Oliveira et al. (2018), entre outros que serão comentados adiante.

Um dos primeiros estudos específicos sobre cianobactérias na região Amazônica foram realizados por Vieira et al. (2003, 2005). Ambos abordaram a ocorrência de espécies produtoras de toxinas no reservatório de água para abastecimento da cidade de Belém-Pará, Amazônia Oriental. Tais estudos resultaram no isolamento de cepas produtoras de microcistina dos

gêneros *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Hapalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Radiocystis*. Também em 2005, Fiore et al. (2005) estudaram a diversidade de cianobactérias fixadoras de nitrogênio nos sedimentos dos rios Amazonas, Solimões e seus tributários na Amazônia Ocidental, resultando no isolamento de várias linhagens dos gêneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Fischerella* e *Anabaena*.

Em 2010, Sá et al. reportaram a ocorrência de floração tóxica de *Dolichospermum* sp. no rio Tapajós, em Santarém. Posteriormente, em 2012, foram disponibilizados dois trabalhos sobre cianobactérias na Amazônia. Um foi o de Nascimento (2012), que avaliou fatores relacionados à dinâmica de cianobactérias e cianotoxinas no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel, em Rondônia. O outro, foi de Dall'agnol et al. (2012), que utilizou técnicas independentes de cultivo para estudar a diversidade de *Synechococcus* no reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, no Pará. Logo em seguida, Aprile et al. (2013) publicaram um estudo de variação espacial e temporal de cianobactérias no Rio Madeira, Amazônia Ocidental.

Recentemente, Doherty et al. (2017) também utilizaram técnicas independentes de cultivo para estudar a biogeografia de bactéria no rio Amazonas e seus tributários. Eles detectaram que as cianobactérias eram representadas principalmente por espécies de *Synechococcus* e *Merismopedia*, as quais mostraram maior proporção durante o período de menor vazão do Amazonas. Por sua vez, Satinsky et al. (2017) empregaram as mesmas técnicas descritas acima para estudar a diversidade de bactérias em águas amazônicas. Eles concluíram que *Synechococcus* é dominante no rio Tapajós, e *Microcystis aeruginosa* em Belém (Pará).

Outro estudo no rio Amazonas e tributários é o de Genuário et al. (2017), o qual isolou 11 cepas homocitadas pertencentes aos gêneros *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Pantalinema*, *Planktothrix* e *Pseudanabaena*. Apenas recentemente foram descritas novas espécies de cianobactérias para a região amazônica: *Cronbergia amazonensis* do rio Solimões (GENUÁRIO et al., 2018a), e *Amazoninema brasiliense* dos rios Amazonas e Solimões (GENUÁRIO et al., 2018b).

O último trabalho realizado na região é o de Oliveira et al. (2019), no qual 14 linhagens de cianobactérias foram isoladas do Rio Amazonas na orla de Macapá, Amapá. As cepas isoladas foram identificadas por métodos morfológicos e moleculares, assim como foram testadas com relação à produção de cianotoxinas. Nenhuma das linhagens de *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Limnothrix*, *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Pseudanabaena* apresentaram genes relacionados à produção de cianotoxinas.

Para o Amapá este é até o momento o único trabalho específico sobre cianobactérias. Porém, estudos sobre o fitoplâncton realizados nos rios Araguari e Amazonas, permitiram a

identificação de cianobactérias a partir de métodos morfológicos (SILVEIRA-JÚNIOR, 2012, CUNHA et al., 2013, SILVA et al., 2018). Alguns estudos sobre o fitoplâncton no estado do Amapá que apresentam informações sobre cianobactérias serão abordados a seguir.

Oliveira (2007), em estudo sobre o fitoplâncton do rio Araguari, verificou a ocorrência de nove espécies de cianobactérias. Este grupo foi o mais representativo em ambos os períodos estudados, e na seca a densidade foi mais expressiva. Os valores de densidade encontrados por ele estiveram entre 157 e 10.961 ind. mL⁻¹ nos períodos de seca e entre 209 e 5.931 ind. mL⁻¹ na cheia. O autor registrou floração da espécie *Synechocystis aquatilis* em maio de 2005.

Outro trabalho realizado no mesmo rio foi o de Dias (2007) com intuito de analisar a estrutura da comunidade fitoplanctônica na Reserva Biológica do Lago Piratuba. A autora verificou a presença de 50 táxons de cianobactérias, sendo esta a classe que apresentou o maior número de espécies. Dias (2007) também registrou uma floração em 2005 no lago do Lodão. Desta vez, a espécie pertenceu ao gênero *Dolichospermum* sp.

Em 2012, Silveira-Júnior identificou no rio Amazonas, na orla de Macapá e Santana, 24 espécies de cianobactérias. Os gêneros *Dolichospermum*, *Microcystis* e *Oscillatoria* foram encontrados em mais de 70% das amostras, sendo considerados muito frequentes.

Cunha et al. (2013) realizou levantamento do fitoplâncton nos rios Araguari e Falsino, desde a Floresta Nacional do Amapá até o reservatório da Usina Hidrelétrica Coaracy Nunes identificando um total de 27 táxons de cianobactérias. Nos anos seguintes surgiram as novas hidrelétricas de Cachoeira Caldeirão e Ferreira Gomes que foram estudadas por Vilhena (2016), que identificou 20 espécies de cianobactérias, dentre elas espécies dos gêneros potencialmente tóxicos *Lyngbya* sp., *Microcystis* sp. e *Planktothrix*.

O estudo sobre o fitoplâncton mais recente que revelou informações sobre cianobactérias no estado do Amapá é o de Silva et al. (2018), que utilizou o fitoplâncton como um dos parâmetros para avaliar se a bubalinocultura influencia negativamente na qualidade dos corpos d'água no Baixo Araguari. Neste estudo as cianobactérias mais abundantes foram: *Anabaena* sp., *Limnothrix planctonica*, *Leptolyngbya* sp., *Raphidiopsis mediterranea* e *Alkalinema* sp.

REFERÊNCIAS

APRILE, F.; DARWISCH, A. J.; MERA, P. A. S.; ROBERTSON, B. A.; MARSHALL, B. G.; SIQUEIRA, W. on the Occurrence of Cyanobacteria in the Madeira River in the Brazilian Amazon. **Global journal of biology, agriculture & health sciences**, [s. l], v. 2, n. 3, p. 125–133, 2013.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, [s. l], v. 181–182, p. 441–6, 2002.

BEASLEY, V. R.; COOK, W. O.; DAHLEM, A. M.; HOOSER, S. B.; LOVELL, R. A.; VALENTINE, W. M. Algae Intoxication in Livestock and Waterfowl. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [s. l], v. 5, n. 2, p. 345–361, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 1.469**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 29 dez. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 518**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 25 mar. 2004.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Nº. 357** Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 17 mar. 2005.

BRASIL. **Portaria 2914**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 12 dez. 2011.

BRASIL. **Avaliação da Vigilância da Qualidade da Água no Estado do Amapá – Ano base 2011**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 11p, 2012.

BRASIL. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Portaria de Consolidação Federal nº 5**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 28 set. 2017.

CAESA. **Informações CAESA - ETAM**. Destinatário: Elane Domênica Cunha de Oliveira. [S. l.], 14 nov. 2018 mensagem eletrônica.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, [s. l], p. 445–459, 1992.

CHEN, G.; YU, S.; WEI, G. [Studies on microcystin contents in different drinking water in highly endemic area of liver cancer]. **Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]**, [s. l], v. 30, n. 1, p. 6–9, 1996.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences , monitoring and management**. Londres: E & FN Spon, 1999. 400 p.

CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 203, n. 3 SPEC. ISS., p. 264–272, 2005.

CUNHA, A.; CUNHA, H.; JÚNIOR, A. C.; DANIEL, L.; SCHULZ, H. Qualidade microbiológica da água em rios de áreas urbanas e periurbanas no baixo amazonas: o caso do Amapá. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 322–328, 2004.

CUNHA, A. C.; CUNHA, H. F. A.; SOUZA, J. A.; NAZARÉ, A. S.; PANTOJA, S. Monitoramento de Águas Superficiais em Rios Estuarinos Poluição do Estado do Amapá sob Poluição Microbiológica. **Bol. Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 1, p. 191–199, 2005.

CUNHA, A. C. Da; BRITO, D. C.; JUNIOR, A. C. B.; PINHEIRO, L. A. dos R.; CUNHA, H. F. A.; SANTOS, E.; KRUSCHE, A. V. Challenges and Solutions for Hydrodynamic and Water Quality in Rivers in the Amazon Basin. **Hydrodynamics - Natural Water Bodies**, v. 3, p. 67–88, 2012.

CUNHA, E. D. S.; DA CUNHA, A. C.; DA SILVEIRA JUNIOR, A. M.; FAUSTINO, S. M. M. Phytoplankton of two rivers in the eastern amazon: Characterization of biodiversity and new occurrences. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 364–377, 2013.

CUNHA, A. C.; STERNBERG, L. S. L. Using stable isotopes ^{18}O and ^2H of lake water and biogeochemical analysis to identify factors affecting water quality in four estuarine Amazonian shallow lakes. **Hydrological Processes**, p. 1188–1201, 2018.

DALL'AGNOL, L. T.; GHILARDI-JUNIOR, R.; MCCULLOCH, J. A.; SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A. Phylogenetic and gene trees of *Synechococcus*: Choice of the right marker to evaluate the population diversity in the Tucuru Hydroelectric Power Station Reservoir in Brazilian Amazonia. **Journal of Plankton Research**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 245–257, 2012.

DAMASCENO, M. C. S.; RIBEIRO, H. M. C1; TAKIYAMA, L. R.; DE PAULA, M. T. **Avaliação sazonal da qualidade das águas superficiais do Rio Amazonas na orla da cidade de Macapá, Amapá, Brasil**. *Ambiente & Água*, v. 10, n. 3, p. 598-613, 2015.

DAVIS, T. W.; BERRY, D. L.; BOYER, G. L.; GOBLER, C. J. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. **Harmful Algae**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 715–725, 2009.

DEBERDT, G. L. B. G. L. B.; NETO, R. C.; AGUIJARO, L. F. Florações de Cianobactérias e sua Inserção na Legislação Brasileira. **Sanasa.Com.Br**, [s. l.], n. 19, p. 1–5, 2004.

DIAS, Maxley Barbosa. **Composição e abundância do fitoplâncton do sudoeste da Reserva Biológica do Lago Piratuba (Amapá, Brasil)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior)- Instituto de Pesquisas da Amazônia, Manaus.112p., 2007.

DJEDIAT, C.; MALÉCOT, M.; DE LUZE, A.; BERNARD, C.; PUISEUX-DAO, S.; EDERY, M. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. **Toxicon**, [s. l.], v. 55, n. 2–3, p. 531–535, 2010.

DOHERTY, M.; YAGER, P.; CRUMP, B.; DOHERTY, M.; YAGER, P. L.; MORAN, M. A.; COLES, V. J. Citation: Bacterial Biogeography across the Amazon River-Ocean Continuum Bacterial Biogeography across the Amazon River-Ocean Continuum. [s. l.], n. May, 2017.

FALCONER, I.; BARTRAM, J.; CHORUS, I.; KUIPER-GOODMAN, T.; UTKILEN, H.; BURCH, M.; CODD, G. Safe levels and safe practices. In: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences , monitoring and management**. E & FN Spon, 1999. p.161-182.

FERNANDES, V. D. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B. De; DE, B. D. Â. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 2, p. 247–258, 2009.

FIORE, M. de F.; NEILAN, B. A.; COPP, J. N.; RODRIGUES, J. L. M.; TSAI, S. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**, [s. l.], v. 39, n. 20, p. 5017–5026, 2005.

FUNASA. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano**. Brasília, DF: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. mai, 2003.

FUNASA. **Potencial fatores de risco à saúde decorrentes de subprodutos da cloração**. [s. l.], v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2007.

GENUÁRIO, D. B.; SANT'ANNA, C. L.; MELO, I. S. Elucidating the *Cronbergia* (cyanobacteria) dilemma with the description of *Cronbergia amazonensis* sp. nov. isolated from Solimões river (Amazonia, Brazil). **Algal Research**, [s. l.], v. 29, n. July 2017, p. 233–241, 2018a.

GENUÁRIO, D. B.; DE SOUZA, W. R.; MONTEIRO, R. T. R.; SANT'ANNA, C. L.; MELO, I. S. *Amazoninema* gen. nov., (Synechococcales, Pseudanabaenaceae) a novel cyanobacteria genus from Brazilian Amazonian rivers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], p. 1–9, 2018b.

GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; MELO, I. S. De. Phylogenetic insights into the diversity of homocytous cyanobacteria from Amazonian rivers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s. l.], v. 116, n. August, p. 120–135, 2017.

GREWE, C. B.; PULZ, O. The Biotechnology of Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 707–739.

GROTT, S. L.; FAÇANHA, E. B.; FURTADO, R. N. Variação espaço-sazonal de parâmetros da qualidade da água subterrânea usada em consumo humano em Macapá , Amapá , Brasil. 23, n. 4, p. 645–654, 2018.

HAIDER, S.; NAITHANI, V.; VISWANATHAN, P. N.; KAKKAR, P. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. **Chemosphere**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 1–21, 2003.

IBELINGS, B. W.; BACKER, L. C.; KARDINAAL, W. E. A.; CHORUS, I. Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe. **Harmful Algae**, [s. l.], v. 40, p. 63–74, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2010: características da população e dos domicílios – resultado dos universos**. Brasil: 2011. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/96/cd_2010_entorno_domicilios.pdf. Acesso em: 20 jun 2017.

JOUNG, S.-H.; OH, H.-M.; KO, S.-R.; AHN, C.-Y. Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. **Harmful Algae**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 188–193, 2011.

JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F.; SCHÖNGART, J.; COHN-HAFT, M.; ADENEY, J. M.; WITTMANN, F. A classification of major naturally-occurring amazonian lowland wetlands. **Wetlands**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 623–640, 2011.

KOMAREK, J. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. **Algae**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 349–375, 2006.

LANKOFF, A.; CARMICHAEL, W. W.; GRASMAN, K. A.; YUAN, M. The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro. **Toxicology**, [s. l.], v. 204, n. 1, p. 23–40, 2004.

LI, J.; PARKEFELT, L.; PERSSON, K. M.; PEKAR, H. Improving Cyanobacteria and Cyanotoxin Monitoring in Surface Waters for Drinking Water Supply. **Journal of Water Security**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2017.

LÜRLING, M.; ESHETU, F.; FAASSEN, E. J., KOSTEN, S., HUSZAR, V. L. M. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. **Freshwater Biology**, v. 58, n.3, p. 552–559, 2013.

MCDERMOTT, C. .; NHO, C. .; HOWARD, W.; HOLTON, B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. **Toxicon**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 1981–1996, 1998.

MENEZES, M.; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N. Update of the Brazilian floristic list of algae and cyanobacteria. **Rodriguesia**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 1047–1062, 2015.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, [s. l.], v. 59, p. 303–27, 2013.

MSAGATI, T.; SIAME, B.; SHUSHU, D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 382–397, 2006.

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. **Cyanobacteria in the environment. In: A guide to their public health consequences, monitoring and management.** 1999.

NASCIMENTO, Elisabete Lourdes do. **Fatores ambientais reguladores da dinâmica de cianobactérias no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel – Rondônia (Amazônia Ocidental, Brasil).** 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas Biofísica)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 190p., 2012.

OLIVEIRA, Juliano Eduardo de. **Caracterização da comunidade potamofitoplânctonica da bacia do rio Araguari (AP) nos períodos de seca e chuva (2004, 2005 e 2006).** 2007. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 91p., 2007.

OLIVEIRA, E. D. C.; CUNHA, A. C.; SILVA, N. B.; CASTELO-BRANCO, R., MORAIS, J.; SCHNEIDER, M. P. C.; FAUSTINO, S. M. M.; RAMOS, V.; VASCONCELOS, V. Morphological and molecular characterization of cyanobacterial isolates from the mouth of the Amazon River. **Phytotaxa**, v. 387, n. 4, p. 269-288, 2019.

PAERL, H. W.; FULTON, R. S.; MOISANDER, P. H.; DYBLE, J. Harmful Freshwater Algal Blooms, with an Emphasis on Cyanobacteria. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 1, p. 76–113, 2001.

PAERL H. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In: **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs.** Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 619. New York, NY: Springer, p. 217-237, 2008.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 102, n. 22, p. 10163–72, 2011.

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. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1650–1680, 2010.

PIETSCH, J.; BORNMANN, K.; SCHMIDT, W. Relevance of Intra- and Extracellular Cyanotoxins for Drinking Water Treatment Paper presented in parts as a lecture at the annual meeting of the Water Chemical Society — a Division of the German Chemical Society (Wasserchemische Gesellschaft — Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker), Bad Wildungen, May 2001. **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 7, 2002.

PILOTTO, L. S.; DOUGLAS, R. M.; 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 exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 562–566, 1997.

PINHEIRO, L. A. R.; CUNHA, A. C.; CUNHA, H. F. A. C.; SOUZA, L. R.; BILHALVA, J. S.; BRITO, D. C.; BRASIL JÚNIOR, A. C. P. Aplicação de simulação computacional à dispersão de poluentes no baixo rio Amazonas: Potenciais riscos à captação de água na orla de Macapá-Amapá. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 7, p. 27–44, 2008.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 521–539, 2009.

REYNOLDS, C. **The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation)**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. *E-book*. Disponível em: doi:10.1017/CBO9780511542145(2006).

RIGONATO, J.; ALVARENGA, D. O.; FIORE, M. F. Tropical Cyanobacteria and their Biotechnological Applications. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 139–167.

ROSS, C.; SANTIAGO-VÁZQUEZ, L.; PAUL, V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 66–73, 2006.

SÁ, L. L. C. De; VIEIRA, J. M. dos S.; MENDES, R. de A.; PINHEIRO, C.; VALE, E. R.; ALVES, F. A. dos S.; JESUS, I. M. De; SANTOS, E. C. de O.; COSTA, V. B. Da; CRISTINA, S. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do rio Tapajós , no Município de Santarém (Pará , Brasil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 159–166, 2010.

SANCHES, S. M.; VIEIRA, E. M.; PRADO, E. L.; BENETTI, F.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudo da presença da toxina microcistina-LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. **Ecletica Química**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 43–48, 2007.

SANT' ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. P., AGUIARO, L. F., CARVALHO, M. C., CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Rima, pp. 58, 2006.

SATINSKY, B. M.; SMITH, C. B.; SHARMA, S.; WARD, N. D.; KRUSCHE, A. V.; RICHEY, J. E.; YAGER, P. L.; CRUMP, B. C.; MORAN, M. A. Patterns of Bacterial and Archaeal Gene Expression through the Lower Amazon River. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 4, n. August, p. 1–15, 2017.

SCHOPF, J. W. The Fossil Record of Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 15–36.

SICIŃSKA, P.; BUKOWSKA, B.; MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcystin-LR in vitro. **Toxicon**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 387–397, 2006.

SILVA, N. B.; LOPES, J. O.; BRITO, J. D. de M.; SANTOS, S. K.; TAKIYAMA, L. R.; MONTAGNER, A. E. A. D.; OLIVEIRA, E. D. C. De. Diagnóstico da qualidade da água em áreas utilizadas pela bubalinocultura no Baixo Araguari, Amapá, Brasil. **Biota Amazônia**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 22–28, 2018.

SILVEIRA-JÚNIOR, Arialdo Martins da. **Composição e biomassa microfitoplanctônica associadas a variáveis físico e químicas em dois transectos da zona estuarina do Rio Amazonas (Amapá, Amazônia, Brasil)**. 2012. Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde)- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 92p., 2012.

SIOLI, H. **The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types**. In: *The Amazon* [s.l.] : Springer, Dordrecht, 1984. p. 127–165.

SIVONEN, K.; JONES, J. Cyanobacterial Toxins. In: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. 1999. p. 41–111.

SCHOPF, J. W. The Fossil Record of Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 15–36.

SOARES, R. M. Toxicologia De Cianotoxinas: Microcistinas As Estrelas Do Tema. **Oecologia Australis**, [s. l.], v. 13, n. 02, p. 259–271, 2009.

SOO, R. M.; HEMP, J.; PARKS, D. H.; FISCHER, W. W.; HUGENHOLTZ, P. **On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria**. *Science*, v. 355, n. 6332, p. 1436–1440, 2017.

TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F. Exposicao humana a trihalometanos presentes em agua tratada. **Revista de Saude Publica**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 413–421, 1999.

UTKILEN, H.; GJØLME, N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 797–800, 1995.

VASCONCELOS, V.; MORAIS, J.; VALE, M. Microcystins and cyanobacteria trends in a 14 year monitoring of a temperate eutrophic reservoir (Aguieira, Portugal). **Journal of environmental monitoring : JEM**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 668–672, 2011.

VIEIRA, J. M. D. S.; AZEVEDO, M. T. D. P.; AZEVEDO, S. M. F. D. O.; HONDA, R. Y.; CORRÊA, B. Microcystin production by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 709–713, 2003.

VIEIRA, J. M. D. S.; DE P AZEVEDO, M. T.; DE OLIVEIRA AZEVEDO, S. M. F.; HONDA, R. Y.; CORRÊA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a

public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 45, n. 7, p. 901–9, 2005.

VILHENA, Jéssica Caroline Evangelista. **Estudo ficológico do reservatório da UHE Ferreira Gomes, Amapá: análise das variáveis físico-químicas da qualidade água e da relação destas com o fitoplâncton**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 109p., Macapá.

WARD, N. D.; KRUSCHE, A. V; SAWAKUCHI, H. O.; BRITO, D. C.; CUNHA, A. C.; MAURO, J.; MOURA, S.; YAGER, P. L.; KEIL, R. G.; RICHEY, J. E. The compositional evolution of dissolved and particulate organic matter along the lower Amazon River — Óbidos to the ocean. **Marine Chemistry**, [s. l.], v. 177, p. 244–256, 2015.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 1–13, 2012.

WHO. **Guidelines for safe recreational water environments**. [s. l.], v. 2, p. 3505–3518, 2003.

WHO; GORCHEV, H. G.; OZOLINS, G. **WHO guidelines for drinking-water quality**. [s. l.], v. 38, n. 3, p. 104–108, 2011.

WHO. **Management of cyanobacteria in drinking-water supplies : information for regulators and water suppliers**. [s. l.], p. 1–12, 2015.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum**. Genebra. P. 631, 2017.

WHO. **Guidelines for Drinking-water Quality 2nd edition- vol1-recomendations-addendum**. [s. l.], v. 1. Recomme, p. 316, 1998.

ZAMYADI, A.; MACLEOD, S. L.; FAN, Y.; MCQUAID, N.; DORNER, S.; SAUVÉ, S.; PRÉVOST, M. Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: A monitoring and treatment challenge. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1511–1523, 2012.

2 PERGUNTA E HIPÓTESE

A pergunta norteadora desta investigação e a hipótese principal são:

- Qual o potencial tóxico das cianobactérias próximo à captação de água para abastecimento da cidade de Macapá?

Hipótese: As cianobactérias da área de estudo apresentam genes relacionados ao potencial para a produção de cianotoxinas.

Predição: Atualmente as cianobactérias não produzem tais metabólitos, uma vez que sua densidade é baixa, inferior a 10.000 células/mL, estando de acordo com a Portaria de consolidação nº5/MS (BRASIL, 2017).

Complementando a pergunta principal, os questionamentos secundários e suas respectivas hipóteses são:

- 1) Quais espécies de cianobactérias estão presentes na água para abastecimento em maior abundância?

H1: *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp. e *Dolichospermum* sp. são as cianobactérias mais abundantes no ponto de captação de água da ETAm.

Predição: Esses grupos de cianobactérias apresentam-se em conformidade com a legislação, com densidades inferiores a 10.000 cels . mL⁻¹ devido ao ambiente dinâmico do rio Amazonas que dificulta a manutenção e crescimento de organismos planctônicos, como as cianobactérias.

- 2) A água tratada fornecida pela CAESA possui cianotoxinas dentro do limite tolerável estabelecido pela Portaria de Consolidação nº5/MS (BRASIL, 2017)?

H2: A água tratada pela ETAm apresenta concentração de microcistina <1 µg.L⁻¹ e de saxitoxina <3 µg.L⁻¹.

Predição: Apesar da observação de poluição na orla de Macapá, causada por cargas de nutrientes, que gera condições ambientais favoráveis ao crescimento de cianobactérias, o Rio Amazonas ainda apresenta um grande poder de diluição que dissipa a poluição observada em pontos da orla.

- 3) Quais fatores ambientais podem favorecer o aumento da concentração de cianobactérias e cianotoxinas?

H3: A elevação das concentrações de nutrientes induz o aumento da densidade de cianobactérias e, conseqüentemente, a produção de cianotoxinas.

Predição: O aumento das concentrações de nutrientes (poluição) na orla de Macapá é resultado do saneamento básico precário. Outros fatores que também contribuem para o crescimento das cianobactérias na área são o aumento da radiação solar e transparência da água na área da captação da ETAm.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Estudar o potencial tóxico das cianobactérias presentes no Rio Amazonas próximo à captação de água para abastecimento da cidade de Macapá, estado do Amapá.

2.1.2 Objetivos específicos

- Isolar linhagens de cianobactérias da área de estudo e cultivar em laboratório
- Caracterizar os isolados por taxonomia polifásica, considerando análises de comportamento em cultivo, identificação morfológica e molecular por sequências de RNAr 16S, filogenia e potencial para produção de cianotoxinas.
- Quantificar as espécies de cianobactérias presentes na água de captação com frequência mensal pelo período de um ano
- Verificar a ocorrência de cianotoxinas e de genes associados à produção de microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina na água bruta e tratada
- Monitorar parâmetros ambientais com frequência mensal pelo período de um ano e avaliar sua influência na concentração de cianobactérias e cianotoxinas

3 CAPÍTULO 1: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE CIANOBACTÉRIAS DA FOZ DO RIO AMAZONAS

Caracterização morfológica e molecular de isolados de cianobactérias da foz do Rio Amazonas

ELANE D. CUNHA DE OLIVEIRA^{1,2}, ALAN C. DA CUNHA², NATALINA B. DA SILVA³, RAQUEL CASTELO-BRANCO⁴, JOÃO MORAIS⁴, MARIA PAULA C. SCHNEIDER⁵, SILVIA M. M. FAUSTINO², VITOR RAMOS^{4*}, VITOR VASCONCELOS^{4,6}

¹IEPA, Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, Macapá-AP, Brasil

. E-mail: elanedsc@yahoo.com.br

²Programa de Pós-Graduação Rede Bionorte, UNIFAP, Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP, Brasil

³Esudante de iniciação científica, PIBIC/IEPA, no Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, Macapá-AP, Brasil

⁴CIIMAR, Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Matosinhos, Portugal

⁵UFPA, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brazil

⁶Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

RESUMO

A região amazônica é detentora de grande diversidade de espécies, e a bacia amazônica contém quase 20% da água doce disponível no mundo. Apesar das condições ambientais favoráveis, pouco se sabe sobre a diversidade de cianobactérias nestes corpos d'água, especialmente na foz do Rio Amazonas. Neste estudo, foi utilizada a abordagem polifásica para identificar 14 linhagens de cianobactérias isoladas do Rio Amazonas, no ponto de captação de água para consumo humano, localizado próximo a foz do rio. As cepas isoladas foram caracterizadas com base na morfologia, comportamento em condições de cultivo, sequenciamento do RNAr 16S, análise filogenética e potencial para a produção de toxina. Os isolados pertencem a sete gêneros diferentes: *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Limnothrix*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* e uma cepa de Nostocales não identificada que pode representar um novo gênero. Não foram encontradas novas espécies, nem tampouco foram encontrados genes associados a produção de toxinas. No entanto, a posição dos isolados amazônicos na árvore filogenética revelou novidades para a taxonomia dos gêneros *Limnothrix* e *Pseudanabaena*, reforçando a necessidade de revisão taxonômica.

Palavras-chave: Amazonia, *Limnothrix*, Taxonomia polifásica, *Pseudanabaena*, filogenia, RNAr 16S

ABSTRACT

The Amazon region contains a great diversity of species, and the Amazon River basin accounts for almost 20% of all the freshwater in the world. Despite the favorable environmental conditions in this region, little is known about the cyanobacterial diversity of this waterbody, especially at the mouth of the river. In this paper, we used the polyphasic approach to identify 14 cyanobacterial strains isolated in the Amazon River on the inlet site from a drinking water supply located close to the river mouth. The isolated strains were characterized based on morphology, behavior in culture, 16S rRNA gene sequencing, phylogenetic analysis and potential for toxin production. The isolated strains belong to seven different genera, namely, *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Limnothrix*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Pseudanabaena* and an unidentified Nostocales taxa that may represent a new genus. Strikingly, there were no new species, nor detection of gene clusters associated with cyanotoxin production. However, the phylogenetic placements of the Amazonian strains of *Limnothrix* and *Pseudanabaena* provide new insight into the taxonomy of these genera, reinforcing the need for taxonomic revision.

Keywords: Amazonia, *Limnothrix*, Polyphasic approach, *Pseudanabaena*, 16S rRNA phylogeny

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias estão entre os organismos mais importantes da Terra, devido a sua capacidade fotossintetizante que alterou a atmosfera de reduzida para oxigenada, contribuindo para o desenvolvimento da respiração aeróbica e da vida multicelular (Soo *et al.* 2017). Estes microrganismos habitam uma gama diversificada de habitats terrestres e aquáticos, incluindo ambientes extremos com alta salinidade e altos níveis de radiação ultravioleta (Whiton & Potts, 2012). Porém, sua biomassa tende a aumentar em climas quentes (Kosten *et al.* 2012) devido a temperatura ótima de crescimento ser alta (Whiton & Potts, 2012).

Atualmente, as cianobactérias podem ser utilizadas em diversas aplicações úteis como: na cosmética, alimentação animal e do homem, no tratamento de águas residuárias, fixação industrial de CO₂ e na fertilização do solo (Grewe & Pulz, 2012). Além disso, outros usos de cianobactérias estão sendo estudados; porém, ainda não são economicamente viáveis. As cianobactérias são uma boa fonte de novos produtos (Grewe & Pulz, 2012, Ramos *et al.* 2018), mas para explorar todo o seu potencial biotecnológico é essencial conhecer melhor sua diversidade, riqueza e distribuição, a qual Grewe & Pulz (2012) consideram ser pouco estudado.

A região amazônica e sua bacia hidrográfica formam um ecossistema com uma megadiversidade de plantas e animais (Tundisi *et al.* 2014). Além disso, a riqueza de espécies tende a aumentar em direção à linha do Equador (Gaston, 2000), onde está localizada a área de estudo deste trabalho. Apesar dessa biodiversidade, o conhecimento das cianobactérias desta região é escasso quando comparado a outras regiões do Brasil e de países do hemisfério norte (Menezes *et al.* 2015, Genuário *et al.* 2017, Rigonato *et al.* 2017).

Uma das primeiras investigações sobre as cianobactérias na Amazônia foi realizada por Fiori *et al.* (2005) em busca de linhagens fixadoras de nitrogênio dos sedimentos dos rios Amazonas e Solimões (Brasil), e de tributários. Estes autores isolaram várias linhagens dos gêneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Fischerella* e *Anabaena*. Vieira *et al.* (2005) isolaram cepas produtoras de microcistinas dos gêneros *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Hapalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Radiocystis* de dois reservatórios de abastecimento de água em Belém, estado do Pará, na Amazônia Oriental. Posteriormente, Dall'Agnol *et al.* (2012) utilizaram

uma abordagem independente de cultura para estudar a diversidade de *Synechococcus* no reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, no estado do Pará.

Recentemente, Doherty *et al.* (2017) também utilizaram abordagem independente de cultura para estudar a biogeografia de bactérias no canal principal do Rio Amazonas e tributários. Eles detectaram que as cianobactérias eram representadas principalmente por espécies de *Synechococcus* e *Merismopedia*, as quais apresentaram maior proporção durante o período de baixa vazão. Por sua vez, Satinsky *et al.* (2017) utilizaram métodos independentes de cultura para estudar a diversidade de bactérias em águas amazônicas. Eles observaram uma dominância de *Synechococcus* sp. no rio Tapajós, e de *Microcystis aeruginosa* em Belém, estado do Pará. Em outro estudo conduzido no Rio Amazonas e afluentes foram isoladas 11 linhagens homocitadas pertencentes aos gêneros *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Pantalinema*, *Planktothrix* e *Pseudanabaena* (Genuário *et al.* 2017). Apenas recentemente espécies novas de cianobactérias foram descritas na região amazônica: *Cronbergia amazonensis* do Rio Solimões (Genuário *et al.* 2018a) e *Amazoninema brasiliense* dos rios Amazonas e Solimões (Genuário *et al.* 2018b).

A diversidade de cianobactérias da região amazônica também está sendo descrita por meio de estudos morfológicos (Aprile *et al.* 2013, Cunha *et al.* 2013, Sena *et al.* 2015, Silva *et al.* 2018, Silveira-Júnior, 2012). No entanto, atualmente sabe-se que a identificação com base exclusiva na análise morfológica não é suficiente para a identificação adequada de cianobactérias (Komárek, 2016). A metodologia recomendada é a abordagem polifásica (Sciuto *et al.* 2012, Komárek, 2016). Esta abordagem consiste em combinar dados derivados de sequenciamento molecular e análise filogenética com aqueles obtidos usando outros métodos, tais como análises morfológicas, ecológicas e ecofisiológicas (Komárek, 2016).

Nos últimos anos, muitos estudos utilizaram a abordagem polifásica para elucidar a taxonomia e as relações filogenéticas das cianobactérias (Furtado *et al.* 2009, Sciuto *et al.* 2012, Andreote *et al.* 2014, Yu *et al.* 2015, Bravakos *et al.* 2016, Genuário *et al.*, 2017). No presente estudo, foram isoladas linhagens de cianobactérias do rio Amazonas, próximo ao ponto de captação de água para abastecimento do município de Macapá; esta área foi caracterizada com relação aos principais parâmetros ambientais. Os isolados de cianobactérias foram caracterizados por morfologia, comportamento em cultura, sequências do gene RNAr 16S, posicionamento filogenético e seu potencial para

produção de toxinas. A relação filogenética entre os isolados deste estudo com outras espécies de gêneros semelhantes também foi discutida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

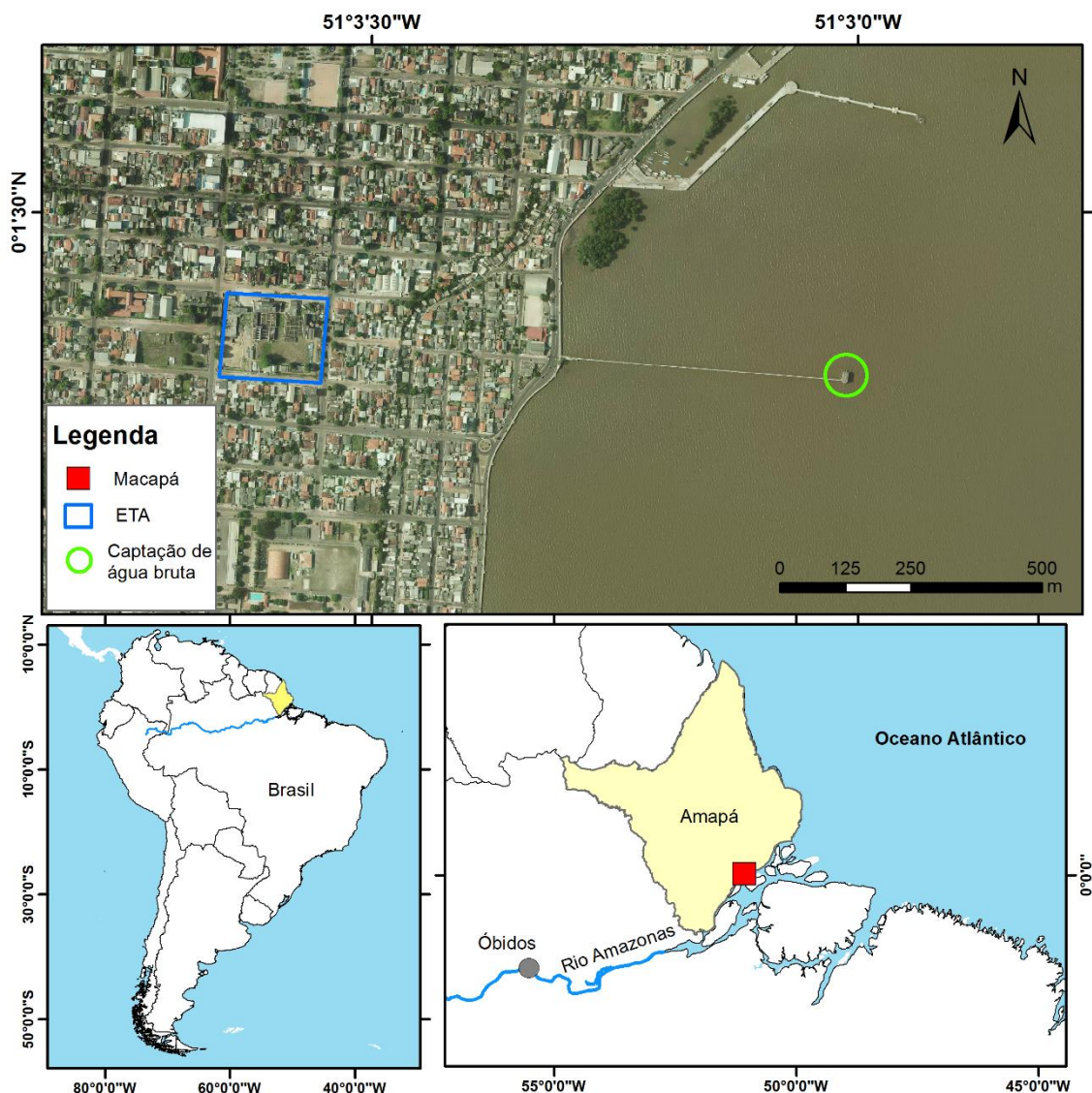
O Rio Amazonas é a principal fonte de abastecimento de água para consumo da população do município de Macapá, estado do Amapá (Brasil). A água é captada em uma adutora que fica a 500 m das margens do rio, no centro comercial da cidade, onde é possível ver despejos de águas pluviais contaminadas e outras fontes de poluição diretamente neste rio (Fig. 1).

Figura 1: Despejo de águas contaminadas no Rio Amazonas ao lado da adutora de captação de água para abastecimento na orla de Macapá, estado do Amapá. Vista de dentro do rio.



O estudo foi realizado na Estação de Tratamento de Água (ETA) de Macapá (Fig. 2), que faz parte da Companhia de Águas e Esgoto do Estado do Amapá - CAESA. As amostras foram coletadas da água bruta (na entrada da ETA, antes do tratamento) e da água tratada, no período de abril de 2015 a abril de 2016 visando o isolamento e caracterização de cepas de cianobactérias.

Figura 2: Rio Amazonas na orla de Macapá (AP), centro da cidade. A figura mostra o ponto de captação de água para abastecimento da cidade e a estação de tratamento de água.



2.2 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL

Parâmetros físicos e químicos foram analisados para caracterizar o ambiente de onde foram isoladas as cepas de cianobactérias. Temperatura da água, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e sólidos totais dissolvidos foram medidos mensalmente *in situ* com sonda multiparâmetro YSI. As amostras para análises químicas e de metais (NH_3^- , NO_3^- , PO_3^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- , Al^{3+} , Fe^{2+}) foram coletadas em frascos âmbar de vidro e mantidas sob refrigeração para análise laboratorial por espectrofotometria com o espectrofotometro DR

3900 (Hach, Colorado, EUA). A turbidez foi mensurada com turbidímetro AP2000iR (PoliControl, Brasil) conforme recomendações da Associação Americana de Saúde Pública (APHA, 2005), e a transparência da água foi medida em campo com disco de Secchi. Dados de radiação e insolação para Macapá foram disponibilizados pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE, 2016), enquanto que os dados de precipitação e temperatura do ar foram cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

2.3 ISOLAMENTO DE CEPAS DE CIANOBACTÉRIAS

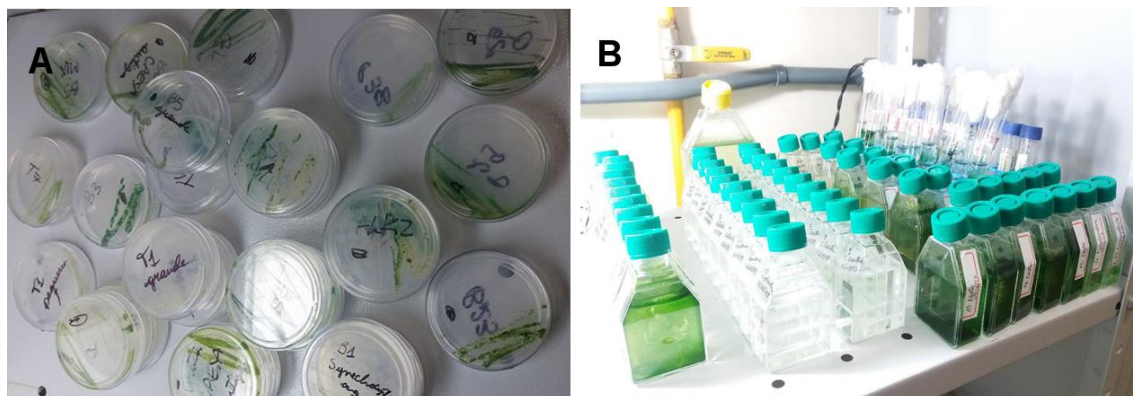
Amostras de água bruta e da água tratada foram coletadas em frascos autoclavados de vidro de 500 mL, na cor âmbar, para simular a cor do Rio Amazonas. Posteriormente, foram isoladas por meio de duas técnicas principais: plaqueamento sucessivos (Rippka *et al.* 1981) e separação de tricomas individuais ou pescaria (Waterbury, 2006; Jacinavicius, 2012) no Laboratório de Cultivo de Algas (LACAL) da UNIFAP. O meio de cultura utilizado nos isolamentos foi o BG-11 e BG-11₀, cuja descrição detalhada pode ser encontrada em Rippka *et al.* (1979) e Jacinavicius *et al.* (2012).

O método de plaqueamento consistiu em adicionar algumas gotas da amostra na placa com meio BG11 sólido e semear em estrias com a alça de platina sem sobreposição do inóculo. Para cada amostra foram feitas duas placas. Após esse procedimento, as placas foram vedadas com *parafilm* e colocadas na sala de cultivo com a tampa virada para baixo em busca de evitar contaminação da amostra devido ao ocasional surgimento de água na tampa (Jacinavicius *et al.* 2012). As placas foram incubadas sob iluminação e temperatura constante (23° C). É importante levar em consideração que a insolação e a temperatura média da área de estudo são altas, portanto a iluminação foi ininterrupta.

As placas (Figura.3A) foram observadas a olho nu frequentemente (a cada dois ou três dias) para visualização do crescimento. Quando do aparecimento de colônias, a placa era examinada em microscópio invertido para verificar se as colônias estavam isoladas. Aquelas que apresentavam mais de uma cianobactéria ou protozoários eram inoculadas novamente em placas com BG11, ao passo que as linhagens isoladas eram transferidas para o meio líquido (Figura. 3B). Após o crescimento da cultura em meio líquido a amostra era analisada novamente para verificar se o isolamento foi alcançado. Em caso negativo, um inóculo era transferido para novas placas estéreis com BG11, e novamente

ocorria o estriamento em placa ou procedia-se ao isolamento por pescaria (descrito a seguir).

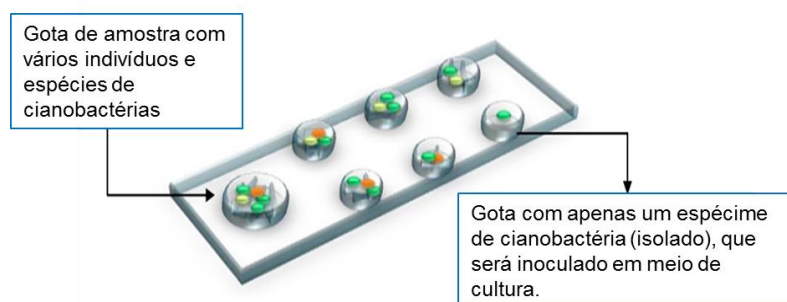
Figura 3: Isolamento e cultivo de cianobactérias em placas (A) e em meio líquido (B) BG11.



Os passos de plaqueamento, crescimento e verificação do isolamento da colônia foram repetidos até a obtenção de colônias puras ou unialgais (com a presença de apenas uma cianobactéria) (Rippka *et al.* 1979). Após atingir o isolamento, a cepa era inoculada e mantida em meio líquido BG11 ou BG11₀, este último apenas para as cianobactérias fixadoras de nitrogênio, pois o meio não tem NaNO₃ e estimula a expressão de heterócitos -células diferenciadas para fixação de nitrogênio- que facilitam a identificação morfológica (Rippka *et al.* 1979).

O outro método utilizado para o isolamento é conhecido popularmente por pescaria (Jacinavicius *et al.* 2012). Para utilizar esse método é necessário afinar as pontas de pipetas de vidro Pasteur com o auxílio de bico de Bunsen e pinça para quebrar a nova e fina ponta (capilar) (Jacinavicius *et al.* 2012). Após este preparo, colocam-se gotas de meio líquido estéril em lâmina limpa e uma gota da amostra. A gota da amostra deve ser examinada em busca de cianobactérias, o organismo de interesse deve ser sugado com a pipeta e transferido para uma das gotas com meio (Figura 4). Esse procedimento é repetido até que reste apenas um espécime de cianobactéria, que é transferido para um frasco com meio líquido.

Figura 4: Demonstração do método de pescaria para isolamento de cianobactérias em lâmina. Adaptado de Jacinavicius *et al.* (2012)



Esse tipo de isolamento em meio líquido foi utilizado para purificar amostras que tinham mais de uma espécie de cianobactérias provenientes do plaqueamento, e também para obter espécies diretamente da amostra coletada no rio Amazonas ou da água tratada. Após as coletas e plaqueamentos, as amostras de água continuaram nos frascos âmbar, aos quais foram adicionados um pouco de meio BG11 e rolhas de gaze e algodão estéreis para evitar contaminação e possibilitar trocas gasosas. Essas garrafas também foram mantidas a 23° C com iluminação ininterrupta. Após algumas semanas era possível observar massas verdes, as quais eram coletadas e procedia-se o método da pescaria.

Todos os isolados foram mantidos em frascos de cultura de células com meio líquido BG11₀ para as heterocitadas, BG11 para as demais cepas, e uma duplicata de todas em meio Z8 (Kotai, 1972) com a finalidade de aclimação para depósito na coleção de culturas LEGE no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR). Não foi adicionado antibiótico a nenhum meio de cultivo, e foi possível observar que o meio BG11 é o melhor para evitar contaminações. A frequência de repique das culturas variou de dois a três meses. Os isolados foram depositados em formol 4% no Herbário Amapaense (HAMAB), fiel depositário do estado do Amapá; e na Coleção de Cultivo do Laboratório Biotecnologia Azul e Ecotoxicologia no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Portugal (Ramos *et al.* 2018), sob os códigos LEGE 15484–LEGE 15497.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

2.4.1 Identificação morfológica

A identificação das espécies isoladas foi realizada em microscópio óptico binocular, com ocular micrometrada e sistema de aquisição de imagens. Foram analisadas amostras vivas para melhor visualização de características como movimento das cianobactérias, que é importante para a identificação dos táxons.

A identificação dos isolados foi realizada com apoio da seguinte bibliografia: Komárek & Anagnostidis (1999); Komárek & Anagnostidis (2005); Komárek (2013); Sant' Anna *et al.* (2006; 2012); Lamparelli *et al.* (2014); Malone *et al.* (2015) e Vaz *et al.* (2015). Para classificação das espécies foi adotado o sistema de Komárek *et al.* (2014), com a atualização de gêneros e espécies de Komarek (2015).

2.4.2 Identificação por biologia molecular (RNAr 16 S)

A análise molecular visou complementar a caracterização morfológica, o que é desejável para a correta identificação de cianobactérias de acordo com Komárek (2016). A identificação molecular foi realizada a partir da amplificação do gene RNAr 16S, que é muito utilizado para bactérias (Woo, 2008). Para tal, o DNA genômico (gDNA) foi extraído das cepas isoladas com o kit de extração PureLink Genomic DNA™ da Invitrogen, seguindo o protocolo de lise para bactérias gram negativas. Posteriormente, o DNA genômico foi amplificado por PCR com um termociclador Biometra T Professional (Biometra, Göttingen, Alemanha).

As PCRs foram realizadas em um volume final de 20 µl. A reação de PCR continha 5× tampão Green GoTaq®, MgCl₂ 25 mM, 10 pmol de *primers* (iniciadores) senso e anti-senso (Tabela 1), 187,5 µM de mistura de dNTP (nucleotídeos), albumina de soro bovino (BSA) e 0,5 U de DNA polimerase GoTaq®. Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificar o gene RNAr 16S

Gene alvo	Primers	Sequência 5'- 3'	Tamanho esperado (bp)	Referência
RNAr 16S	CYA106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	675	Nübel <i>et al.</i> (1997)
	CYA781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT		
	CYA359F	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	1135	Nübel <i>et al.</i> (1997)
	CYA1494R	TACGGCTACCTTGTTACGAC		Neilan <i>et al.</i> (1997)

A amplificação dos fragmentos do gene do RNAr 16S (Tabela 1) ocorreu nas seguintes condições: 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos, cada um consistindo de uma desnaturação de 1 min a 95°C, anelamento por 45s a 55°C, e extensão de 1 min a 72°C. A extensão final foi de 5min a 72°C.

Os produtos de PCR foram examinados por electroforese em gel de agarose 1,5% corados com SYBR® Safe. Os produtos de PCR foram purificados com um kit NucleoSpin® Gel e PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, e depois foram sequenciados bidirecionalmente pelo método de Sanger na empresa GATC Biotech (Alemanha). As seqüências foram depositadas no NCBI GenBank sob os números de acesso MF629801–MF629814.

Após o sequenciamento do gene rRNA 16S, as seqüências foram inspecionadas visualmente e montadas utilizando o software Geneious (versão 8.1.8). Ademais, foram comparadas com as seqüências de nucleotídeos depositadas no banco de dados GenBank usando o algoritmo BLASTN (do inglês, *basic local alignment search tool* [ferramenta básica de busca de alinhamento local]). Os resultados da busca mostraram as seqüências com maior similaridade (identidade %) em relação às obtidas neste estudo.

2.4.3 Filogenia

Foi construída uma árvore filogenética com 95 seqüências de RNAr 16S de cepas de cianobactérias, dentre elas: as obtidas neste estudo, cepas de referência incluídas na base de dados online CyanoType (Ramos *et al.* 2017), seqüências que apresentaram os maiores valores de identidade (%) nas buscas com a ferramenta BLASTn, e a seqüência de *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl (NR_074263), que foi utilizada como grupo externo. Após a seleção, todas as seqüências foram alinhadas com o algoritmo *ClustalW* no

programa MEGA7 (Kumar *et al.* 2016). Este também foi utilizado para construção da árvore filogenética pelos métodos de máxima verossimilhança (ML) e máxima parcimônia (MP), com 1000 reamostragens (bootstrap) para avaliar a robustez dos nós (agrupamentos). A análise bayesiana foi realizada com o *software* MrBayes (versão 3.2.6) plugin in do programa Geneious (versão 8.1.8; Biomatters).

Estes três métodos diferentes foram empregados para construir as topologias das árvores, utilizando o alinhamento múltiplo de sequências referido anteriormente. Posições do alinhamento com ambiguidade, dados faltantes, ou espaços foram excluídas da análise filogenética, resultando em uma base de dados final composta de 871 posições.

O modelo de evolução empregado foi o modelo geral reversível no tempo (GTR+G+I), escolhido pelo software MEGA 7 como o melhor modelo de acordo com o critério de informação Akaike corrigido (AICc). Uma distribuição discreta gama foi utilizada para modelar diferenças nas taxas evolutivas entre os locais (4 categorias (+G, parâmetro = 0,3133)). O modelo de taxa de variação permitiu que alguns locais fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 29,62% dos locais).

Para a pesquisa das melhor árvore de MP foi aplicada a poda e enxerto de sub-árvores, durante a operação de rearranjo das árvores. A árvore de inferência bayesiana foi executada através da análise de Monte Carlo da Cadeia de Markov (MCCM). As buscas bayesianas foram realizadas utilizando as seguintes especificações: uma árvore de partida gerada aleatoriamente, com uma cadeia fria e sete incrementalmente aquecidas (temperatura = 0.2), o número de ciclos para o algoritmo MCCM foi definido para 1.100.000 gerações, com um comprimento de queima (*burn-in*) de 100.000 e com uma frequência de amostragem de árvore de 200.

Algumas sequências (das 95 utilizadas para a construção das árvores filogenéticas) foram selecionadas para gerar uma matriz de similaridade de sequências de RNAr 16S.

2.4.4 Potencial dos isolados para a produção de toxinas

O potencial tóxico foi estudado usando conjuntos de *primers* visando os *clusters* gênicos envolvidos na produção de microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina (Moreira *et al.* 2014), conforme indicado na Tabela 2. As condições de PCR para o amplificação do gene *mcyA* foram: desnaturação inicial a 95 ° C por 2 min, seguida de 35 ciclos consistindo de 95 ° C por 1 min 30s, 56 ° C por 30s e 72 ° C

por 50s. Para o gene *mcyE*, o primeiro passo foi a 92 ° C por 2 min, seguido por 35 ciclos consistindo de 92 ° C por 20s, 52 ° C por 30s e 72 ° C por 1 min. A linhagem *Microcystis aeruginosa* LEGE 91339 foi utilizada como controle positivo para a amplificação dos genes *mcyA* e *mcyE*.

Tabela 2: *Primers* utilizados para detectar grupos de genes das cianotoxinas microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina.

Gene	Primer	Sequência Primer 5'- 3'	Tamanho (pb)	Referência	Controle positivo
mcyA	CD1F/ CD1R	AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCAT	297	Hisbergues <i>et al.</i> (2003)	LEGE91339- <i>Microcystis aeruginosa</i>
mcyE	HEPF/ HEPR	AGTC AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGT TT	472	Jungblut; Neilan (2006)	LEGE91339- <i>Microcystis aeruginosa</i>
sxtI	SXTI 682F/ SXTI 877R	GGATCTCAAA GAAGATGGCA GCCAAACGCAGTACCACTT	100	Lopes <i>et al.</i> (2012)	LMECYA 040 - <i>Aphanizomenon gracile</i>
anaC	anaCF/ anaCR	TCTGGTATTCAGTCCCCTCTAT CCCAATAGCCTGTCATCAA	366	Rantala-Ylinen <i>et al.</i> (2011)	LEGE X-002 - <i>Anabaena</i> sp.
pks	M4/M5	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA AATCCTTACGGGATCCGGTGC	535/540	Schembri <i>et al.</i> (2001)	LEGE 97047 - <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>
ps	M13/M14	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC GATGGAACATCGCTCACTGGTG	511/534	Schembri <i>et al.</i> (2001)	LEGE 97047 - <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>

Para a amplificação do gene *sxtI*, o primeiro passo ocorreu a 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos consistindo de 94°C durante 10s, 60°C durante 20s e 72°C durante 1 min. Utilizou-se a cepa *Aphanizomenon gracile* LMECYA 040 como controle positivo para a amplificação do gene *sxtI*. A amplificação do gene *anaC*, iniciou a 94°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos consistindo em 94°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C durante 30s. A cepa *Anabaena* sp. LEGE X-002 foi utilizada como controle positivo para a amplificação do gene *anaC*.

Por fim, o primeiro passo da amplificação dos genes *PS* e *PKS* deu-se em 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos consistindo de 95°C por 1min 30s, 55°C por 30s e 72°C

por 50s. O isolado *Cylindrospermopsis raciborskii* LEGE 97047 foi usado como controle positivo para esta amplificação.

Os volumes da reação de PCR e o tratamento dos produtos foram os mesmos utilizados para as PCRs do gene RNAr 16S (seção 2.4.2- Identificação por biologia molecular (RNAr 16 S), exceto que após o sequenciamento as sequências positivas foram comparadas com as sequências de proteínas depositadas no banco de dados GenBank usando o algoritmo BLASTX (do inglês, *basic local alignment search tool*/ Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local – Proteínas). Os resultados da busca mostraram as sequências com maior similaridade (identidade %) em relação às obtidas neste estudo.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL

As características da área de estudo estão descritas na Tabela 3. A água do rio Amazonas em Macapá é turbida (19,8–122 NTU), a transparência variou de 12–36,5 cm, e o pH foi de aproximadamente 7. A água apresentou uma alta concentração de sólidos dissolvidos (20–30 ppm), e a condutividade elétrica média foi de aproximadamente 50 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Com relação ao clima, a temperatura do ar variou de 22,7 a 35,3°C, e a quantidade de chuva mensal foi em média 205,9 mm distribuídas ao longo do ano, sendo que não houve chuva nos meses de setembro, outubro e novembro de 2015.

Tabela 3: Parâmetros ambientais da área de estudo (média e desvio padrão). Água bruta corresponde a água do Rio Amazonas destinada a captação para abastecimento na orla do município de Macapá, Amapá; e a água tratada é oriunda da saída da estação de tratamento da ETA CAESA.

Parâmetro	Água Bruta	Água tratada
pH	6,6 ± 0,28	6,0 ± 0,3
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	6,0 ± 0,71	4,2 ± 0,2
Nitrato (mg L ⁻¹)	0,4 ± 0,83	0,9 ± 1,3
Amônia (mg L ⁻¹)	0,7 ± 0,54	0,1 ± 0,05
Ortofosfato (mg L ⁻¹)	0,3 ± 0,44	0,13 ± 0,09
Cloreto (mg L ⁻¹)	8,7 ± 9,17	3,8 ± 1,7
Sulfato (mg L ⁻¹)	1,8 ± 1,48	14 ± 3,6
Alumínio (mg L ⁻¹)	0,1 ± 0,07	0,11 ± 0,06
Ferro (mg L ⁻¹)	2,2 ± 1,26	0,7 ± 1,1
Transparência (cm)	25,3 ± 9,6	NA
Zona eufótica (cm)	75,9 ± 28,9	NA
Turbidez (NTU)	55,5 ± 41	9,8 ± 13,5
Sólidos Totais Dissolvidos (ppm)	24,3 ± 4,41	31,2 ± 8,2
Condutividade Elétrica (µS cm ⁻¹)	50,4 ± 7,81	68,2 ± 10,7
Temperatura da água (°C)	28,8 ± 1,88	28,9 ± 1,7
Temperatura mínima do ar (°C)	24,3 ± 0,82	24,3 ± 0,8
Temperatura máxima do ar (°C)	33,2 ± 1,95	33,2 ± 2
Insolação (h)	7,7 ± 3,38	7,7 ± 3,4
Irradiação (W m ⁻²)	241,9 ± 75,55	241,9 ± 75,6
Precipitação mensal (mm)	206±209	206±209

*Legenda: NA: dados não analisados, aqueles que são mensurados na água bruta, mas não é possível medir na água tratada.

3.2 CEPAS ISOLADAS

Neste estudo foram isoladas 14 linhagens de cianobactérias, sendo 13 obtidas na água bruta (antes do tratamento), e uma oriunda da saída do tratamento (água tratada). Todas estas são filamentosas, sendo a maioria homocitadas. O exame polifásico possibilitou classificá-las nas ordens Synechococcales, Oscillatoriales e Nostocales (Tabela 4).

Tabela 4 Cianobactérias isoladas da água do Rio Amazonas (Brasil)

Ordem	Cepa	Ponto de coleta	Número de acesso (Genbank)	Meio de cultura
Synechococcales	<i>Alkalinema</i> aff. <i>pantanalense</i> LEGE 15484	Água bruta	MF629801	BG11, Z8
	<i>Limnothrix</i> cf. <i>planctonica</i> LEGE 15497	Água bruta	MF629814	BG11, Z8
	<i>Limnothrix</i> cf. <i>planctonica</i> LEGE 15485	Água bruta	MF629802	BG11, Z8
	<i>Leptolyngbya boryana</i> LEGE 15486	Água tratada	MF629803	BG11, Z8
	<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15489	Água bruta	MF629806	BG11, Z8
	<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15490	Água bruta	MF629807	BG11, Z8
	<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15491	Água bruta	MF629808	BG11, Z8
Oscillatoriales	<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15487	Água bruta	MF629804	BG11, Z8
	<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15492	Água bruta	MF629809	BG11, Z8
	<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15493	Água bruta	MF629810	BG11, Z8
	<i>Phormidium</i> sp. LEGE 15488	Água bruta	MF629805	BG11, Z8
Nostocales	Nostocales não identificada LEGE 15494	Água bruta	MF629811	BG11 ₀
	Nostocales não identificada LEGE 15495	Água bruta	MF629812	BG11 ₀
	Nostocales não identificada LEGE 15496	Água bruta	MF629813	BG11 ₀

3.2.1 Identificação morfológica e comportamento em cultivo

Alkalinema aff. *pantanalense* Vaz et al. (2015: 305) (Fig 5A)

Cepa: LEGE 15484 (MF629801)

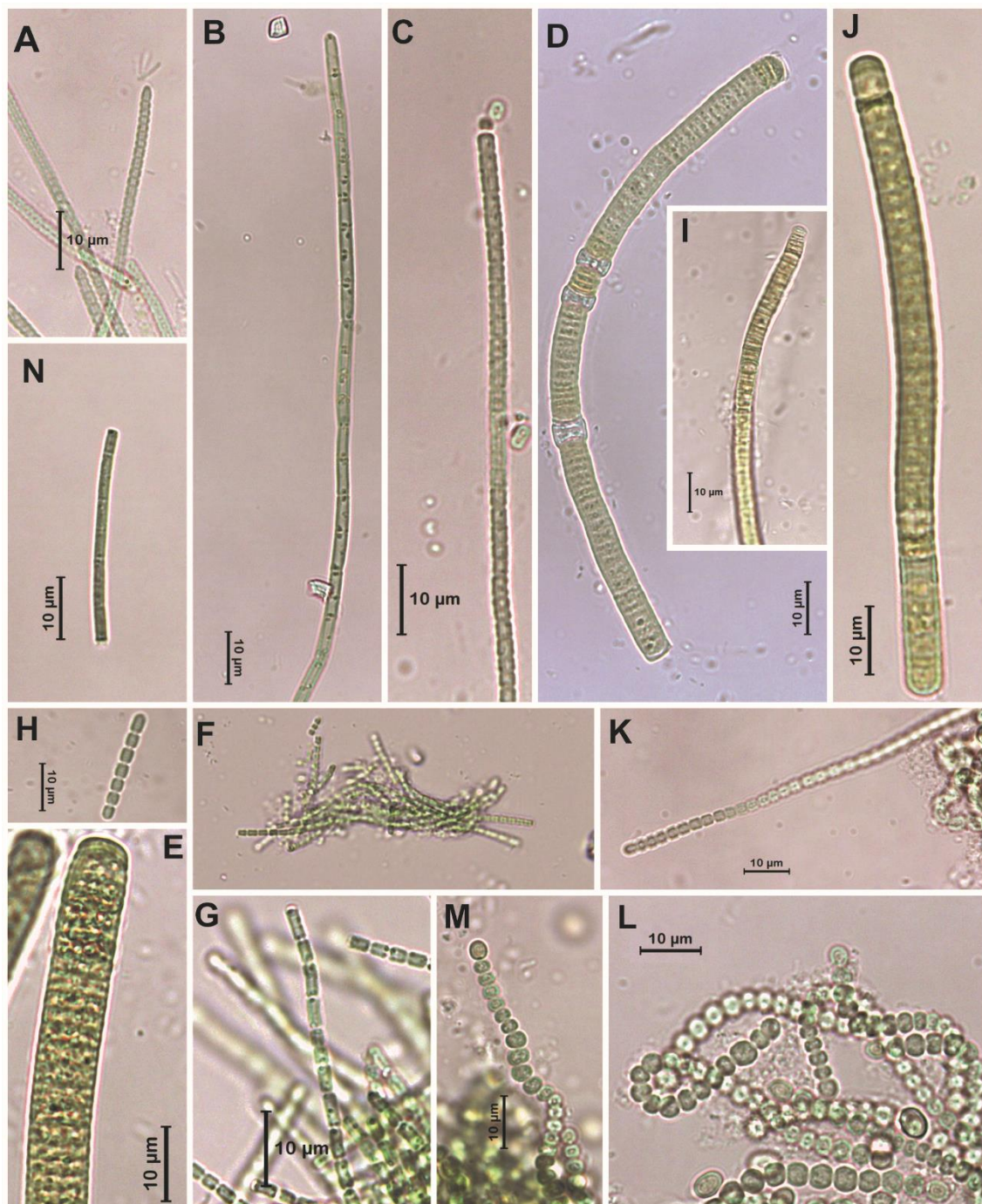
Os cultivos de *Alkalinema* aff. *pantanalense* (Fig 6A) apresentam coloração variando de verde pálido a verde-azulado vivo, e podem ser compostos de filamentos solitários ou formando emaranhados frouxos (feixes) no meio líquido. Os tricomas são pequenos, retos, imóveis, constrictos, e não formam necrídios. Eventualmente é possível observar uma bainha de mucilagem difluente durante a formação dos hormogônios. As células são cilíndricas, mais longas (1,2–4,0 µm) do que largas (1,7–2,9 µm), sendo as células apicais arredondadas ou atenuadas. O conteúdo celular é homogêneo, verde pálido e não apresenta vesículas de gás.

Limnothrix cf. planctonica (Woloszynska) Meffert (1988: 269) (Figs 5B, 5N)

Cepas: LEGE 15485 (MF629802) e LEGE 15497 (MF629814)

Em condições de cultivo, grupos de tricomas podem flutuar na superfície, indicando a presença de aerótopos. Por outro lado, os que ficam no fundo do frasco de cultivo não apresentam tais vesículas gasosas. Eles se agrupam em feixes verde-azulados, que podem formar um biofilme que varia de frouxo a bem firme na interface entre o ar e o meio de cultura, nas paredes, e no fundo do frasco de cultivo, formando uma biomassa parecida com um funil (Fig 6B e C). Quando o biofilme se desprende do fundo do frasco, torna-se uma massa flutuante. Os tricomas são longos, quase retos, não constrictos, não atenuados, e se movem lentamente por deslizamento. Podem apresentar bainha difluente e estreita, quase inconspícua, observável nas células apicais (Fig. 5B, 5N). As células são cilíndricas, verde-azuladas pálidas, mais longas (2,9-8,6 μm) do que largas (1,6-2,6 μm) com pequenos aerótopos facultativos nas extremidades das células. Além disso, apresentam grânulos facultativos. A morfologia desses isolados assemelha-se à de *Limnothrix redekei* e de *Limnothrix planctonica*, no entanto, as linhagens isoladas neste estudo compartilham mais atributos morfológicos com *L. planctonica* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Figura 5: Fotomicrografias dos isolados amazônicos: A) *Alkalinema* aff. *pantanalense* LEGE 15484, B) *Limnothrix* cf. *planctonica* LEGE 15485, C) *Leptolyngbya* *boryana* LEGE 15486, D) *Cephalothrix* *lacustris* LEGE 15487, E) *Phormidium* sp. LEGE 15488, F) *Pseudanabaena* cf. *galeata* LEGE 15489, G) *P.* cf. *galeata* LEGE 15490, H) *P.* cf. *galeata* LEGE 15491, I) *Cephalothrix* *lacustris* LEGE 15492, J) *C. lacustris* LEGE 15493; K) Nostocales não identificada LEGE 15494, L) Nostocales não identificada LEGE 15495, M) Nostocales não identificada LEGE 15496, e N) *Limnothrix* cf. *planctonica* LEGE 15497.



Leptolyngbya boryana (Gomont 1899: 36) Anagnostidis et Komárek (1988: 391) (Fig 5C)

Cepa: LEGE 15486 (MF629803)

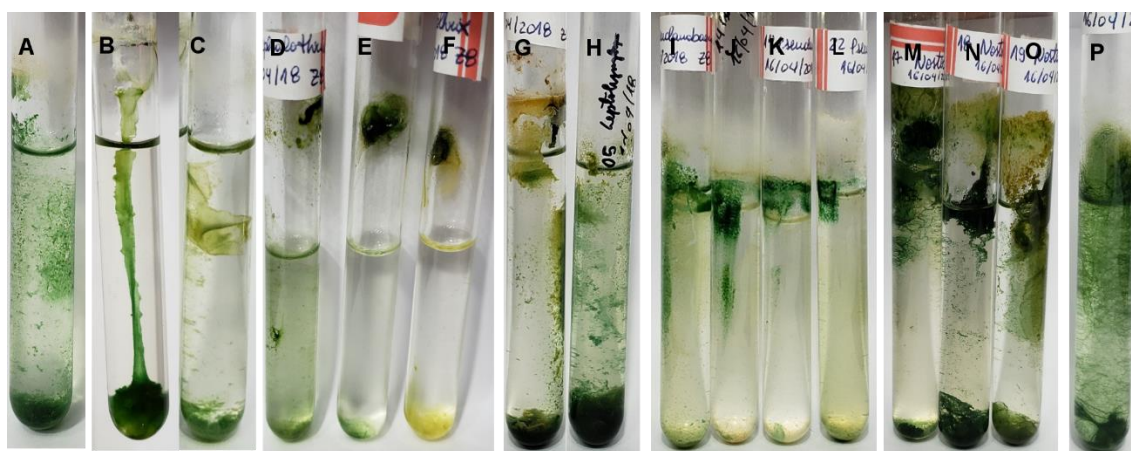
Os filamentos ficam emaranhados, formando um biofilme verde escuro que se adere às paredes e fundo do frasco. Além disso, os filamentos também ficam dispersas em meio líquido. Em culturas envelhecidas dessa linhagem, surge uma cor de ferrugem misturada ao verde escuro (Fig 6G e H). Os tricomas são longos, flexíveis, imóveis, não atenuados, com bainhas mucilaginosas estreitas e hialinas. Eles são constrictos e podem formar necrídios. As células são verde-azuladas pálidas, subquadráticas, mais longas do que largas (1,6-2,9 μm de comprimento; 1,9-2,6 de largura). Os homócitos se movem por movimentos trêmulos.

Cephalothrix lacustris Malone *et al.* (2015: 3004) (Figs 5D, 5I, 5J)

Cepas: LEGE 15487 (MF629804), LEGE 15492 (MF629809) e LEGE 15493 (MF629810)

Em cultivo, os tricomas começam a crescer no fundo do frasco de cultura, e formam um biofilme fino em direção à superfície do meio líquido. Tal biofilme pode se desprender do fundo e os tricomas passam a flutuar na superfície do meio líquido. Alternativamente, alguns agregados podem ficar fixos ao fundo do frasco formando biofilmes com bolhas de ar (Fig 6D, E e F). Os tricomas são retos ou flexíveis, levemente constrictos, movimentam-se por deslizamento, e formam necrídios em formato bicôncavo. Eles apresentam coloração entre verde pálido a verde oliva vivo, e podem ocorrer de forma solitária ou agrupados em feixes. Além disso, apresentam facultativamente envelope mucilaginoso hialino, porém conspícuo, que pode ser estreito ou amplo. As células são mais largas (4,2-7,5 μm) do que longas (1,4–3,8 μm) e apresentam vesículas de gás facultativas. Células apicais podem ser arredondadas ou capitadas com caliptra facultativa. As extremidades do tricoma podem ser levemente atenuadas e curvas.

Figura 6: Fotos dos cultivos dos isolados amazônicos em frascos de cultura de célula com meio líquido BG11: A) *Alkalinema* aff. *pantanalense* LEGE 15484, B) *Limnothrix* cf. *planctonica* LEGE 15485, C) *Limnothrix* cf. *planctonica* LEGE 15497, D) *Cephalothrix lacustris* LEGE 15487, E) *Cephalothrix lacustris* LEGE 15492, F) *C. lacustris* LEGE 15493; G, H) *Leptolyngbya boryana* LEGE 15486, I) *Pseudanabaena* cf. *galeata* LEGE 15490, J, K) *P. cf. galeata* LEGE 15489, L) *P. cf. galeata* LEGE 15491, M) Nostocales não identificada LEGE 15494, N) Nostocales não identificada LEGE 15495, O) Nostocales não identificada LEGE 15496, P) *Phormidium* sp. LEGE 15488.



***Phormidium* sp.** (Kützing 1843: 190) Gomont (1892: 156) (Fig. 5E)

Cepa: LEGE 15488 (MF629805)

Os cultivos desta linhagem apresentam cor verde escura, e crescem em feixes por toda a parede do frasco de cultivo e também na superfície do meio líquido, formando uma “teia de aranha” (Fig 6P). Esse biofilme é tão firme que permanece na mesma posição mesmo após a diminuição do nível de meio líquido. É possível observar a formação de bolhas de ar no fundo dos frascos. Os tricomas são longos, com coloração verde oliva a verde escuro; isopolares; retos, curvos ou até enrolados; imóveis; não constritos ou pouco constritos; não atenuados; e formam necrídios. Podem apresentar bainha de mucilagem estreita e difluente. As células são mais largas (5,6–8,8 μm) do que longas (1,7–3,8 μm) e apresentam grânulos. Tal característica celular também lembra o gênero *Lyngbya* sp.

Pseudanabaena cf. galeata (Figs 5F, 5G, 5H)

Cepas: LEGE 15489 (MF629806), LEGE 15490 (MF629807) e LEGE 15491 (MF629808)

Em condições de cultivo podem ocorrer de forma solitária ou agregados, formando feixes verde esmeralda que flutuam na interface ar/meio líquido, e também crescem agregados nas paredes e fundo do frasco de cultivo (Fig 6I, J, K e L). Os tricomas são quase retos, profundamente constrictos, não atenuados, e apresentam grânulos facultativos. As células são cilíndricas, mais longas (1,4–5,7 μm) do que largas (1,3–2,8 μm), cor verde azulado brilhante, e são conectadas umas às outras por septos hialinos. Apresentam aerótopo polar na célula apical. Os tricomas movem-se lentamente para frente por movimentos trêmulos. Tais linhagens são mais longas que *P. mucicola* e sua morfologia confere com a de *Pseudanabaena galeata* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Nostocales não identificada (Figs 5K, 5L, 5M)

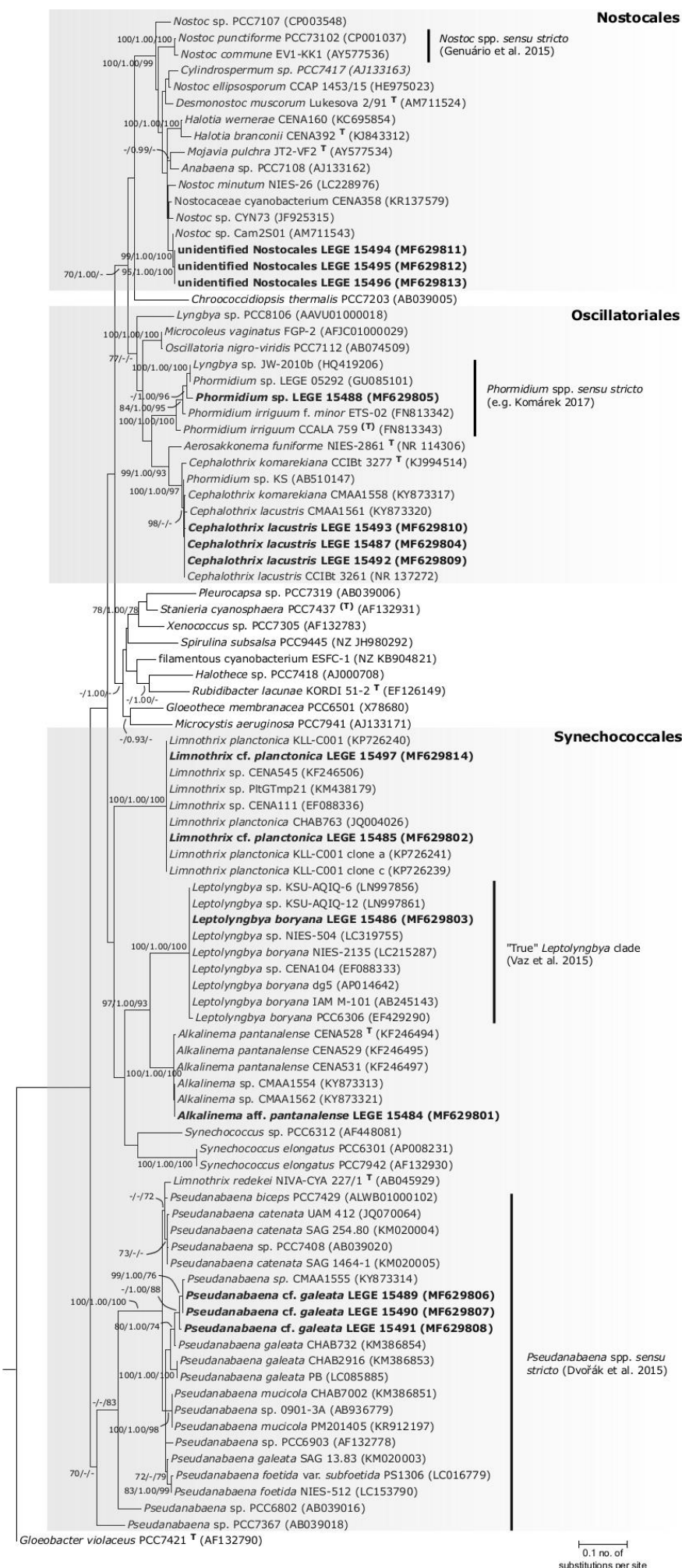
Cepas: LEGE 15494 (MF629811), LEGE 15495 (MF629812) e LEGE 15496 (MF629813).

Cianobactérias heterocitadas típicas da ordem Nostocales com morfologia similar ao gênero *Nostoc* sp. Os filamentos dessas linhagens crescem no fundo e parede do frasco de cultivo e podem produzir bolhas de ar (Fig 6M, N e O). As colônias são verde-oliva e arredondadas, achatadas ou irregulares. Os filamentos são flexíveis ou enrolados com envelopes mucilaginosos estreita e difluente. As células vegetativas são ovais ou esféricas, medindo 2,0–4,0 μm de comprimento, e 2,8–4,6 μm de largura. Os heterócitos terminais possuem $3,2 \pm 0,4$ μm de largura e $3,3 \pm 0,4$ μm de comprimento. Foi possível observar que os hormogônios movem-se por deslizamento.

3.2.2 Análises moleculares e filogenia

As análises moleculares e genética foram realizadas com intuito de complementar a identificação morfológica e promover uma caracterização confiável, seguindo os preceitos da taxonomia polifásica. Os resultados das buscas por sequências genéticas de RNAr 16S semelhantes na base de dados do GenBank (BLASTn) (Tabelas 5 e 6) e as árvores filogenéticas (Figura 7) que foram geradas a partir destes resultados podem ser observados a seguir.

Figura 7: Árvore filogenética (ML) baseada em sequências gênicas de RNAr 16S mostrando a posição das cepas de cianobactérias amazônicas (em negrito). Valores de reamostragem >70% ou probabilidade posterior >0.90 são indicados abaixo dos nós de cada clado (ML/BI/MP). Cada linhagem é identificada pelo seu número de acesso do GenBank. Para a construção desta árvore, *Chloroflexus aurantiacus* J-10-fl (NR_074263) foi utilizado como grupo externo, porém foi removido da figura para maior clareza. (T) refere-se a linhagem tipo de acordo com a base de dados online CyanoType (Ramos *et al.* 2017).



***Alkalinema aff. pantanalense* LEGE 15484 (MF629801) (Fig 5A)**

As sequências de RNA ribossomal 16S do isolado *A. pantanalense* LEGE 15484 compartilham mais de 99% de identidade com as sequências de quatro linhagens de *Alkalinema* spp., incluindo *A. pantanalense* CENA 531 e CENA 529 (Tabela 5 e 6). De fato, a sequência de *A. pantanalense* LEGE 15484 compartilha alto valor de similaridade com o da linhagem tipo *A. pantanalense* CENA 528 (99,6%) e com *Alkalinema* sp. CMAA 1554 (99,8%). Tais sequências formam um grupo bem definido (Fig. 7), com 100% de suporte pelos métodos Máxima Verossimilhança (ML) e Máxima Parcimônia (MP), e 1,0 por Inferência Bayesiana (BI). Apesar de LEGE 15484 parecer mais relacionada a cepas de *Alkalinema* sp. CMAA, a distância filogenética entre todas as linhagens deste clado é mínima. Portanto a análise polifásica do isolado LEGE 15484 resultou na sua identificação como *Alkalinema aff. pantanalense* (Vaz *et al.* 2015).

***Limnothrix cf. planctonica* LEGE 15485 (MF629802) e LEGE 15497 (MF629814) (Figs 5B, 5N)**

As sequências de RNAr 16S dos isolados de *Limnothrix* LEGE 15485 e LEGE 15497 compartilharam mais de 99% de identidade com as sequências de *Limnothrix* sp. CENA545 e outras identificadas como *L. planctonica* ou *Limnothrix* sp. (Tabelas 5 e 6). Essas sequências formam um clado composto exclusivamente de cepas do gênero *Limnothrix* com altos valores de suporte por ML e BI (Fig. 7). Todavia, este grupo ficou distante do clado da linhagem tipo *L. redekei* NIVA-CYA 227/1 (Suda *et al.* 2002), que mostrou-se mais relacionada filogeneticamente à linhagens de *Pseudanabaena* (Fig. 7). Com base nesses dados, as cepas LEGE 15485 e LEGE 15497 foram identificadas como *Limnothrix cf. planctonica* (Meffert, 1988; Komárek & Anagnostidis, 2005).

Tabela 5: Matriz de similaridade das sequências de RNAr 16S obtidas das linhagens de cianobactérias isoladas do Rio Amazonas (cepas LEGE marcadas em negrito), das linhagens com maiores valores de identidade no BLASTn(*), linhagens tipo (T) ou de referência (R).

	NIVA-CYA 227/1	SAG 254.80	NIES-512	CHAB732	PCC 73102	EV1-KK1	Lukesova 2/91	JT2-VF2	CENA392	LEGE 05292	CHAB7002	LEGE 15491	LEGE 15489	LEGE 15490	CMAA1555	PCC 7429	PCC 6306	LEGE 15486	NIES-504	CMAA1554	CENA528	LEGE 15484	LEGE 15497	CENA545	LEGE 15485	PCC 7108	CENA358	Cam2S01	LEGE 15496	LEGE 15494	CCIBt 3261	LEGE 15493	LEGE 15492	LEGE 15487	CMAA1561	CCIBt 3277	LEGE 15488	JW-2010b	CCALA 759				
<i>Phormidium irriguum</i> CCALA 759 ^(T)																																											
<i>Lyngbya</i> sp. JW-2010b *	97,2																																										
<i>Phormidium</i> sp. LEGE 15488	96,9	98,1																																									
<i>Cephalothrix komarekiana</i> CCIBt 3277 ^T	91,1	91,3	91,7																																								
<i>Cephalothrix lacustris</i> CMAA1561 *	90,9	90,3	90,7	98,5																																							
<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15487	91,6	90,7	91,2	98,4	99,5																																						
<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15492	90,9	90,3	91,1	98,0	98,9	99,9																																					
<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15493	91,6	90,7	91,0	98,6	99,5	99,9	99,9																																				
<i>Cephalothrix lacustris</i> CCIBt 3261 *	91,1	90,9	90,9	99,0	99,4	99,5	98,8	99,4																																			
unidentified Nostocales LEGE 15494	90,3	90,1	90,9	90,4	89,1	89,3	89,5	89,5	89,7																																		
unidentified Nostocales LEGE 15496	90,3	90,1	90,9	90,4	89,2	89,3	89,5	89,6	89,7	100																																	
unidentified Nostocales LEGE 15495	90,1	89,9	90,8	90,3	89,0	89,4	89,4	89,4	89,5	100	100																																
<i>Nostoc</i> sp. Cam2S01 *	89,9	90,1	90,6	89,5	88,7	89,3	88,9	89,6	89,2	99,6	99,6	99,5																															
Nostocaceae cyanobacterium CENA358 *	89,7	90,1	90,3	89,5	88,8	89,4	89,0	89,8	89,0	97,4	97,5	97,3	97,2																														
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7108 ^R	89,4	90,0	89,9	88,7	87,7	88,8	88,3	89,0	88,0	96,8	96,6	96,7	95,5	95,2																													
<i>Limnithrix</i> cf. <i>planctonica</i> LEGE 15485	88,7	88,3	88,4	86,7	86,3	86,4	86,7	86,7	86,5	89,1	89,1	89,0	89,0	89,1	88,0																												
<i>Limnithrix</i> sp. CENA545 *	88,5	88,3	88,5	86,5	86,1	86,3	86,4	86,9	86,3	89,1	89,0	89,0	88,5	88,7	87,4	99,7																											
<i>Limnithrix</i> cf. <i>planctonica</i> LEGE 15497	88,8	88,4	88,5	86,9	86,5	86,3	86,8	86,9	86,7	89,1	89,0	89,0	89,0	89,1	88,0	99,7	100																										
<i>Alkalinema</i> aff. <i>pantanalense</i> LEGE 15484	89,5	89,8	89,5	88,3	88,0	87,6	87,8	88,2	87,9	88,2	88,3	88,0	88,0	88,2	87,4	89,1	89,1	89,1																									
<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA528 ^T	89,2	89,7	89,4	88,0	87,9	87,3	87,5	88,1	87,8	88,0	88,2	87,8	87,8	87,9	86,8	89,0	89,0	89,2	99,6																								
<i>Alkalinema</i> sp. CMAA1554 *	89,2	90,0	89,7	88,2	87,6	87,5	87,7	88,2	88,0	88,2	88,3	88,0	87,9	88,1	86,9	89,1	89,0	89,1	99,8	99,6																							
<i>Leptolyngbya</i> sp. NIES-504 *	88,2	88,9	88,5	86,7	86,5	86,4	86,5	87,3	86,4	87,7	87,8	87,5	86,8	87,6	86,4	87,7	87,4	87,9	92,1	91,7	91,8																						
<i>Leptolyngbya boryana</i> LEGE 15486	88,8	88,9	88,5	87,1	86,9	86,5	87,1	87,3	86,9	87,7	87,7	87,6	87,8	87,9	87,3	87,8	87,9	92,0	91,9	92,0	100																						
<i>Leptolyngbya boryana</i> PCC 6306 ^R	88,9	89,8	89,1	88,8	88,2	88,8	88,3	89,3	88,9	89,0	88,9	88,3	88,7	87,8	89,2	88,6	89,3	92,5	92,4	92,2	99,5	99,4																					
<i>Pseudanabaena biceps</i> PCC 7429	88,0	87,7	87,6	86,1	86,0	85,2	85,4	85,9	85,9	88,1	88,3	87,9	88,0	87,6	87,4	88,2	88,0	88,4	87,7	87,7	87,9	87,0	87,8	87,8																			
<i>Pseudanabaena</i> sp. CMAA1555 *	87,4	87,3	87,1	85,7	85,0	84,7	85,1	85,5	85,5	87,1	87,4	86,9	87,2	87,1	87,1	87,9	87,6	87,9	87,8	88,0	88,1	87,5	88,3	87,5	96,7																		
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15490	87,3	86,8	86,7	84,8	84,4	85,0	84,8	84,8	84,5	86,8	86,8	86,9	87,1	86,9	87,0	87,5	87,4	87,4	87,2	87,0	87,2	87,4	87,4	87,1	96,6	99,7																	
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15489	88,0	87,6	87,3	85,7	85,4	85,0	85,7	85,8	85,4	87,4	87,6	87,2	87,8	87,6	87,7	88,2	88,2	88,2	88,1	88,2	88,6	88,5	88,5	97,0	99,8	100																	
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15491	87,5	87,2	87,2	85,9	85,4	85,0	85,7	85,8	85,5	87,0	87,3	86,9	87,3	87,3	87,1	88,2	88,2	88,2	87,9	87,7	87,9	88,9	89,0	96,6	99,0	99,1	99,2																
<i>Pseudanabaena mucicola</i> CHAB7002	88,5	88,0	87,8	86,3	85,6	85,5	85,7	86,2	86,1	87,6	87,8	87,4	87,7	87,1	87,1	87,8	87,6	88,0	88,0	87,9	88,0	87,6	88,5	85,0	97,5	98,2	98,5	98,7	97,9														
<i>Phormidium</i> sp. LEGE 05292 *	97,2	99,9	98,2	90,5	89,6	90,8	90,1	90,8	90,2	90,1	90,2	89,9	89,1	89,2	88,8	88,4	88,0	88,4	89,9	89,0	89,2	88,3	89,0	89,0	87,3	86,9	86,9	87,7	87,3	87,7													
<i>Halotia branconii</i> CENA392 ^T	88,9	89,5	89,3	88,2	88,3	88,2	88,1	88,6	88,2	94,5	94,5	94,4	94,3	95,7	93,4	87,1	87,0	87,2	88,2	88,2	88,5	86,9	87,4	88,3	86,5	86,7	86,0	86,7	86,2	86,7	88,6												
<i>Mojavia pulchra</i> JT2-VF2 ^T	89,1	89,5	89,9	89,9	89,2	90,0	89,6	90,3	89,4	96,4	96,2	96,3	95,8	96,1	94,8	87,5	87,3	87,7	87,8	87,3	87,5	87,2	88,0	87,0	87,9	88,1	88,2	88,8	88,0	87,9	88,5	94,7											
<i>Desmonostoc muscorum</i> Lukesova 2/91 ^T	90,7	90,9	90,9	89,9	89,3	89,6	89,2	89,8	89,5	96,7	96,8	96,6	96,6	97,1	94,6	88,8	88,4	88,8	88,4	88,5	88,6	87,3	87,6	88,7	87,7	87,3	87,0	87,6	87,2	87,4	89,9	94,7	95,1										
<i>Nostoc commune</i> EV1-KK1	88,8	88,6	89,2	90,7	90,2	91,3	90,5	91,3	90,4	96,1	95,9	96,0	95,1	95,4	93,6	88,8	88,4	88,7	87,9	87,6	87,8	87,3	87,5	87,9	87,9	88,0	88,5	88,2	87,8	87,6	94,3	95,4	95,7										
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102^R	88,8	88,5	89,1	89,9	89,2	89,4	89,1	89,7	89,5	96,1	95,9	95,9	95,5	95,3	94,1	88,9	88,8	89,1	87,8	87,9	88,0	86,6	87,0	87,8	87,4	86,8	86,2	86,9	86,6	86,8	87,8	93,9	95,8	95,4	99,2								
<i>Pseudanabaena galeata</i> CHAB732	87,9	87,3	87,0	86,5	86,4	85,8	86,6	86,5	86,3	87,6	87,8	87,4	88,1	87,9	87,8	88,2	88,6	88,6	88,1	87,9	88,1	88,9	88,9	88,6	97,3	98,8	98,8	98,9	98,8	98,8	87,3	87,1	88,0	88,1	88,1	87,3							
<i>Pseudanabaena foetida</i> NIES-512	87,5	87,0	87,0	85,6	85,1	84,7	85,0	85,4	85,4	87,6	87,8	87,4	87,6	87,2	87,3	87,9	87,7	88,1	87,6	87,6	87,7	87,5	88,3	87,1	98,3	97,3	97,2	97,5	97,1	97,5	86,7	86,5	87,9	87,5	88,0	87,1	97,9						
<i>Pseudanabaena catenata</i> SAG 254.80	88,4	87,9	87,8	86,4	86,2	85,5	85,7	86,2	86,2	88,3	88,5	88,1	88,3	87,7	88,0	88,8	88,6	89,0	87,7	87,7	87,8	86,8	87,6	87,9	99,1	95,9	95,7	96,1	95,8	96,8	87,6	86,7	87,6	88,0	87,9	87,7	96,8	97,6					
<i>Limnithrix redekei</i> NIVA-CYA 227/1 ^T	87,5	87,5	87,3	85,4	85,1	84,9	85,2	85,6	85,1	87,9	88,1	87,7	87,5	87,4	87,2	88,0	87,8	88,3	87,6	87,1	87,2	86,9	87,9	87,2	98,9	95,7	95,7	96,1	95,8														

Leptolyngbya boryana LEGE 15486 (MF629803) (Fig 5C)

A cepa LEGE 15486 apresentou 100% de identidade com sequências de quatro linhagens de *Leptolyngbya*: *Leptolyngbya* sp. NIES-504; *Leptolyngbya* sp. KSU-AQIQ-12 e KSU-AQIQ-6; e *Leptolyngbya* sp. CENA104 (Tabela 6). A sequência do gene RNAr 16S compartilhou 99,4% de similaridade com *L. boryana* PCC 6306 (Tabela 5), cepa de referência conforme o Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (Castenholz *et al.* 2015). Tais linhagens agruparam-se com outras *Leptolyngbya boryana* e *Leptolyngbya* sp. Num clado monofilético com alto valor de suporte (ML/BI/MP = 100/1.00/100) (Fig. 7). A avaliação polifásica de LEGE 15486 possibilitou sua identificação como *L. boryana* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

Cephalothrix lacustris LEGE 15487 (MF629804), LEGE 15492 (MF629809) e LEGE 15493 (MF629810) (Figs 5D, 5I, 5J)

As sequências de RNAr 16S de LEGE 15487, LEGE 15492 e LEGE 15493 mostraram valores de similaridade $\geq 98,8\%$ (Tabela 5) com as sequências de *Cephalothrix lacustris* CCIBt 3261 (98,8–99,5%) e *C. lacustris* CMAA 1561 (98,9–99,5%). Com relação a árvore filogenética, apenas o método Máxima Verossimilhança deu suporte a um subgrupo formado pelas linhagens mencionadas juntamente com *C. komarekiana* CMAA 1558 e *Phormidium* sp. KS (Fig. 7). Mesmo assim, os três métodos de inferência deram suporte a um clado maior (ML/BI/MP = 100/1.00/97) que englobou as sequências mencionadas acima juntamente com a sequência da linhagem tipo do gênero, *Cephalothrix komarekiana* CCIBt 3277 (Fig. 6). Os isolados LEGE 15487, LEGE 15492 e LEGE 15493 foram identificados como *Cephalothrix lacustris*.

***Phormidium* sp.** LEGE 15488 (MF629805) (Fig. 5E)

A sequência de RNAr 16S de LEGE 15488 compartilhou 98% de identidade com as sequências de três cepas identificadas como *Phormidium* sp., *Lyngbya* sp. e com uma cianobactéria não identificada (Tabela 6). Ainda, a sequência de LEGE 15488 (Tabela 5) mostrou altos valores de similaridade com as sequências de *Phormidium* sp. LEGE 05292 (98,2%) e *Lyngbya* JW-2010b (98,1%), e num grau menor com a sequência de

Phormidium irriguum CCALA 759 (96,9%). Na Fig. 7 é possível observar que LEGE 15488 formou um clado robusto (ML/BI/MP = 100/1.00/100) com *P. irriguum* CCALA 759, considerada o epítipo para essa espécie e para o gênero *Phormidium* (Sciuto *et al.* 2012). Com base na avaliação polifásica, a cepa LEGE 15488 foi identificada como *Phormidium* sp. (Komárek & Anagnostidis, 2005, Sciuto *et al.* 2012).

TABELA 6. Melhores resultados (*best hits*) do BLASTn para as sequências de rRNA 16S das linhagens obtidas neste estudo

Linhagem	Best Hits	Cobertura (%)	Identidade (%)	Número de acesso
<i>Alkalinema</i> aff. <i>pantanalense</i> LEGE 15484	<i>Alkalinema</i> sp. CMAA1554	100%	99%	KY873313
	<i>Alkalinema</i> sp. CMAA1562	100%	99%	KY873321
	<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA531	100%	99%	KF246497
	<i>Alkalinema pantanalense</i> CENA529	100%	99%	KF246495
<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15487	<i>Phormidium</i> sp. KS	99%	99%	AB510147
	<i>Cephalothrix lacustris</i> CMAA1561	99%	99%	KY873320
	<i>Cephalothrix lacustris</i> CCIBt 3261	99%	99%	NR_137272
	<i>Cephalothrix komarekiana</i> CMAA1558	99%	99%	KY873317
<i>Limnothrix</i> cf. <i>planctonica</i> LEGE 15485	<i>Limnothrix</i> sp. NIES-3735	99%	99%	LC037450
	<i>Limnothrix planctonica</i> CHAB763	99%	99%	JQ004026
	<i>Limnothrix</i> sp. CENA111	99%	99%	EF088336
	<i>Limnothrix planctonica</i> KLL-C001	99%	99%	KP726239
<i>Leptolyngbya boryana</i> LEGE 15486	<i>Leptolyngbya</i> sp. NIES-504	100%	100%	LC319755
	<i>Leptolyngbya</i> sp. KSU-AQIQ-12	100%	100%	LN997861
	<i>Leptolyngbya</i> sp. KSU-AQIQ-6	100%	100%	LN997856
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA104	100%	100%	EF088333
<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15493	<i>Phormidium</i> sp. KS	100%	99%	AB510147
	<i>Cephalothrix lacustris</i> CMAA1561	99%	99%	KY873320
	<i>Cephalothrix lacustris</i> CCIBt 3261	100%	99%	NR_137272
	<i>Cephalothrix komarekiana</i> CMAA1558	99%	99%	KY873317
<i>Cephalothrix lacustris</i> LEGE 15492	<i>Phormidium</i> sp. KS	99%	99%	AB510147
	<i>Cephalothrix lacustris</i> CMAA1561	99%	99%	KY873320
	<i>Cephalothrix lacustris</i> CCIBt 3261	99%	99%	NR_137272
	<i>Cephalothrix komarekiana</i> CMAA1558	99%	99%	KY873317
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15490	<i>Pseudanabaena</i> sp. CMAA1555	100%	99%	KY873314
	<i>Pseudanabaena mucicola</i> PM201405	100%	99%	KR912197
	<i>Pseudanabaena</i> sp. 0901-3A	100%	99%	AB936779
	<i>Pseudanabaena mucicola</i> CHAB7002	100%	99%	KM386851
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> LEGE 15489	<i>Pseudanabaena</i> sp. CMAA1555	100%	99%	KY873314
	<i>Pseudanabaena mucicola</i> PM201405	100%	99%	KR912197
	<i>Pseudanabaena</i> sp. 0901-3A	100%	99%	AB936779
	<i>Pseudanabaena mucicola</i> CHAB7002	100%	99%	KM386851
<i>Phormidium</i> sp.	<i>Oscillatoria</i> sp. LEGE 05292	100%	98%	GU085101

LEGE 15488			<i>Lyngbya</i> sp. JW-2010b	100%	98%	HQ419206
			<i>Phormidium irriguum</i> f. <i>minor</i> ETS-02	100%	98%	FN813342
			Cyanobacterium PL	100%	98%	DQ072163
unidentified 15494	Nostocales	LEGE	<i>Nostoc</i> sp. Cam2S01	100%	99%	AM711543
			<i>Nostoc</i> sp. CYN73	100%	98%	JF925315
			<i>Nostoc minutum</i> NIES-26	100%	98%	LC228976
			<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/15	100%	98%	HE975023
unidentified 15495	Nostocales	LEGE	<i>Nostoc</i> sp. Cam2S01	99%	99%	AM711543
			<i>Nostoc</i> sp. CYN73	99%	98%	JF925315
			<i>Nostoc minutum</i> NIES-26	99%	98%	LC228976
			<i>Nostoc ellipsosporum</i> CCAP 1453/15	99%	98%	HE975023
unidentified 15496	Nostocales	LEGE	<i>Nostoc</i> sp. Cam2S01	100%	99%	AM711543
			<i>Nostoc minutum</i> NIES-26	100%	98%	LC228976
			<i>Nostoc</i> sp. CYN73	100%	98%	JF925315
			Nostocaceae cyanobacterium CENA358	100%	98%	KR137579
<i>Pseudanabaena</i> cf. <i>galeata</i> 15491		LEGE	<i>Pseudanabaena</i> sp. CMAA1555	100%	99%	KY873314
			<i>Pseudanabaena mucicola</i> PM201405	100%	98%	KR912197
			<i>Pseudanabaena</i> sp. 0901-3A	100%	98%	AB936779
			<i>Pseudanabaena galeata</i> CHAB2916	100%	98%	KM386853
<i>Limnothrix</i> cf. <i>planctonica</i> 15497		LEGE	<i>Limnothrix</i> sp. CENA545	100%	100%	KF246506
			<i>Limnothrix planctonica</i> KLL-C001	100%	99%	KP726241
			<i>Limnothrix</i> sp. PltGTmp21	100%	99%	KM438179
			<i>Limnothrix</i> sp. NIES-3735	100%	99%	LC037450

Pseudanabaena* cf. *galeata LEGE 15489 (MF629806), LEGE 15490 (MF629807) e LEGE 15491 (MF629808) (Figs 5F, 5G, 5H)

Os resultados do BLAST para as sequências das linhagens LEGE 15489 e LEGE 15490 foram muito semelhantes, enquanto os resultados do BLAST para a sequência de LEGE 15491 foram comparáveis, embora ligeiramente diferentes (Tabela 6). Apesar disso, as cepas LEGE de *Pseudanabaena* compartilharam altos valores de similaridade entre si (99,1–100%), e com as cepas que apresentaram os melhores resultados em buscas do BLAST: *Pseudanabaena* sp. CMAA1555 (99-99,8%) e *P. galeata* CHAB 732 (98,8-99,9%) (Tabela 5). Os isolados LEGE 15489 e LEGE 15490 agruparam-se com *Pseudanabaena* sp. CMAA1555 em um clado com bons valores de suporte (ML / BI / MP = 99 / 1.00 / 76), conforme ilustrado na Fig. 7. Por outro lado, essas linhagens formaram um clado maior juntamente com LEGE 15491 e *P. galeata* CHAB732, embora neste caso seja melhor apoiado pelos métodos BI (1,00) do que pelos

métodos ML (80%) e MP (74%). O ramo mais próximo deste clado é um grupo que inclui *P. galeata* CHAB 2916 e *P. galeata* PB (Fig. 7). Com base na descrição morfológica, comportamento em cultura e informação filogenética, as três cepas LEGE foram identificadas como *Pseudanabaena* cf. *galeata* (ver também Komárek & Anagnostidis, 2005).

Nostocales não identificadas LEGE 15494 (MF629811), LEGE 15495 (MF629812) e LEGE 15496 (MF629813) (Figs 5K, 5L, 5M)

Os resultados do BLAST mostraram que as sequências das cepas LEGE heterocitadas apresentam $\geq 98\%$ de identidade com sequências de várias linhagens identificadas como *Nostoc* e com uma sequência de uma cianobactéria Nostocaceae não identificada (Tabela 6). A Tabela 5 mostra que as sequências LEGE apresentam alto valor de similaridade com a linhagem *Nostoc* sp. Cam2S01 (variando de 99,5% a 99,6%), ao passo que apresentam menor valor de similaridade com a cepa de referência *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (95,9-96,1%) (Tabela 5). De fato, as cepas LEGE Nostocales estão filogeneticamente separadas do clado *Nostoc sensu stricto* (Genuário *et al.* 2015), que inclui *N. punctiforme* PCC 73102 (Fig. 7). Dados de análises morfológicas, ecológicas e filogenéticas não foram suficientes para identificar adequadamente estas linhagens ao nível de espécie ou gênero. No entanto, essas cepas podem ser classificadas como pertencentes à ordem Nostocales.

3.2.3 Potencial tóxico

Nenhum dos genes associados à produção de cianotoxinas foi amplificado nas cepas isoladas neste estudo.

4 DISCUSSÃO

As características físicas e químicas da água do Rio Amazonas são típicas de rios de águas brancas, turbidos, com altos valores de sólidos totais dissolvidos, baixo valor de transparência (profundidade de secchi), quentes e com pH em torno de 7 (Junk *et al.* 2011, Ward *et al.* 2015). O clima também apresentou de forma geral comportamento

típico da Amazônia, com altas temperaturas do ar, precipitação e insolação (Junk *et al.* 2011; Cunha & Sternberg, 2018), exceto o fato da ausência de chuvas de setembro a novembro 2015. Vale a pena ressaltar que este período foi considerado um evento extremo de estiagem devido ao El Niño, sendo a estiagem mais forte já identificada na região com 105 dias sem chuvas (Vilhena *et al.* 2018).

Alguns dos táxons isolados neste estudo já haviam sido registrados para a região amazônica (Cunha *et al.* 2013; Genuário *et al.* 2017), enquanto que outros representam os primeiros registros para esta região e até para o Brasil. Esses táxons incluem *Alkalinema pantanalense* e *Limnothrix planctonica*, que são os primeiros registros para a região amazônica, considerando os métodos taxonômicos modernos- taxonomia polifásica. De fato, a “Lista de espécies da flora brasileira (Cyanophyceae)” não tem registros desses taxóons para esta região (Werner *et al.* 2015). Além disso, *Leptolyngbya boryana* nunca foi oficialmente registrada no Brasil (Werner *et al.* 2015).

No que diz respeito a *A. aff. pantanalense* LEGE 15484, o conteúdo celular desta cepa é azul-esverdeado que varia de pálido a brilhante, ao passo que a cor da espécie tipo (*Alkalinema pantanalense* CENA 528) varia de avermelhado a acastanhado (Vaz *et al.* 2015). A cepa tipo foi isolada de uma lagoa salina-alcálica do Pantanal a partir de uma amostra de água com valores incomuns de condutividade elétrica (variando de 1,1 a 4,7 $\mu\text{m cm}^{-1}$) e pH (variando de 8,5 a 8,8) (Andreote *et al.* 2014; Vaz *et al.* 2015). *A. aff. pantanalense* LEGE 15484 também foi coletada no Brasil, mas na parte leste da bacia do Rio Amazonas, em um ambiente com valores de pH variando de 6 a 7,2 e valores de CE variando de 40 a 60 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Apesar das diferenças de cor e ecologia, a morfologia destas linhagens é bastante similar. Portanto, a cepa isolada neste trabalho foi identificada como *Alkalinema aff. pantanalense* LEGE 15484.

Três cepas de *Alkalinema* sp. foram recentemente isoladas em outras regiões da bacia amazônica brasileira: *Alkalinema* sp. CACIAM 70d (Lima *et al.* 2017), *Alkalinema* sp. CMAA1554 e CMAA1562 (Genuário *et al.* 2017). *Alkalinema* sp. CACIAM 70d também foi isolada na Amazônia Oriental, no reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, estado do Pará. Seu genoma foi sequenciado recentemente, sendo a primeira sequência de genoma completo disponível para este gênero (Lima *et al.* 2017). Por outro lado, informações morfológicas ou ecológicas adicionais sobre essa cepa ainda não estão disponíveis. Com relação à *Alkalinema* sp. CMAA1554, esta apresenta cor acastanhada e tem células apicais cônicas/ arredondadas. As dimensões celulares são 1,0–2,3 μm (comprimento) e 2,5–3,1 μm (largura) (Genuário *et al.* 2017). Assim, esta cepa exibe

algumas diferenças de *A. aff. pantanalense* LEGE 15484 em termos de cor e tamanho de célula (Fig. 5A). No entanto, tais diferenças morfológicas não são refletidas na análise filogenética, visto que as cepas de CMAA aparecem como as linhagens mais próximas de *A. aff. pantanalense* LEGE 15484 (Fig. 7). As linhagens de *Alkalinema* CMAA 1554 e 1562 foram isoladas dos rios Amazonas e Solimões, na parte oeste da bacia amazônica brasileira (Genuário *et al.* 2017), sob condições ecológicas semelhantes às observadas em Macapá. A cepa *Alkalinema* CMAA 1562 foi perdida após a extração de DNA, não permitindo comparações morfológicas (Genuário *et al.* 2017).

O gênero *Alkalinema* foi recentemente identificado no estado do Amapá em um estudo sobre o fitoplâncton do Rio Araguari que utilizou abordagem morfológica (Silva *et al.* 2018). Aparentemente, as cianobactérias *Alkalinema* sp. são amplamente distribuídas nas águas da bacia amazônica brasileira, que normalmente são ácidas, embora o nome do gênero se refira aos lagos alcalinos de onde foi isolada pela primeira vez (Vaz *et al.* 2015). Esta descoberta demonstra que esta espécie exibe excelente tolerância a uma faixa de valores de pH no ambiente natural; esse intervalo de tolerância já foi demonstrado em experimentos de laboratório (Vaz *et al.* 2015; Genuário *et al.* 2017). Notavelmente, até o momento, a distribuição geográfica de *Alkalinema* sp. é restrita ao Brasil.

A morfologia dos isolados de *Limnothrix*, LEGE 15497 e LEGE 15485 (Fig. 5B, 5N), assemelha-se mais à da espécie *L. planctonica* do que a de *L. redekei*. Os isolados neste estudo diferem de *L. planctonica* devido a posição das vesículas de gás que ocorrem apenas nos pólos celulares e não no meio da célula (Komárek & Anagnostidis, 2005). No entanto, as cepas LEGE apresentam motilidade, enquanto os tricomas de *L. redekei* são imóveis. Ainda, as células das linhagens LEGE são mais curtas e formam vesículas de gás menores, ocupando menos de 10% do conteúdo celular em comparação com o tamanho máximo de aerótopos observados em *L. redekei*, que representam 10 a >50% do conteúdo celular (Komárek & Anagnostidis, 2005). Os resultados moleculares são consistentes com a caracterização morfológica, uma vez que as sequências do gene RNAr 16S das cepas LEGE 15497 e 15485 mostraram-se filogeneticamente relacionadas às linhagens de várias *L. planctonica* e *Limnothrix* sp., e distantes da sequência tipo *L. redekei* NIVA-CYA 227/1 (Fig. 7, Tabela 5, Suda *et al.* 2002). A cepa *Limnothrix redekei* NIVA-CYA 227/1 foi utilizada para descrever a espécie-tipo, isto é, o holótipo para *Limnothrix* (Meffert 1988). No entanto, esta linhagem agrupou-se com *Pseudanabaena* spp. dentro do clado de *Pseudanabaena* (Fig. 7), o que também foi observado em vários

estudos anteriores (Suda *et al.* 2002, Gkelis *et al.* 2005, Willame *et al.* 2006, Zhu *et al.* 2012, Andreote *et al.* 2014, Yu *et al.* 2015). Além disso, alguns desses estudos (Zhu *et al.* 2012, Andreote *et al.* 2014, Yu *et al.* 2015) mostraram que o mesmo clado que contém as duas cepas isoladas neste estudo, *L. cf. planctonica* LEGE 15497 e LEGE 15485 (Fig. 7), é composto exclusivamente de cepas de *Limnothrix* spp. e está filogeneticamente distante de *L. redekei* NIVA-CYA 227/1. Willame *et al.* (2006) já haviam relatado que as sequências *Pseudanabaena* spp. estavam intimamente relacionadas com as sequências "Meffert" de *Limnothrix*, destacando a alta relação genotípica de ambos os gêneros e suas diferenças imperceptíveis em termos de fenótipo. Portanto, Yu *et al.* (2015) sugerem que a linhagem *L. redekei* NIVA-CYA 227/1 deve ser transferida para o gênero *Pseudanabaena*, uma vez que este gênero foi descrito antes de *Limnothrix* (Meffert, 1988, Komárek & Anagnostidis, 2005), e o clado que possui apenas cepas de *Limnothrix* spp. deve permanecer sob o gênero *Limnothrix*. Andreote *et al.* (2014) também concorda com essa reavaliação taxonômica de *Limnothrix* e seu holótipo, opinião que compartilho.

Outros autores (Gkelis *et al.* 2005, Zhu *et al.* 2012) acreditam que o clado com a cepa tipo deve permanecer sob o gênero *Limnothrix*, enquanto o clado bem suportado de outras *Limnothrix* spp. deve ser taxonomicamente revisado e estabelecido como um novo gênero. Para torná-lo ainda mais complexo, a Fig. 8 mostra que *Limnothrix redekei* NIVA-CYA 227/1 está no mesmo clado que várias cepas designadas para a espécie-tipo do gênero *Pseudanabaena*, *P. catenata*. No entanto, Yu *et al.* (2015) consideram que faltam estudos polifásicos sobre cepas de *P. catenata* e devem ser realizados para reavaliação do gênero *Pseudanabaena* sob taxonomia moderna. Anteriormente, quando foi sugerido que as espécies de *Limnothrix* constituem um grupo polifilético, havia poucas linhagens disponíveis para estudos filogenéticos. Atualmente, existem várias cepas disponíveis da África, América, Ásia, Europa e Oceania (Bernard *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2012) que podem ajudar a elucidar as relações filogenéticas dentro deste gênero. Considerando os valores limiares de 98,7-99% para a delimitação de espécies ao usar sequências do gene rRNA 16S (Stackebrandt & Ebers 2006, Kim *et al.* 2014), as duas cepas de *Limnothrix* deste estudo e *Limnothrix* sp. CENA 545 (99,7-100%, Tabela 5) deve pertencer à mesma espécie, neste caso *L. planctonica*. A cepa CENA 545 também foi coletada no Brasil, de um lago salino-alcálico no estado de Mato Grosso do Sul. Da mesma forma como foi observado para *Alkalinema* aff. *pantanalense*, este resultado parece indicar a versatilidade ecológica do *L. cf. planctonica*.

Leptolyngbya boryana LEGE 15486 é a única cepa deste estudo que foi isolada da água tratada. *Leptolyngbya* sp. CENA 104, uma das cepas incluídas no mesmo clado que *L. boryana* LEGE 15486, foi isolado de um tanque defletor de cloração na área de saída de um sistema de lagoa de estabilização de resíduos durante uma operação sem cloração (Furtado *et al.* 2009). Curiosamente, ambos os sistemas são ambientes fechados, artificiais onde a presença de algum cloro na água é esperada. As características morfológicas de CENA 104, que foi originalmente identificado apenas a nível de gênero (Furtado *et al.* 2009), são semelhantes às de *L. boryana* LEGE 15486. Os tricomas dessas linhagens estão dispostos em aglomerados densos e estão ligados às paredes de vidro dos frascos de cultura. A cor, o tamanho das células e outras características morfológicas das duas linhagens também são muito semelhantes (Furtado *et al.* 2009). Essas duas linhagens, que compartilham características comuns e foram coletadas de regiões geográficas relativamente próximas, são, até o momento, as únicas cepas de *L. boryana* do Brasil. Outra característica que pode ser comum a cepas dessa espécie é a capacidade de crescer com pouca luz. Por exemplo, além das duas estirpes acima mencionadas (obtidas de sistemas fechados), *L. boryana* dg5 é uma variante adaptada ao escuro de IAM M-101 que pode crescer heterotroficamente no escuro (Fujita *et al.* 1996; Hiraide *et al.* 2015). Tanto a linhagem dg5 quanto a linhagem IAM M-101 estão incluídas no clado verdadeiro de *Leptolyngbya*, mostrado na figura 7.

Os isolados do gênero *Cephalothrix* são morfológicamente muito semelhantes às cepas descritas por Malone *et al.* (2015). Além disso, a ecologia e o ciclo de vida dos isolados são comparáveis. Durante o processo de isolamento, observou-se a existência de fases planctônicas e bentônicas para as cepas LEGE de *C. lacustris*, o que também foi descrito por Malone *et al.* (2015). A cultura às vezes fica aderida ao fundo do frasco de cultivo, enquanto em outros momentos, uma massa de tricomas pode ser encontrada flutuando na interface ar-meio. Filogeneticamente, as cepas LEGE foram agrupadas com *Cephalothrix lacustris* CCIBt 3261 (Fig. 7),- cepa usada para descrever esta espécie (Malone *et al.* 2015), e com outras cepas de *C. lacustris*, assim como com uma cepa de *C. komarekiana*. No entanto, os altos valores de similaridade das seqüências ($\geq 98,8\%$, ver Tabela 5) dos isolados LEGE com a linhagem CCIBt 3261, juntamente com os dados morfológicos, indicam que eles são *C. lacustris*. Além disso, os valores de similaridade em relação a *C. komarekiana* CCIBt 3277 (98,0-98,6%) estão abaixo do valor limite para serem considerados uma única espécie (Stackebrandt & Ebers, 2006, Kim *et al.* 2014). *Phormidium* sp. KS, que está incluído no mesmo clado (Fig. 8), provavelmente também

pertence a *C. lacustris*, algo que já foi sugerido por Malone *et al.* (2015). De fato, as características morfológicas e o comportamento em cultura dos três isolados LEGE de *C. lacustris* e da linhagem *Phormidium* sp. KS também são muito semelhantes. Em nível macroscópico, todas essas linhagens têm cores semelhantes, formam espirais em placas de ágar e formam bolhas de ar (Sato *et al.* 2014). Até o momento, o isolamento da espécie recém-estabelecida *C. lacustris* foi relatado apenas no Brasil (Malone *et al.* 2015, Genuário *et al.* 2017) e mais provavelmente no Japão (Sato *et al.* 2014). Assim, as cepas *C. lacustris* LEGE 15493, 15487 e 15492 isoladas neste estudo podem ajudar a revelar a distribuição global deste táxon. *C. lacustris* foi isolado pela primeira vez de um lago de água doce, o Lago das Garças (pH 7-8), no sudeste do Brasil (Malone *et al.* 2015). Genuário *et al.* (2017) isolaram *C. lacustris* CMAA1561 de uma amostra coletada na Amazônia Ocidental Brasileira. Portanto, as cepas LEGE representam o segundo registro desse táxon da bacia amazônica, desta vez no estado do Amapá, Amazônia oriental.

A linhagem *Phormidium* sp. LEGE 15488 mostrou 98% de identidade com *Phormidium irriguum* f. ETS-02 minor, *Phormidium* sp. LEGE 05292 (Dias *et al.* 2017) e *Lyngbya* sp. JW-2010b (Tabela 6). Segundo Komárek (2017), essas cepas devem ser consideradas *Phormidium* spp. *sensu stricto*, uma vez que elas se agruparam em um clado bem definido que inclui a cepa *P. irriguum* CCALE 759 (Fig. 7). Esta cepa foi proposta por Sciuto *et al.* (2012) para servir como epítipo dessa espécie. Adicionalmente, segundo os autores, *P. irriguum* CCALE 759 deve ser considerado o holótipo para o gênero *Phormidium*, o que é consistente com a nova delimitação deste gênero proposta por Komárek (2017).

Com relação ao comportamento em cultura, a linhagem *Phormidium* sp. LEGE 05292, previamente isolada de uma parede de aquário em Porto, Portugal (Leão *et al.* 2009), é muito semelhante a *Phormidium* sp. LEGE 15488, que foi isolada do Ro Amazonas. Além disso, a sequência de LEGE 05292 apresenta maior valor de similaridade de (98,2%, ver Tabela 5) em relação à cepa de *Phormidium* isolada no presente estudo. Ambas as cepas crescem enquanto fixadas à superfície do frasco de cultura, formando uma manta densa muito resistente. Nem mesmo uma forte agitação é suficiente para separar os tricomas cianobacterianos (Leão *et al.* 2010). A biomassa da linhagem amazônica permanece acima dos meios de cultura como uma teia de aranha mesmo quando o nível de meio líquido diminui.

Quanto às outras cepas filogeneticamente relacionadas (Fig. 7), *P. irriguum* f. minor ETS-02 foi isolado a partir de uma superfície de lama termal na Itália, em

temperatura de 45°C e com pH de 6,8; e *P. irriguum* CCALA 759 foi isolado de um lago em Bratislava, Eslováquia (Sciuto *et al.* 2012). Na Amazônia, *Phormidium* sp. foi registrado nos estados do Amazonas, Pará, Roraima (Werner *et al.* 2015) e Amapá (Cunha *et al.* 2013). Esses achados reforçam a ideia de que o gênero revisado *Phormidium* (Sciuto *et al.* 2012; Komárek, 2017) é cosmopolita.

As características das células e tricomas, o comportamento em cultura e a ecologia das cepas *Pseudanabaena galeata* LEGE 15489, LEGE 15490 e LEGE 15491 (Fig. 5F, 5G, 5H) correspondem à descrição de *P. galeata* (Komárek & Anagnostidis, 2005). Este gênero foi registrado nos estados do Amazonas e Tocantins (Werner *et al.* 2015). Além disso, *P. galeata* foi identificada por observações morfológicas no Rio Araguari, estado do Amapá (Cunha *et al.* 2013). A filogenia das linhagens *Pseudanabaena* LEGE (Fig. 7) corrobora sua identificação, uma vez que estas linhagens são agrupadas em um grande clado com várias espécies de *Pseudanabaena*. A cepa mais próxima filogeneticamente é *Pseudanabaena* sp. CMAA1555. Esta linhagem é também a mais intimamente relacionada em termos de origem geográfica, pois também foi coletada na parte brasileira do Rio Amazonas (Genuário *et al.* 2017). Infelizmente, a cultura foi perdida e não há descrição morfológica detalhada dessa linhagem (Genuário *et al.* 2017). Outras linhagens estreitamente relacionadas são *P. galeata* CHAB732, *P. galeata* CHAB2916 e *P. galeata* PB. As duas primeiras linhagens foram isoladas na China a partir de uma lagoa e um lago, e essas linhagens são morfolologicamente semelhantes a *P. galeata* LEGE 15491, exibindo uma lacuna em forma de bolha (como um aerótopo) entre as paredes (Yu *et al.* 2015). *P. galeata* PB foi isolado na represa de Serikawa, no Japão, e mostrou alta capacidade de produzir o composto odorífero 2-metilisoborneol (2-MIB) (Takahashi *et al.* 2016). Este composto confere um odor e sabor de terra e mofo à água (Takahashi *et al.* 2016).

O clado com as cepas LEGE *Pseudanabaena* é grupo irmão de outro que inclui *P. galeata* SAG 13.83, *P. subfoetida* PS1306 e *P. foetida* NIES-512. As duas últimas linhagens foram coletadas no Japão e são ambas produtoras de 2-MIB (Niiyama *et al.* 2016, Tuji & Niiyama, 2016). *P. foetida* NIES-512, previamente identificada como *P. galeata*, é considerada uma cepa modelo para o estudo de cianobactérias produtoras de 2-MIB (Tuji & Niiyama, 2016). Segundo Niiyama *et al.* (2016), a produção de 2-MIB deve ser considerada uma característica taxonômica do gênero *Pseudanabaena*. Dadas essas observações, as cepas de *Pseudanabaena* presentes na água bruta do Rio Amazonas destinada à captação podem ser produtores de 2-MIB; porém, esta hipótese justifica uma

análise mais aprofundada usando as cepas LEGE de *P. galeata*. De fato, os cidadãos de Macapá costumam reclamar de um gosto de terra na água potável; este sabor pode ser devido à presença deste composto odorífero ou devido a sedimentos que não foram totalmente removidos durante o tratamento da água potável. Notavelmente, o Rio Amazonas contém uma quantidade considerável de sedimentos, o que é característico dos rios de águas brancas (Junk *et al.* 2011, Ward *et al.* 2015).

As linhagens heterocitadas filamentosas de Nostocales isoladas neste estudo foram agrupadas em um clado bem suportado juntamente com *Nostoc* sp. Cam2S01 (Fig. 7), a qual foi isolada de solo de origem vulcânica em Camarões (Papaefthimiou *et al.* 2008). Todas essas cepas apresentaram alto valor de similaridade de sequência entre elas (> 98,7, Tabela 5), além da semelhança morfológica com *Nostoc* sp.; porém, ficaram fora do clado '*Nostoc sensu stricto*' (Hrouzek *et al.* 2013, Genuário *et al.* 2015), como pode ser observado na Fig. 7. Este clado é usado atualmente para definir filogeneticamente o gênero *Nostoc*, e para melhor delimitar espécies típicas como *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet e Flahault (1888), *N. calcicola*, *N. edaphicum* e *N. punctiforme* (Rajaniemi *et al.* 2005, Papaefthimiou *et al.* 2008, Hrouzek *et al.* 2013, Genuário *et al.* 2015) e outras cepas relacionadas a *N. commune* (Papaefthimiou *et al.* 2008). Segundo Komárek (2013), as cianobactérias que se encaixam na descrição de *Nostoc* sp. provavelmente incluem espécies que produzem colônias macroscópicas com morfologias distintas, como observado na espécie-tipo *Nostoc commune*. Assim, apesar de serem colocados em um clado com uma cepa identificada como *Nostoc* sp., os isolados da Amazônia claramente não pertencem a essa redefinição do gênero *Nostoc*. No entanto, essas cepas possuem características biológicas, morfológicas e moleculares suficientes para serem inequivocamente atribuídas à ordem Nostocales. Além disso, as cepas LEGE Nostocales e Cam2S01 encerradas em um clado tão distinto e bem sustentado (Fig. 7) devem merecer um estudo taxonômico mais exaustivo no futuro, uma vez que elas podem representar um novo gênero.

Nenhuma das cepas isoladas no presente estudo demonstrou possuir genes associados à produção de cianotoxinas comuns, indicando que esses isolados podem não ter o potencial de produzir microcistina, saxitoxina, anatoxina ou cilindrospermopsina. Este resultado é importante, uma vez que a água da área de estudo é destinada para fins de abastecimento de água para consumo da população. No entanto, outras cianobactérias que podem estar presentes nos locais de amostragem, mas que não puderam ser detectadas neste estudo, ainda podem representar um risco.

5 CONCLUSÃO

Este estudo forneceu novas informações sobre a biodiversidade de cianobactérias na região amazônica, especialmente para a foz do Amazonas, local com poucos estudos disponíveis sobre o tema. Este estudo pode servir de base para implantação do monitoramento de cianobactérias e para múltiplos estudos, como avaliação da qualidade da água local, estudos de biodiversidade, produção de geosmina e outros compostos na água, entre outros. Este foi o primeiro a utilizar a abordagem polifásica para estudar as cianobactérias da Amazônia Oriental, por meio de combinação de análises morfológicas, moleculares, filogenéticas, comportamento em cultura, análise de toxicidade e dados ecológicos. A maior parte dos isolados obtidos representam primeiros registros para a Amazônia Oriental, particularmente para o estado do Amapá, de forma a expandir a distribuição geográfica das espécies identificadas. Adicionalmente, os resultados forneceram material que pode contribuir para a revisão da taxonomia dos gêneros *Limnothrix* e *Pseudanabaena*. As catorze cepas isoladas representam uma pequena porção da biodiversidade de cianobactérias cultiváveis. Portanto, é importante a continuação de estudos visando a obtenção de novas linhagens de cianobactérias ou explorando a biodiversidade por meio de técnicas independentes de cultivo.

Agradecimentos

Agradecemos aos revisores anônimos pelos comentários construtivos e sugestões ao manuscrito. Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Amapá (FAPEAP) por meio do Programa PPSUS, CNPq (Bolsa: 303715/2015-4), e Projeto FCT UID/Multi/04423/2013 (CIIMAR). Agradecemos à Companhia de Águas e Esgoto do Estado do Amapá (CAESA) pela receptividade e apoio durante as amostragens. Agradecemos ainda a Jéssica Lopes e Paulo Gibson pelo auxílio em campo e laboratório, e às instituições UNIFAP- especialmente aos laboratórios de Cultivo de Algas e ao de Química, Saneamento e Modelagem de Sistemas Ambientais (LQSMSA/UNIFAP), UFPA, IEPA e CIIMAR pelo uso de suas instalações de pesquisa para conduzir as várias análises descritas neste estudo. Por fim, somos gratos ao Governo do Estado do Amapá, Exército Brasileiro e ao Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) por gerar e disponibilizar as imagens aéreas do Projeto da Base Cartográfica do Estado do Amapá para a construção do mapa.

REFERÊNCIAS

- Anagnostidis, K. & Komárek, J. (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement* 80: 327–472.
- Andreote, A. P. D., Vaz, M. G. M. V., Genuário, D. B., Barbiero, L., Rezende-Filho, A. T. & Fiore, M. F. (2014) Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *Journal of Phycology* 50: 675–684. <http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12192>
- APHA-American Public Health Association (2005) *Standard methods for the examination and wastewater*, 21th ed. APHA, Washington, DC.
- Aprile, F., Darwisch, A. J., Mera, P. A. S., Robertson, B. A., Marshall, B. G. & Siqueira, W. (2013) On the occurrence of cyanobacteria in the Madeira River in the Brazilian Amazon. *Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences* 2: 125–133.
- Bernard, C., Froscio, S., Campbell, R., Monis, P., Humpage, A. & Fabbro, L. (2011) Novel toxic effects associated with a tropical *Limnothrix/Geitlerinema*-like cyanobacterium. *Environmental Toxicology* 26: 260–270. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20552>
- Böcher, T.W. (1949) Studies on the sapropelic flora of the lake Flyndersø with special reference to the Oscillatoriaceae. Kongelige Danske Videnskabernes Selskab *Biologiske Meddelelser* 21: 1–46.
- Bravakos, P., Kotoulas, G., Skaraki, K., Pantazidou, A. & Economou-Amilli, A. (2016) A polyphasic taxonomic approach in isolated strains of cyanobacteria from thermal springs of Greece. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 98: 147–160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2016.02.009>
- Castenholz, R. W., Rippka, R., Herdman, M., Wilмотte, A., Castenholz, R. W., Rippka, R., Herdman, M. & Wilмотte, A. (2015) Form-*Leptolyngbya*. In: Whitman, W. B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B. & Dedys, S. (Eds.) *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp. 1–3. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00437>
- CPTEC/INPE (2016) *Divisão de satélites e sistemas ambientais*. Available from: <http://satelite.cptec.inpe.br/radiacao/> (accessed: 29 April 2016).
- Cunha, A. C. da & Sternberg, L. da S. L. (2018) Using stable isotopes ^{18}O and ^2H of lake water and biogeochemical analysis to identify factors affecting water quality in four estuarine Amazonian shallow lakes. *Hydrological Processes* 32: 1188–1201. <http://dx.doi.org/10.1002/hyp.11462>
- Cunha, E. D. S., da Cunha, A. C., da Silveira Junior, A. M. & Faustino, S. M. M. (2013) Phytoplankton of two rivers in the Eastern Amazon: characterization of biodiversity and new occurrences. *Acta Botanica Brasilica* 27: 364–377. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062013000200011>
- Dall'Agnol, L. T., Ghilardi-Junior, R., McCulloch, J. A., Schneider, H., Schneider, M. P. C. & Silva, A. (2012) Phylogenetic and gene trees of *Synechococcus*: choice of the right marker to evaluate the population diversity in the Tucuruí hydroelectric power station reservoir in Brazilian Amazonia. *Journal of Plankton Research* 34: 245–257. <http://dx.doi.org/10.1093/plankt/fbr109>
- Dias, F., Antunes, J. T., Ribeiro, T., Azevedo, J., Vasconcelos, V. & Leão, P. N. (2017) Cyanobacterial allelochemicals but not cyanobacterial cells markedly reduce microbial community diversity. *Frontiers in Microbiology* 8: 1495. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01495>
- Doherty, M., Yager, P. L., Moran, M. A., Coles, V. J., Fortunato, C. S., Krusche, A. V., Medeiros, P. M., Payet, J. P., Richey, J. E., Satinsky, B. M., Sawakuchi, H. O., Ward, N. D. & Crump, B. C. (2017) Bacterial biogeography across the Amazon River-ocean

- continuum. *Frontiers in Microbiology* 8: 882.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00882>
- Dvořák, P., Jahodářová, E., Hašler, P., Gusev, E. & Pouličková, A. (2015) A new tropical cyanobacterium *Pinocchia polymorpha* gen. et sp. nov. derived from the genus *Pseudanabaena*. *Fottea* 15: 113–120. <http://dx.doi.org/10.5507/fot.2015.010>
- Fiore, M. de F., Neilan, B. A., Copp, J. N., Rodrigues, J. L. M., Tsai, S. M., Lee, H. & Trevors, J. T. (2005) Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. *Water Research* 39: 5017–5026.
<http://dx.doi.org/10.1016/J.WATRES.2005.10.002>
- Fujita, Y., Takagi, H. & Hase, T. (1996) Identification of the chlB gene and the gene product essential for the light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant and Cell Physiology* 37: 313–323.
<http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a028948>
- Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. D. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuário, D. B. & Fiore, M. F. (2009) Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* 627: 195–209. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-009-9728-6>
- Gaston, K. J. (2000) Global patterns in biodiversity. *Nature* 405: 220–227.
<http://dx.doi.org/10.1038/35012228>
- Genuário, D. B., Sant'Anna, C. L. & Melo, I. S. (2018 a) Elucidating the *Cronbergia* (Cyanobacteria) dilemma with the description of *Cronbergia amazonensis* sp. nov. isolated from Solimões river (Amazonia, Brazil). *Algal Research* 29: 233–241.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.034>
- Genuário, D. B., Souza, W. R., Monteiro, R. T. R Rosin, Sant' Anna, C. L. & Melo, I. S. (2018 b) *Amazoninema* gen. nov., (Synechococcales, Pseudanabaenaceae) a novel cyanobacteria genus from Brazilian Amazonian rivers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002821>
- Genuário, D. B., Vaz, M. G. M. V. & Melo, I. S. de (2017) Phylogenetic insights into the diversity of homocytous cyanobacteria from Amazonian rivers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 116: 120–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.08.010>
- Genuário, D. B., Vieira Vaz, M. G. M., Hentschke, G. S., Sant ' Anna, C. L. & Fiore, M. F. (2015) *Halotia* gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 633–675. <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.070078-0>
- Gkelis, S., Rajaniemi, P., Vardaka, E., Moustaka-Gouni, M., Lanaras, T. & Sivonen, K. (2005) *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. *Microbial Ecology* 49: 176–182.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-003-2030-7>
- Gomont, M. (1892) Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées). Deuxième partie. - Lyngbyées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série 7* 16: 91–264.
- Gomont, M. (1899) Sur quelques Oscillariées nouvelles. *Bulletin de la Société Botanique de France* 46: 25–41.
- Goor, A.C.J. van (1918) Zur Kenntnis der Oscillatoriaceen. *Reçueil des Travaux Botaniques Néerlandais* 15: 255–262.
- Grewe, C. B. & Pulz, O. (2012) The biotechnology of cyanobacteria. In: Whitton, B. A. (Ed.) *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 707–739.
http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_26
- Hiraide, Y., Oshima, K., Fujisawa, T., Uesaka, K., Hirose, Y., Tsujimoto, R., Yamamoto, H., Okamoto, S., Nakamura, Y., Terauchi, K., Omata, T., Ihara, K., Hattori, M. & Fujita, Y. (2015) Loss of cytochrome c M stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark.

- Plant and Cell Physiology* 56: 334–345. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcu165>
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K. & Börner, T. (2003) PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. *Archives of Microbiology* 180: 402–410. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-003-0605-9>
- Hrouzek, P., Lukešová, A., Mareš, J. & Ventura, S. (2013) Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. *Fottea* 13: 201–213. <http://dx.doi.org/10.5507/fot.2013.016>
- Jacinavicius, F. R., Gama Júnior, W. A., Azevedo, M. T. de P. & Sant'Anna, C. L. (2012) *Manual para cultivo de cianobactérias*. 32 pp.
- Jungblut, A. D. & Neilan, B. A. (2006) Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 185: 107–114. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5>
- Junk, W. J., Piedade, M. T. F., Schöngart, J., Cohn-Haft, M., Adeney, J. M. & Wittmann, F. (2011) A classification of major naturally-occurring Amazonian lowland wetlands. *Wetlands* 31: 623–640. <http://dx.doi.org/10.1007/s13157-011-0190-7>
- Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C. & Chun, J. (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 64: 346–51. doi: 10.1099/ijs.0.059774-0.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005) Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B., Gärdner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 19/2. Elsevier, München, pp. 1–759.
- Komárek, J. (2013) Cyanoprokaryota. 3. Teil: Heterocytous Genera. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 19/3. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, pp. 1–1131.
- Komárek, J.; Kaštovský, J.; Mareš, J.; Johansen, J. R. (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, [s. l.], v. 86, n. 4, p. 295–335.
- Komárek, J. (2015) Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: State as of 2014. *Hydrobiologia*, [s. l.], v. 764, n. 1, p. 259–270.
- Komárek, J. (2016) A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology* 51: 346–353. <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>
- Komárek, J. (2017) Delimitation of the family Oscillatoriaceae (Cyanobacteria) according to the modern polyphasic approach (introductory review). *Brazilian Journal of Botany*. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-017-0415-y>
- Kosten, S., Huszar, V. L. M., Bécares, E., Costa, L. S., van Donk, E., Hansson, L. A., Jeppesen, E., Kruk, C., Lacerot, G., Mazzeo, N., De Meester, L., Moss, B., Lürling, M., Nöges, T., Romo, S. & Scheffer, M. (2012) Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology* 18: 118–126. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02488.x>
- Kotai, J. (1972) *Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae*. Norwegian Institute for Water Research, Blindern, Oslo, Norway.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kützing, F.T. (1843) *Phycologia generalis: oder, Anatomie, Physiologie und Systemkunde der*

- Tange, F.A. Brockhaus, Leipzig. 459 pp.
- Lamparelli, M. C., Tucci, A., Sant'anna, C. L., Pires, D. A., Lerche, L. H. M., Carvalho, M. C. & C. Rosal (2014) *Atlas de cianobactérias da bacia do Alto Tietê*. CETESB, São Paulo, pp. 1–76.
- Lauterborn, R. (1915) Die sapropelische Lebewelt. Ein Beitrag zur Biologie des Faulschlammes natürlicher Gewässer. *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg ser. 2* 13: 395–481.
- Leao, P. N., Pereira, A. R., Liu, W.-T., Ng, J., Pevzner, P. A., Dorrestein, P. C., König, G. M., Vasconcelos, V. M. & Gerwick, W. H. (2010) Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 11183–11188. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0914343107>
- Leão, P. N., Vasconcelos, M. T. S. D. & Vasconcelos, V. M. (2009) Allelopathic activity of cyanobacteria on green microalgae at low cell densities. *European Journal of Phycology* 44: 347–355. <http://dx.doi.org/10.1080/09670260802652156>
- Lima, A. R. J., Castro, W. de O., Moraes, P. H. G., Siqueira, A. S., Aguiar, D. C. F., de Lima, C. P. S., Vianez-Júnior, J. L. S. G., Nunes, M. R. T., Dall'Agnol, L. T. & Gonçalves, E. C. (2017) Draft genome sequence of *Alkalinema* sp. strain CACIAM 70d, a cyanobacterium isolated from an Amazonian freshwater environment. *Genome Announcements* 5: e00635-17. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00635-17>
- Lopes, V. R., Ramos, V., Martins, A., Sousa, M., Welker, M., Antunes, A. & Vasconcelos, V. M. (2012) Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research* 73: 7–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.005>
- Malone, C. F. da S., Rigonato, J., Laughinghouse, H. D., Schmidt, É. C., Bouzon, Z. L., Wilmotte, A., Fiore, M. F. & Sant'Anna, C. L. (2015) *Cephalothrix* gen. nov. (Cyanobacteria): towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2993–3007. <http://dx.doi.org/10.1099/ijls.0.000369>
- Meffert, M. E. (1988) *Limnothrix Meffert nov. gen.*- the unsheathed planktic cyanophycean filaments with polar and central gas vacuoles. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*: 269–276.
- Menezes, M., Bicudo, C. E. M. & Moura, C. W. N. (2015) Update of the Brazilian floristic list of algae and cyanobacteria. *Rodriguesia* 66: 1047–1062. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566408>
- Moreira, C., Ramos, V., Azevedo, J. & Vasconcelos, V. (2014) Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 8073–8082. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5951-9>
- Neilan, B. A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T. & Goodman, A. E. (1997) rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 693–697. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-3-693>
- Niiyama, Y., Tuji, A., Takemoto, K. & Ichise, S. (2016) *Pseudanabaena foetida* sp. nov. and *P. subfoetida* sp. nov. (Cyanophyta/ Cyanobacteria) producing 2-methylisoborneol from Japan. *Fottea* 16: 1–11. <http://dx.doi.org/10.5507/fot.2016.006>
- Nubel, U., Muyzer, G., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Microbiology* 133: 3327–3332.
- Papaefthimiou, D., Hrouzek, P., Mugnai, M. A., Lukesova, A., Turicchia, S., Rasmussen, U. & Ventura, S. (2008) Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 553–564. <http://dx.doi.org/10.1099/ijls.0.65312-0>

- Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. & Sivonen, K. (2005) Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 11–26. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63276-0>
- Ramos, V., Morais, J., Castelo-Branco, R., Pinheiro, Â., Martins, J., Regueiras, A., Pereira, A. L., Lopes, V. R., Frazão, B., Gomes, D., Moreira, C., Costa, M. S., Brûle, S., Faustino, S., Martins, R., Saker, M., Osswald, J., Leão, P. N. & Vasconcelos, V. M. (2018) Cyanobacterial diversity held in microbial biological resource centers as a biotechnological asset: the case study of the newly established LEGE culture collection. *Journal of Applied Phycology* 30: 1437–1451. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-017-1369-y>
- Ramos, V., Morais, J. & Vasconcelos, V. M. (2017) A curated database of cyanobacterial strains relevant for modern taxonomy and phylogenetic studies. *Scientific Data* 4: 1–8. <http://dx.doi.org/10.1038/sdata.2017.54>
- Rantala-Ylinen, A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Berg, K., Gugger, M. & Sivonen, K. (2011) Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7271–7278. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06022-11>
- Rigonato J., Alvarenga D.O. & Fiore M.F. (2017) Tropical cyanobacteria and their biotechnological applications. In: de Azevedo, J. L. & Quecine, M. C. (Eds.) *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*. Springer, Cham, pp. 139–167. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_7
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. & Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology* 111: 1–61. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Rippka, R., Waterbury, J. B. & Stanier, R. Y. (1981) Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G. (Eds.) *The prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 212–220. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_8
- Sant'Anna, C. L., Azevedo, M. T. P., Aguiaro, L. F., Carvalho, M. C., Carvalho, L. R. & Souza, R. C. R. (2006) *Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras*. Rima, Rio de Janeiro, 58 pp.
- Sant'Anna, C. L., Tucci, A., Azevedo, M.T.P., Melcher, S.S., Werner, V.R., Malone, C.F.S., Rossini, E.F., Jacinavicius, F.R., Hentschke, G.S., Osti, J.A.S., Santos, K.R.S., Gama-Júnior, W.A., Rosal C. & Adame, G. (2012) *Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras*. Instituto de Botânica, São Paulo. 175 pp.
- Satinsky, B. M., Smith, C. B., Sharma, S., Ward, N. D., Krusche, A. V., Richey, J. E., Yager, P. L., Crump, B. C. & Moran, M. A. (2017) Patterns of bacterial and archaeal gene expression through the Lower Amazon River. *Frontiers in Marine Science* 4: 1–15. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2017.00253>
- Sato, N., Katsumata, Y., Sato, K. & Tajima, N. (2014) Cellular dynamics drives the emergence of supracellular structure in the cyanobacterium, *Phormidium* sp. KS. *Life (Basel, Switzerland)* 4: 819–36. <http://dx.doi.org/10.3390/life4040819>
- Schembri, M. A., Neilan, B. A. & Saint, C. P. (2001) Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16: 413–421. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.1051>
- Schwabe, G.H. (1964) Grundprobleme der Cyanophytentaxonomie. *Gewässer und Abwässer* 36: 7–39.

- Sciuto, K., Andreoli, C., Rascio, N., La Rocca, N. & Moro, I. (2012) Polyphasic approach and typification of selected *Phormidium* strains (Cyanobacteria). *Cladistics* 28: 357–374. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.2011.00386.x>
- Sena, B. A., Costa, V. B., Nakayama, L. & Rocha, R. M. (2015) Composition of microphytoplankton of an estuarine Amazon River, Pará, Brazil. *Biota Amazonia* 5: 1–9. <https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/915>
- Silva, N. B., Lopes, J. O., Brito, J. D. M., Santos, S. K., Takiyama L. R., Montagner, A. E. A. D. & Oliveira, E. D. C. de. Water quality of areas used for buffalo farming - Lower Araguari River, Amapá, Brazil. *Biota Amazonia* 8: 22–28. <https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/3419>
- Silveira-Júnior, A. M. (2012) Composição e biomassa microfítotoplanctônica associadas a variáveis físico e químicas em dois transectos da zona estuarina do Rio Amazonas (Amapá, Amazônia, Brasil). Unifap, Macapá, 93 pp. www2.unifap.br/ppcs/files/2012/02/Dissertação_final_Csaude_Arialdo1.pdf
- Soo, R. M., Hemp, J., Parks, D. H., Fischer, W. W. & Hugenholtz, P. (2017) On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in cyanobacteria. *Science* 355: 1436–1440. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal3794>
- Suda, S., Watanabe, M. M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N., Liu, Y. & Day, J. G. (2002) Taxonomic revision of water-bloom- forming species of oscillatoroid cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1577–1595. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.01834-0>
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33: 152–155.
- Takahashi, T., Takase, K., Takeshita, K., Kawano, H., Mamizuka, M. & Kizu, H. (2016) State transition of musty-odor-producing cyanobacteria and 2-methylisoborneol in the Serikawa Dam reservoir. *Journal of Japan Society on Water Environment* 39: 51–62. <https://doi.org/10.2965/jswe.39.51>
- Tuji, A. & Niiyama, Y. (2016) The identity and phylogeny of *Pseudanabaena* strain, NIES-512, producing 2-methylisoborneol (2-MIB). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science* 42: 83–89.
- Tundisi, J. G., Goldemberg, J., Matsumura-Tundisi, T. & Saraiva, A. C. F. (2014) How many more dams in the Amazon. *Energy Policy* 74: 703–708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2014.07.013>
- Vaz, M. G. M. V., Genuário, D. B., Andreote, A. P. D., Malone, C. F. S., Sant'Anna, C. L., Barbiero, L. & Fiore, M. F. (2015) *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline-alkaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 298–308. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.070110-0>
- Vieira, J. M. D. S., Azevedo, M. T. D. P., De Oliveira Azevedo, S. M. F., Honda, R. Y. & Corrêa, B. (2005) Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 45: 901–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.008>
- Ward, N. D., Krusche, A. V., Sawakuchi, H. O., Brito, D. C., Cunha, A. C., Moura, J. M. S., da Silva, R., Yager, P. L., Keil, R. G. & Richey, J. E. (2015) The compositional evolution of dissolved and particulate organic matter along the Lower Amazon River-Óbidos to the ocean. *Marine Chemistry* 177: 244–256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marchem.2015.06.013>
- Waterbury, J. B. (2006) The Cyanobacteria—Isolation, Purification and Identification. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (Eds.) *The*

- Prokaryotes*. Springer US, New York, NY, pp. 1053–1073. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30744-3_38
- Werner, V.R., Cabezudo, M.M., Neuhaus, E.B., Caires, T.A., Sant'Anna, C.L., Azevedo, M.T.P., Malone, C., Gama Jr., W.A., Santos, K.R.S. & Menezes, M. (2015) Cyanophyceae. In: Forzza, R.C. (Ed) *Lista de espécies da flora do Brasil*. Rio de Janeiro, Brazil. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB116809> (accessed: 29 April 2016)
- Whitton, B. A. & Potts, M. (2012) Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton, B. A. (Ed.) *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–3. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_1
- Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komárek, J. & Hoffmann, L. (2006) Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology* 42: 1312–1332. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00284.x>
- Woo, P.C.Y. et al. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 14, Issue 10, 908 – 934.
- Yu, G., Zhu, M., Chen, Y., Pan, Q., Chai, W. & Li, R. (2015) Polyphasic characterization of four species of *Pseudanabaena* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) from China and insights into polyphyletic divergence within the *Pseudanabaena* genus. *Phytotaxa* 192: 1–12. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.192.1.1>
- Zhu, M., Yu, G., Li, X., Tan, W. & Li, R. (2012) Taxonomic and phylogenetic evaluation of *Limnothrix* strains (Oscillatoriales, Cyanobacteria) by adding *Limnothrix planktonica* strains isolated from central China. *Hydrobiologia* 698: 367–374. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-012-1127-8>

**4 CAPÍTULO 2: DINÂMICA DE CIANOBACTÉRIAS E PRIMEIRA
DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR EM SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE
ÁGUA PARA CONSUMO NO RIO AMAZONAS (BRASIL)**

RESUMO

As cianobactérias apresentam funções importantes como a produção primária em ambientes aquáticos, além de produzirem metabólitos secundários de grande interesse biotecnológico e industrial. Porém, são também conhecidas pelos problemas que podem ocasionar ao ambiente aquático, como as florações e produção de cianotoxinas. As florações são caracterizadas pelo aumento excessivo da densidade de cianobactérias e estes eventos estão relacionados à produção de cianotoxinas. Tais toxinas podem afetar a saúde humana pela ingestão de água, entre outras vias. As cianotoxinas mais comuns (microcistinas) são resistentes a altas temperaturas e mesmo a fervura. Registros de intoxicações humanas têm sido documentados em muitos países, incluindo o Brasil, onde já houve casos fatais. Com relação ao Rio Amazonas, existe a preocupação pelo fato deste ser utilizado para a captação de água de abastecimento da cidade de Macapá e a companhia de águas e esgoto local não realizar o monitoramento destes microrganismos. Este estudo investigou a dinâmica de cianobactérias no Rio Amazonas, por meio de um monitoramento com contagem das células de cianobactérias, cálculo de biovolume, caracterização morfológica das espécies; análise de toxinas na água e também busca por genes relacionados à produção de toxinas nas amostras ambientais. As amostragens foram realizadas mensalmente na água bruta e na água tratada da Estação de Tratamento de Água de Macapá (ETAm) durante o período de abril de 2015 a abril de 2016. O monitoramento no Rio Amazonas revelou a primeira detecção de microcistina-LR neste rio, que é considerado o maior do mundo. A densidade de cianobactérias e concentração de microcistina-LR observadas foram baixas ao longo do período de estudo. Apenas no trimestre junho a agosto de 2015 ocorreu pico de *Limnothrix planctonica* (± 1000 células. mL⁻¹) e detecção de microcistina-LR (máx 2,1 µg.L⁻¹), porém ambos parâmetros apresentaram-se em conformidade com os limites recomendados pela Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde. As análises estatísticas indicaram fortemente que linhagens de *L. planctonica* produziram a toxina microcistina-LR detectada neste estudo. Porém não foi possível confirmar essa informação, uma vez que a detecção pelos métodos químicos (ELISA e LC/MS) e moleculares (amplificação do marcador *mcyE*) ocorreu em amostras ambientais com a presença de várias espécies. Os parâmetros físico-químicos que mostraram maior associação com a produção de microcistina-LR e com o aumento da densidade de *L. planctonica* foram o aumento da transparência da água e da vazão. Tais resultados reforçam que *L. planctonica* produziu as toxinas detectadas, uma vez que esta espécie é bem adaptada às condições do Rio Amazonas e sua densidade se eleva mesmo no ápice da vazão, com o rio mais turbulento. Foram observados 10 táxons na água bruta ao longo do ano, sendo praticamente os mesmos, e todos com formato filamentoso. As cianobactérias com maior abundância no rio Amazonas foram *L. planctonica*, *Leptolyngbya* sp. e *Alkalinema pantanalense*.

Palavras-chave: abastecimento, ETAm, *Limnothrix planctonica*, *mcyE*, toxicidade.

ABSTRACT

Cyanobacteria play important roles as primary producers in aquatic environments, as well as producing secondary metabolites of great biotechnological and industrial interest. However, those microorganisms are also known for the problems they may cause to the aquatic environment, such as blooms and cyanotoxin production. The blooms are characterized by the excessive increase of the cyanobacteria density and these events are related to the production of cyanotoxins. Such toxins can affect human health through ingestion of water, among other routes. The most common cyanotoxins (microcystins) are resistant to high temperatures and even boiling. Records of human poisoning have been documented in many countries, including Brazil, where fatal cases have already occurred. Regarding the Amazon River, there is a concern because it used as the main source of drinking water for the municipality of Macapá and the local water and sewage company does not carry out the monitoring of these microorganisms. This study investigated the cyanobacteria dynamics in the Amazon River, and cyanotoxins by means of morphological identification, counting, biovolume calculation of cyanobacteria, toxin analyses in water samples and a molecular screening for genes involved in the production of cyanotoxins. The sampling was carried out monthly from April 2015 to April 2016 at the raw water intake and at the exit from the drinking water treatment plant. The water sampling monitoring revealed the first detection of microcystin-LR in the Amazon River, the world's largest river. Cyanobacteria mean density and microcystin-LR concentration were both low during the water monitoring. However, *Limnothrix planctonica* showed a density peak (± 1000 cells mL⁻¹) in the quarter June-August 2015, when Microcystin-LR (2.1 µg L⁻¹) was detected. Despite this, the treated water was in accordance with the values recommended by the Brazilian government available in Consolidation Ordinance No. 5. Statistical analyzes strongly indicate that *L. planctonica* produced the microcystin detected in this study. Nevertheless, it is not possible to confirm this information, once the detection by ELISA, LC/MS and *mcyE* occurred in environmental samples with many species. Higher transparency and high river discharge were associated with greater microcystin-LR concentrations and rising in *L. planctonica* densities. Such results reinforce the hypothesis that *L. planctonica* might have produced the toxins detected in the present study, since this species is well adapted to the Amazon River environmental conditions, showed by the higher densities of this taxa even in the high river discharge, when the water is more turbulent. Ten cyanobacteria taxa were observed on the microscopic monitoring of the raw water from the Amazon River, all of them are filamentous forms. The most abundant cyanobacteria in the Amazon River were *L. planctonica*, *Leptolyngbya* sp., and *Alkalinema pantanalense*.

Keywords: water supply, DWTP, *Limnothrix planctonica*, *mcyE*, toxicity

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são bactérias gram-negativas que possuem o pigmento clorofila-a, o qual confere a capacidade de realização de fotossíntese. Estes organismos são considerados os produtores primários mais antigos do planeta (3,5 bilhões de anos), fornecendo oxigênio e energia para os ambientes aquáticos e terrestres (SCHOPF, 1999 apud SCHOPF, 2012), e permanecem até os dias atuais, sendo de fácil adaptação. As cianobactérias apresentam também outros pigmentos, como a ficoeritrina e ficocianina, responsáveis por sua coloração verde azulada (ciano) (WHITTON; POTTS, 2012).

Possuem ampla distribuição que é decorrente do seu metabolismo versátil e de adaptações (FERNANDES et al., 2009), as quais explicam sua sobrevivência, dispersão e sucesso ecológico (VAITOMAA, 2006). Como exemplo, conseguem viver em ambientes com pouca luz e nitrogênio, têm capacidade de produzir células diferenciadas (acinetos) que funcionam como esporos de resistência em condições adversas, algumas espécies pode fixar nitrogênio atmosférico, outras podem formar vacúolos gasosos (aerótopos) que permitem migração vertical na coluna d'água, toleram variações de temperatura, podem armazenar fósforo em seu citoplasma e, por fim, podem ser tóxicas para outros organismos (WHITTON; POTTS, 2012).

Estudos apontam que as cianobactérias produzem toxinas em condições mais favoráveis ao seu crescimento (CHORUS; BARTRAM, 1999). Portanto, as cianotoxinas são comumente observadas durante as florações de cianobactérias, que consistem no aumento expressivo da biomassa destes organismos em relação às condições normais dos ecossistemas aquáticos. Nessas situações, geralmente uma ou duas espécies predominam (CHORUS; BARTRAM, 1999). As cianotoxinas podem afetar a saúde do homem, tanto pela ingestão de água como por contato em atividades de recreação no ambiente, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado (WHO, 2003; 2017).

Para prever o possível crescimento de populações de cianobactérias (indicador de risco de produção de cianotoxinas) em águas destinadas à captação para consumo humano, é recomendável o monitoramento mensal destes organismos com a contagem e identificação dos gêneros mais frequentes e que já tiveram registros de produção de cianotoxinas (CHORUS; BARTRAM, 1999). No Brasil, o Ministério da Saúde exige o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas na água fornecida pelas companhias de abastecimento de água (BRASIL, 2017). Porém, tal monitoramento não é realizado no

estado do Amapá (BRASIL, 2012). Por estes motivos, até a presente data, permanecem desconhecidos os riscos associados à presença de cianobactérias na captação de água do município de Macapá.

Tradicionalmente, a identificação e contagem de cianobactérias vem sendo realizada por microscopia óptica com auxílio de literatura especializada, com grande contribuição da série *Die Süßwasserflora von Mittel Europa- Cyanoprokaryota* do autor Jiri Komárek, grande taxonomista de cianobactérias (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1999; 2005; KOMÁREK, 2013). Tais análises de cunho morfológico são demoradas e requerem profissional especializado, uma vez que o grupo das cianobactérias é constituído por organismos de difícil identificação e muitas vezes ocorrem espécies crípticas, isto é, apresentam fenótipo (morfologia) similar; porém, são espécies diferentes (KOMÁREK, 2016).

No caso das cianobactérias existe outro agravante: algumas linhagens da mesma espécie podem ser tóxicas, enquanto outras não (CHORUS; BARTRAM, 1999). Tal característica não é detectável por morfologia, de forma que linhagens tóxicas e não tóxicas da mesma espécie são idênticas (MOREIRA et al., 2014). Uma solução para este problema é complementar a contagem de cianobactérias tradicional com métodos moleculares, os quais permitem elucidar se as espécies de interesse (encontradas em amostras ambientais ou isoladas) são potencialmente tóxicas. Os métodos moleculares consistem na busca de genes envolvidos na síntese de cianotoxinas (ex: *mcyA*, *mcyE*, *sxtI*, *anaC*, *pks*, *ps*) (HISBERGUES et al., 2003; JUNGBLUT; NEILAN, 2006; LOPES et al., 2012; RANTALA-YLINEN et al., 2011; SCHEMBRI et al., 2001). Eles permitem uma análise rápida quando comparado a outros métodos, além de fornecer um primeiro indício de que há espécies tóxicas no ambiente. Portanto, auxiliam no monitoramento de corpos d'água destinados à captação de água para consumo do homem (MOREIRA et al., 2014).

Alguns gêneros de cianobactérias considerados potenciais produtores de cianotoxinas como *Dolichospermum*, *Microcystis* e *Oscillatoria* (CHORUS; BARTRAM, 1999) foram encontrados com alta frequência de ocorrência no Rio Amazonas, na orla de Santana, município vizinho à Macapá, em estudo de biodiversidade que utilizou análises morfológicas (SILVEIRA-JÚNIOR, 2012). A presença de tais cianobactérias próximo à orla de Macapá desperta preocupação, pois a água utilizada para consumo no município de Macapá é obtida diretamente do Rio Amazonas.

A captação ocorre a 500 m de distância da margem, no centro comercial da cidade, e segue para a Estação de Tratamento de Água de Macapá (ETAm) que fica a 1000 m de distância da adutora. A rede de abastecimento atende a 40,6% da população urbana, aproximadamente 46.903 domicílios (CAESA, 2018). Além disso, estudos numéricos sugerem que potenciais plumas de poluentes originados ao longo da orla de Macapá e Santana podem alcançar, em média, ao longo de um ciclo de maré, uma distância dispersiva de aproximadamente até 800 m a frente da margem da cidade de Macapá (PINHEIRO et al., 2008), dependendo do período sazonal. Assim, é provável que o ponto de captação da ETAm, a apenas 500 m de distância da margem, possa ser atingido pela pluma de poluentes, o que representa uma ameaça à segurança da água para captação.

Alguns problemas relacionados a poluição da água tem sido relatados nesta área, especialmente de cunho microbiológico (CUNHA et al., 2004; CUNHA et al., 2005; CUNHA, 2012; DAMASCENO et al., 2015; PEREIRA et al., 2014). Um motivo de preocupação é que o crescimento das cianobactérias é favorecido em ambientes poluídos com grande quantidade de nutrientes, podendo produzir florações tóxicas. Porém, ainda que seja possível observar fontes difusas de poluição na orla de Macapá, o rio Amazonas mostra-se resiliente à perturbações naturais e antrópicas devido ao seu grande poder de diluição e capacidade de autodepuração (BRITO, 2013).

O principal objetivo deste estudo foi investigar a dinâmica de cianobactérias e a possível ocorrência de cianotoxinas na área de influência da captação de água da ETAm, além de verificar os fatores que podem induzir o aumento de densidade das cianobactérias e desencadear a produção de cianotoxinas. Para atingir tal objetivo foi realizado um monitoramento na área de captação de água do município de Macapá com a realização de análises morfológicas, ecológicas, moleculares e químicas.

A hipótese desta investigação é que as cianobactérias do Rio Amazonas (na área de estudo) apresentam densidade inferior a 10.000 células/mL, e atualmente não produzem cianotoxinas, estando de acordo com a Portaria de consolidação nº5/MS (BRASIL, 2017).

Para elucidar tais questões, os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Quantificar e identificar as cianobactérias presentes na água de captação
2. Verificar a ocorrência de cianotoxinas e de genes associados à produção de microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina

3. Monitorar parâmetros ambientais e avaliar sua influência na concentração de cianobactérias e cianotoxinas

O cumprimento de tais objetivos fornecerão informações valiosas para a tomada de decisão relacionadas aos processos de tratamento de água para consumo proveniente da área de estudo. Além disso, será possível conhecer melhor a biodiversidade e ecologia de cianobactérias do estuário do Amazonas. Essas informações são básicas e úteis para estudos ecológicos, bem como para o monitoramento da qualidade da água, ações de prevenção em estratégias de saneamento e parametrizações experimentais em estudos de modelagem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

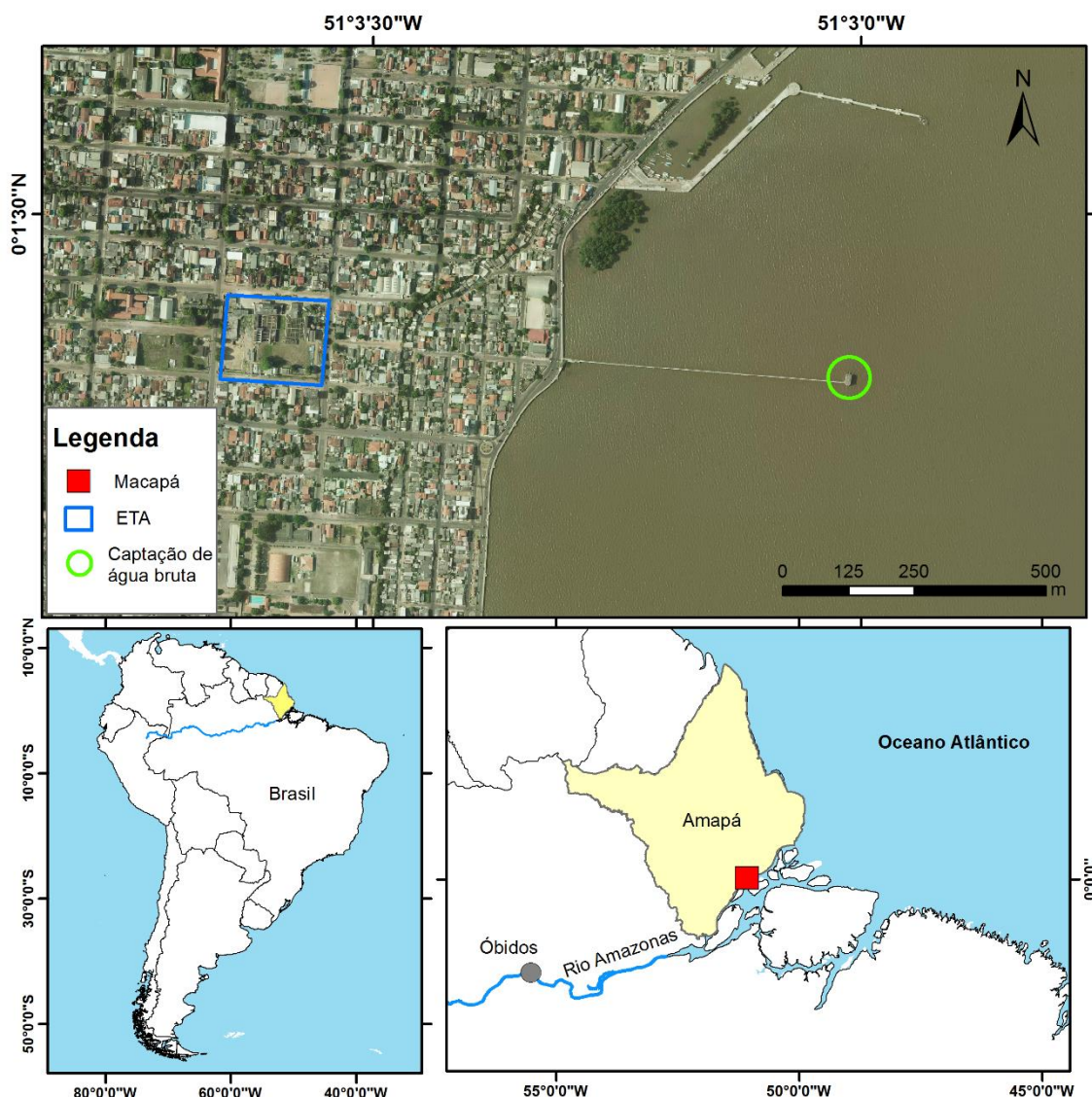
A bacia amazônica possui uma área de drenagem de 6 milhões de km², sendo considerada a maior do planeta. A vazão média anual do rio na foz é de aproximadamente 219 m³. s⁻¹, representando de 16 a 20% da vazão de água doce global para os oceanos (WARD et al., 2015). O Rio Amazonas é o maior rio do mundo e transporta uma imensa quantidade de sedimentos ricos em nutrientes desde os Andes até o Oceano Atlântico (SIOLI, 1984). A alta concentração de sólidos dissolvidos torna a água turba, com baixa transparência (20-60 cm) e com coloração barrenta, uma das características principais de classificação do Amazonas como um rio de águas brancas (JUNK et al., 2011; SIOLI, 1984).

O trecho próximo da foz do Rio Amazonas é composto pelo Canal Norte (às margens da cidade de Macapá) e pelo Canal Sul. A última estação hidrológica do Amazonas dotada de monitoramento ou séries históricas hidrometeorológicas fica localizada em Óbidos, estado do Pará, a 900 km da foz do Rio Amazonas, sendo esta uma das razões pela qual o trecho entre Óbidos e Macapá é pouco estudado. Outro motivo para a existência de poucos estudos neste trecho é a complexidade do escoamento hidrodinâmico, o qual está sujeito não somente aos efeitos hidrológicos de montante (Óbidos) quanto das marés semidiurnas influenciadas pelo Oceano Atlântico, com oscilações de sentido do escoamento e recirculações (CUNHA et al., 2012; CUNHA;

STERNBERG, 2018). Contudo, a área compreendida pelo complexo estuarino amazônico que inclui este trecho do rio representa 13% da área superficial da Bacia Amazônica (WARD et al., 2015; CUNHA et al., 2017).

O presente estudo foi realizado em Macapá, estado do Amapá, Brasil, especificamente na Companhia de Águas e Esgoto do Estado do Amapá (CAESA), no ponto de entrada de água bruta da estação de tratamento de água (ETA); e na saída do tratamento localizada também nas dependências da ETA (coordenadas 0° 1'22.72"N 51°3'35.53"W) a 1000 m do ponto de captação de água para abastecimento do município de Macapá (Fig. 1). Como pode ser observado na Figura. 1, a água é captada na orla da cidade de Macapá, no Canal Norte do rio Amazonas (coordenadas 0° 1'19.50"N 51°3'0.77"W), em frente do centro comercial. As proximidades deste trecho do Rio Amazonas recebe águas de canais poluídos (como o da rua Mendonça Júnior) e outras fontes de poluição pontuais e difusas há décadas (CUNHA et al., 2004; PINHEIRO et al., 2008), pois quase não há nenhum tipo de tratamento de esgotos (CUNHA et al., 2004).

Figura 1: Rio Amazonas na orla de Macapá-AP, centro da cidade. Em destaque estão o ponto de captação de água para abastecimento da cidade (em verde) e a estação de tratamento de água a 1000 m de distância (em azul).



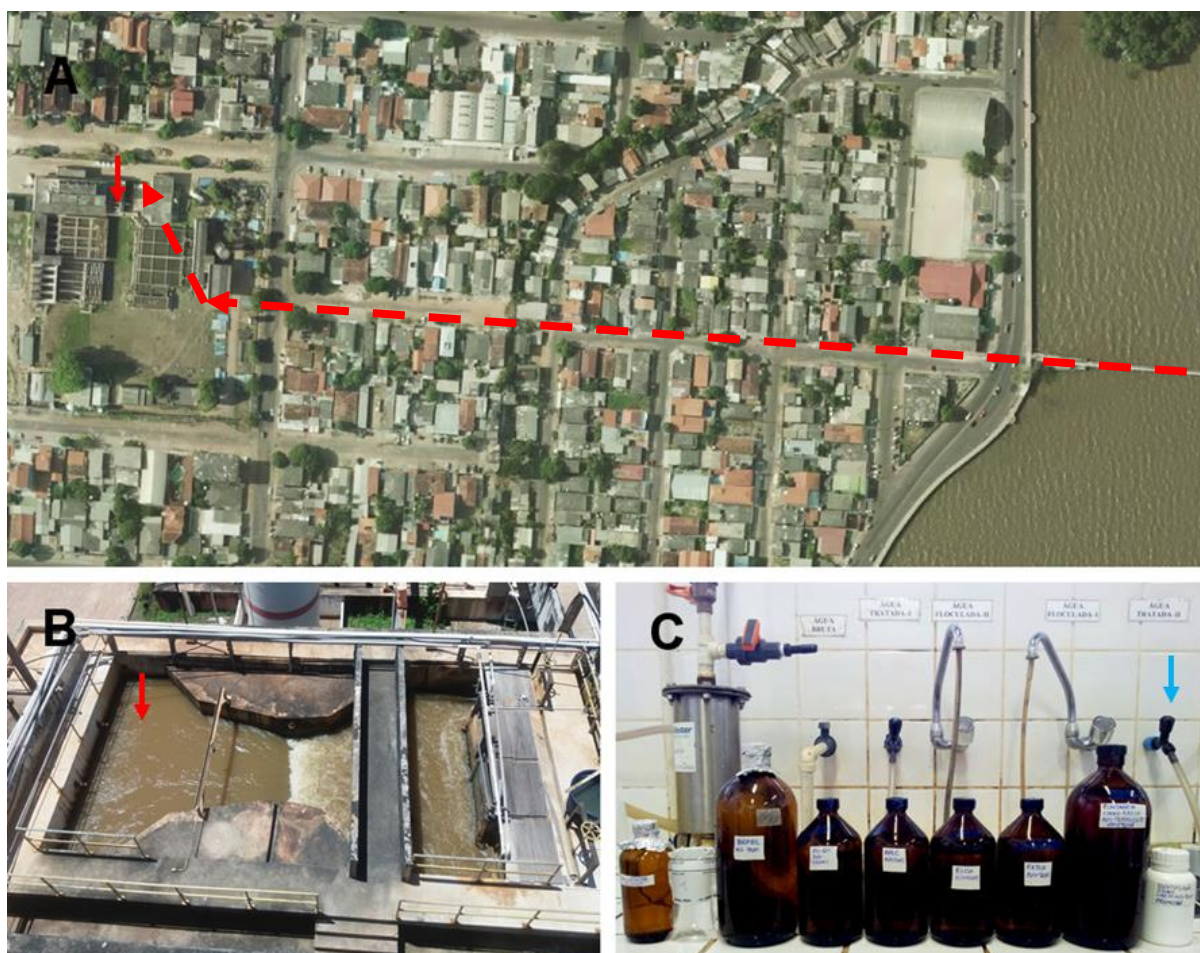
2.2 DELINEAMENTO AMOSTRAL

As amostragens foram realizadas mensalmente na estação de tratamento de água de Macapá (ETAm), conforme recomendação da portaria de consolidação nº 5/2017 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). As coletas ocorreram em dois pontos estratégicos: o primeiro antes do tratamento (logo após a água entrar na ETAm- Fig. 2B), e o segundo na saída da ETAm (Figura 2C); durante o período de abril de 2015 a abril de 2016; sempre na preamar para a padronização dos procedimentos de coleta e evitar interferências de

possíveis efeitos ambientais decorrentes das diferentes fases das marés (COSTA et al., 2004; CUNHA et al., 2004; CUNHA et al., 2017). A escolha da maré cheia possibilitou uma melhor visualização dos microrganismos nas contagens ao microscópio, pois na maré baixa o rebaixamento do nível d'água na captação da ETAm fica mais evidente, favorecendo a entrada de maior concentração de sólidos suspensos devido as suas características e proximidade com o leito do rio.

Em cada ponto amostral (Fig 2B, 2C) foram examinados parâmetros físicos, químicos e microbiológicos descritos na Tabela 1. No entanto, o foco deste capítulo é o monitoramento da água bruta do rio Amazonas destinada ao consumo humano. A exceção deste capítulo serão as análises de cianotoxinas, as quais serão discutidas também na água tratada.

Figura 2A-C: Pontos de amostragem na Estação de Tratamento de Água da CAESA. 2A Vista aérea da ETAm com seta vermelha destacando a entrada de água bruta do Rio Amazonas; 2B Ponto de coleta de água bruta-seta vermelha; 2C Ponto de coleta água tratada-seta azul.



As coletas de amostras de água do Amazonas foram realizadas na própria ETAm ao invés de ocorrerem na adutora de captação (Fig. 1—círculo verde) devido a vantagens relacionadas à logística de pesquisa e segurança da equipe. Antes do início da amostragem foram realizadas coletas piloto para comparar diferenças entre as amostras obtidas no ponto de captação no Rio Amazonas e as do ponto de entrada de água bruta (na ETA à 1000 m de distância da captação). Não foram observadas diferenças em relação a composição e abundância de espécies, e também com relação aos parâmetros ambientais (físico-químicos e hidrometeorológicos). Ainda, a estrutura oferecida pela ETAm permitiu a coleta quase simultânea de parâmetros antes e após o tratamento, além de fornecer mais segurança, uma vez que a passarela da adutora está a uma altura considerável sob o rio Amazonas e apresenta várias falhas e buracos, que poderiam levar a perdas de equipamentos ou queda de pesquisadores no rio.

É importante frisar que existe projeto de monitoramento mensal realizado pelo Laboratório de Análise de Águas (LANA) do IEPA sob responsabilidade do Dr. Luis Takiyama desde janeiro de 2013. As coletas do referido projeto são realizadas na adutora e são analisados parâmetros físicos e químicos da água, além de coleta de plâncton. Este último, não foi avaliado desde o início do projeto devido a ausência de profissionais da área na equipe (BRITO, 2014- comum. pessoal). Contudo, a autora teve acesso às informações prévias de amostras coletadas no rio, ratificando a decisão de realizar a amostragem apenas na ETAm.

2.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA E ANÁLISE

2.3.1 Fatores ambientais

Foram efetuadas medidas de parâmetros físicos e químicos (temperatura da água, pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos) *in situ* com os equipamentos descritos na Tabela 1 (Fig. 3A). A transparência da água também foi verificada em campo pelo disco de Secchi (Fig. 3B). Além das análises em campo, foram coletadas amostras de água de 500 mL em frascos estéreis de vidro para cada um dos parâmetros estudados: químicos (NH_3 , NO_3 , PO_4^{3-} , SO_4 , Cl^-) e metais (Al^{+3} , Fe), turbidez, coliformes totais e *E. coli* (com saco estéril comercial), toxinas para as análises em LC-

MS, ELISA, e biologia molecular (Tabela 1). As amostras foram preservadas sob refrigeração para análise em laboratório.

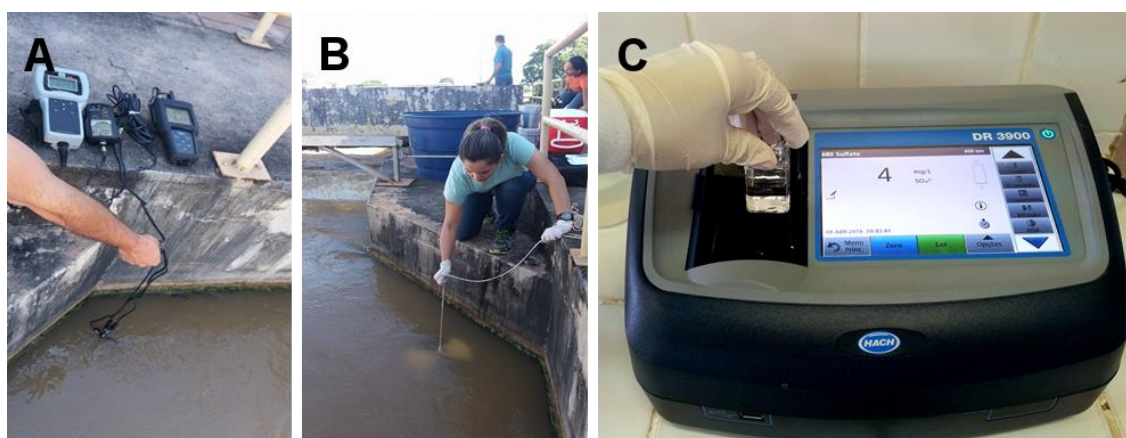
Tabela 1: Parâmetros monitorados no Rio Amazonas, unidades de medida, e métodos e equipamentos de análise.

	Parametros	Unidade	Método/ Equipamento
Químicos	pH	pH	pHmetro portátil - OrionStar A121 Thermoscientific
	Oxigênio Dissolvido	mg L ⁻¹	YSI 550 A sonda de OD
	Microcistina- LR	µg L ⁻¹	ELISA, biologia molecular, LC-ESI-MS/MS
	Nitrato	mg L ⁻¹	Reduction Cadmium/ Espectrofotômetro
	Amônia	mg L ⁻¹	Nessler/ Espectrofotômetro
	Ortofosfato	mg L ⁻¹	Phosver3/ Espectrofotômetro
	Cloreto	mg L ⁻¹	Mercuric Thiocyanate/ Espectrofotômetro
	Sulfato	mg L ⁻¹	Method Sulfaver/ Espectrofotômetro
	Alumínio	mg L ⁻¹	Aluver/ Espectrofotômetro
	Ferro	mg L ⁻¹	Ferover/ Espectrofotômetro
Físicos	Transparência	cm	Disco de Secchi
	Zona Eufótica	cm	Disco de Secchi x 3.0
	Turbidez	NTU	Turbidímetro AP2000 Policontrol
	Sólidos Total Dissolvidos	ppm	Sonda portátil CE, TDS e temperatura HI8730 Hanna
	Condutividade Elétrica	µS cm ⁻¹	Sonda portátil CE, TDS e temperatura HI8730 Hanna
	Temperatura da água	°C	pHmetro portátil - OrionStar A121 Thermoscientific
	Temperatura mín do ar	°C	INPE
	Temperatura máx do ar	°C	INPE
	Insolação	h	INPE
	Irradiação	W m ⁻²	INPE
	Precipitação diária	mm	Estação metereológica/ INMET
	Precipitação mensal	mm	Estação metereológica/ INMET
	Preamar	m	Tábua de maré/ Marinha do Brasil
	Vazão	m ³ s ⁻¹	Hidroweb ANA
Microbiol.	Coliformes Totais	TC/100 mL	Substrato cromogênico Colilert
	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> /100 mL	Substrato cromogênico Colilert
	Cianobactérias	Cels/mL	Sedimentação em câmaras de Utermöhl

A quantificação de químicos e metais foi realizada pelo método espectrofotométrico (Figura 3C) usando um espectrofotômetro DR 3900 Hach (Colorado, EUA) e a turbidez com o turbidímetro AP2000 Policontrol seguindo as recomendações de APHA (2005) nos laboratórios de Química, Saneamento e Modelagem de Sistemas Ambientais (LQSMSA/UNIFAP) e da CAESA. Parâmetros como radiação solar incidente e insolação foram obtidos das bases de dados do Instituto Nacional de Pesquisas

Espaciais (CPTEC/INPE, 2016), enquanto que os dados de precipitação e temperatura do ar para Macapá foram disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (BDMEP/INMET, 2016). Os dados de vazão foram obtidos do banco de dados online HIDROWEB da Agência Nacional de Águas (ANA/2016). A quantificação de coliformes totais e termotolerantes foi realizada pelo método do Substrato Cromogênico Definido com o kit comercial Colilert[®] conforme recomendações do fabricante.

Figura 3: Análise de parâmetros físicos e químicos do Rio Amazonas A) Medição dos parâmetros físicos e químicos *in situ*, B) medidas de transparência com disco de secchi C) análise espectrofotométrica em laboratório.



Os dados das variáveis ambientais foram utilizados em análise multivariada (Análise de Correspondência Canônica - CCA) para buscar associações com a concentração de cianobactérias e cianotoxinas.

2.3.2 Contagem e identificação de cianobactérias

Para a análise quantitativa de cianobactérias foram coletados 1000 mL de amostra da água bruta, posteriormente fixadas com solução de Lugol (7 mL para 1 L) e armazenadas em frascos de vidro âmbar (Figura 4) (APHA, 2005). O processo de contagem foi realizado pelo método de sedimentação em câmaras de Utermöhl de 5 mL, pois este foi o maior volume em que foi possível enxergar os organismos devido a presença de muitos sólidos na água do Rio Amazonas. Após o preparo das câmaras de Utermöhl, as mesmas foram armazenadas em recipientes fechados úmidos longe de

qualquer trepidação para que a sedimentação ocorresse de forma homogênea e sem risco de formação de bolhas de ar (devido a evaporação). O tempo de sedimentação foi de ≈ 24 h, sendo superior ao tempo mínimo recomendado de 1 hora de sedimentação para cada milímetro de coluna (APHA, 2005). Todo o procedimento de análise foi realizado em microscópio invertido Axiovert A1 (Zeiss, Alemanha) com o sistema de imagem Zen Lite 2012 com aumento de 400x nas dependências do Laboratório de Química, Saneamento e Modelagem de Sistemas Ambientais da UNIFAP (LQSMSA).

Como não foi possível aumentar o volume da amostra, a contagem consistiu em analisar toda área da base da câmara de 5 mL (2,5 cm de diâmetro), identificando as espécies de cianobactérias e contando todas as células de indivíduos, colônias e filamentos deste grupo. Para obter a densidade de células por mililitro (cels. mL⁻¹), foi utilizada a equação (1), descrita na seção 10200–Técnicas de contagem do fitoplâncton do Standard Methods (APHA, 2005):

$$\text{cels/mL} = C \cdot A_t / A_c \cdot V \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, C = número de células contadas

A_t = Área total da base da câmara de Utermöhl utilizada (4,9 cm²)

A_c = Área contada (4,9 cm²)

V = Volume da câmara de Utermöhl (5 mL)

O cálculo final da densidade foi simplificado, uma vez que a área contada foi igual a área da câmara (4,9/4,9=1). Desta forma, para obtenção do número de células de cianobactérias por mililitro bastou multiplicar o número de células contadas por 0,2 (1/5= 1 dividido pelo volume 5 mL= 0,2). Este valor é definido como fator de concentração pela norma técnica Cetesb L5303 (CETESB, 2012), e representa simplificada o mesmo cálculo recomendado por APHA (2005).

Figura 4: Coleta de água para quantificação de cianobactérias na ETAm, água bruta.



A identificação das cianobactérias pela análise quantitativa foi realizada com auxílio do microscópio invertido Axiovert A1 (Zeiss, Alemanha) e da seguinte bibliografia: Bicudo & Menezes (2006); Lamparelli *et al.* (2014); Komárek & Anagnostidis (1999); Komárek & Anagnostidis (2005); Komárek (2013) e Sant' Anna *et al.* (2006; 2012). As espécies mais frequentes e abundantes foram isoladas e sua identificação confirmada por métodos polifásicos (OLIVEIRA *et al.*, 2019), o que facilitou a identificação das cianobactérias encontradas no monitoramento quantitativo.

As espécies consideradas abundantes foram aquelas cujo percentual (abundância) foi superior à abundância média das demais espécies, isto é, ao número total de indivíduos dividido pelo número de espécies. Foram consideradas dominantes as espécies cujos indivíduos constituíram >50% em relação ao número total de indivíduos da amostra (LOBO; LEIGTON, 1986).

2.3.3 Biovolume

O biovolume celular médio foi estimado a partir das medidas de células de cianobactérias, as quais apresentam formas geométricas conhecidas (cilindro, esfera, entre outras). Para obtenção do biovolume, foram efetuadas medições de comprimento e diâmetro nas células de pelo menos 30 indivíduos de cada espécie em cada amostra mensal (APHA, 2005). Esse valor nem sempre foi alcançado, pois algumas espécies

tiveram baixa frequência de ocorrência. Nestes casos, o cálculo foi realizado com dados do total de observações. A partir do valor médio de comprimento e diâmetro mensal, foram efetuados os cálculos de biovolume celular médio (μm^3) conforme a forma geométrica de cada espécie (HILLEBRAND et al., 1999; SUN; LIU, 2003). Os valores de volume celular médio foram multiplicados pela densidade (cels.mL^{-1}) para obtenção do biovolume total ($\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$) (HILLEBRAND et al., 1999; SUN; LIU, 2003), que foi dividido por 10^{-6} para conversão em $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$. Além disso, foi realizado também o cálculo da superfície celular (área).

As equações para o cálculo de biovolume e da área da superfície celular estão descritas abaixo (Equações 2a-b e 3a-b):

Cilindro:

$$V = \pi/4. d^2. H \quad (\text{Equação 2a})$$

$$A = \pi. d. (d/2+h) \quad (\text{Equação 2b})$$

Esfera:

$$V = \pi/6. d^3 \quad (\text{Equação 3a})$$

$$A = \pi. d^2 \quad (\text{Equação 3b})$$

Onde, V = Volume

A = Área

$\pi = 3,14$

d = diâmetro celular, largura (μm)

h = comprimento celular (μm)

2.3.4 Detecção de cianotoxinas

Para avaliar a presença de toxinas na água, foram coletados mensalmente 500 mL de água bruta e de água tratada para cada um dos métodos de análise (ELISA, *screening molecular* e LC-MS). Cada amostra foi filtrada em filtros GF/F, gerando duas subamostras: fração dissolvida (filtrado) e fração celular (filtro). Ambas foram armazenadas em freezer para posterior análise (MERILUOTO; CODD, 2005). A separação em duas frações visou quantificar as cianotoxinas intracelulares e

extracelulares. Este método foi aplicado em todas as amostras destinadas à análise de cianotoxinas.

Foram realizados três tipos de exames para detecção de cianotoxinas, sendo o primeiro pelo método de ELISA. Posteriormente, os filtros foram analisados em busca de marcadores moleculares associados à produção de cianotoxinas. Finalmente, as amostras positivas foram avaliadas por espectrometria de massa por cromatografia líquida (LC/MS). Desta forma, foi possível confirmar os resultados e evitar falsos positivos.

2.3.4.1 Quantificação pelo método de ELISA

As amostras destinadas à análise pelo método de ELISA foram analisadas em triplicatas. Para a extração das toxinas da fração celular (Fig. 5), os filtros foram macerados em um cadinho com 10mL de água destilada. Em seguida, o material foi transferido para um tubo Falcon e alocado em freezer -80°C . Após isso, a amostra foi congelada e descongelada 3 vezes com o intuito de promover a quebra celular. Terminado esse processo, a amostra foi analisada ao microscópio para confirmar se houve rompimento celular (CHORUS; BARTRAM, 1999). Logo após, o material foi centrifugado a 4.000 RPM por 20 minutos e o sobrenadante foi armazenado em eppendorf (1,5mL) e congelado até o momento da análise pelos kits de Elisa.

Figura 5: Detecção de cianotoxinas pelo método de ELISA em placas.



Para as análises de toxinas por ELISA foram utilizados os kits de microcistina e saxitoxina em placa da marca Beacon ®. O de microcistina permite detectar a partir de 0,1 ppb de microcistina-LR (que é utilizada como calibrador), apesar de não diferenciar entre MC-LR e outras variantes. Ele apenas detecta a presença de microcistina em graus

diferentes, sendo a reatividade cruzada: MC-LR (100%), -RR (73%), -YR (58%), -LA (2%), -LF (3%), -LW (4%), e nodularina (126%). Já o kit de saxitoxina detecta concentrações tão baixas quanto 0,02 ppb. A execução dos testes ocorreu no Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN/AP), no Laboratório de Virologia com leitora de ELISA e lavadora de placas. Após o término do ensaio, os resultados das absorvâncias foram plotados em planilha eletrônica fornecida pelo fabricante que mostra as concentrações de toxinas. Ambos os kits foram calibrados e obtiveram $R^2 \geq 0,98$ em relação à curva de calibração.

4.3.4.2 Detecção de genes associados à produção de cianotoxinas em amostras ambientais

O DNA genômico foi extraído de cada filtro oriundo das amostras de água bruta e tratada com o kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen) utilizando o protocolo de lise de bactérias gram-negativas conforme recomendações do fabricante. A amplificação do DNA (PCR) foi realizada utilizando o gene RNAr 16S para detecção de cianobactérias, e também foi realizada uma busca molecular por genes envolvidos na produção de cianotoxinas (microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina).

Todas as reações foram feitas em volume final de 20 μ L, composto de: 5x Green GoTaq® Flexi Buffer, 25 mM de $MgCl_2$, 10 pmol de cada *primer forward* e *reverse* (Tabela 2), 10 mM de mix dNTP, Albumina Bovina (BSA) e 0,5 U de GoTaq® DNA polimerase. As reações de PCR foram executadas no termociclador Biometra T professional gradient (Biometra, Göttingen, Alemanha). *Primers* e controle positivos estão descritos na Tabela 2. As condições da PCR utilizadas para o gene RNAr 16S e genes associados à produção de cianotoxinas serão descritas a seguir:

RNAr 16S: 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos, cada um consistindo de uma desnaturação de 1 min a 95°C, anelamento por 45s a 55°C, e extensão de 1 min a 72°C. A extensão final foi de 5min a 72°C.

***mcyA*:** a desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 2 min, seguida por 35 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 1 min 30s, anelamento a 56°C por 30s, e extensão a 72°C por 50s. A extensão final deu-se a 72°C por 7 min, seguida de resfriamento a 8°C.

***mcyE*:** para a amplificação do *mcyE*, o primeiro passo foi a 92°C por 2 min, seguido por 35 ciclos consistindo de 92°C por 20s, 52°C por 30s e 72°C por 1 min. A fase final ocorreu a 72°C por 5 min, seguida de resfriamento a 8°C. A cepa *Microcystis*

aeruginosa LEGE 91339 foi utilizada como controle positivo para a amplificação dos genes *mcyA* e *mcyE*.

sxtI: Para a amplificação do gene *sxtI*, o primeiro passo foi a 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos consistindo de 94°C durante 10s, 60°C durante 20s e 72°C durante 1 min. A extensão final deu-se a 72°C por 7 min, seguida de resfriamento a 8°C. Utilizou-se a cepa *Aphanizomenon gracile* LMECYA 040 como controle positivo para a amplificação do gene *sxtI*.

anaC: Para a amplificação do gene *anaC*, o primeiro passo foi a 94°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos consistindo em 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s e 72°C durante 30s. A fase final ocorreu a 72°C por 5 min, seguida de resfriamento a 8°C. A cepa *Anabaena* sp. LEGE X-002 foi usada como controle positivo para a amplificação do gene *anaC*.

Ps e pks: Por fim, a primeira fase de amplificação dos genes *PS* e *PKS* ocorreu em 95°C por 2 min, seguida por 35 ciclos consistindo de 95°C por 1min 30s, 55°C por 30s e 72°C por 50s. Ademais, uma fase de 7 min a 72°C e o resfriamento a 8°C. O DNA genômico extraído de *Cylindrospermopsis raciborskii* LEGE 97047 foi utilizado como controle positivo para esta amplificação.

Tabela 2: *Primers* utilizados para detectar cianobactérias e grupos de genes das cianotoxinas microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina.

Gene	Primer	Sequência Primer 5'- 3'	Tamanho(pb)	Referência
16S	CYA106F/	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	675	Nübel et al. (1997)
	CYA781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT		
16S	CYA359F/	GGGGAATYTTCCGCAATGGG	1135	Nübel et al. (1997)
	1494R	TACGGCTACCTTGTTACGAC		Neilan et al. (1997)
mcyA	CD1F/ CD1R	AAAATTAAAAGCCGTATCAAA	297	Hisbergues et al. (2003)
		AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT		
mcyE	HEPF/ HEPR	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC	472	Jungblut; Neilan (2006)
		AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT		
sxtI	SXTI 682F/	GGATCTCAAGAAGATGGCA	100	Lopes et al. (2012)
	SXTI 877R	GCCAAACGCAGTACCACTT		
anaC	anaCF/ anaCR	TCTGGTATTCAAGTCCCCTCTAT	366	Rantala-Ylinen et al. (2011)
		CCCAATAGCCTGTCATCAA		

pks*	M4/M5	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA	535/540	Schembri et al. (2001)
		AATCCTTACGGGATCCGGTGC		
ps*	M13/M14	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC	511/534	Schembri et al. (2001)
		GATGGAACATCGCTCACTGGTG		

* PKS e PS são genes diretamente associados com a habilidade de produzir cilindrospermopsina (SCHEMBRI et al., 2001).

Os produtos das amplificações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe. Os resultados positivos para os fragmentos de genes envolvidos na produção de cianotoxinas foram purificados com o kit Gel NucleoSpin® e PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) e sequenciados bidirecionalmente por sequenciamento de Sanger pela companhia GATC Biotech (Alemanha). As sequências foram alinhadas com o *software* Geneious 8.1 e foram comparadas com sequências depositadas na base de dados GenBank utilizando o BLASTx (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local) para confirmar a identificação da toxina. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank do NCBI sob os números de acesso MG914077-MG914079.

2.3.4.3 Quantificação por LC-MS/MS

As amostras com resultados positivos para toxinas no ELISA e no *screening* molecular, foram analisadas por cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS). Antes das análises, houve um pré-processamento das amostras. No caso das frações dissolvidas (filtrado) foram utilizados cartuchos C18 de extração em fase sólida (SPE) (Tabela 3) com metanol (MEREL et al., 2013). Em seguida, o material adsorvido no cartucho foi eluído com 10 mL de MeOH 100% e submetido à evaporação à temperatura ambiente. O material foi então ressuspensão com 1 mL de MeOH 50% para as análises.

Tabela 3: Procedimento de extração em fase sólida (*SPE-Solid Phase Extraction*) em cartuchos C18 para análise em LC-MS.

Passos	Solvente	SPE 1 Volume (mL)
Acondicionamento	MeOH 100%	20
Acondicionamento	H ₂ O	20
Aplicação da amostra	Amostra- água	500
Lavagem	MeOH 20%	20
Eluição	MeOH 100%	10

As frações celulares foram sonicadas em MeOH 50% (5 vezes, 60s, 60Hz) em gelo para extração das toxinas intracelulares. Após isso, foram congeladas e descongeladas três vezes verificando-se a lise celular por microscopia. Por fim, foram centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para análise. As amostras oriundas de frações dissolvidas e celulares foram liofilizadas. O sólido obtido ao final deste processo foi diluído em MeOH 50% para evitar efeitos de matriz.

O sistema de LC-MS utilizado para quantificar microcistina-LR foi um cromatógrafo a líquido modelo Finnigan Surveyor (Thermo Scientific, San Jose, EUA) acoplado com um espectrômetro de massas do tipo ion-trap (armadilha de íons) modelo LCQ Fleet, com ionização por *electrospray* – ESI, equipado com bomba Surveyor LC, com amostrador automático (Surveyor- Autosampler) e um detector de fotodiodos (PDA-Surveyor). O programa Xcalibur™ versão 2 (Thermo Scientific, San Jose, EUA) foi utilizado para aquisição de dados e processamento. O espectrômetro de massas foi operado em modo *Full scan*. A voltagem do capilar e das lentes do tubo foram mantidas em 22 e 120kV, respectivamente e a voltagem utilizada foi 5,5 kV. Nitrogênio foi utilizado como gás de bainha e como gás auxiliar, e o hélio como gás de colisão na armadilha de íons a uma pressão de 3 bar. O fluxo de gás de bainha foi 80 (unidade arbitrária) e a do gás auxiliar foi 10. A temperatura capilar foi mantida em 350 °C.

A separação foi obtida em coluna C₁₈ Hypersil Gold (100 × 4.6 mm I.D., 5 µm, Thermo Scientific, Waltham, EUA) mantida em 25 °C, com um fluxo de 0,7 mL/min. O volume injetado foi 10 µL em modo parcial. Foi utilizado *Full scan* (270-2000 m/z) em modo positivo. Os padrões e amostras foram injetados em duplicatas, e a cada 6 amostras foi introduzido um branco e dois padrões com concentrações diferentes. A solução padrão de MC-LR foi adquirida a partir da DHI LAB Products (Hørsholm, Dinamarca, lote nº MCLR-110), com uma concentração de 11,026 µg/mL. O sistema foi calibrado utilizando 7 diluições da solução padrão de MC-LR (entre 8,5 e 180 µg/L) diluída em 50% acetonitrila (ACN). A eluição foi gradiente e com os eluentes A) Acetonitrilo e B) água ultrapura, ambos acidificados com 0,1% ácido fórmico (55 % A e 45 % B durante 0 min, 90 % A e 10 % B durante 12 min, 100 % A durante 12,5 min, 100 % A durante 15 min, 45 % A e 55 % B durante 15,01 e 25 min). Nessas condições, o tempo de retenção de MC-LR foi 10,16 min e o LOD e LOQ foram 5,7 µg/L e 8,5 µg/L, respectivamente. A transição usada para a quantificação foi 995 > 599 (m/z), com uma energia de colisão de

35eV. O íon precursor (m/z 995) e os respectivos fragmentos m/z de 375, 553, 599, 866 e 977 foram monitorados no modo MS/MS, para validar a presença da toxina.

A análise molecular de busca por genes associados a produção de cianotoxinas e a análise de LC-MS foram realizadas no Laboratório Blue Biotechnology (BBE) do CIIMAR, Matosinhos, Portugal.

2.3.5 Análises estatísticas

2.3.5.1 Influência dos fatores ambientais na concentração de cianobactérias e cianotoxinas

A análise de correspondência canônica (CCA) foi utilizada para inferir sobre a influência dos fatores ambientais na abundância de cianobactérias. Este método é ideal para revelar as relações entre os táxons e as variáveis físico-químicas do ambiente, sendo bastante aplicado na análise de abundância de organismos aquáticos, as quais usualmente são funções unimodais das variáveis ambientais (ter BRAAK; VERDONSCHOT, 1995).

A CCA deve ser utilizada quando o conjunto de dados y (espécies, abundâncias) é explicado pelo conjunto de dados x (fatores ambientais) (LEGENDRE; LEGENDRE, 2012). Para sua aplicação recomenda-se que pelo menos dois dos critérios abaixo sejam preenchidos: 1) relações unimodais; 2) dados apresentam valores positivos, apesar de conter muitos zeros; 3) os dados são de composição, no sentido de que valores relativos são relevantes para o problema (ter BRAAK; VENDONSCHOT, 1995). Todas as premissas foram atendidas, exceto a distribuição das espécies *Leptolyngbya* sp. (bimodal) sp. e *Pseudanabaena* sp. (trimodal).

Para realizar a análise de correspondência canônica foram utilizados dados de abundância relativa de cianobactérias conforme recomendação de ter Braak & Verdonschot (1995). Espécies com densidade $\leq 10\%$ da densidade total ou com frequência de ocorrência $< 20\%$ foram excluídas da análise. Primeiramente, foi feita transformação de $\ln(x+1)$ nos dados biológicos e ambientais. Em seguida, foi realizada a seleção das variáveis físicas e químicas utilizadas na CCA por meio de “*forward selection*” na função *ordistep* do pacote *vegan*, *software* R 3.4.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017). Foram aplicados testes de permutação (*anova.cca*, função R) para testar a significância

do modelo, dos eixos e das variáveis ambientais selecionadas. Além disso, foi calculado o fator de inflação (VIF), sendo eliminadas as variáveis com $VIF \geq 15$, considerando que $VIF \geq 10$ ou 20 indicam variáveis multicolineares (OKSANEN, 2012). Tal seleção visou remover variáveis explanatórias irrelevantes da análise, fatores altamente correlacionados e aqueles com menor variação (ver BRAAK; VERDONSCHOT, 1995). Após a triagem, a CCA foi realizada no *software* Past 3.19. Ademais, foi efetuada uma análise de correlação de Spearman com todas as variáveis do estudo (matriz cheia) como o objetivo de identificar quais fatores estão associados aos que foram selecionados na CCA para uma melhor interpretação dos resultados desta última. Para as análises de CCA e de correlação, foram utilizados os dados do monitoramento de maio de 2015 a abril de 2016, uma vez que alguns parâmetros ambientais não foram coletados na primeira amostragem (abril 2015), a qual foi propositadamente desconsiderada.

Além das análises de CCA, foi realizado no *software* Past 3.19 o cálculo do índice de diversidade de Shannon–Wiener (H') para todas as amostras, assim como o da uniformidade de Pielou (J), e do estimador de riqueza Chao 2. Este último foi utilizado para estimar a quantidade de espécies e indicar se a amostragem foi satisfatória.

3 RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS AMBIENTAIS

A caracterização da água bruta e tratada do rio Amazonas durante o monitoramento de um ano estão na Tabela 4. Durante o período do estudo, o pH do rio esteve próximo ao neutro ($6,6 \pm 0,28$); a média de oxigênio dissolvido foi de $6 \pm 0,7$ mg. L⁻¹; a transparência variou entre 12 e 36,5 cm, sendo menor de janeiro a abril; enquanto que a turbidez (média anual $55,5 \pm 41$ NTU) foi maior também de janeiro a abril (média 107,7 NTU), isto é, pouco tempo após o início das chuvas na região (VILHENA et al., 2018).

A condutividade elétrica não diferiu significativamente ao longo do ano ($50,4 \pm 7,81 \mu S\ cm^{-1}$), como ocorreu com o TDS ($24,3 \pm 4,41$ ppm), enquanto a insolação e irradiação variaram de 1,3 a 10,6 h ($7,7 \pm 3,4$ h) e de 86,6 a 312,3 W m⁻² ($241,9 \pm 75,6$ W

m²), respectivamente (Tabela 4). A temperatura da água variou de 25 a 30,3 (28,8 ±1,7 °C) e o nível da água na preamar de 2,9 m a 3,4 m (média 3,1 ± 0,2 m), sendo estável durante o ano.

Com relação à precipitação, não houve chuvas de setembro a novembro de 2015, e ocorreu uma precipitação muito baixa em dezembro (26,6 mm). Os maiores valores de precipitação ocorreram de fevereiro a abril de 2016 (média 498,73 mm) e maio de 2015 (375,9 mm). Coliformes totais e *E. coli* apresentaram grandes variações durante o ano (Tabela 4). Quanto às cianobactérias, a densidade média foi de 2,1 x 10² cels. mL⁻¹, com pico de densidade em julho (1,09 x 10³ cels. mL⁻¹). A maior concentração de microcistina-LR também foi observada em julho de 2015 (2,1 µg L⁻¹), na água bruta. A água tratada estava em conformidade com os valores recomendados pelo governo brasileiro disponíveis na Portaria de Consolidação nº 5 (BRASIL, 2017).

Tabela 4 Valores de média, desvio padrão, mínimo e máximo para os parâmetros monitorados na água bruta e tratada do Rio Amazonas.

* DP: Desvio padrão; VMP: Valor Máximo Permitido

Parâmetro	Água Bruta		Água tratada		Padrão água tratada Portaria nº5/MS/2017
	Média ± DP	Mín-máx	Média ± DP	Mín-máx	
pH	6,6 ± 0,28	6-7,2	6,0 ± 0,3	5,44-6,7	Em conformidade
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	6,0 ± 0,71	4,86-6,8	4,2 ± 0,2	3,85-4,5	-
Microcistina- LR (µg L ⁻¹)	0,4 ± 0,69	0-2,11	0,01 ± 0,03	0-0,1	Em conformidade
Nitrato (mg L ⁻¹)	0,4 ± 0,83	0-2,5	0,9 ± 1,3	0,02-4,5	Em conformidade
Amônia (mg L ⁻¹)	0,7 ± 0,54	0,05-1,67	0,1 ± 0,05	0-0,2	Em conformidade
Ortofosfato (mg L ⁻¹)	0,3 ± 0,44	0,02-1,66	0,13 ± 0,09	0,05-0,4	-
Cloreto (mg L ⁻¹)	8,7 ± 9,17	1,6-25,8	3,8 ± 1,7	1,8-6,8	Em conformidade
Sulfato (mg L ⁻¹)	1,8 ± 1,48	0-4	14 ± 3,6	9,0 - 21,0	Em conformidade
Alumínio (mg L ⁻¹)	0,1 ± 0,07	0,03-0,31	0,11 ± 0,06	0,006 - 0,2	Em conformidade
Ferro (mg L ⁻¹)	2,2 ± 1,26	0,89-5,46	0,7 ± 1,1	0,07- 3,9	*Acima do VMP 0,3
Transparência (cm)	25,3 ± 9,6	12-36,5	-	-	-
Zona eufótica (cm)	75,9 ± 28,9	36-109,5	-	-	-
Turbidez (NTU)	55,5 ± 41	19,8-122	9,8 ± 13,5	1,41 – 48,9	*Acima do VMP 5,0
Sólidos Totais Dissolvidos (mg L ⁻¹)	24,3 ± 4,41	20-30	31,2 ± 8,2	20-40	Em conformidade
Condutividade Elétrica (µS cm ⁻¹)	50,4 ± 7,81	40-60	68,2 ± 10,7	50- 80	-
Temperatura da água (°C)	28,8 ± 1,7	25-30,3	28,9 ± 1,7	24,4- 30,7	-
Temperatura mínima do ar (°C)	24,3 ± 0,8	22,7-25,7	24,3 ± 0,8	22,7- 25,7	-
Temperatura máxima do ar (°C)	33,2 ± 2	28,9-35,3	33,2 ± 2	28,9- 35,3	-
Insolação (h)	7,7 ± 3,4	1,3-10,6	7,7 ± 3,4	1,3- 10,6	-
Irradiação (W m ⁻²)	241,9 ± 75,6	86,6-312,3	241,9 ± 75,6	86,6- 312,3	-
Precipitação diária (mm)	5,3 ± 7,6	0-22,4	5,3 ± 7,6	0- 22,4	-
Precipitação mensal (mm)	206±209	0-528,2	206±209	0-528,2	-
Nível da água (m)	3,1 ± 0,2	2,9-3,4	3,1 ± 0,2	2,9- 3,4	-
Vazão (m ³ s ⁻¹)	177.376 ± 72.829	89.302-279.922	177.376 ± 72.829	89.302-279.922	-
Coliformes Totais (TC. 100 mL ⁻¹)	12838,7 ± 7239,23	2658-22494	0,0	0,0	Em conformidade

Tabela 4 Valores de média, desvio padrão, mínimo e máximo para os parâmetros monitorados na água bruta e tratada do Rio Amazonas.

* DP: Desvio padrão; VMP: Valor Máximo Permitido

106

<i>E.coli</i> (<i>E.coli</i> .100 mL ⁻¹)	1082,7 ± 1832,57	68-6780	0,0	0,0	Em conformidade
Cianobactérias (cels mL ⁻¹)	214,7 ± 277,81	89,4-1090	-	-	Em conformidade

3.2 CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS

O monitoramento realizado durante um ano de amostragem possibilitou detectar dez táxons de cianobactérias, além de confirmar a presença de toxinas na captação de água para consumo na cidade de Macapá. É importante frisar que os táxons mais frequentes foram identificados por morfologia e por taxonomia polifásica, os demais foram identificados apenas por morfologia.

Os táxons identificados no monitoramento da água bruta do Rio Amazonas foram: *Limnothrix planctonica*, *Alkalinema pantanalense*, *Leptolyngbya* sp., *Pseudanabaena* sp., *Raphidiopsis mediterranea*, *Anabaena* sp., *Dolichospermum* sp., *Geitlerinema splendidum*, *Cephalothrix lacustris*, e uma cianobactéria não identificada que foi nomeada “morfoespécie 1”; todas estas espécies são filamentosas.

As espécies mais abundantes foram *L. planctonica*, *Leptolyngbya* sp. e *A. pantanalense* (Fig. 6). As duas primeiras dominaram a comunidade representando $\geq 50\%$ de todos os espécimes na amostra; *L. planctonica* dominou durante maio-setembro, e *Leptolyngbya* sp. de novembro a março (Fig. 7). *Limnothrix planctonica* e *A. pantanalense* ocorreram em 100% das amostras, *Leptolyngbya* sp. em 92%, e as demais espécies ocorreram em $\leq 50\%$ das amostras. Os maiores valores de densidade de células de cianobactérias foram observados em julho de 2015 ($1,09 \times 10^3$ cels.mL⁻¹), ao passo que janeiro apresentou a menor densidade celular $8,94 \times 10$ céls. mL⁻¹ (Tabela 4).

Figura 6: Abundância relativa de cianobactérias na água bruta do Rio Amazonas durante o período de estudo (abril de 2015 a abril de 2016).

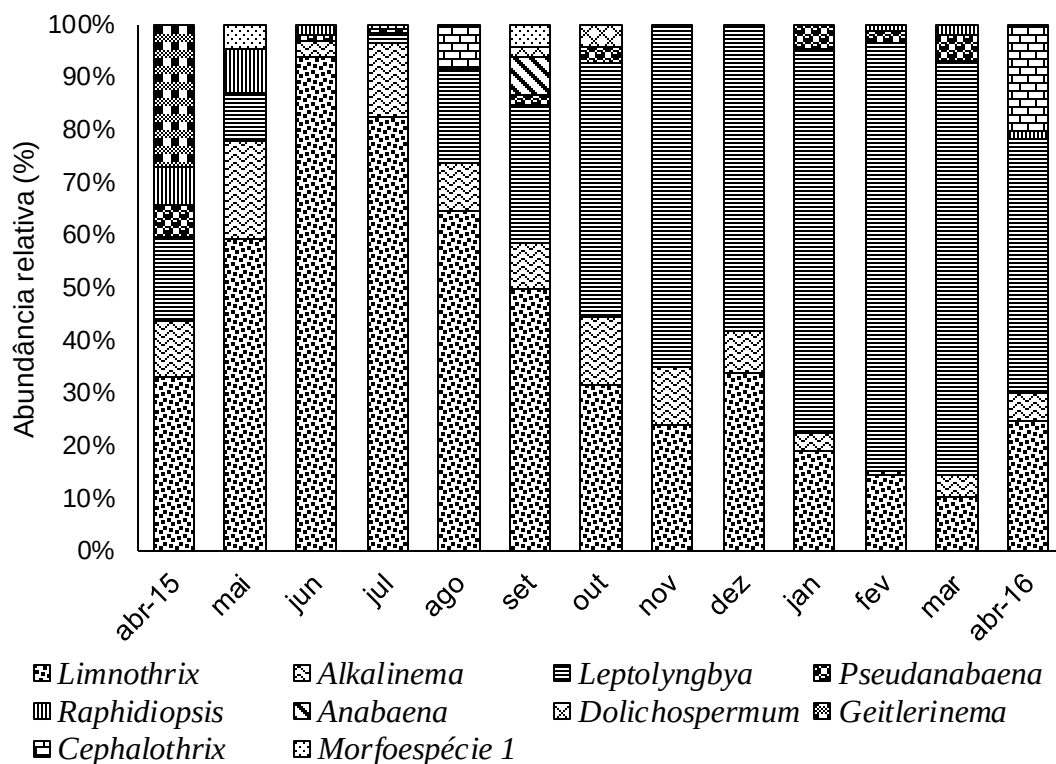
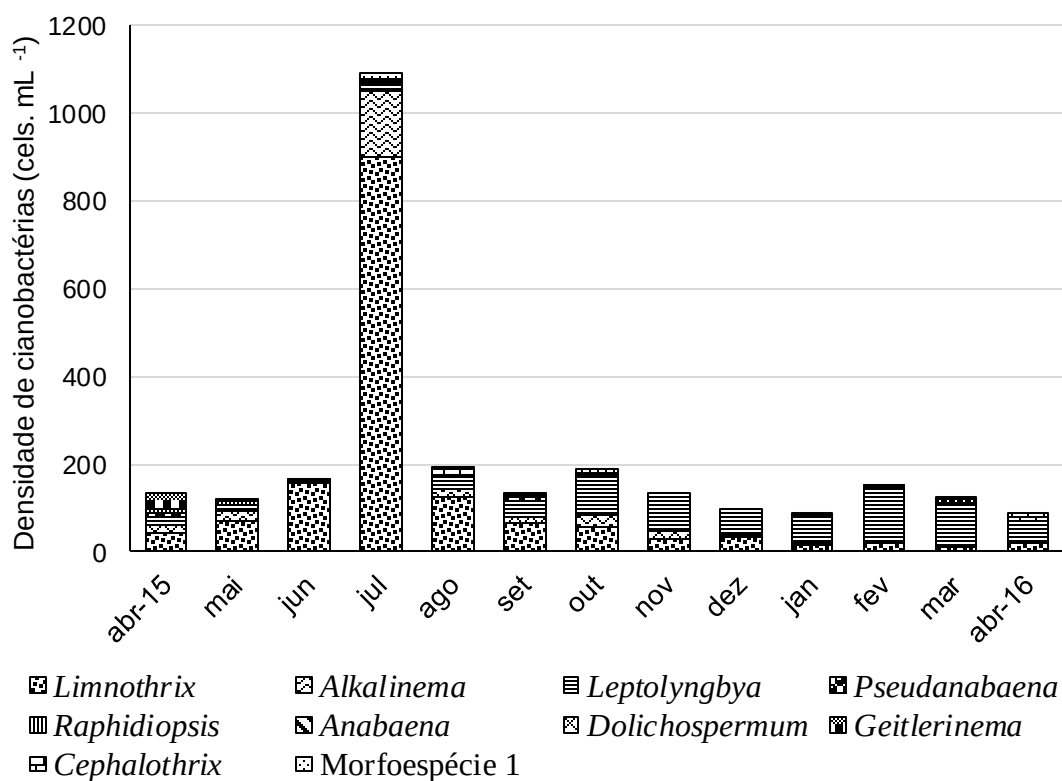


Figura 7: Densidade de células de cianobactérias no ponto de captação de água para abastecimento no Rio Amazonas de abril de 2015 a abril de 2016.



As espécies registradas no monitoramento foram caracterizadas e suas descrições seguem abaixo. O resumo das informações estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Características das células de cianobactérias identificadas no monitoramento.

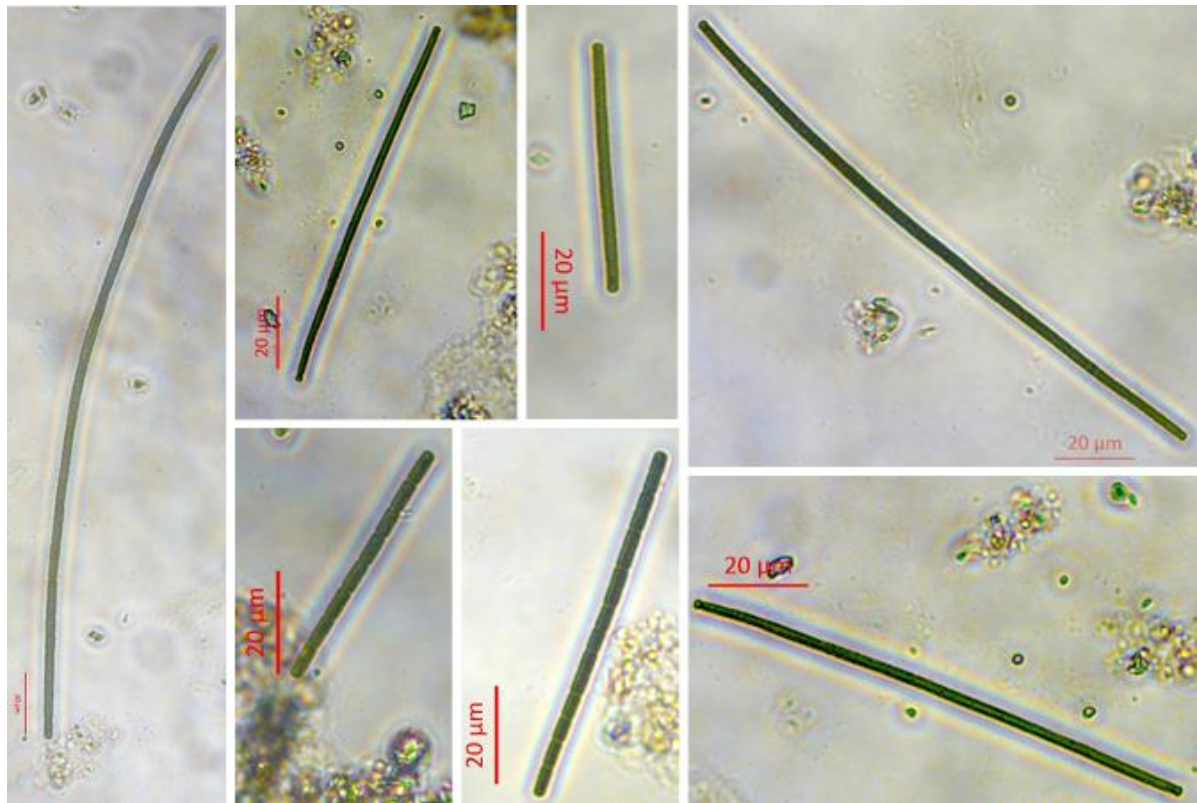
Táxon	Formato	d (µm)	d mín- máx (µm)	h (µm)	h mín- máx (µm)	Área média (µm ²)	Volume médio (µm ³)	S/V	Média de células por tricoma	N amostral (células)
<i>L. planctonica</i>	cilíndrico	1,94 ±0,6	0,7-4,2	5,0 ±1,5	1,7-9,9	36,8	15,0	2,5	19,1	778
<i>A. pantanalense</i>	cilíndrico	1,31 ±0,4	0,7-2,0	2,9 ±0,7	1,6-5,8	14,7	3,9	3,7	22,3	76
<i>Leptolyngbya</i> sp.	cilíndrico	1,17 ±0,4	0,7-2,4	4,1 ±1,3	2,0-6,5	17,2	4,4	3,9	20,8	58
<i>Pseudanabaena</i> sp.	cilíndrico	2,76 ±0,6	1,0-3,9	4,8 ±0,9	2,8-7,6	53,7	28,8	1,9	14,5	54
<i>R. mediterranea</i>	cilíndrico	1,27 ±0,3	0,8-2,5	3,7 ±0,9	2,4-6,7	17,3	4,7	3,7	12,8	24
<i>Anabaena</i> sp.	cilíndrico	3,19 ±0,1	3,0-3,3	6,0 ±0,9	4,6-7,5	76,4	48,2	1,6	48,0	15
<i>G. splendidum</i>	cilíndrico	2,72 ±0,7	1,8-4,6	6,0 ±2,9	2,6-14,6	63,8	35,6	1,8	66,3	80
<i>C. lacustris</i>	cilíndrico	6,36 ±1,8	4,2-8,7	3,9 ±1,3	2,4-6,5	140,7	122,7	1,1	58,0	9
Morfoespécie 1	cilíndrico	2,19 ±0,4	1,8-3,1	7,0 ±1,2	5,0-8,5	55,8	26,4	2,1	27,7	12
<i>Dolichospermum</i> sp.	esférico	6,22 ±0,8	4,5-7,9			121,5	126,0	1,0	18,3	37

Legenda: **d**- Diâmetro celular (µm); **h**- Comprimento celular (µm)

Limnothrix planctonica (Fig. 8):

As populações de *Limnothrix planctonica* da área de estudo apresentam tricomas solitários, longos, isopolares, quase retos, não atenuados, não constritos ou levemente constritos próximo aos septos, os quais são translúcidos, além de cor verde oliva, verde pálido, ou verde-azulado brilhante. Não formam necrídios, apresentam facultativamente mucilagem hialina bem fina observável na célula apical. As células de *Limnothrix planctonica* são cilíndricas, medindo entre 0,7-4,2 µm de diâmetro, e 1,7-9,9 µm de comprimento (Tabela 5), apresentando pequenos aerótopos facultativos nos pólos. O biovolume celular médio deste táxon foi de 15,0 µm³.

Figura 8: Tricomas de *Limnothrix planctonica* com aumento de 400x



Alkalinema pantanalense (Fig. 9):

A espécie *Alkalinema pantanalense* apresenta tricomas de tamanho pequeno a médio, quase retos, profundamente constritos, e não formam necrídios. As células são cilíndricas, com uma pequena constrição ao meio, semelhante ao formato de barril. Seu diâmetro variou entre 0,7-2,0 µm e o comprimento entre 1,6-5,8 µm; com biovolume celular médio de 3,9 µm³, variando de 1 a 12 µm³ ao longo do ciclo anual (Tabela 5- biovolume média mensal). As células apicais podem ser arredondadas ou atenuadas. O conteúdo celular é homogêneo, verde pálido, a verde brilhante, e não apresenta aerótopos.

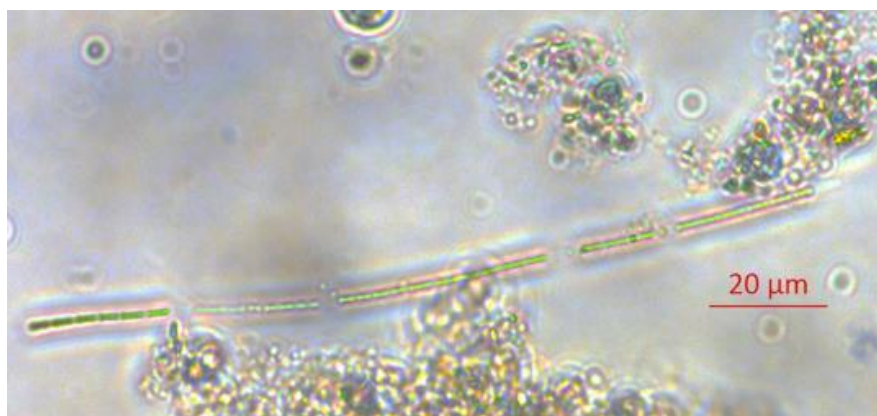
Figura 9: *Alkalinema pantanalense* com aumento de 400x



***Leptolyngbya* sp.** (Fig. 10):

Leptolyngbya sp. apresentaram tricomas de tamanho variável, flexuosos, não atenuados, e ocorrem livres ou aderidos a substratos. Apresentaram facultativamente um envelope mucilaginoso firme, fino e hialino. As células podem ser mais longas que largas, isodiamétricas, ou subquadráticas com diâmetro celular entre 0,7-2,4 µm, e comprimento entre 2,0-6,5 µm. O biovolume celular médio foi de 4,4 µm³.

Figura 10: *Leptolyngbya* sp. com aumento de 400x



***Pseudanabaena* sp. (Fig. 11):**

Os representantes de *Pseudanabaena* sp. observados no monitoramento apresentam tricomas solitários, retos, constritos, não atenuados e com poucas células (~14). As células são cilíndricas, com extremidades arredondadas, conectadas por septos que assemelham-se a “pontes hialinas” (Komárek, 2005). O diâmetro celular médio variou entre 1,0-3,9 μm , e comprimento entre 2,8-7,6 μm . O biovolume celular médio de *Pseudanabaena* sp. foi 28,8 μm^3 .

Figura 11: *Pseudanabaena* sp. com aumento de 400x

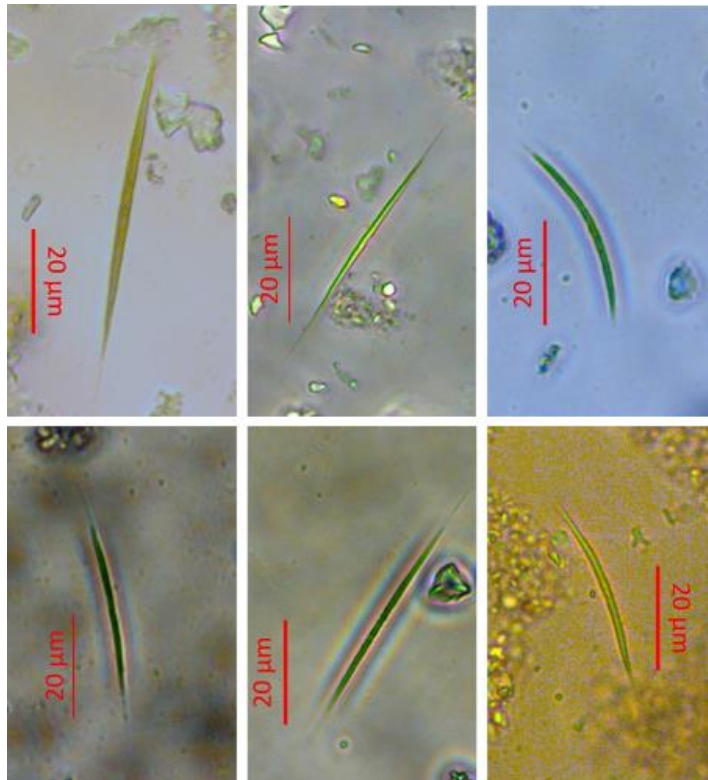


***Raphidiopsis mediterranea* (Fig. 12):**

R. mediterranea apresentaram tricomas finos, solitários, curtos, com poucas células (~13). São isopolares, e atenuados em ambas as extremidades, que podem ser afiladas assemelhando-se ao gênero *Cuspidothrix*. Alguns tricomas são constritos, ao passo que outros não o são, sendo muito difícil a delimitação das células. As células

possuem formato cilíndrico, com diâmetro entre 0,8-2,5 μm e comprimento entre 2,4-6,7 μm . O biovolume celular médio desse táxon foi de 4,7 μm^3 (Tabela 5).

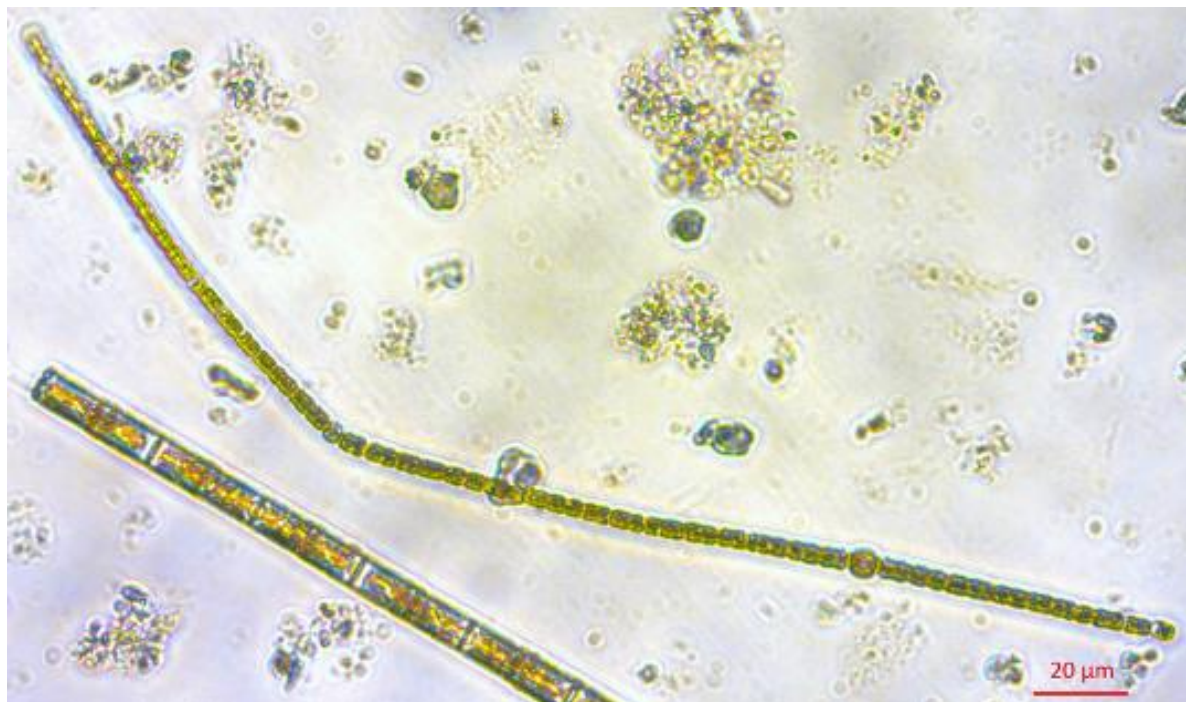
Figura 12: *Raphidiopsis* com aumento de 400x



***Anabaena* sp.** (Fig. 13):

Anabaena sp. apresentou tricomas isopolares e constritos. As células vegetativas não possuem aerótopos, e têm formato cilíndrico, assemelhando-se ao formato de barril, com diâmetro celular entre 3,0-3,3 μm e comprimento entre 4,6-7,5 μm de. O biovolume celular médio foi de 48,2 μm^3 (Tabela 5). O heterocito possui formato esférico e mede 4,5 μm de diâmetro.

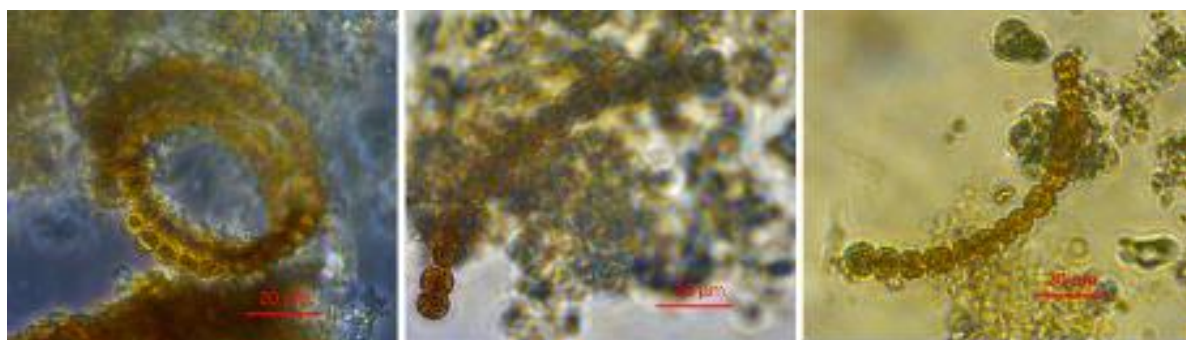
Figura 13: *Anabaena* sp. obtida do monitoramento do Rio Amazonas na captação de água da cidade de Macapá, aumento de 400x.



***Dolichospermum* sp. (Fig. 14):**

Tricomas solitários, curvos ou retos, constrictos, formados por células esféricas ou com formato semelhante ao de um barril, contendo aerótopos. As células possuem diâmetro entre 4,5-7,9 μm .

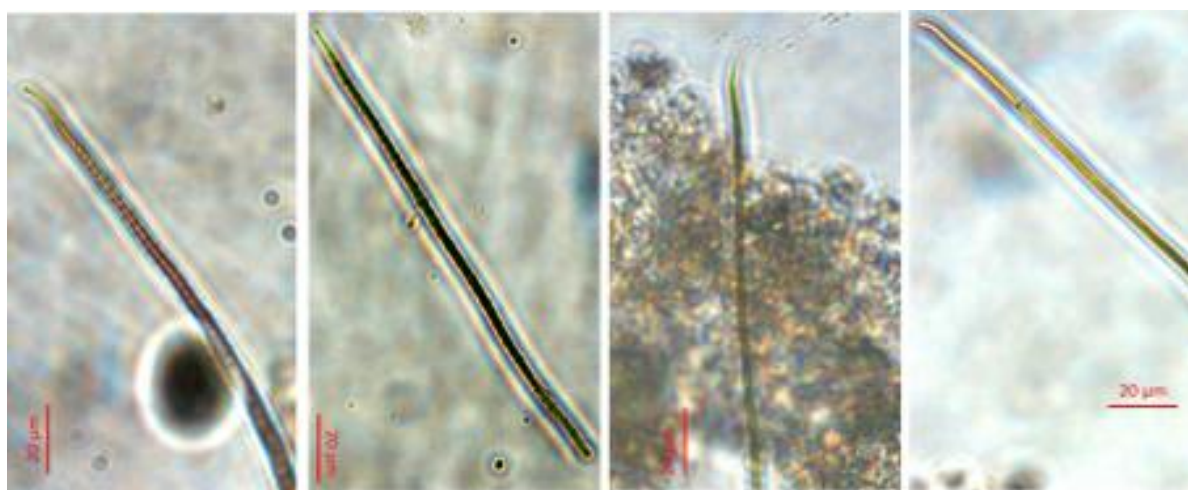
Figura 14: Fotomicrografias de *Dolichospermum* sp. obtida do monitoramento do Rio Amazonas na captação de água da cidade de Macapá, aumento de 400x.



***Geitlerinema splendidum* (Fig. 15):**

Os tricomas de *G. splendidum* são verde pálido a verde brilhante, atenuados em ambas as extremidades ou em apenas uma, com células apicais alongadas e capitadas, características desta espécie. As células são cilíndricas e apresentaram em média $2,72 \pm 0,7 \mu\text{m}$ de diâmetro e $6,0 \pm 2,9 \mu\text{m}$ de comprimento. O biovolume celular médio foi de $35,6 \mu\text{m}^3$.

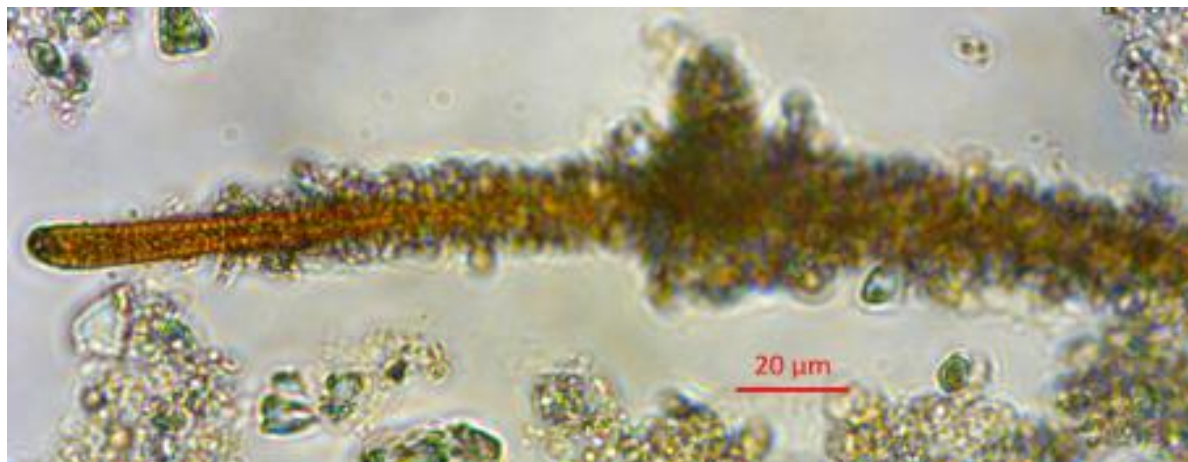
Figura 15: *Geitlerinema splendidum* obtida do monitoramento do Rio Amazonas na captação de água da cidade de Macapá, aumento de 400x.



***Cephalothrix lacustris* (Fig. 16):**

Os tricomas apresentam cores vivas do verde ao marrom, são retos ou flexíveis, levemente constrictos e apresentam facultativamente envelope mucilaginoso hialino. As células são mais largas ($4,2\text{--}8,7 \mu\text{m}$) do que longas ($2,4\text{--}6,5 \mu\text{m}$) e apresentam aerótopos facultativos. As células apicais podem ser arredondadas ou capitadas com caliptra facultativa. O biovolume celular médio foi de $122,7 \mu\text{m}^3$.

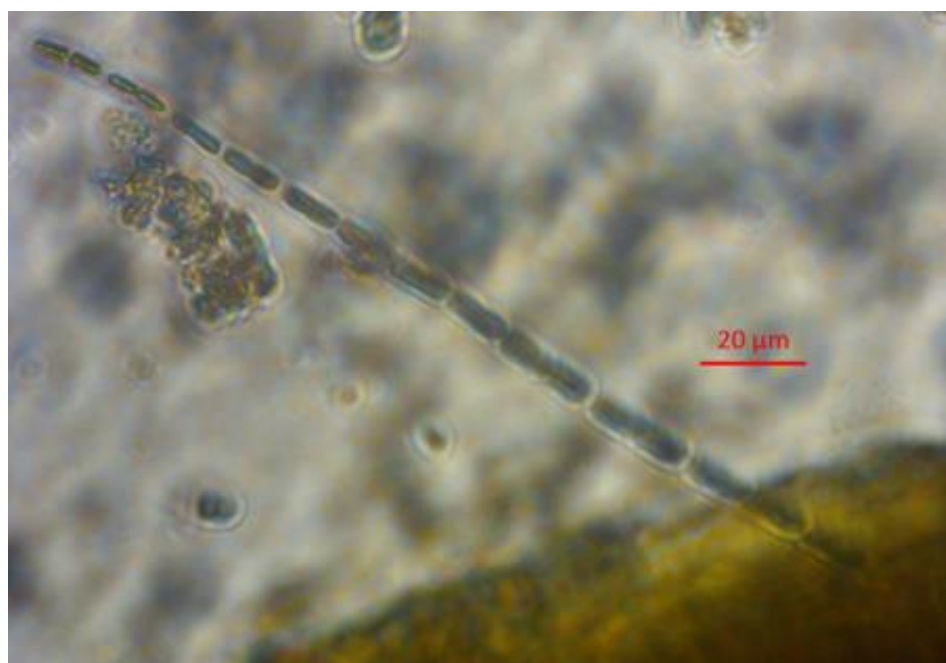
Figura 16: *Cephalothrix lacustris* obtida do monitoramento do Rio Amazonas na captação de água da cidade de Macapá, aumento de 400x.



Morfoespécie 1 (Fig. 17):

Tricoma quase reto, formado por células cilíndricas ou ovais envoltas em envelope mucilaginoso hialino. As células são dispostas em fileira com um grande espaçamento intercelular, o qual frequentemente ocorre a cada duas células. O diâmetro celular varia de 1,8-3,1 μm e o comprimento varia de 5,0-8,5 μm . O biovolume celular médio foi de 26,4 μm^3 .

Figura 17: Morfoespécie 1 obtida do monitoramento do Rio Amazonas na captação de água da cidade de Macapá, aumento de 400x.



3.3 BIOVOLUME

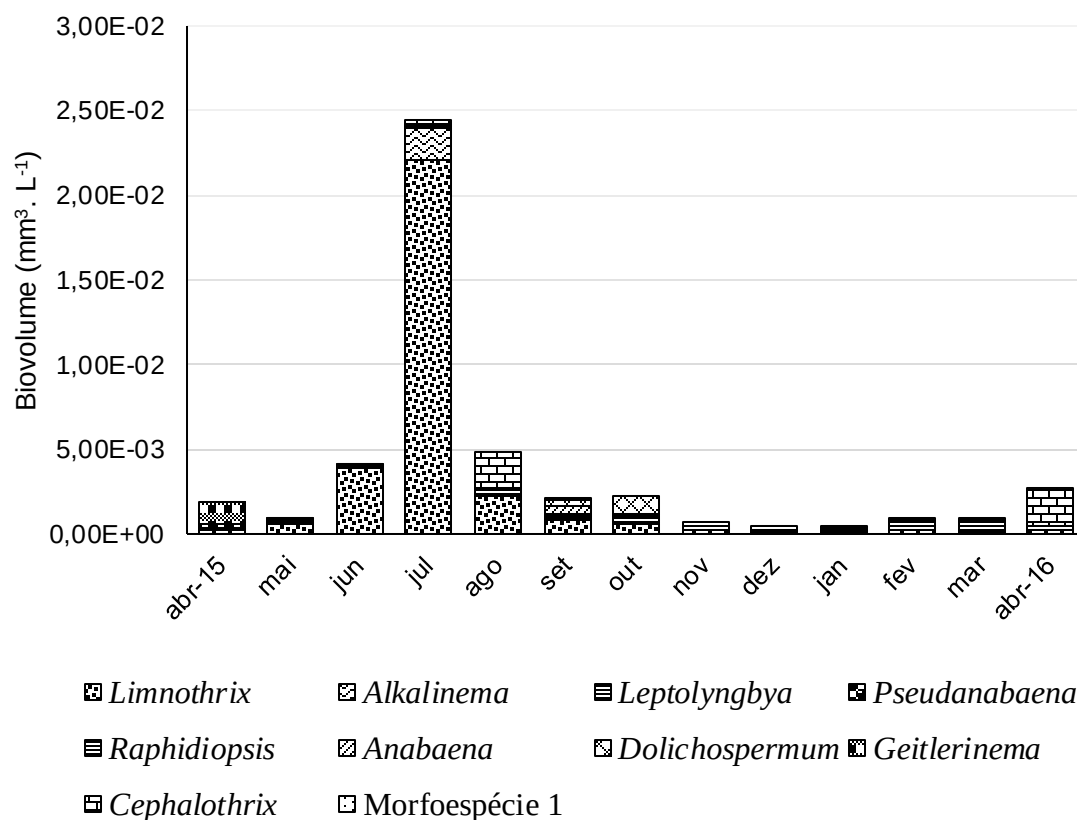
Foi calculado o biovolume das cianobactérias para complementar a contagem de células. E, desta forma, foi possível avaliar a biomassa real destes organismos no Rio Amazonas. Para os táxons mais frequentes foram feitas medições em cada amostragem mensal, sendo possível observar a variação das espécies ao longo do ciclo anual (aumento ou diminuição do volume (ver Tabela 6). As espécies que tiveram frequência muito baixa não foram medidas a cada amostragem, e sim pela média do total de ocorrências.

Tabela 6: Biovolume celular médio considerando os valores médios de cada amostragem (a variação ao longo dos meses)

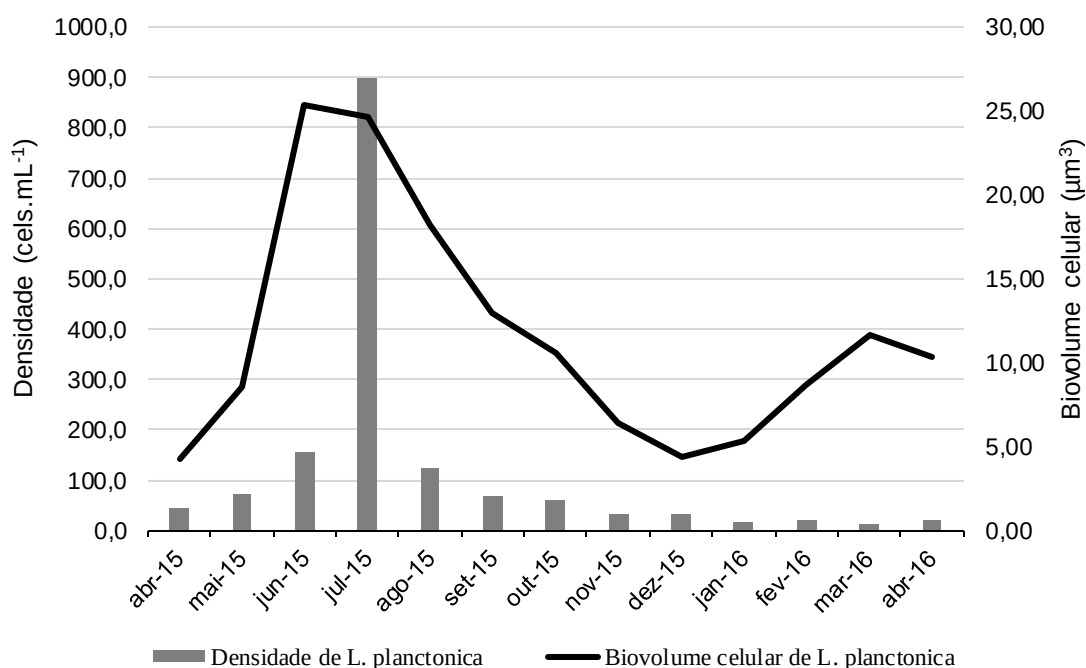
Táxon	Biovolume celular médio (μm^3)	Mínimo-máximo (μm^3)
<i>Limnothrix planctonica</i>	11,6 $\pm$ 7,1	4,2-25,4
<i>Alkalinema pantanalense</i>	4,1 $\pm$ 3,2	1,1-12
<i>Leptolyngbya</i> sp.	5,7 $\pm$ 3,0	2,6-12,1
<i>Pseudanabaena</i> sp.	28,9 $\pm$ 6,9	22,2-38,6
<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	4,7 $\pm$ 1,4	3,1-7,1
<i>Anabaena</i> sp.	48,2 $\pm$ 0	48,2-48,2
<i>Dolichospermum</i> sp.	126,0 $\pm$ 0	126,0-126,0
<i>Geitlerinema splendidum</i>	35,6 $\pm$ 0	35,6-35,6
<i>Cephalothrix lacustris</i>	122,7 $\pm$ 0	122,7-122,7
Morfoespécie 1	26,4 $\pm$ 0	26,4-26,4

A partir dos volumes celulares médios, foi obtido o biovolume total ($\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$) para cada espécie, que corresponde a multiplicação dos volumes celulares pela densidade (Fig. 18). Foi possível observar que *L. planctonica* dominou também em termos de biomassa, apresentando picos nos meses de junho, julho e agosto (Fig. 18). Essa espécie mostrou grande variação no volume celular ao longo do ciclo anual com valores mínimos e máximos, respectivamente 4,2 μm^3 e 25,4 μm^3 (Tabela 6). *A. pantanalense* seguiu tendência similar a de *L. planctonica* com pico em julho de 2015.

Figura 18: Biovolume total ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) das espécies de cianobactérias encontradas no Rio Amazonas, ponto de captação de água para consumo.



Devido a grande contribuição em densidade e biomassa, *L. planctonica* foi avaliada individualmente. O volume celular da referida espécie foi maior nos meses de junho a agosto, assim como foi a densidade celular (Fig. 19). Por outro lado, a espécie *Leptolyngbya* sp. apresentou alta densidade celular e foi dominante durante os meses de novembro a março, porém não teve biomassa expressiva (Fig. 18).

Fig. 19: Densidade de células e biovolume celular médio de *Limnithrix planctonica*.

3.4 TOXINAS

Considerando os métodos utilizados para detectar e quantificar microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina, apenas microcistina-LR foi detectada nas amostras do estudo. Detalhes serão apresentados a seguir.

3.4.1 Quantificação de cianotoxinas pelo método de ELISA

O método de ELISA permitiu a detecção de microcistina-LR em junho ($1,5\mu\text{g L}^{-1}$ na água bruta/ $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ na água tratada) e julho de 2015 ($2,1\mu\text{g L}^{-1}$ na água bruta/ $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ em água tratada) como descrito na Tabela 7 e Fig. 20. A água bruta do mês de agosto também apresentou microcistina-LR com concentração de $0,6\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 7, Fig. 20). Outros meses apresentaram concentrações muito baixas de microcistina (média $0,1\mu\text{g L}^{-1}$) na água bruta, e ausência na água tratada, sendo estas consideradas falsos positivos. De qualquer forma, todas as amostras foram analisadas novamente em uma busca molecular por genes relacionados a produção de toxinas (MOREIRA et al., 2014). As análises de

saxitoxinas não apresentaram resultados positivos tanto na água bruta como na tratada durante o período de estudo.

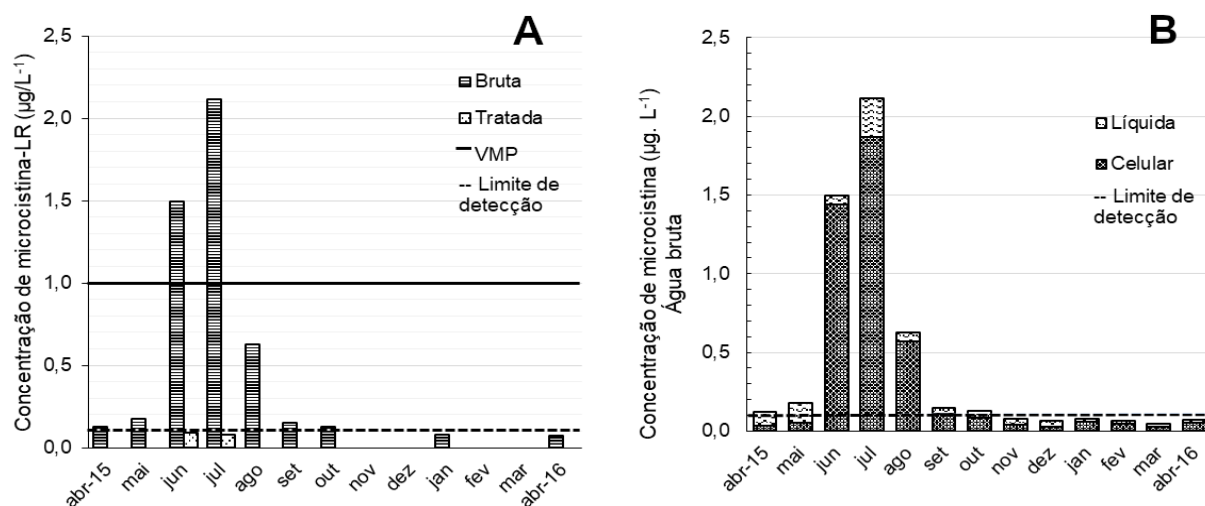
Tabela 7 Resultados para a detecção de microcistina pelos métodos *screening* molecular (*mcyE*) e ELISA (MC-LR) para água bruta e tratada na ETAm-CAESA.

	Água Bruta		Água Tratada	
	<i>mcyE</i>	ELISA	<i>mcyE</i>	ELISA
Mai	-	-	-	-
Jun	*	+	+	+
Jul	+	+	+	+
Ago	-	+	-	-
Set	-	-	-	-
Out	-	-	-	-
Nov	-	-	-	-
Dez	-	-	-	-
Jan	-	-	-	-
Fev	-	-	-	-
Mar	-	-	-	-
Abr	-	-	-	-

* Filtro perdido; + Resultado Positivo; - Resultado Negativo

A separação das amostras em frações celulares e líquidas mostrou que a maior parte das cianotoxinas detectadas no Rio Amazonas são provenientes de células de cianobactérias (Fig. 20B). O valor máximo detectado nas frações dissolvidas foi $0,2\mu\text{g.L}^{-1}$, na água tratada de julho de 2015. Com relação a água tratada, apenas os meses de junho, julho e dezembro apresentaram resultados positivos de $0,1\mu\text{g.L}^{-1}$, oriundos das frações celulares. Nenhum resultado positivo foi obtido da fração dissolvida da água tratada.

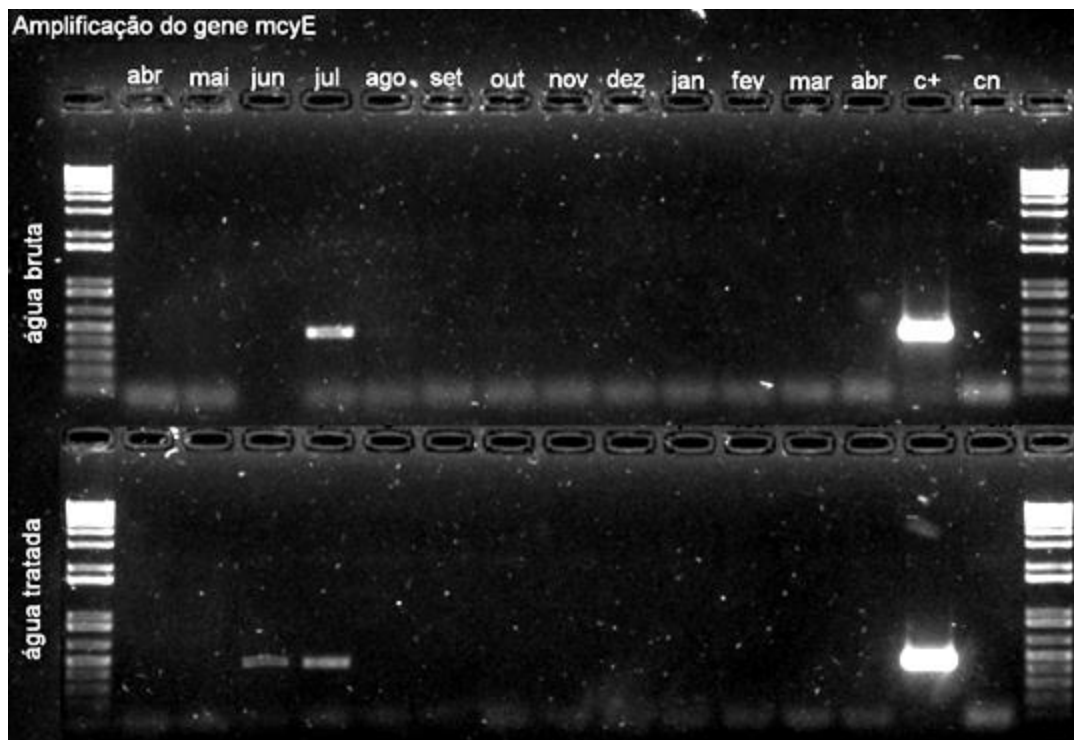
Figura 20: Concentrações de microcistina-LR estimadas pelo método de ELISA. A) Resultados de amostra integrada (frações sólidas + dissolvidas) para microcistina na água bruta e tratada da ETA-CAESA. Na linha em destaque observa-se o valor máximo permitido para microcistina de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2017), e o limite de detecção de MC-LR de $0,1\mu\text{g.L}^{-1}$ B) Detalhamento das concentrações de MC-LR nas frações sólidas e dissolvidas da água bruta.



3.4.2 Detecção de genes relacionados a cianotoxinas

De todos os genes envolvidos na produção de cianotoxinas investigados neste estudo, o único que amplificou nas amostras foi o gene *mcyE*, indicando a presença de cianobactérias que possuem o potencial para a produção de hepatotoxinas tanto na água bruta, quanto na água tratada durante o mês de julho; e na água tratada do mês de junho (Figura 21). Nestes casos, os fragmentos positivos de *mcyE* foram sequenciados e comparados com outras sequências da base de dados BLASTx para proteínas. Os resultados sugeriram a presença de genes relacionados à síntese de microcistina, ou à ocorrência de amplificação de produtos de PCR inespecíficos.

Figura 21: Gel de agarose evidenciando a amplificação do gene *mcyE* na água tratada do mês de junho, e nas águas bruta e tratada do mês de julho. Amostras utilizadas foram os filtros para água bruta e tratada, controles positivos (c+) e negativos (cn).



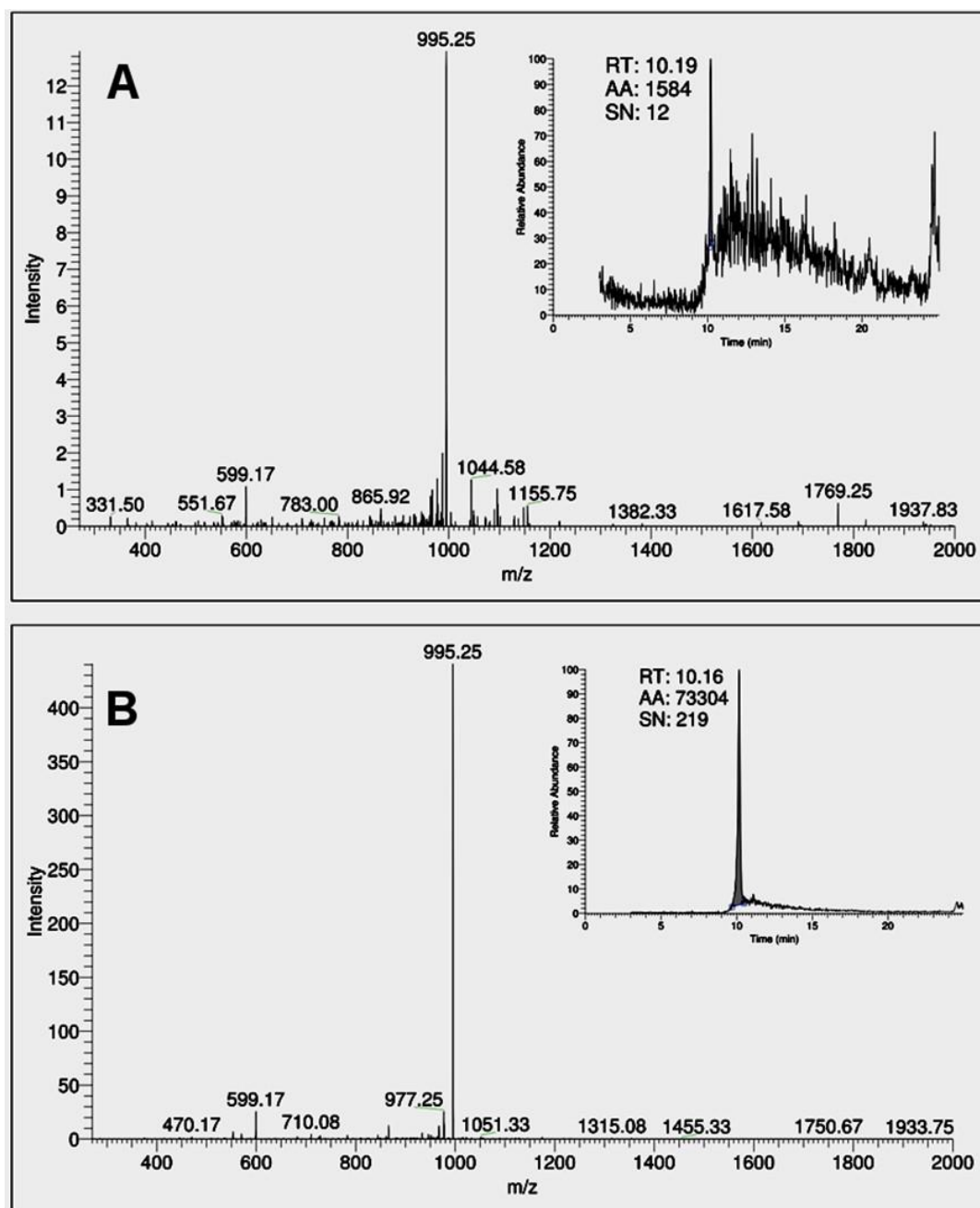
* O filtro de água bruta do mês de junho foi perdido.

3.4.3 Quantificação de MC-LR por LC-ESI-MS/MS

A presença de microcistina-LR foi confirmada por análise de LC-MS na água tratada do mês de junho de 2015 (Fig. 22). A amostra apresentou tempo de retenção de 10,19 minutos e sinal de pico m/z de 995,25 com fragmentos m/z 599,17 e m/z 865,92. A concentração de microcistina detectada foi $0,026 \mu\text{g.L}^{-1}$. A ausência de MC-LR em outras amostras previamente confirmadas por ELISA e por métodos moleculares pode ser explicada pelas condições de preservação, e pelo fato de que LC-MS é um método seletivo para microcistina-LR, uma vez que esta variante foi utilizada como padrão. Já o método de ELISA detecta uma mistura de microcistinas (MOUNTFORT et al., 2005).

Figura 22: Espectro de massa de microcistina-LR por LC-MS, tempo de retenção e área.

A) amostra da água tratada de junho de 2015; B) padrão de microcistina- LR



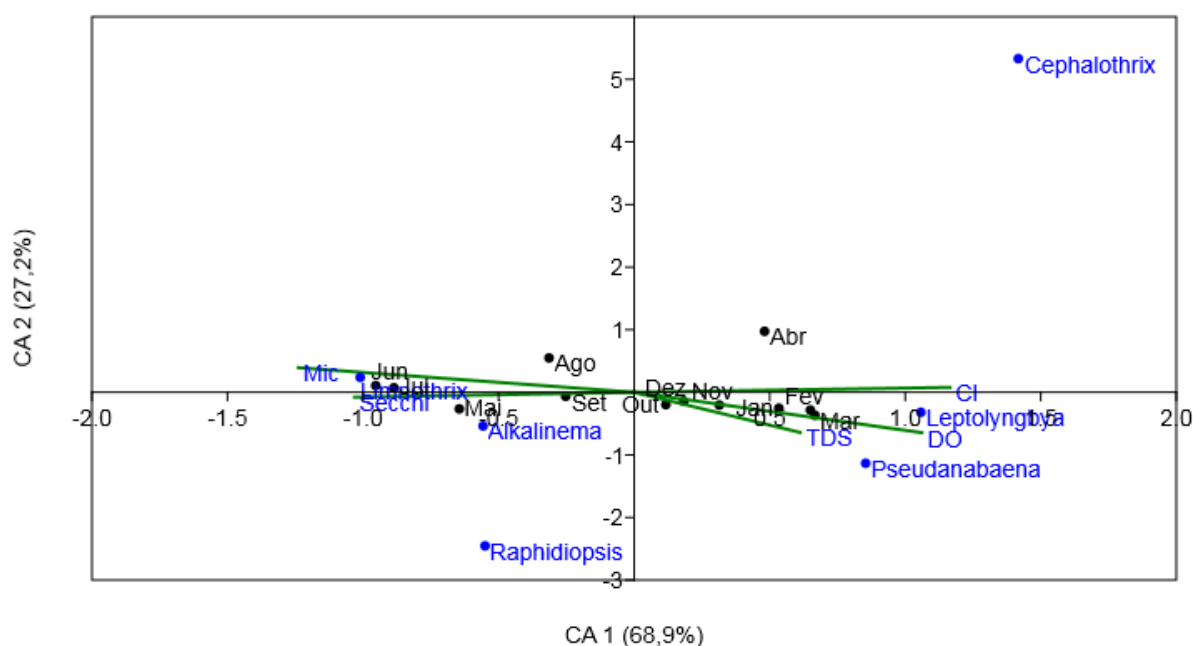
3.5 ASSOCIAÇÕES ENTRE CIANOBACTÉRIAS, CIANOTOXINAS E FATORES AMBIENTAIS

A análise de correspondência canônica foi realizada com cinco variáveis ambientais selecionadas por *forward selection* (microcistina, sólidos totais dissolvidos, cloreto, oxigênio dissolvido e transparência), somando-se às espécies de cianobactérias

com maior abundância e frequência de ocorrência (*L. planctonica*, *A. pantanalense*, *Leptolyngbya* sp., *Pseudanabaena* sp., *R. mediterranea* e *C. lacustris*) detectadas durante os doze meses de monitoramento.

O primeiro eixo (CA1) da Figura 23 explicou 68,9% da variação da abundância de cianobactérias e variáveis ambientais, enquanto que o segundo eixo explicou 27,25%. Ambos os eixos somados explicaram 96,15% da variação. O teste de permutação mostrou que o modelo foi significativo ($p=0,003$), assim como os dois primeiros eixos da CCA com $p=0,004$ para o CA1, e $p=0,016$ para o CA2. Todas as variáveis escolhidas por *forward selection* foram significativas ($p<0,05$) e apresentaram $VIF<15$.

Figura 23: Triplot da CCA mostrando os meses de amostragem, espécies e fatores ambientais associados a Microcistina (Mic).



O eixo 1 (Fig. 23) mostrou os fatores que apresentaram maior correlação com a abundância de cianobactérias no Rio Amazonas. CA1 foi positivamente correlacionado com os parâmetros TDS(0,4), OD(0,7) e Cl(0,77), enquanto que foi negativamente correlacionado com microcistina (-0,82) e secchi (-0,68). Já o eixo 2 foi correlacionado principalmente com OD (-0,42) e TDS (-0,42).

Microcistina e cloreto apresentaram maior variação no primeiro eixo (CA1). Microcistina foi o valor que mais variou no estudo e ocorreu no mesmo sentido da

transparência (que apresentou correlação mais forte com a microcistina devido ao baixo ângulo formado com o eixo). Isto é, os maiores valores de microcistina estão associados ou correlacionados com os maiores valores de transparência. Esse resultado foi observado no período entre maio a setembro, principalmente nos meses de junho e julho, os quais apresentaram as maiores densidades de *Limnothrix*. Na Figura 23, o ponto desta espécie coincidiu com o ponto do mês de julho indicando abundância máxima deste táxon. A abundância de *Alkalinema* esteve relacionada aos mesmos parâmetros e meses de *Limnothrix*, porém apresentou valores médios mais baixos.

No lado oposto do CA1 (direito), a variável cloreto apresentou forte correlação com o eixo, seguida de OD. Esta variação ocorreu entre outubro e abril e influenciou a abundância de *Leptolyngbya*, que foi maior nos pontos de maior concentração de cloreto e oxigênio dissolvido (OD). *Pseudanabaena* teve sua abundância também relacionada ao cloreto e OD. Entretanto, o fator principal foi sólidos totais dissolvidos (TDS).

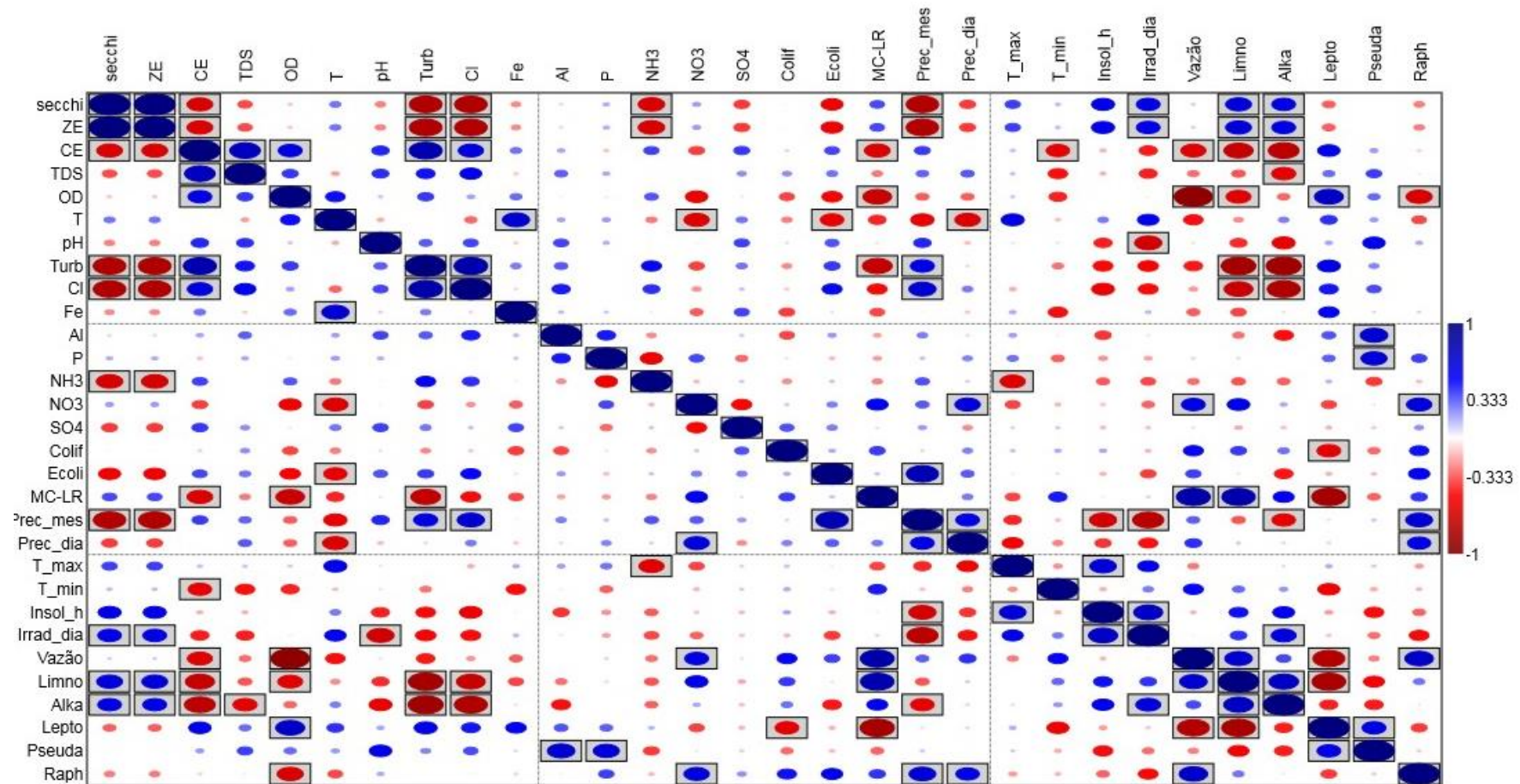
Os parâmetros com os maiores scores no eixo CA2 (OD e TDS) exerceram influência negativa na abundância de *Cephalothrix* com score 5,33 nos meses de abril de 2016 e agosto de 2015, com scores 0,97 e 0,55, respectivamente. Outra espécie relacionada ao eixo CA2 foi *Raphidiopsis* (-2,45), que apresentou abundância influenciada positivamente por TDS e OD.

O resultado da análise de correlação de Spearman entre os fatores do estudo é apresentado na Tabela 8 apenas para correlações significativas ($p < 0,05$) para as cinco variáveis escolhidas para a CCA, e na figura 24 para todas os parâmetros. As variáveis vazão (Fig. 24) e *Limnothrix* mostraram altos valores de correlação com as concentrações de MC-LR.

Tabela 8: Valores de Rs para os fatores ambientais que apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) com as variáveis escolhidas para a Análise de Correspondência Canônica (CCA): cloreto, oxigênio dissolvido, microcistina, sólidos totais dissolvidos e transparência.

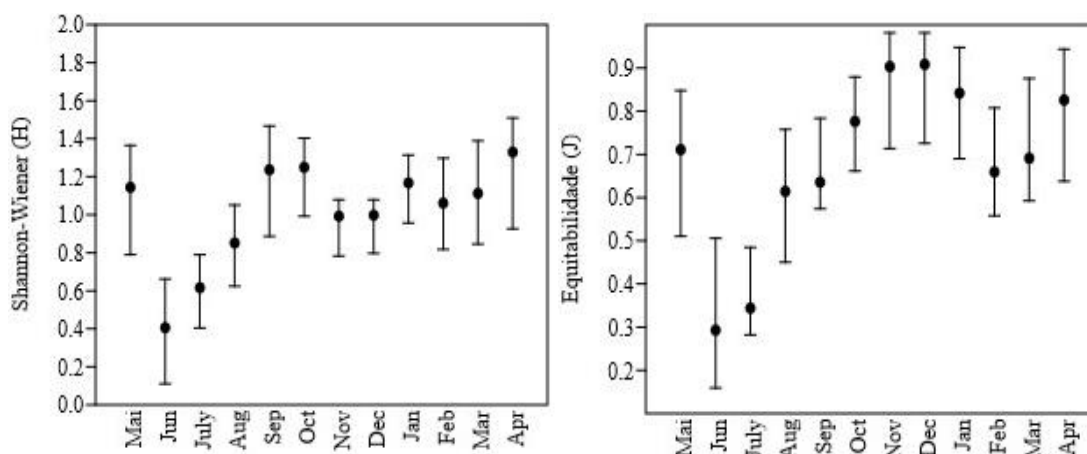
	Cloreto	OD	Microcistina	TDS	Secchi
Relação positiva	Turbidez (0,8)	CE (0,6)	Vazão (0,8)	CE (0,7)	ZE (1)
	CE (0,6)	<i>Leptolyngbya</i> (0,7)	<i>Limnothrix</i> (0,8)		Irradiação (0,6)
	Precipitação mensal (0,6)		-		<i>Limnothrix</i> (0,6)
					<i>Alkalinema</i> (0,6)
Relação negativa	Secchi (-0,9)	Microcistina (-0,7)	CE (-0,6)	<i>Alkalinema</i>	Turbidez (-0,9)
	ZE (-0,9)	Vazão (-0,9)	OD (-0,7)	(-0,6)	Cl (-0,8)
	<i>Limnothrix</i> (-0,7)	<i>Limnothrix</i> (-0,6)	Turbidez (-0,7)		Precipitação mensal
	<i>Alkalinema</i> (-0,8)	<i>Raphidiopsis</i> (-0,6)	<i>Leptolyngbya</i> (-0,8)		(-0,8)
					CE (-0,6)
					NH3 (-0,6)

Figura 24: Matriz de correlação de Spearman dos fatores físicos, químicos e biológicos deste estudo (descritos na Tabela 1). Vermelho = correlação negativa; azul = correlação positiva; quadrado indica correlação significativa com $p < 0,05$.



Com relação aos índices de diversidade, a uniformidade de Pielou (J) mostrou valores acima de 0,5 durante o monitoramento anual, exceto nos meses de junho e julho, os quais apresentaram valores muito baixos de equitabilidade (0,29 e 0,34, respectivamente). O índice de diversidade de Shannon-Wiener também apresentou os menores valores de diversidade durante os meses de junho e julho (Fig. 25).

Figura 25: Diversidade de Shannon-Wiener (H) e equitabilidade de Pielou (J) para cianobactérias do rio Amazonas observados durante um ciclo anual.



Quanto ao estimador de riqueza Chao 2, a quantidade estimada de espécies foi 10,30 (sd 0,86). Após a técnica de bootstrap o valor de Chao2 foi de 9,54 com sd 1,44.

4. DISCUSSÃO

O monitoramento anual mostrou que as cianobactérias da área de captação no Rio Amazonas são majoritariamente filamentosas e adaptadas aos ambientes turbulentos e com pouca disponibilidade de luz. Tais características do Rio Amazonas parecem ter sido determinantes na definição da composição de espécies de cianobactérias encontradas. O táxon que apresentou maior densidade e biovolume foi *L. planctonica*, com pico de crescimento nos meses de junho, julho e agosto de 2015, quando foi registrada a primeira detecção de microcistina-LR no Rio Amazonas.

4.1. DINÂMICA DE CIANOACTÉRIAS NA CAPTAÇÃO DE ÁGUA PARA CONSUMO

As espécies encontradas durante os doze meses de monitoramento são cianobactérias filamentosas, típicas de ambientes com limitação de luz e adaptadas à condição de mistura da coluna d'água (PADISÁK et al., 2009; REYNOLDS et al., 2002; SCHEFFER et al., 1997); logo estas espécies seriam esperadas em um rio como o Amazonas, de cor barrenta (FISHER, 1978), e extremamente turbido, com alta concentração de sólidos suspensos, e, por estes motivos, classificado como rio de águas brancas (JUNK et al., 2011; SIOLI, 1984; WARD et al., 2015) e turbulento, sem estratificação (SIOLI, 1984). Na presente investigação, a zona de mistura vertical pode ser considerada em toda sua profundidade (cerca de 3m na zona de captação da ETAm, onde o nível da água se aproxima de um nível mínimo durante a maré seca, mas não apresenta variação ao longo do ano (JUNK et al., 2013). Apesar de ser um ambiente amazônico, para o qual espera-se grande riqueza de espécies, deve-se lembrar que tais atributos do Rio Amazonas são limitantes para grande parte dos microrganismos fotossintetizantes aquáticos (MUR et al., 1999).

Uma característica comum aos táxons aqui registrados foram os elevados valores de razão superfície/volume ($s.v^{-1} > 0,5\mu m^{-1}$, BRASIL; HUSZAR, 2011), sendo os maiores valores referentes às espécies mais abundantes (*L. planctonica*, *Leptolyngbya* sp. e *A. pantanalense*), além de *R. mediterranea* (Tabela 5). Essa particularidade morfológica está ligada a outras propriedades, como o lento crescimento (KRUK et al., 2010). Por outro lado, a alta razão $s.v^{-1}$ implica em uma área superficial maior para estes organismos, o que proporciona vantagens como uma baixa taxa de sedimentação, possibilitando que permaneçam mais tempo flutuando na coluna d'água, com melhor acesso a zona eufótica, onde há luz para realização de fotossíntese (KRUK et al., 2010). Além disso, evitar perdas de cianobactérias por sedimentação é uma excelente estratégia para a vida em corpos d'água com elevadas taxas de mistura (REYNOLDS, 2006), especialmente a vertical, características de águas rasas.

Os altos valores de razão $s.v^{-1}$ conferem grande área por unidade de massa à essas cianobactérias, e indicam que sua morfologia distancia-se do formato de esfera e aproxima-se de formas atenuadas, como filamentos cilíndricos (PADISÁK et al., 2003). A forma filamentosa das cianobactérias do Rio Amazonas (cilíndricas ou em formato de agulha) as torna boas receptoras de luz, uma vez que a forma alongada (com pequeno diâmetro) maximiza a exposição dos cloroplastos à luz solar, otimizando o processo fotossintético. Essa característica

possibilita também que tais espécies sejam mais tolerantes a ambientes com baixa penetração de luz (NASELLI-FLORES; BARONE, 2007).

O formato de filamento cilíndrico também as protege de perdas como a predação pelo zooplâncton, contribuindo com a manutenção desses táxons no ambiente. Um dos motivos é que filamentos longos podem bloquear o aparato de filtração do zooplâncton (DEMOTT et al., 1991). E uma peculiaridade adicional que contribui para dificultar a herbivoria pelo zooplâncton é a presença de bainhas mucilaginosas (presente nos táxons *L. planctonica*-facultativa na célula apical, *Leptolyngbya* sp., *C. lacustris* e Morfoespécie 1). As bainhas mucilaginosas tornam as cianobactérias maiores à capacidade de ingestão do zooplâncton, e podem ocasionar obstrução em cládóceros filtradores (BRASIL; HUSZAR, 2011; REYNOLDS, 2007). Ainda, as cianobactérias com mucilagem, caso ingeridas, podem passar pelo sistema digestivo dos predadores e resistir (REYNOLDS, 2007). A presença de mucilagem também auxilia na flutuação, como resultado da diminuição da densidade estrutural do microrganismo (PÁDISAK et al., 2003).

Um terceiro fator que pode contribuir com a defesa das cianobactérias em relação à predação são as próprias cianotoxinas, que podem inibir o zooplâncton (FERRÃO FILHO et al., 2010). Com relação a esta última característica, não é possível afirmar no presente estudo se as cianobactérias registradas no monitoramento são tóxicas ou não, assunto que será discutido na seção 4.2. Por outro lado, as demais características identificadas as tornam mais resistentes à herbivoria.

Uma característica comum às espécies dominantes (*L. planctonica* e *Leptolyngbya* sp.) é a mixotrofia, isto é, apresentam um comportamento de nutrição tanto autotrófico quanto heterotrófico. Esse traço funcional é vantajoso para organismos fotossintetizantes que vivem sob limitação de luz em ambientes muito oligotróficos ou ricos em nutrientes (BRASIL; HUSZAR, 2011). Por exemplo, Daniels (2016) observou comportamento heterotrófico em culturas de *Limnothrix* (cepa AC0243). No referido estudo, cultivos de *Limnothrix* foram testados sob diferentes intensidades luminosas e temperaturas, e foi observado que as linhagens cresceram até mesmo na ausência de luz (com adição de glicose ao meio como fonte de carbono). Com relação ao gênero *Leptolyngbya*, a linhagem *L. boryana* dg5 foi identificada como uma variante adaptada ao escuro que também pode crescer heterotroficamente na ausência de luz (FUJITA et al., 1996; HIRAIDE et al., 2015).

Estudo prévio no Rio Solimões (rio de águas brancas com características similares ao Rio Amazonas) demonstrou tal dificuldade para a captação de luz em rios de água branca. Fisher (1978) concluiu que a produtividade primária das microalgas foi muito baixa devido a

deficiência na penetração de luz provocada pela alta turbidez e também à turbulência. As algas do Solimões ficam expostas à luz apenas durante pequenas frações de tempo, que pareceu ser insuficiente para o crescimento líquido das espécies. Tal estudo, porém, não realizou a identificação dos organismos. Portanto não é possível confirmar se estes apresentavam adaptações para a vida neste ambiente limitante.

No que diz respeito às espécies registradas no presente estudo, acredita-se que estão bem adaptadas ao ambiente limitante e dinâmico do estuário do rio Amazonas, uma vez que foram encontradas praticamente as mesmas espécies ao longo do ano, apenas com variações na densidade. Isolados provenientes da área de estudo (OLIVEIRA et al., 2019) das espécies *Limnothrix planctonica*, *Leptolyngbya boryana* e *C. lacustris*, entre outras, foram estudados em cultivo e observou-se que estes organismos apresentam fase planctônica (exceto *L.boryana*) e bentônica, e podem ser resistentes a dessecação. Ora estavam aderidos às paredes do frasco de cultura de células, assim como também foram observados flutuando na superfície do meio líquido, e inclusive permanecendo vivas fora do meio de cultura (quando este decrescia por evaporação). A partir dessas informações, pode-se extrapolar que tais cianobactérias apresentam comportamento similar no ambiente natural (DANIELS, 2016), estando aptas a viver na superfície da coluna d'água, no sedimento, assim como sobreviver fora do ambiente aquático durante as duas marés secas diárias do Rio Amazonas na área de estudo.

De forma geral, as cianobactérias do rio Amazonas identificadas no monitoramento podem ser agrupadas nos grupos funcionais S1 e SN (PADISÁK et al., 2009; REYNOLDS et al., 2002). A abordagem dos grupos funcionais (GF) está relacionada ao agrupamento de organismos que apresentam semelhanças na resposta às condições ambientais, além de outras características semelhantes (similaridades funcionais) como a razão superfície/volume, adaptações, e até a forma corporal (BRASIL; HUSZAR, 2011; NISHIMURA et al., 2015). Desta forma seria possível analisar o ambiente e prever quais organismos fariam parte do plâncton ou vice-versa. Essa proposta foi consolidada por Reynolds et al. (2002) e aprimorada em trabalhos posteriores como o de Padisák et al. (2009).

Os táxons *Limnothrix planctonica* (KRUK et al., 2002; PADISÁK et al., 2009), *Pseudanabaena* sp. (PADISÁK et al., 2009; VARDAKA et al., 2005), gênero *Phormidium* (HUSZAR et al., 2000; PADISÁK et al., 2009) e *Cephalothrix* (que é um gênero recente originário de *Phormidium*) fazem parte do grupo funcional S1 proposto por Reynolds et al. (2002). É importante mencionar que *Leptolyngbya* e *Geitlerinema* também já foram enquadradas neste GF (PADISÁK et al., 2009). O grupo funcional S1 é típico de ambientes turbidos e com mistura da coluna d'água, sendo uma das características principais destes

organismos a tolerância às condições de deficiência de luz (PADISÁK et al., 2009; REYNOLDS et al., 2002).

Raphidiopsis mediterranea, também registrada no monitoramento, é representante do grupo funcional SN, que é típico de ambientes com limitação de luz e nitrogênio (REYNOLDS et al., 2002), além de apresentar mistura da coluna d'água e altas temperaturas (PADISÁK et al., 2009). Tais características são bem semelhantes às do grupo funcional S1, mas neste caso as cianobactérias são da ordem Nostocales, as quais conseguem fixar nitrogênio diretamente da atmosfera para suprir as limitações de N.

Os táxons encontrados já haviam sido registrados em ambientes turbidos, como lagos rasos ou rios sujeitos a mistura da coluna da água, um fator que também contribui para a baixa captação de luz pelo fitoplâncton (PADISÁK et al., 2009; REYNOLDS et al., 2002). Porém, a maior parte dos trabalhos foi realizada em lagos e em países com clima temperado (KRUK; SEGURA, 2012; MANTZOUKI et al., 2016; MISCHKE; NIXDORF, 2003; NIXDORF; MISCHKE, 2003; NÖGES; NÖGES, 1999; NÖGES et al., 2003; RÜCKER et al., 1997; SCHEFFER et al., 1997). Por isso, é importante e necessário realizar pesquisas em ecossistemas com clima tropical e em rios. Os resultados encontrados aqui reforçam que a pouca disponibilidade de luz e a mistura da coluna d'água são os fatores principais para a manutenção da ocorrência destes táxons nas proporções encontradas, independentemente do grau de trofia, clima e outros fatores.

Limnothrix planctonica apresentou os maiores valores de densidade e biovolume, além de 100% de frequência nas amostras. Um dos fatores que contribuíram para a dominância desta espécie foi a baixa penetração de luz no corpo d'água devido à presença de materiais em suspensão. Rucker et al. (1997) estudaram os fatores que controlam a dominância de espécies de *Limnothrix* (*L. redekei*, *planctonica* e *amphigranulata*) em lagos polimíticos (lagos rasos sujeitos à circulação quase diária) e concluíram que a luz é um fator chave para a dominância de *Limnothrix*, pois esta cresce de forma eficiente em ambientes com limitação de luz. Kruk e Segura (2012) concluíram que organismos filamentosos grandes com aerótopos (características de *L. planctonica*), apresentam maior tolerância à limitação de luz, e poucas perdas devido à predação pelo zooplâncton e afundamento.

Quanto ao suprimento de nutrientes, *Limnothrix* consegue competir com outras espécies (*Planktothrix agardhii*) sob limitação de fósforo (NICKLISCH et al., 1999), o mesmo não ocorre com relação ao nitrogênio (RÜCKER; WIEDNER; ZIPPEL, 1997). No que diz respeito à temperatura, as altas temperaturas da água observadas parecem ser ideais para *L. planctonica*.

Estudo com uma a linhagem *Limnothrix* AC0243 mostrou que os melhores resultados de crescimento foram obtidos em temperaturas de 35°C (DANIELS, 2016).

A análise de correspondência canônica (CCA) identificou os parâmetros ambientais que mais influenciaram a ocorrência e abundância das cianobactérias, e agrupou aquelas com maiores semelhanças (ou associadas entre si). Como a CCA é realizada com um número limitado de variáveis, foi realizada também uma correlação de Spearman para entender a interação com os demais parâmetros ambientais. O eixo CA1 foi dividido pelas duas espécies com maior densidade (*L. planctonica* e *Leptolyngbya* sp.), ambas situaram-se em um ângulo bem próximo ao eixo CA1, mas em extremidades opostas.

Na CCA, o ponto de *Limnothrix* esteve bem próximo ao da variável disco de secchi, assim como ao de microcistina. O pico de densidade desta espécie ocorreu no momento em que houve um aumento da transparência da água e da irradiação solar (Fig. 23; Tabela 8). Outras mudanças desse período foram a diminuição da precipitação mensal, turbidez, concentração de cloreto, condutividade elétrica e concentração de amônia (NH₃). É interessante ressaltar que apesar de *L. planctonica* ser altamente adaptada a ambientes aquáticos com limitação de luz, sua densidade e volume celular aumentaram quando as condições para a absorção de luz melhoraram. A fotossíntese pode ser muito mais eficiente em condições como estas com maior irradiação, além de dispor de água mais transparente (REYNOLDS, 2006) devido provavelmente à diminuição das chuvas, resultando em ambiente com menor turbidez, condutividade elétrica e concentração de cloreto e amônia. Isso porque o cloreto e amônia poderiam ser carregados do solo das margens pelas chuvas via escoamento superficial e enriquecer o rio com nutrientes (ESTEVES, 2011).

Estudo sobre o crescimento da cepa *Limnothrix* AC0243 em diferentes intensidades luminosas (PAR, radiação fotossinteticamente ativa) de 0, 80, 160, 400 e 560 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mostrou aumento nas concentrações celulares em todas as intensidades luminosas, até mesmo em 0 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ com adição de glicose. Porém, a maior concentração de células deu-se em 160 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ou seja, numa intensidade luminosa intermediária (DANIELS, 2016). O crescimento em 400 e 560 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi maior do que o das cepas cultivadas em 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. No entanto, intensidade muito altas parecem afetar o crescimento em comparação com o tratamento de 160 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Também foi observado que a densidade celular apresentou relação positiva com o tamanho do tricoma (DANIELS, 2016). Provavelmente a população de *L. planctonica* do rio Amazonas utiliza luz de forma mais eficiente na intensidade captada nos meses de junho a agosto, que é resultado da interação de fatores como maior transparência, insolação e irradiação (Fig. 24).

Sobre a associação entre *Limnothrix* e microcistina-LR na CCA, já houve registro de produção de MC-LR por cepas deste gênero (*Limnothrix* CENA 109 e 110), que será discutido na próxima seção (4.2) (FURTADO et al., 2009).

No outro extremo do CA1 observa-se *Leptolyngbya* sp. bem próxima aos parâmetros cloreto e oxigênio dissolvido, e de *Pseudanabaena* sp. Os valores de cloreto foram maiores quando a turbidez e condutividade elétrica foi maior, assim como a precipitação mensal. Mas estes parâmetros foram negativamente correlacionados a transparência da coluna d'água. Isto indica que estas espécies são mais adaptadas ao sombreamento (VIEHMAN; RICHARDSON, 2002) que é resultado também das presença de nuvens e chuvas resultando em maior escoamento superficial. Além disso, pode-se inferir que *Leptolyngbya* sp. apresenta uma tolerância a luz ainda menor que a de *Limnothrix* (DANIELS, 2016; MYERS et al., 2007).

Myers et al. (2007) estudaram a linhagem de *Leptolyngbya* (FLK1-C) isolada a partir de biofilmes de microrganismos que provocam a doença da banda negra em corais (BBD) e verificaram que os valores máximos de atividade fotossintética foram atingidos em níveis baixos de luz ($108 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Sabe-se que muitas cianobactérias filamentosas (Oscillatoriales) não toleram altas intensidades luminosas e têm a habilidade de migrar ou de se auto sombrear para manter os níveis ótimos de fotossíntese (SCHEFFER, 1997). No caso das *Leptolyngbya*, assim como de *Geitlerinema* (também encontrada no grupo microbiano causador da doença da banda negra), elas migraram para a parte inferior do biofilme em períodos de maior intensidade luminosa ($238\text{-}308 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (VIEHMAN; RICHARDSON, 2002).

Com relação aos índices de diversidade e equitabilidade, ambos apresentaram valores menores nos meses de junho e julho (Fig. 25) que refletem a dominância da comunidade por *L. planctonica*. Além da distribuição desigual dos indivíduos por espécie (equitabilidade), foram observadas poucas espécies no total. Apesar do monitoramento anual ter detectado 10 espécies de cianobactérias, o estimador de riqueza Chao2 indica que o esforço amostral do estudo foi satisfatório, uma vez que a quantidade esperada de táxons seria entre 9 e 10.

4.2 PRIMEIRA DETECÇÃO DE MICROCISTINA-LR NO RIO AMAZONAS

De forma geral, tanto a água bruta, como a água tratada apresentaram boa qualidade, estando de acordo com o recomendado pelo ministério da saúde (BRASIL, 2017). A microcistina detectada na água bruta apresentou-se em menor concentração na água tratada, e dentro dos limites legais ($<1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). A densidade de cianobactérias também esteve sempre

abaixo de 10.000 cels. mL⁻¹ na água bruta. Apenas os parâmetros ferro (2,2 ±1,26 mg. L⁻¹) e turbidez (55,5 ±41 NTU) da água tratada exibiram valores em desconformidade com a portaria nº5/MS (BRASIL, 2017). O valor máximo permitido (VMP) de ferro na saída do tratamento é de 0,3 mg. L⁻¹, mas a legislação permite ultrapassar o VMP desde que a concentração atinja até 2,4 mg. L⁻¹, entre outros critérios. Com relação à turbidez, o VMP é 5,0 uT (NTU) para o sistema de distribuição de água tratada, pois não há previsão de valor para a saída do tratamento. É importante frisar que os parâmetros ferro e turbidez estiveram fora dos padrões organolépticos de potabilidade. Os parâmetros organolépticos são aqueles que provocam estímulos sensoriais que afetam a aceitação da água para o consumo, mas não estão diretamente ligados a riscos à saúde (BRASIL, 2017). Um exemplo é a questão da água turva que não é bem recebida pela população.

Os resultados do ELISA e do marcador molecular *mcyE* foram positivos para as amostras de junho e julho de 2015. Porém, divergiram no mês de agosto, no qual houve detecção apenas pelo método de ELISA. Isto ocorreu provavelmente como resultado da manutenção da cianotoxina no ambiente aquático mesmo após o desaparecimento das cianobactérias tóxicas, situação já relatada em outros estudos (NIMPTSCH et al., 2016). O fragmento do gene *mcyE* encontrado nas amostras do rio Amazonas está presente nas cianobactérias produtoras de hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas) (JUNGBLUT; NEILAN, 2006). As microcistinas são produzidas por várias espécies de cianobactérias, ao passo que as nodularinas são exclusivas do gênero *Nodularia* (até o momento). Com o uso deste marcador é possível detectar rapidamente a presença de cianobactérias com potencial para a produção de hepatotoxinas, bastando extrair o DNA e realizar uma reação de PCR (JUNGBLUT; NEILAN, 2006).

As microcistinas são peptídeos cíclicos extremamente estáveis e resistentes à hidrólise química ou oxidação em pH próximo ao neutro, com altas temperaturas (resistindo inclusive à fervura) (SIVONEN; JONES, 1999), e podem permanecer no corpo d'água em média de 90 a 120 dias por metro de profundidade (WELKER; STEINBERG, 2000). Por outro lado, a sua degradação pode ser acelerada por fatores como a diminuição do pH do meio (SONG et al., 2007), entre outros fatores. As microcistinas são inibidoras das proteínas fosfatases 1 e 2A, de forma que a exposição aguda pode levar à falência do fígado e morte (KUIPER-GOODMAN et al., 1999), e a exposição crônica à pequenas concentrações eleva os riscos de câncer fígado. Em regiões da China (província de Jiangsu) foi observado o aumento de câncer de fígado em locais onde a concentração de microcistinas era de 0.16 µg. L⁻¹ (HITZFELD et al., 2000).

A concentração de microcistina detectada por LC/MS na amostra de água tratada de junho (0,026 µg L⁻¹) está abaixo do VMP para água de consumo que é de 1 µg.L⁻¹, previsto na

portaria de consolidação nº5 (BRASIL, 2017) e recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011). A molécula de microcistina-LR foi “atomizada” no LC/MS e apresentou padrão de fragmentação típico desta molécula, com sinal de pico m/z de 995, e fragmentos m/z de 599 e 866, assim como o tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos (CHORUS; BARTRAM, 1999; MAYUMI et al., 2006). Essas características de MC-LR foram comparadas a um padrão para validar a análise.

Este trabalho detectou pela primeira vez a presença de microcistina no Rio Amazonas. Relatos anteriores de detecção de toxinas ocorreram em rios de águas claras como o Tapajós (SÁ et al., 2010) ou em lagos (VIEIRA et al., 2003; 2005) da região Amazônica, mas não se tem notícia de registro no Rio Amazonas. A partir desses resultados surge a necessidade de criação de um plano de monitoramento para a área de influência da captação da ETAm, pois as concentrações de cianotoxinas podem aumentar ao longo do tempo e ocasionar riscos à saúde da população local (capital do estado do Amapá). Apesar do valor encontrado parecer relativamente baixo, deve-se levar em consideração o fato de que o Rio Amazonas apresenta o maior volume de água do mundo com uma vazão de aproximadamente $219 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ e duas marés diárias (SIOLI, 1984; WARD et al., 2015), sendo a área de amostragem uma zona estuarina.

Alguns autores comentaram previamente que a diluição é um dos fatores que pode reduzir a toxicidade de microcistinas em ecossistemas aquáticos (SCHMIDT et al., 2014; TSUJI et al., 2001). Porém a dispersão de poluentes (definido como um escalar em modelos de dispersão de poluentes) (PINHEIRO et al., 2008; CUNHA et al., 2012) não se dilui espacialmente de forma homogênea por toda a extensão ou largura do rio. No caso deste trecho do Amazonas ela tende a se concentrar na pluma nas margens no rio (CUNHA et al., 2012), especialmente sob os efeitos das marés semidiurnas que influenciam significativamente o transporte de plumas de poluentes e tendem a cobrir uma área relativamente extensa, em relação às margens, incluindo-se a captação da ETAm (PINHEIRO et al., 2008), dependendo da condição hidrodinâmica sazonal.

Por outro lado, existem mais de 90 tipos de microcistinas, mas poucos ocorrem com frequência e em altas concentrações (SCHMIDT et al., 2014). A variante MC-LR está entre as mais frequentes e mais tóxicas, com muitos dados toxicológicos disponíveis, motivo pelo qual é a única com valor de referência sugerido pela OMS (WHO, 2011). A exposição à microcistinas costuma ocorrer pela ingestão de água e recreação (WHO, 2011), usos preponderantes das águas do Rio Amazonas no trecho em estudo. É comum a orla de Macapá ser utilizada para a prática de esportes aquáticos como o *kitesurf* e até mesmo por jogadores de futebol durante a maré baixa (*futlama*), assim como por banhistas. A orla do Amazonas em

frente à cidade de Macapá também é muito utilizada para a prática de caminhada, corrida e contemplação da natureza, uma vez que é palco das principais praças da cidade, parques, e locais para a prática de esportes. Estes usos que ocorrem fora do ambiente aquático também podem ser prejudicados com a presença de altas concentrações de microcistinas, uma vez que a mesma pode ser propagada por aerossóis (via aérea), apresentando riscos à saúde pela inalação da toxina (CHENG et al., 2007; KOREIVIENE et al., 2014).

O uso mais importante, porém, é a captação de água para o município de Macapá. As microcistinas são endotoxinas (ROSS et al., 2006) e usualmente permanecem contidas dentro das células de cianobactérias e são liberadas pela lise celular, senescência do organismo ou por outros fatores. No tratamento de água para consumo deve-se levar em consideração que o uso de substâncias que provoquem a morte de cianobactérias podem também promover a liberação destas toxinas endocelulares, que são de difícil remoção (SIVONEN; JONES, 1999). Por este motivo, a água de captação deve ser monitorada e o tratamento deve ser alterado em condições de floração, evitando-se o uso de cloro (ZAMYADI et al., 2012) e algicidas, como o sulfato de cobre (CHORUS; BARTRAM, 1999). As células devem ser removidas ainda íntegras para evitar a potencial liberação de microcistinas durante os processos unitários de tratamento da água (MEREL et al., 2013). Os estímulos físicos que ocorrem durante o tratamento também podem promover a permeabilização ou quebra das células (Codd et al., 2005).

Por exemplo, o tratamento da ETAm é convencional com etapas de floculação, decantação, filtração, desinfecção e fluoretação. Dentre as substâncias utilizadas no tratamento estão a cal hidratada, o clorogás, fluorsilicato de sódio, polímero não iônico LP 20 e o sulfato de alumínio (CAESA, 2018). Sobre este último, existem estudos sobre a sua interação com microcistinas no tratamento de água que mostram a eficiência do sulfato de alumínio na remoção de microcistinas com concentrações de 0,1-1 mg. L⁻¹ (BADAR et al., 2015). A adição de sulfato de alumínio remove os nutrientes da coluna d'água e também reduz o biovolume de cianobactérias, de modo que possivelmente reduz também as concentrações de microcistinas (HARRIS et al., 2014).

Nos meses em que foi observada a detecção de microcistina, foram registrados os seguintes táxons: *Limnothrix planctonica*, *Leptolyngbya* sp., *Pseudanabaena* sp., *R. mediterranea*, *Alkalinema pantanalense*, *C. lacustris* e Morfoespécie 1. Dentre estes, os maiores valores de densidade foram de *L. planctonica*, *Leptolyngbya* sp., e *A. pantanalense* (Fig. 7). Dos gêneros citados, já houve registro de produção de microcistinas em isolados de *Limnothrix* sp. (CENA 109 e CENA 110) obtidos de um lagoa de estabilização (FURTADO et al., 2009). Além disso, estudos com a linhagem australiana *Limnothrix* AC0243 mostraram que

este gênero é capaz de produzir uma nova toxina (Limnothrixin), para qual ainda não há kits comerciais (BERNARD et al., 2011; HUMPAGE et al., 2012; WHAN, 2015), e apresenta características de espécies invasoras, sendo fortes competidoras em ambientes dinâmicos como os estuários (DANIELS, 2016).

Há registros de produção de microcistina-LR também em culturas de *Leptolyngbya* obtidas no Brasil a partir de reservatório para recreação em São Paulo (GENUÁRIO et al., 2016). Outro caso de detecção de produção de MC-LR por *Leptolyngbya* ocorreu em linhagens obtidas de sistema de tratamento de esgoto (lagoa de estabilização) (FURTADO et al., 2009). Também há registros de toxicidade desta espécie no exterior. *Leptolyngbya* sp. e *Geitlerinema* sp. foram obtidas de biofilmes de microrganismos de coral (doença black band disease-BBD) de Bahamas e Florida Keys e confirmou-se por análises em HPLC/MS e com detecção do marcador *mcyA* que tais cepas produziam microcistina (RICHARDSON et al., 2007). *Geitlerinema splendidum* CCIBt 3223 coletada no Brasil também produziu o efeito tóxicos de inibição da atividade de acetilcolinesterase em ratos que foi irreversível, porém não produziu MC-LR (CARVALHO et al., 2013).

Quanto aos demais gêneros, *Pseudanabaena* foi considerada um dos gêneros produtores de toxinas mais frequentes (CHORUS; BARTRAM, 1999) e possui linhagens produtoras de microcistinas (MARSALEK et al., 2003; OUDRA et al., 2002). *Raphidiopsis mediterranea* já apresentou cepas produtoras de outras toxinas (MOHAMED, 2007), assim como atualmente este gênero engloba o gênero *Cylindrospermopsis*, com a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (AGUILERA et al., 2018), que é tóxica, invasora, e amplamente distribuída (CHORUS; BARTRAM, 1999; KOMÁREK, 2013). Para os gêneros *Alkalinema* e *Cephalothrix* não foram encontradas citações na literatura relacionadas à produção de cianotoxinas. Porém, *Alkalinema* (VAZ et al., 2015) e *Cephalothrix* (MALONE et al., 2015) são gêneros relativamente novos e ainda pouco estudados. Uma consideração interessante é que *Alkalinema* apresentou comportamento semelhante ao de *Limnothrix* ao longo deste estudo. Portanto, este táxon também pode ser um dos responsáveis pela produção de microcistina-LR.

A análise de correlação de Spearman mostrou que existe forte correlação positiva entre a concentração de microcistina com a de *Limnothrix* e com a vazão do Rio Amazonas, assim como apresentou correlação negativa com *Leptolyngbya* e turbidez. Isso indica que microcistina-LR é produzida mesmo em condições de maior vazão, e consequentemente maior velocidade e turbulência (WARD et al., 2018). Estas condições dificultam a manutenção e crescimento de organismos planctônicos fotoautotróficos na coluna d'água, assim como a produtividade do ecossistema (DOKULIL, 1994; REYNOLDS et al., 1994; REYNOLDS,

2006). Porém, deve-se levar em consideração que mesmo na máxima vazão, o fluxo de água pelo canal do rio não ocorre de forma homogênea (CUNHA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2008). Desta forma, uma parte da água provavelmente permanece por um tempo maior nas margens permitindo a manutenção das populações fitoplanctônicas (REYNOLDS et al., 1994). Ainda, a menor turbidez observada durante a detecção de microcistina é um fator que contribui com as cianobactérias por facilitar o acesso à luz (DOKULIL, 1994).

No caso do gênero *Limnothrix*, cuja forte relação com microcistina foi observável tanto na análise de correlação quanto na CCA, o seu sucesso (pico de crescimento) durante a vazão máxima do Rio Amazonas foi facilitado por suas características morfológicas e fisiológicas como a produção de aerótopos que permitem a diminuição da sua gravidade específica (PADISÁK et al., 2003) e migração na coluna d'água (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005), flutuação com pouco afundamento devido a forma corporal cilíndrica com alta razão S/V (KRUK et al., 2010), provável hábito plânctônico e bentônico e capacidade de se aderir em substratos (BERNARD et al., 2011; DANIELS, 2016), além da presença de pigmentos carotenoides (BERNARD et al., 2011; EGELAND, 2011) que são associados a mecanismos de fotoproteção (KIRILOVSKY; KERFELD, 2012). A forma de *L. planctonica* e outras Oscillatoriales as torna excelente captadoras de luz- *antenas de luz* (REYNOLDS, 2006, pag 191). Portanto, é bastante provável que a espécie *L. planctonica* seja a produtora de microcistina-LR observada na água bruta do Rio Amazonas.

Apesar dos fortes indícios, não se pode afirmar que *L. planctonica* ou uma das cianobactérias encontradas no monitoramento da ETAm foi a responsável pela produção de microcistina-LR, uma vez que a detecção do marcador molecular relacionado a produção da cianotoxina (*mcyE*) ocorreu em uma amostra ambiental, na qual podem existir muitas outras espécies, inclusive cianobactérias pico ou nanoplanctônicas que dificilmente seriam observadas nas contagens em microscópio invertido. Este problema já foi relatado em outros estudos, como o de Genuário et al. (2016). Isso se deve tanto ao aumento de 400x usual para a análise em microscópio invertido, como também pela dificuldade de processar amostras de rios de água branca devido à grande quantidade de sólidos que dificultam a visualização dos organismos planctônicos. Essa dificuldade de análise já foi relatada por Fisher (1978) no Rio Solimões em que considerou impossível a quantificação do fitoplâncton deste rio devido à baixa quantidade de células e alta quantidade de material particulado. Wood (1966), em pesquisa no Amazonas, também mencionou a mesma dificuldade de contagem dos organismos devido à grande carga de sedimentos.

Para vincular uma espécie à microcistina-LR seria necessário proceder o isolamento das cianobactérias e então buscar pelo marcador relacionado à cianotoxinas em cada linhagem individual de cianobactérias (MOREIRA et al., 2014). Esse processo foi realizado com linhagens isoladas da captação de água da ETAm (OLIVEIRA et al., 2019), porém nenhuma delas apresentou potencial para a produção das toxinas microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina. De qualquer forma, a toxina (substância química) foi detectada pelos métodos de ELISA e LC-MS, indicando que alguma linhagem “ainda desconhecida” de cianobactéria do Amazonas está produzindo tal metabólito.

5 CONCLUSÕES

Foi observada uma baixa quantidade de espécies de cianobactérias ao longo do monitoramento de 13 meses. Praticamente os mesmos táxons ocorreram ao longo do ano, com variações nas suas densidades. Todas estas espécies observadas no Rio Amazonas são filamentosas e, conseqüentemente, sua elevada razão superfície/volume (S/V), possibilita uma maior flutuabilidade na coluna d'água, evitando o afundamento, e aumentando as chances das cianobactérias terem acesso à zona eufótica. Além disso, filamentos cilíndricos dificilmente são predados pelo zooplâncton. Todas essas características contribuem para uma maior estabilidade desse grupo em rio de águas brancas, como o Amazonas.

Este estudo revelou a primeira detecção de microcistina-LR no Rio Amazonas. Contudo, a densidade de cianobactérias e concentração de cianotoxinas foram baixas ao longo do período de estudo. Apenas no trimestre junho a agosto de 2015 ocorreu maior pico de *L. planctonica* e detecção de microcistina-LR. Porém, ambos parâmetros apresentaram-se abaixo dos limites da Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

As análises realizadas indicam fortemente que linhagens de *L. planctonica* produziram a toxina microcistina-LR detectada nas águas do Rio Amazonas. Porém, não é possível confirmar tal informação, uma vez que a detecção pelos métodos químicos e moleculares ocorreu em amostras ambientais (com a presença de várias espécies).

A partir dos dados obtidos, conclui-se que seria melhor garantir a segurança e saúde da população a médio e longo prazos, dadas as características de baixo nível de saneamento básico do município de Macapá. Esta sugestão está embasada no fato de que a cidade apresenta elevados níveis de poluição por esgotos (nutrientes P e N, principalmente) e é também

abastecida com esta mesma água bruta do Rio Amazonas, além das características das cianobactérias presentes serem bastante estáveis, de forma que tais eventos de produção de toxinas apresentam alta probabilidade de voltar a ocorrer. A detecção de eventos com produção de cianotoxinas somente será possível, contudo, se houver o monitoramento adequado, de modo que ações preventivas possam ser implementadas.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, A.; GÓMEZ, E. B.; KAŠTOVSKÝ, J.; ECHENIQUE, R. O.; SALERNO, G. L. The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). **Phycologia**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 130–146, 2018.

ANA. **Séries Históricas de Estações.** Disponível em: http://www.snirh.gov.br/hidroweb/publico/medicoes_historicas_abas.jsf. Acesso em 29 abr. 2016.

APHA-AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 10200 Plankton: 10200 B: Sample Collection. **Standard Methods for the Examination and Wastewater**, [s. l.], n. 10000, p. 2–31, 2005.

BADAR, M; KHOKHAR, I.; KHAN, S. S.; MAHMOOD-URRAHMAN; BATOOL, F.; CH, YASIR. **Removal of cyanobacterial toxins from drinking water sources by aluminium sulphate treatment.** Brazilian Journal of Biological Sciences, v. 2, n. 3, p. 135-145, 2015.

BDMEP/INMET. **BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa.** Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em 29 abr. 2016.

BERNARD, C.; FROSCIO, S.; CAMPBELL, R.; MONIS, P.; HUMPAGE, A.; FABBRO, L. Novel toxic effects associated with a tropical Limnothrix/Geitlerinema-like cyanobacterium. **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 260–270, 2011.

BRASIL. **Avaliação da Vigilância da Qualidade da Água no Estado do Amapá – Ano base 2011.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 11p, 2012.

BRASIL. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Portaria de Consolidação** Federal nº 5. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 28 set. 2017.

BRASIL, J.; HUSZAR, V. L. M. o papel dos traços funcionais Na Ecologia do fitoplâncton continental. [s. l.], v. 15, n. 4, p. 799–834, 2011.

BRITO, Daímio Chaves. **Balanço de carbono e modelagem de fluxos biogeoquímicos no continuum do estuário amazônico.** 2013. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical)-Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 126p., 2013.

BRITO, José Dinaldo de Miranda. Comunicação pessoal, 2014.

CAESA. **Informações CAESA - ETAM.** Destinatário: Elane Domênica Cunha de Oliveira. [S. l.], 14 nov. 2018 mensagem eletrônica.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, [s. l.], p. 445–459, 1992.

CARVALHO, L. R.; COSTA-NEVES, A.; GEANNE, A. A.; BRUNETTI, R. L.; HENTSCHEKE, G. S.; MALONE, F. S.; TORRES, L. M. B.; ANNA, C. L. S. Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: in vivo and in vitro aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 471–480, 2013.

CESTEB, C. Norma Técnica L5.303 Fitoplâncton de água doce: Métodos qualitativo e quantitativo. [s. l.], v. 04, n. 502, p. 1–7, 2012.

CHENG, Y. S.; ZHOU, Y.; IRVIN, C. M.; KIRKPATRICK, B. Characterization of Aerosols Containing Microcystin. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 5, p. 136–150, 2007.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. Londres: E & FN Spon, 1999. 400 p.

CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 203, n. 3 SPEC. ISS., p. 264–272, 2005.

CPTEC/INPE. **Divisão de satélites e sistemas ambientais**. Disponível em: <http://satelite.cptec.inpe.br/radiacao/>. Acesso em 29 abr. 2016.

COSTA, W. J. P.; MARTINS, M. H. A.; SILVA, M. S.; TORRES, A. M.; TAKIYAMA, L. R.; CUNHA, A. C.; SILVA, A. Q.. Recursos Hídricos Superficiais. In: **Diagnóstico Sócio-Ambiental Participativo do Setor Costeiro Estuarino do Estado do Amapá**. Macapá: IÊPA, v. 1, p. 1-14, 2004.

CUNHA, A.; CUNHA, H.; JÚNIOR, A. C.; DANIEL, L.; SCHULZ, H. Qualidade microbiológica da água em rios de áreas urbanas e periurbanas no baixo amazonas: o caso do Amapá. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 322–328, 2004.

CUNHA, A. C.; CUNHA, H. F. A.; SOUZA, J. A.; NAZARÉ, A. S.; PANTOJA, S. Monitoramento de Águas Superficiais em Rios Estuarinos Poluição do Estado do Amapá sob Poluição Microbiológica. **Bol. Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 1, p. 191–199, 2005.

CUNHA, A. C.; BRITO, D. C.; JUNIOR, A. C. B.; PINHEIRO, L. A. dos R.; CUNHA, H. F. A.; SANTOS, E.; KRUSCHE, A. V. Challenges and Solutions for Hydrodynamic and Water Quality in Rivers in the Amazon Basin. **Hydrodynamics - Natural Water Bodies**, v. 3, p. 67–88, 2012.

CUNHA, A. C.; MUSTIN, K.; DOS SANTOS, E. S.; DOS SANTOS, É. W. G.; GUEDES, M. C.; CUNHA, H. F. A.; ROSMAN, P. C. C.; STERNBERG, L. da S. L. Hydrodynamics and seed dispersal in the lower Amazon. **Freshwater Biology**, [s. l.], v. 62, n. 10, p. 1721–1729, 2017.

CUNHA, A. C.; DA SILVEIRA LOBO STERNBERG, L. Using stable isotopes ^{18}O and ^2H of lake water and biogeochemical analysis to identify factors affecting water quality in four estuarine Amazonian shallow lakes. **Hydrological Processes**, [s. l.], 2018.

DAMASCENO, M. C. S.; RIBEIRO, H. M. C1; TAKIYAMA, L. R.; DE PAULA, M. T. **Avaliação sazonal da qualidade das águas superficiais do Rio Amazonas na orla da cidade de Macapá, Amapá, Brasil.** *Ambiente & Água*, v. 10, n. 3, p. 598-613, 2015.

DANIELS, Olivia. **Autecology, allelopathy and toxicity of *Limnothrix* (strain AC0243): Multiple-organism studies using laboratory cultures.** 2016. Doutorado. Faculdade de Ciencias Médicas e Aplicadas, Universidade CQ, Australia, 312p.,2016.

DEMOTT, W. R. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. [s. l.], **Limnology and Oceanography**, v. 36, n. 7, p. 1346–1357, 1991.

DOKULIL, M. T. Environmental control of phytoplankton productivity in turbulent turbid systems. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 289, n. 1992, p. 65–72, 1994.

EGELAND. **Pigments and toxins of harmful algae (including algae for which pigment information was not found).** In: *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, Cambridge University Press. 2011.

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de **Limnologia**. 3. ed., Rio de Janeiro: Interciência. ,p. 826., 2011.

FALCONER, I.; BARTRAM, J.; CHORUS, I.; KUIPER-GOODMAN, T.; UTKILEN, H.; BURCH, M.; CODD, G. Safe levels and safe practices. In: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences , monitoring and management.** E & FN Spon, 1999. p.161-182.

FERRÃO-FILHO, A. S.; CAROLINA, M.; SOARES, S.; FREITAS, V.; MAGALHÃES, D.; AZEVEDO, S. M. F. O. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 2084–2093, 2010.

FERNANDES, V. D. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B. De; DE, B. D. Â. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. *Oecologia Australis*, v. 13, n. 2, p. 247–258, 2009.

FISHER, T. R. Plâncton e produção primária em sistemas aquáticos da bacia da Amazônia Central (*) *Acta Amazônica*, v.8,n.4,p.43-54, 1978.

FUJITA, Y.; TAKAGI, H.; HASE, T. Identification of the chlB gene and the gene product essential for the light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 313–323, 1996.

FURTADO, A. L. F. F.; CALIJURI, M. D. C.; LORENZI, A. S.; HONDA, R. Y.; GENUÁRIO, D. B.; FIORE, M. F. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 627, n. 1, p. 195–209, 2009.

GENUÁRIO, D. B.; LORENZI, A. S.; AGUIJARO, L. F.; ISAAC, R. de L.; AZEVEDO, M. T. de P.; CANTÚSIO NETO, R.; FIORE, M. F. Cyanobacterial community and microcystin production in a recreational reservoir with constant *Microcystis* blooms. **Hydrobiologia**, [s. l.],

v. 779, n. 1, p. 105–125, 2016.

HARRIS, T. D.; WILHELM, F. M.; GRAHAM, J. L.; LOFTIN, K. A.; HARRIS, T. D.; WILHELM, F. M.; GRAHAM, J. L.; LOFTIN, K. A. Lake and Reservoir Management Experimental additions of aluminum sulfate and ammonium nitrate to in situ mesocosms to reduce cyanobacterial biovolume and microcystin concentration Experimental additions of aluminum sulfate and ammonium nitrate to in situ. **Lake and Reservoir Management**, v. 2381, 2014.

HILLEBRAND, H.; KIRSCHTEL, D.; OCEANOGRAPHIC, I.; BOX, P. O. BIOVOLUME CALCULATION FOR PELAGIC AND BENTHIC MICROALGAE 1 Claus-Dieter Du. [s. l.], v. 424, p. 403–424, 1999.

HIRAIDE, Y.; OSHIMA, K.; FUJISAWA, T.; UESAKA, K.; HIROSE, Y.; TSUJIMOTO, R.; YAMAMOTO, H.; OKAMOTO, S.; NAKAMURA, Y.; TERAUCHI, K.; OMATA, T.; IHARA, K.; HATTORI, M.; FUJITA, Y. Loss of Cytochrome c M Stimulates Cyanobacterial Heterotrophic Growth in the Dark. [s. l.], v. 56, n. November 2014, p. 334–345, 2015.

HISBERGUES, M.; CHRISTIANSEN, G.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 180, n. 6, p. 402–410, 2003.

HUMPAGE, A.; FALCONER, I.; BERNARD, C.; FROSCIO, S.; FABBRO, L. Toxicity of the cyanobacterium *Limnithrix* AC0243 to male Balb/c mice. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1576–1583, 2012.

HUSZAR, V. L. M.; SILVA, L. H. S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P.; ANNA, C. L. S. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. **Hydrobiologia**, v. 424, p. 67–77, 2000.

JUNGBLUT, A. D.; NEILAN, B. A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 185, n. 2, p. 107–114, 2006.

JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F.; SCHÖNGART, J.; COHN-HAFT, M.; ADENEY, J. M.; WITTMANN, F. A classification of major naturally-occurring amazonian lowland wetlands. **Wetlands**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 623–640, 2011.

JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F.; LOURIVAL, R.; WITTMANN, F.; KANDUS, P.; LACERDA, L. D.; BOZELLI, R. L.; ESTEVES, F. A.; NUNES DA CUNHA, C.; MALTCHIK, L.; SCHÖNGART, J.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; AGOSTINHO, A. A. Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and protection. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 5–22, 2014.

KIRILOVSKY, D.; KERFELD, C. A. The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1817, n. 1, p. 158–166, 2012.

KOMAREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota 1. Chroococcales**. [s.l.: s.n.] Springer Spektrum, 1999.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Cyanoprokaryota, Part 2: Oscillatoriales**. München: Elsevier, 2005.

KOMÁREK, J. **Cyanoprokaryota. 3. Teil: Heterocytous Genera**. Berlin: Springer Spektrum, 2013.

KOMÁREK, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. **European Journal of Phycology**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 346–353, 2016.

KOREIVIEN, J.; ANNE, O.; KASPEROVICIENE, J.; BURSKEYTE, V. Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 186, p. 4443–4459, 2014.

KRUK, C.; HUSZAR, V. L. M.; PEETERS, E. T. H. M.; BONILLA, S.; COSTA, L.; LÜRLING, M.; REYNOLDS, C. S.; SCHEFFER, M. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. **Freshwater Biology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 614–627, 2010.

KRUK, C.; MAZZEO, N.; LACEROT, G. & REYNOLDS, C.S. Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. **Journal of Plankton Research**, v. 24, p. 1191–1216, 2002.

KRUK, C.; SEGURA, A. M. The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia*, v. 698, p. 191–202, 2012.

LAMPARELLI, M. C.; TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L.; AMAZONAS, P. D.; HALPEK, L. L.; CARMO, C. M. De; ROSAL, C. **Atlas De Cianobactérias Da Bacia Do Alto Tietê**. [s.l.: s.n.].2014

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L.; LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. **Numerical ecology**. [s.l.] : Elsevier, 2012.

LOBO, E.; LEIGHTON, G. Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctonicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la zona central de Chile. **Rev. Bio. Mar**, [s. l.], p. 1–29, 1986.

LOPES, V. R.; RAMOS, V.; MARTINS, A.; SOUSA, M.; WELKER, M.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V. M. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 73, p. 7–16, 2012.

MALONE, C. F. da S.; RIGONATO, J.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L.; WILMOTTE, A.; FIORE, M. F.; SANT'ANNA, C. L. *Cephalothrix* gen. nov. (Cyanobacteria): Towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 9, p. 2993–3007, 2015.

MANTZOUKI, E.; VISSER, P. M.; BORMANS, M.; IBELINGS, B. W. Understanding the key ecological traits of cyanobacteria as a basis for their management and control in changing lakes. **Aquatic Ecology**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 333–350, 2016.

- MARSALEK, B.; BLAHA, L.; BABICA, P. Analyses of microcystins in the biomass of *Pseudanabaena limnetica* collected in Znojmo reservoir. **Czech Phycology**, [s. l.], v. 3, p. 195–197, 2003.
- MAYUMI, T.; KATO, H.; IMANISHI, S.; KAWASAKI, Y.; HASEGAWA, M.; HARADA, K. Structural Characterization of Microcystins by LC/MS/MS under Ion Trap Conditions. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 11, p. 710–719, 2006.
- MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**, v. 59, p. 303–27, 2013.
- MERILUOTO, J.; CODD, G. A. **Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**. [s.l.: s.n.], p. 164, 2005
- MISCHKE, U.; NIXDORF, B. Equilibrium phase conditions in shallow German lakes: How Cyanoprokaryota species establish a steady state phase in late summer. [s. l.], p. 123–132, 2003.
- MOHAMED, Z. A. First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], 2007.
- MOUNTFORT, D. O.; HOLLAND, P.; SPROSEN, J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. **Toxicon**, v. 45, p. 199–206, 2005.
- MOREIRA, C.; RAMOS, V.; AZEVEDO, J.; VASCONCELOS, V. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8073–8082, 2014.
- MSAGATI, T.; SIAME, B.; SHUSHU, D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 382–397, 2006.
- MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. **Cyanobacteria in the environment. In: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. 1999.
- MYERS, J. L.; SEKAR, R.; RICHARDSON, L. L. Molecular detection and ecological significance of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Leptolyngbya* in black band disease of corals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5173–5182, 2007.
- NASELLI-FLORES, L.; BARONE, R. Pluriannual morphological variability of phytoplankton in a highly productive Mediterranean reservoir (Lake Arancio, Southwestern Sicily). **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 578, n. 1, p. 87–95, 2007.
- NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L. L.; HAWKINS, P. R.; COX, P. T.; GOODMAN, A. E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International journal of systematic bacteriology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 693–697, 1997.

NICKLISCH, A. Competition between the Cyanobacterium *Limnithrix redekei* and Some Spring Species of Diatoms under P-Limitation. **International Review of Hydrobiology**, [s. l.], v. 3, p. 233–241, 1999.

NIMPTSCH, J.; WOELFL, S.; OSORIO, S.; VALENZUELA, J.; MOREIRA, C.; RAMOS, V.; CASTELO-BRANCO, R.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. First record of toxins associated with cyanobacterial blooms in oligotrophic North Patagonian lakes of Chile-a genomic approach. **International Review of Hydrobiology**, [s. l.], v. 101, n. 1–2, p. 57–68, 2016.

NIXDORF, B.; MISCHKE, U. Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes – an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales. [s. l.], p. 111–121, 2003.

NISHIMURA, P.Y.; MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPÊO, M. O estudo do fitoplâncton com base nos grupos funcionais: origens e um vislumbre sobre seu futuro. In **Grupos funcionais do fitoplâncton. Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Universidade de São Paulo, v. 1, part. 1, p. 120-130. 2015.

NÖGES, T.; P. NÖGES. The effect of extreme water-level decrease on hydrochemistry and phytoplankton in a shallow eutrophic lake. **Hydrobiologia** v. 408/409, p. 277–283. , 1999.

NÖGES, T.; P. NÖGES; R. LAUGASTE. Water level as the mediator between climate change and phytoplankton composition in a large shallow temperate lake. **Hydrobiologia**, v. 506, p. 257–263, 2003.

NUBEL, U.; MUYZER, G.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. **Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 8, p. 3327–3332, 1997.

NIMPTSCH, J.; WOELFL, S.; OSORIO, S.; VALENZUELA, J.; MOREIRA, C.; RAMOS, V.; CASTELO-BRANCO, R.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. First record of toxins associated with cyanobacterial blooms in oligotrophic North Patagonian lakes of Chile-a genomic approach. **International Review of Hydrobiology**, [s. l.], v. 101, n. 1–2, p. 57–68, 2016.

OKSANEN, J. Constrained ordination: tutorial with R and vegan. **R- package Vegan**, [s. l.], p. 1–10, 2012.

OLIVEIRA, E. D. C.; CUNHA, A. C.; SILVA, N. B.; CASTELO-BRANCO, R., MORAIS, J.; SCHNEIDER, M. P. C.; FAUSTINO, S. M. M.; RAMOS, V.; VASCONCELOS, V. Morphological and molecular characterization of cyanobacterial isolates from the mouth of the Amazon River. **Phytotaxa**, v. 387, n. 4, p. 269-288, 2019.

OUDDA, B.; LOUDIKI, M.; VASCONCELOS, V.; SABOUR, B.; SBIYYAA, B.; OUFDOU, K.; MEZRIOUI, N. Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. **Environmental Toxicology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 32–39, 2002.

PADISÁK, J.; SORÓCZKI-PINTÉR, É.; REZNER, Z. Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton - An experimental study. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 500, p. 243–257, 2003.

PADISÁK, J.; CROSSETTI, L. O.; NASELLI-FLORES, L. Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. **Hydrobiologia**, [s. l.], p. 1–19, 2009.

PINHEIRO, L. A. R.; CUNHA, A. C.; CUNHA, H. F. A. C.; SOUZA, L. R.; BILHALVA, J. S.; BRITO, D. C.; BRASIL JÚNIOR, A. C. P. Aplicação de simulação computacional à dispersão de poluentes no baixo rio Amazonas: Potenciais riscos à captação de água na orla de Macapá-Amapá. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 7, p. 27–44, 2008.

RANTALA-YLINEN, A.; KÄNÄ, S.; WANG, H.; ROUHIAINEN, L.; WAHLSTEN, M.; RIZZI, E.; BERG, K.; GUGGER, M.; SIVONEN, K. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 20, p. 7271–7278, 2011.

REYNOLDS, C. S.; PADISDK, J. Are phytoplankton dynamics in rivers so different from those in shallow lakes? [s. l.], p. 1–7, 1994.

REYNOLDS, C. S.; HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 417–428, 2002.

REYNOLDS, C. **The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation)**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. *E-book*. Disponível em: doi:10.1017/CBO9780511542145(2006).

REYNOLDS, C. S.; PADISDK, J. Are phytoplankton dynamics in rivers so different from those in shallow lakes? **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 289, p. 1–7, 1994.

RICHARDSON, L. L.; SEKAR, R.; MYERS, J. L.; GANTAR, M.; VOSS, J. D.; KACZMARSKY, L.; REMILY, E. R.; BOYER, G. L.; ZIMBA, P. V. The presence of the cyanobacterial toxin microcystin in black band disease of corals. **FEMS**, [s. l.], v. 272, p. 182–187, 2007.

ROSS, C.; SANTIAGO-VÁZQUEZ, L.; PAUL, V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 66–73, 2006.

RÜCKER, J.; WIEDNER, C.; ZIPPEL, P. Factors controlling the dominance of *Planktothrix agardhii* and *Limnithrix redekei* in eutrophic shallow lakes. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 342/343, p. 107–115, 1997.

SANT' ANNA, C. L., AZEVEDO, M. T. P., AGUJARO, L. F., CARVALHO, M. C., CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R. **Manual Ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Rima, pp. 58, 2006.

SANT'ANNA, C. L., TUCCI, A., AZEVEDO, M.T.P., MELCHER, S.S., WERNER, V.R., MALONE, C.F.S., ROSSINI, E.F., JACINAVICIUS, F.R., HENTSCHEKE, G.S., OSTI, J.A.S., SANTOS, K.R.S., GAMA-JÚNIOR, W.A., ROSAL C.; ADAME, G. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras**. Instituto de Botânica, São Paulo. p. 175, 2012.

SCHEFFER, M.; RINALDI, S.; GRAGNANI, A.; MUR, L. R.; VAN NES, E. H. On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow , turbid lakes. **Ecology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 272–282, 1997.

SCHEMBRI, M. a; NEILAN, B. a; SAINT, C. P. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental toxicology**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 413–421, 2001.

SCHMIDT, J. R.; WILHELM, S. W.; BOYER, G. L. The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring. **Toxins**, [s. l.], v. 6, p. 3354–3387, 2014.

SCHOPF, J. W. **Cradle of life, the discovery of earth's earliest fossils**. Princeton University Press, Princeton, p. 367, 1999, apud WHITON; POTTS, 2012 **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.

SILVEIRA-JÚNIOR, Aivaldo Martins da. **Composição e biomassa microfitoplanctônica associadas a variáveis físico e químicas em dois transectos da zona estuarina do Rio Amazonas (Amapá, Amazônia, Brasil)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 92p., 2012.

SIOLI, H. **The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types**. In: The Amazon [s.l.] : Springer, Dordrecht, p. 127–165, 1984.

SIVONEN, K.; JONES, J. **Toxic Cyanobacteria in Water. In: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. 1999.

SONG, W.; BARDOWELL, S.; O SHEA, K. E. O. Mechanistic Study and the Influence of Oxygen on the Photosensitized Transformations of Microcystins (Cyanotoxins). **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 15, p. 5336–5341, 2007.

SUN, J. U. N.; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. [s. l.], **Journal of Plankton Research**, v. 25, 2003.

TER BRAAK, C. J. F.; VERDONSCHOT, P. F. M. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. **Aquatic Sciences**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 255–289, 1995.

TSUJI, K.; MASUI, H.; UEMURA, H.; MORI, Y.; HARADA, K. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. **Toxicon**, [s. l.], v. 39, p. 687–692, 2001.

VAITOMAA, Jaana. **The Effects of Environmental Factors on Biomass and Microcystin Production by the Freshwater Cyanobacterial Genera Microcystis and Anabaena** Department of Applied Chemistry and Microbiology. 2006. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia) – Departamento de microbiologia e química aplicada, Universidade de Helsínquia, Helsínquia , 2006.

VARDAKA, E., M. MOUSTAKA–GOUNI, C. M. COOK; T. LAÑARAS. Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies. **Journal of Applied Phycology** 17: 391–401. 2005.

VAZ, M. G. M. V.; GENUÁRIO, D. B.; ANDREOTE, A. P. D.; MALONE, C. F. S.; SANT'ANNA, C. L.; BARBIERO, L.; FIORE, M. F. Pantanalinema gen. nov. and Alkalinema gen. nov.: Novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 298–308, 2015.

VIEHMAN, T. S.; RICHARDSON, L. L. **Motility patterns of *Beggiatoa* and *Phormidium corallyticum* in black band disease. In Proceedings of the Ninth International Coral Reef Symposium, vol. 2. Bali, Indonesia. P. 1251-1255, 2002.**

WARD, N. D.; KRUSCHE, A. V; SAWAKUCHI, H. O.; BRITO, D. C.; CUNHA, A. C.; MAURO, J.; MOURA, S.; YAGER, P. L.; KEIL, R. G.; RICHEY, J. E. The compositional evolution of dissolved and particulate organic matter along the lower Amazon River — Óbidos to the ocean. **Marine Chemistry**, [s. l.], v. 177, p. 244–256, 2015.

WARD, N. D.; SAWAKUCHI, H. O.; NEU, V.; LESS, D. F. S.; VALERIO, A. M.; CUNHA, A. C.; KAMPEL, M.; BIANCHI, T. S.; KRUSCHE, A. V; RICHEY, J. E.; KEIL, R. G. Velocity-amplified microbial respiration rates in the lower Amazon River. **Limnology and Oceanography Letters**, 2018.

WELKER, M.; STEINBERG, C. Rates of Humic Substance Photosensitized Degradation of Microcystin-LR in Natural Waters. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 34, p. 3415–3419, 2000.

WHAN, P. M. **Investigation Of A Novel Toxin Produced by A *Limnothrix* Cyanobacteria**. 2015. Tese de Doutorado- Departamento de Química, Universidade de Adelaide, 2015.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 1–13.

WHO. **Guidelines for safe recreational water environments**. [s. l.], v. 2, p. 3505–3518, 2003.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. [s. l.], v. 38, n. 3, p. 104–108, 2011.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum**. Genebra. P. 631, 2017.

WOOD, E. J. F. A Phytoplankton Study of the Amazon Region. **Bulletin of Marine Science**. 1966.

ZAMYADI, A.; MACLEOD, S. L.; FAN, Y.; MCQUAID, N.; DORNER, S.; SAUVÉ, S.; PRÉVOST, M. Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: A monitoring and treatment challenge. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1511–1523, 2012.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Neste estudo foi possível isolar 14 linhagens de cianobactérias pertencentes aos gêneros *Alkalinema*, *Cephalothrix*, *Limnothrix*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, Nostocales e *Leptolyngbya*. Apenas esta última foi obtida na água tratada, as demais foram isoladas a partir da água bruta do Rio Amazonas. Nenhuma delas apresentou potencial para a produção de microcistina, saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina. Entretanto, podem existir outras linhagens destas mesmas espécies com genes relacionados a produção de microcistinas na área da captação de água do Rio Amazonas.
- As cepas de cianobactérias isoladas foram identificadas por uma abordagem polifásica, usando combinação de análises morfológicas, moleculares, filogenéticas, comportamento em cultura, análise de toxicidade e dados ecológicos. Este foi o primeiro trabalho a utilizar tal abordagem na Amazônia Oriental. A partir dos resultados deste estudo a identificação das espécies poderá ser realizada com maior precisão. Mesmo a análise morfológica permitirá a identificação de espécies na área de captação, uma vez que foram observadas poucas espécies (10) na área de estudo ao longo de 13 amostragens mensais. Das 10 espécies observadas no monitoramento, 5 (50%) foram isoladas e caracterizadas. Esses dados devem ser utilizados como ponto de partida para o início de monitoramento sistemático por parte da Companhia de Águas e Esgoto do Estado do Amapá (CAESA).
- A análise filogenética dos isolados forneceu material que pode contribuir para a revisão da taxonomia dos gêneros *Limnothrix* e *Pseudanabaena*. Tais resultados reforçam a hipótese de que a linhagem *L. redekei* NIVA-CYA 227/1 (cepa tipo do gênero *Limnothrix*) deva ser transferida para o gênero *Pseudanabaena*, uma vez que este gênero foi descrito antes de *Limnothrix*. Já o clado que possui apenas cepas de *Limnothrix* spp. (com o qual as cepas de *Limnothrix* deste estudo se agrupou) deve permanecer sob o gênero *Limnothrix*.
- A maior parte dos isolados obtidos representam primeiros registros para a Amazônia Oriental, particularmente para o estado do Amapá, de forma a expandir a distribuição geográfica das espécies identificadas.

- Este estudo revelou a primeira detecção de microcistina-LR no Rio Amazonas.
- A densidade de cianobactérias e concentração de microcistina-LR observadas foram baixas ao longo do período de estudo. Apenas no trimestre junho a agosto de 2015 ocorreu pico de *L. planctonica*. (± 1000 cels. mL⁻¹) e detecção de microcistina-LR (máx 2,1 µg.L⁻¹), porém ambos parâmetros apresentaram-se abaixo dos limites da Portaria de Consolidação nº5 do Ministério da Saúde, que é de 10.000 cels. mL⁻¹ para cianobactérias, e 1 µg.L⁻¹ para microcistinas na água tratada.
- A detecção de microcistina nas amostras ambientais foi corroborada pelos métodos de ELISA, LC/MS e pela amplificação do gene *mcyE*, relacionado à produção de hepatotoxinas (microcistina é uma delas). Desta forma, este estudo confirma que cianobactérias da área de captação no Rio Amazonas (Macapá, AP) possuem potencial para a produção de microcistinas.
- Não foram amplificados genes associados à produção de saxitoxina, anatoxina e cilindrospermopsina.
- As análises realizadas indicam fortemente que linhagens de *Limnothrix planctonica* produziram a toxina microcistina-LR detectadas nas águas do Amazonas.
- Porém não foi possível confirmar a produção de microcistina no Rio Amazonas por *L. planctonica*, uma vez que a detecção pelos métodos químicos e moleculares ocorreu em amostras ambientais (com a presença de várias espécies). Na análise com os isolados de *L. planctonica* LEGE 15485 e 15497 obtidos neste estudo não foram detectados genes relacionados à produção de microcistinas. É necessário continuar com o isolamento de novas cepas para descobrir qual (is) estão produzindo MC-LR.
- Foi observada baixa quantidade de espécies ao longo do monitoramento da água bruta do Rio Amazonas (realizado durante um ano de amostragem com amostragens mensais). Praticamente os mesmos táxons ocorreram ao longo do ano, com variações nas suas densidades. Os táxons observados foram: *L. planctonica*, *A. pantanalense*,

Leptolyngbya sp., *Pseudanabaena* sp., *R. mediterranea*, *Anabaena* sp., *Dolichospermum* sp., *G. splendidum*, *C. lacustris*, e uma cianobactéria não identificada que foi nomeada Morfoespécie 1. Todas estas espécies são filamentosas.

- As espécies identificadas diferem das esperadas na hipótese deste estudo. *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp. e *Dolichospermum* sp. seriam as cianobactérias mais abundantes no ponto de captação de água da ETAm conforme observado em estudo anterior qualitativo, porém o estudo mencionado, assim como outros já realizados nesta área, são análises qualitativas do fitoplâncton. Tais análises, cujas amostras são obtidas com rede de plâncton, são excelentes para inventário florístico, capturando grande quantidade de espécies, inclusive muitas espécies raras. Por outro lado, a análise quantitativa (realizada neste estudo) permite visualizar as espécies nas suas concentrações naturais, de forma que espécies raras provavelmente não aparecerão na amostra, ou, caso apareçam, serão identificadas como raras. E as espécies abundantes e dominantes serão identificadas como tais por este tipo de análise. Para obtenção de uma melhor resposta sobre o ambiente é necessário ver quais são as espécies mais abundantes.
- As espécies mais abundantes foram *Limnothrix planctonica*, *Leptolyngbya* sp. e *Alkalinema pantanalense*. As duas primeiras dominaram a comunidade representando $\geq 50\%$ de todos os espécimes na amostra. *L. planctonica* dominou durante maio-setembro, e *Leptolyngbya* sp. de novembro a março. *L. planctonica* e *A. pantanalense* ocorreram em 100% das amostras, *Leptolyngbya* sp. em 92%, e as demais espécies ocorreram em $\leq 50\%$ das amostras. Os maiores valores de densidade de células de cianobactérias foram observados em julho de 2015 ($1,09 \times 10^3$ cels.mL⁻¹), ao passo que janeiro apresentou a menor densidade celular $8,94 \times 10$ céls. mL⁻¹.
- Com relação ao biovolume (medida de biomassa), a espécie *Limnothrix planctonica* dominou também, apresentando picos nos meses de junho, julho e agosto. Essa espécie mostrou grande variação no volume celular ao longo do ciclo anual com valores mínimos e máximos, respectivamente $4,2 \mu\text{m}^3$ e $25,4 \mu\text{m}^3$. *Alkalinema pantanalense* seguiu tendência similar à de *L. planctonica* com pico em julho de 2015. A partir dessa e outras observações ao longo do estudo, pode-se inferir que *A. pantanalense* apresenta

hábitos semelhantes aos de *Limnothrix*, podendo inclusive ter sido a produtora de microcistina-LR, esta última suposição é improvável.

- A tolerância à limitação de luz foi uma das principais características compartilhadas pelas espécies mais frequentes e abundantes deste estudo. Esta característica está intimamente vinculada aos traços morfológicos observados nas cianobactérias encontradas neste trecho do Rio Amazonas. A morfologia filamentosa e, conseqüentemente, sua elevada razão superfície/volume (S/V), permite uma maior fluvariabilidade destes microrganismos na coluna d'água, evitando o afundamento, e aumentando as chances das cianobactérias terem acesso à zona eufótica. Além disso, filamentos cilíndricos dificilmente são predados pelo zooplâncton. Assim, essas características contribuem para uma maior estabilidade desse grupo em rio de águas brancas, como o Amazonas, apesar da sua estreita zona eufótica e intensa turbulência nestes trechos do baixo Rio Amazonas.
- Os parâmetros que mostraram maior associação com a produção de microcistina-LR e com o aumento da densidade de *Limnothrix planctonica* foram o aumento da transparência da água e da vazão. Tais resultados reforçam que *L. planctonica* produziu as toxinas detectadas, uma vez que esta espécie é bem adaptada às condições do Rio Amazonas e sua densidade se eleva mesmo no ápice da vazão, com o rio mais turbulento. Além disso os aumentos e diminuições dos parâmetros *Limnothrix* e microcistina-LR seguiram tendência similar.
- É importante mencionar também que a população de *Limnothrix planctonica*, que já domina o ambiente na área da captação, tende a aumentar no contexto de elevação das temperaturas devido às mudanças climáticas. Outro cenário de aumento da densidade dessas cianobactérias estaria ligado com à elevação das concentrações de nutrientes devido ao aumento das cargas orgânicas, resultantes de expansão urbana descontrolada não vinculada a melhorias no saneamento básico.
- A partir dos dados observados, conclui-se que é melhor garantir a segurança e saúde da população a médio e longo prazos, dadas as características de baixo nível de saneamento básico do município de Macapá. Esta sugestão está embasada no fato de que a cidade

apresenta poluição por esgotos (nutrientes P e N, principalmente) e é também abastecida com esta mesma água bruta do Rio Amazonas, além das características das cianobactérias presentes serem bastante estáveis, de forma que tais eventos de produção de toxinas devem voltar a ocorrer. A detecção de eventos com produção de cianotoxinas somente será possível, se houver o monitoramento adequado, de modo que ações preventivas possam ser implementadas.