

PLANO DIDÁTICO PARA IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS NOS LABORATÓRIOS DAS URCQAs/FUNASA

Giulliani Alan da Silva Tavares de Lira¹; Alba Lemos de Oliveira² Eliane Lopes Borges¹; Maria de Fátima de Vasconcelos Silva²; Osman de Oliveira Lira²; Vilma Ramos Feitosa³

¹ Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS/ Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, Brasília, DF, Brasil; giulliani@gmail.com

² Unidade Regional de Controle da Qualidade da Água – URCQA/ Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, Recife, PE, Brasil;

³ Fundação Nacional de Saúde – FUNASA - Presidência, Brasília, DF, Brasil.

Abstract

Considering the need to establish procedures and responsibilities for the strengthening of water control actions regarding the occurrence of cyanobacteria, the present study proposes a plan addressing analyses methods directed at these organisms for the instruction of professionals at the laboratories of regional water quality control units in Brazil (URCQAs/FUNASA). The content will be addressed through classes on theory and practice in the laboratory and field, with the use of audiovisual resources and instructive elements designed by the teacher for the conduction of classroom practices. The training of techniques will be carried out through a 40-hour course at each of the thirteen water quality control units in Brazil. In compliance with the guidelines stipulated in Ministry of Health Ordinance n°518/2004, the aim of the work is to enable technical skills for monitoring water quality with regard to the presence of cyanobacteria.

Palavras Chave: Capacitação Técnica; Qualidade de Água; Vigilância Ambiental.

Introdução

Problemas relacionados à degradação dos ecossistemas aquáticos são cada vez mais comuns, sendo principalmente causados por atividades humanas, como o avanço desgovernado das grandes metrópoles, provocando inúmeras alterações na estrutura e dinâmica das comunidade aquáticas, além do comprometimento da qualidade da água, que pode tornar-se veículo disseminador de inúmeras doenças.

Nesse sentido, a comunidade fitoplanctônica exerce relevante função no desenvolvimento de estudos em ecossistemas aquáticos. As mudanças ambientais induzem respostas rápidas desses organismos, representando alterações na sua composição e dinâmica, e estabelecendo ferramentas de análises para melhor compreensão dos mecanismos de funcionamento dos corpos d'água. No entanto, as alterações fitoplanctônicas, sejam estas temporais e/ou espaciais (verticais e horizontais), não dependem apenas dos fatores ambientais e as características comportamentais de cada grupo devem ser consideradas.

Sendo assim, as Cianobactérias destacam-se nesse aspecto, pois apresentam estratégias de crescimento que sob condições ambientais favoráveis, como temperatura em torno de 25 °C, valores de pH entre 6 a 9, concentração elevada de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e estabilidade da coluna d'água, muitas vezes promovem as chamadas florações ou “blooms”, fenômeno de crescimento exagerado das populações fitoplanctônicas em curtos espaços de tempo. No caso das cianobactérias, potencialmente trazem grande risco, pois são capazes de liberar para o meio metabólitos secundários tóxicos conhecidos como cianotoxinas, que podem provocar graves conseqüências à saúde de homens e animais. (Azevedo et al. 1994; Bittencourt-Oliveira e Molica 2003).

As florações algais, que não são um fenômeno exclusivo das Cianobactérias, mesmo nos casos onde não há liberação de toxinas, não sendo considerado um risco para a saúde pública, podem provocar uma série de transtornos, como: o entupimento dos filtros nas estações de tratamento, produção de compostos que gera sabor e odor desagradáveis à água, alteração dos aspectos cênicos da água, déficit de oxigênio, favorecimento para o estabelecimento de outros agentes patogênicos, entre outras perturbações.

Um exemplo clássico desses efeitos ocorreu em 1996, na cidade de Caruaru, Pernambuco, com a morte de dezenas de pacientes renais de uma clínica de hemodiálise, após o contato com água contaminada por toxinas provenientes de Cianobactérias (Jochimsen et al., 1998; Azevedo et al., 2002). Esse episódio acarretou em mudanças significativas na legislação que rege as normas de potabilidade da água no Brasil, com a inclusão do monitoramento de Cianobactérias e cianotoxinas, a partir da homologação da portaria 1469/00/MS, atualmente revogada pela 518/04/MS (Brasil, 2004).

Tal tragédia também impulsionou o desenvolvimento de estudos voltados ao conhecimento da dinâmica das Cianobactérias em reservatórios de abastecimento. Nesse sentido, a ocorrência de florações tóxicas são frequentemente registradas em diversas regiões do país (Costa et al., 2006; Carvalho et al., 2007; Sotero-Santos et al., 2008; Sant'Anna et al., 2008). No Brasil, 32 espécies de Cyanobacteria tóxicas já foram descritas para regiões tropicais e subtropicais do país (Sant'Anna et al., 2008). No estado de Pernambuco, a presença de cianotoxinas foi observada em florações de *Anabaena spiroides* Klebahn, *Pseudanabaena* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju e *Microcystis*

aeruginosa (Kützing) Kützing ocorridos em importantes reservatórios da região (Molica et al., 2002; Molica et al., 2005).

Diante de tais circunstâncias, a legislação que rege as normas de potabilidade da água prevê o monitoramento de cianobactérias, em seu art. 19 §1º, onde destaca que “O monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL ou 1mm³/L de biovolume, e semanal, quando o número de cianobactérias exceder esse valor”.

Considerando a importância do monitoramento desses organismos em sistemas aquáticos, principalmente daqueles voltados ao abastecimento público, o fato destes atuarem como fonte produtora de toxinas, possibilitando riscos à saúde pública, e a obrigação em garantir água de qualidade através do controle e vigilância, em conformidade com a Portaria nº 518/04/GM, a formação de corpo técnico especializado, apto ao desenvolvimento de técnicas de identificação e quantificação de cianobactérias é fundamental para viabilização de planos de monitoramento e prevenção.

Desta forma, diante da necessidade de estabelecer procedimentos e responsabilidades para o fortalecimento das ações no controle da qualidade da água em relação à ocorrência de cianobactérias e visando dar continuidade à estruturação e implantação de metodologias de análise desses organismos nos laboratórios das Unidades Regionais de Controle da Qualidade da Água – URCQAs/ FUNASA, o presente artigo apresenta um plano didático em métodos de análise qualitativa e quantitativa de cianobactérias, viabilizando uma ferramenta de formação técnica que possibilitará a aplicação do monitoramento de mananciais utilizados para abastecimento público, atendendo às exigências especificadas na Portaria nº 518/04/GM.

Abordagem didática

1. Características gerais de ecossistemas dulcícolas

Quando um pesquisador parte para o estudo de um organismo ou de grupos de organismos aquáticos, seja este de ambientes continentais ou não, é necessário ampliar o campo de observações e não se deixar restringir apenas ao foco da pesquisa. A interação entre as comunidades aquáticas e suas relações com o sistema devem ser evidenciadas. Nesse sentido, a conceituação de alguns componentes e compartimentos de um ambiente aquático é essencial para um melhor entendimento das relações entre as comunidades aquáticas e o ambiente.

1.1 O ambiente dulcícola

Os ecossistemas de água doce podem ser divididos basicamente em dois grupos: os **sistemas lênticos** - ambientes de água parada como lagos, reservatórios, etc.; e os **sistemas lóticos** - ambientes de água corrente, como rios, riachos, etc.. Por sua vez, os ambientes lênticos podem ser definidos em 4 (quatro) zonas distintas: **Zona litorânea** - ecótono com vegetação que limita a região marginal do ambiente aquático (está em contato direto com o ambiente terrestre), sendo a área de transição entre a terra e a água, apresenta macrófitas emergentes; **Zona pelágica ou limnética** - região central e aberta de um corpo hídrico, que comporta a maior parte dos organismos fotoautotróficos e nectônicos; **Zona profunda** - região afótica, caracterizada pela ausência de organismos fotoautotróficos, habitat da comunidade bentônica (organismos que vivem pelo sedimento); **Zona de interface água/ar** - região de tensão superficial da água, habitada por organismos neustônicos: neuston (animais e vegetais que vivem nos primeiros centímetros da massa d'água) e pleuston (animais e vegetais que apresentam deslocamento fundamentalmente assegurado pelo vento).

1.2 Comunidades planctônicas

Cada ambiente possui um conjunto de formas planctônicas cuja variedade, abundância e distribuição são próprias e dependem da adaptação às características abióticas (temperatura, luz, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, entre outros) e bióticas (predadores, parasitas e competidores) para a permanência no ecossistema.

Quanto às espécies representantes do ambiente, suas proporções podem variar de uma massa d'água para outra, além disso, cada sistema apresenta variações estacionais na composição específica dos organismos planctônicos. Deve-se considerar que as atividades antrópicas produzem importantes alterações físicas, químicas e biológicas nas massas de água, que são diretamente refletidas nas comunidades planctônicas.

1.3 A influência externa no ambiente aquático

A superfície de um ecossistema aquático é a porta de entrada para o calor, a luz, os gases e os nutrientes de que os componentes bióticos necessitam. O desenvolvimento da comunidade planctônica dependerá das combinações de fatores físicos e químicos que atuam dentro do sistema. Por sua vez, esses fatores são influenciados por características da bacia hidrográfica (como a geomorfologia e interações com os ecossistemas terrestres adjacentes), atividades antrópicas e aos usos do solo, além de outras ações de impactos na dispersão e na colonização das diferentes espécies (como por exemplo, as variáveis climatológicas).

2. O Plâncton

O plâncton foi descoberto e caracterizado por volta dos séculos XVII e XVIII, porém foi Johannes Muller quem deu impulso decisivo às técnicas de estudo destes organismos, quando, em 1845, arrastou uma rede fina pelas águas do Mar do Norte. Em 1887, Hensen propôs o termo plâncton para designar as partículas vivas e levadas passivamente pelo movimento da água, separando-as das inertes, as quais foram denominadas “tripton” (Infante, 1988).

2.1 Características do Plâncton

Na presença de nutrientes adequados e em quantidades suficientes, alguns grupos do plâncton são capazes de transformar a energia solar e acumular compostos químicos energéticos, por meio da fotossíntese. O oxigênio gerado por esse processo representa uma fração substancial do utilizado pelos organismos aquáticos para a respiração. Tal característica confere a esses grupos planctônicos a condição de organismos produtores primários, os quais se encontram na base da cadeia trófica.

a) Quanto à natureza, o plâncton distingue-se em quatro categorias:

- **Bacterioplâncton**
- **Protozooplâncton**
- **Fitoplâncton**
- **Zooplâncton**

b) Quanto à permanência na vida planctônica, podem ser classificados em:

- **Euplâncton** – habitantes do plâncton durante toda a vida, deste grupo fazem parte o fitoplâncton;
- **Meroplâncton** – habitantes do plâncton somente durante parte do ciclo de vida;
- **Pseudoplâncton** – plâncton ambiental, como as formas perífíticas ou as bentônicas arrancadas do substrato;

c) Quanto à distribuição no meio aquático, os organismos podem ser:

- **Espécies litorâneas** – aquelas fixas a substratos ou vegetação aquática submersa, ou que vivem nadando na região litorânea de corpos d’água permanentes.
- **Espécies limnéticas** – vivem nas áreas de águas abertas ou na parte central de corpos permanentes de água doce.
- **Espécies psamolitorâneas** – vivem na água intersticial, entre grãos de sedimento.
- **Espécies sapropélicas** – vivem em pequenos corpos d’água com excesso de matéria orgânica.

d) Quanto ao tamanho, segundo Wetzel (1975), podem ser classificados em:

- **Macroplâncton** > 500 μm ;
- **Mesoplâncton** de 500 > 50 μm ;
- **Microplâncton** de 50 a 500 μm ;
- **Nanoplâncton** de 10 a 50 μm ;
- **Ultraplâncton** de 2 a 10 μm ;
- **Picoplâncton** de 0,2 a 2 μm .

3. O fitoplâncton

3.1 Características gerais

- Unidade básica da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos;
- Organismos fotossintetizantes que vivem ao sabor das águas;
- Indicadores das alterações naturais e antrópicas de um ecossistema aquático;
- Modelo para estudo das sucessões ecológicas de comunidades complexas;
- Componentes: algas e cianobactérias.

O fitoplâncton configura-se como o grupo de organismos planctônicos, que melhor expressam o comportamento de um corpo hídrico. Destaca-se o fitoplâncton, uma vez que este grupo responde prontamente às modificações destes ecossistemas, podendo inclusive adquirir caráter preditivo sobre as possíveis alterações no meio (Huszar, 2000). Nesse sentido as Cyanobacteria, organismos constituintes do fitoplâncton, comumente apresentam respostas exageradas aos impactos gerados no ambiente, formando as conhecidas florações algais ou “blooms”, que podem provocar graves conseqüências à saúde de homens e animais.

Para o estudo qualitativo e quantitativo das Cianobactérias faz-se necessário o conhecimento básico das principais características de outros grupos algais que compõem o fitoplâncton, uma vez que ocorrem geralmente em um mesmo ecossistema, integrando uma única comunidade e a distinção entre os grupos é imprescindível para o aprofundamento do estudo. Nesse sentido, apresentaremos a seguir as características gerais dos principais grupos fitoplanctônicos de ecossistemas continentais do Brasil, excluindo-se as Cianobactérias que serão detalhadas em um capítulo a parte.

3.2 Chlorophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila “a”, alfa e beta caroteno, Várias xantofilas; **Substância de reserva** - Amido e óleos; **Parede celular** - Com celulose.

3.2.1 Características gerais

São organismos eucariontes, parede celular às vezes ausente, celulósica ou ainda glicoprotéica, cloroplastos com forma e número variados, podendo ainda estar ausentes, não associados às membranas do retículo endoplasmático. Quanto à organização celular são unicelulares isolados ou coloniais, filamentosos ou parenquimatosos. A grande maioria dos representantes são dulciaquícolas, mas existem espécies marinhas e também terrestres (ambientes úmidos). Podem apresentar dimensões macroscópicas ou microscópicas. A ordem Chlorococcales é a mais representativa na comunidade fitoplanctônica. Possuem estruturas como estigma, pirenóides e alguns grupos podem ter flagelos. Apresentam algumas espécies que podem ser confundidas como cianobactérias quando não identificados corretamente.

3.3 Euglenophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila “a” e “b”, α e β caroteno, Anteroxantina, neoxantina; **Substância de reserva** - Paramilo (carboidrato) e óleo; **Parede celular** - Sem parede celular.

3.3.1 Características gerais

As Euglenophyceae incluem organismos unicelulares flagelados, palmelóides e coloniais sésseis; existem cerca de 40 gêneros com aproximadamente 900 espécies; 2/3 dos seus representantes são heterótrofos e 1/3 autótrofos apresentando plastídios verdes com clorofila “a” e “b”, e carotenóides similares às algas verdes; a maioria ocorre em água doce; sem reprodução sexuada.

3.3.2 Citologia

Apresentam ausência da parede celular, observando-se uma película protéica semi-rígida abaixo da membrana plasmática denominada “periplasto” (constituída por 80% de proteínas e 20% de lipídios e carboidratos); no gênero *Trachelomonas* observa-se uma cobertura constituída por substâncias férricas sobre feixes mucilaginosos, denominada lórica;

São geralmente “diflagelados”, ou seja, com um flagelo curto não emergente e outro largo e emergente. Ocorrem também formas não flagelada, uni e multiflageladas. Como característica dos indivíduos, observa-se uma invaginação anterior (reservatório) - piriforme, sub-apical ou apical.

Localizado na base do flagelo encontra-se o “estigma” ou “mancha ocelar”, órgão receptor de luz (autotactismo). Ocorrem um ou mais “vacúolos contrácteis” próximos ao reservatório; alguns indivíduos como “*Peranema* sp.” apresentam um “citóstoma” c/ função de digestão. São uninucleados, com núcleo proeminente ovóide ou alongado, apresentam organelas como: Complexo de Golgi, mitocôndrias e vesículas de fosfolipídios, além de numerosos e pequenos “cloroplastos” discoidais sem pirenóide ou em forma de escudo com um pirenóide central. A maioria não apresenta pigmentos.

3.4 Bacillariophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila “a” e “c”, β caroteno, Várias xantofilas (fucoxantina, diatoxantina, etc); **Substância de reserva** - Óleo, leucosina e volutina; **Parede celular** - Sílica.

3.4.1 Características gerais

São incluídas nesta classe as algas conhecidas comumente como diatomáceas. Constituem um grupo característico de organismos, predominantemente unicelulares de vida livre, ocorrendo, entretanto, indivíduos filamentosos ou reunidos em colônias por uma capa de mucilagem. A parede celular é de pectina, fortemente impregnada com sílica, dividida em duas porções (epiteca e hipoteca) que se encaixam como se fossem as duas partes de um par de placas de *Petri*. A célula contém de dois a muitos cromatóforos de cor marrom-dourada. São reconhecidas duas ordens, Centralles e Penalles:

- **Centralles** - caracterizam-se por apresentar indivíduos com simetria radial, vários cromatóforos e reprodução por autogamia, embora possa ocorrer um esboço de conjugação. A parede não possui rafe e os organismos são imóveis. A maioria das formas é planctônica, ocorrendo tanto em água doce como no mar, sendo nesta última mais abundante, correspondendo a um dos principais componentes do fitoplâncton marinho. **Gêneros freqüentes** - *Conscinodiscus* (planctônico), *Melosira* (epífita), *Rhizosolenia* (planctônico), *Chaetoceros* (filamentos planctônicos), *Biddulphia* (planctônico e epífita), *Triceratium* (planctônico), etc.
- **Penalles** – caracterizam-se por apresentar indivíduos com simetria bilateral, podendo a carapaça apresentar rafe (sulco longitudinal no centro de cada valva). Estas formas são dotadas de movimentos. Em geral, ocorrem dois plastos em cada célula. A reprodução sexuada é geralmente por isogâmica, ocorrendo conjugação. Existem formas planctônicas ou fixas e neste caso muitas vezes formam colônias grandes. Existem tanto no mar como em água doce e assim como as Centralles, são importantes elementos do plâncton marinho. **Gêneros freqüentes** - *Tabellaria*, *Licmophora*, *Diatoma*, *Synedra*, *Pinnularia*, *Navicula*, *Amphora*, *Nitzschia*, *Surirella*, etc.

3.5 Dinophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila "a" e "c₂", Várias xantofilas, β – caroteno; **Substância de reserva** - Amido e óleo; **Parede celular** - Alguns representantes apresentam parede celular com celulose. A parede celular é dividida em duas porções: epiteca e hipoteca.

3.5.1 Características gerais

A Divisão Dinophyta compreende os dinoflagelados. Caracterizam-se como organismos unicelulares flagelados, ocorrendo principalmente no plâncton marinho (90%) e também na água doce (alguns gêneros). Apresentam numerosos cloroplastos, com três membranas (nenhuma conectada com o retículo endoplasmático), três tilacóides (em geral) e sem cinta. Possuem vários tipos de pirenóide (pedunculados, dentro dos cloroplastos), estigma (vários tipos em diversas localizações) e dois flagelos desiguais com mastigonemas. Existem aproximadamente 550 gêneros, dos quais aproximadamente 50% são heterotróficos e incolores e parte destes apresenta plastídios;

3.5.2 Fenômenos associados

- **Marés vermelhas** – florações de dinoflagelados que apresentam coloração diferenciada devido ao acúmulo de carotenóides e assim como as cianobactérias, podem apresentar efeitos tóxicos muitas vezes nocivos à saúde humana.
Ex: *Ceratium*, *Gonyaulax*
- **Bioluminescência** – fenômeno de fosforescência; a enzima luciferase cataliza a oxidação do composto luciferina.
Ex: *Noctiluca*, *Polyedra*, *Gonyaulax*

3.6 Chrysophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila "a", "c₁" e "c₂", Carotenóides (fucoxantina e violaxantina); **Substância de reserva** – Crisolaminarina; **Parede celular** - As células podem ser nuas ou apresentar uma fina parede, ou ainda, estarem incluídas em uma lorica.

3.6.1 Características gerais

São organismos eucariontes unicelulares (maioria) ou coloniais, flagelados ou não (dois flagelos desiguais), alguns representantes são filamentosos. Cloroplasto apresenta-se com cor verde dourado. Apresentam a particularidade de formar cistos endógenos silicosos, constituindo uma fase de repouso e resistência.

3.7 Cryptophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila "a", "c", Ficoeritrina, Vários carotenóides; **Substância de reserva** - Grãos de glicanos (tipo de amido das florídeas); **Parede celular** - Constituída por uma camada interna de placas pequenas, provavelmente protéicas, retangulares ou poligonais.

3.7.1 Características gerais

Organismos eucariontes, unicelulares flagelados, com dois flagelos desiguais, células assimétricas com face dorsal convexa e ventral achatada, cloroplasto com coloração distintas (azul, castanho, vermelha, verde, etc.).

4. O que são cianobactérias?

Cyanophyta, Cianofíceas, Cyanophyceae, algas azuis, entre outras denominações, as cianobactérias dentro de uma conceituação bastante generalizada são organismos geralmente microscópicos, uni ou pluricelulares, procariontes e fotossintetizantes (com "clorofila a"). Diante de suas características pode-se dizer que estruturalmente e fisiologicamente, as cianobactérias assemelham-se as bactérias e funcionalmente, estão mais próximas das plantas dos sistemas aquáticos. Devido a essas constatações tais organismos são sistematicamente classificados em dois importantes grupos:

a) Botânica: São considerados **vegetais procariontes**, pertencem à Divisão Cyanophyta de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica – ICBN.

Reino: Metaphyta;

Divisão: Cyanophyta;

Classe: Cyanophyceae;

Ordens: Chroococcales; Oscillatoriales; Nostocales e Stigonematales.

b) Bacteriologia: São considerados **bactérias fotossintetizantes**, com clorofila a e produção de O₂, pertencentes à Divisão Cyanobacteria de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias – ICNB.

Reino: Bacteria;

Divisão: Cyanobacteria;

Classe: Gloeobacteria; Chroobacteria; Hormogoneae

Ordens: Gloeobacterales; Chroococcales; Pleurocapsales; Oscillatoriales; Nostocales e Stigonematales.

Considerações relevantes

a) considerando a existência do conflito do enquadramento das cianobactérias como algas ou bactérias, adote os termos próprios de cada sistema de classificação a sua escolha e mantenha a uniformidade da nomenclatura;

b) Quando o enfoque do trabalho for da área de saúde, existe uma tendência na adoção do sistema de classificação da Bacteriologia, não sendo esta uma orientação ou regra geral;

c) É importante ressaltar que alga é um termo que não designa nenhuma categoria taxonômica tendo sido utilizado para evidenciar genericamente os grupos como algas pardas ou feófitas, algas verdes ou clorófitas, algas vermelhas, algas cianofíceas ou azuis, diatomáceas, dentre outras.

4.1 Semelhanças e diferenças entre cianobactérias e bactérias

Semelhanças

- São seres procariontes, ou seja, não possuem núcleo organizado;
- Possuem parede celular constituída por substâncias quimicamente idênticas (glicopeptídeos, ác. Murâmico, ác. Aspártico, etc.);
- Não apresentam cloroplastos;
- Habilidade na fixação de nitrogênio atmosférico.

Diferenças

- As cianobactérias utilizam autotrofia;
- Não possuem flagelos;
- Não se reproduzem sexualmente
- Possuem maior complexidade morfológica;
- As cianobactérias produzem O₂ na fotossíntese;
- Apresentam fotossistemas I e II (ao contrário das bactérias fotossintéticas)
- Apresentam diferentes pigmentos: Cianobactérias - clorofila a; Bactérias - bacteriofilina

4.2 Cianobactérias ou Cyanophyceae

Pigmentos fotossintetizantes - Clorofila "a", Ficobiliproteínas (C-ficocianina; C-ficoeritrina; Aloficocianina; ficoeritrocianina), Carotenóides (beta - caroteno), Xantofilas; **Substância de reserva** - Amido das Cianofíceas = grânulos de glicogênio; **Parede celular** - Ácido diaminopimélico, ácido murâmico, ácido glutâmico.

4.2.1 Características Gerais

As cianobactérias não apresentam núcleo definido e organelas, o que as constituem como seres procariontes, não apresentam flagelos e não se reproduzem sexualmente. Fazem fotossíntese utilizando a "clorofila a" e produzem oxigênio no final do processo, de forma semelhante às plantas. Algumas ordens apresentam células especializadas (heterócito e acineto) diferente das vegetativas;

Acredita-se que as cianobactérias tiveram origem há pelo menos 3,5 bilhões de anos e figuram-se entre os primeiros seres vivos que apareceram na Terra, sendo-lhes atribuída a responsabilidade de terem possibilitado o início da formação da atmosfera atual;

São encontrados nos mais diversos habitats: marinho, água doce, águas termais (temperaturas acima de 60°C), neve, solo, etc.;

Morfologicamente, as cianobactérias podem ser unicelulares ou coloniais e filamentosas sem ou com ramificação (ramificação pode ser falsa ou verdadeira de acordo com o plano de divisão celular, conforme veremos mais adiante). Podem apresentar envoltório ou bainha de mucilagem.

4.2.2 Classificação de Cyanobacteria

As Cianobactérias são classificadas de acordo com o Sistema de Classificação das Cyanophyceae ou Cyanobacteria, segundo Komárek & Anagnostidis, diferenciadas de acordo com características morfofisiológicas em 4 (quatro) subgrupos, sistematicamente denominados ordens: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales.

4.2.2.1 Chroococcales

- Unicelulares, coloniais ou pseudofilamentosas (filamentos não verdadeiros, sem conexão entre as células);
- Células cocóides (cilíndricas, ovóides, esféricas);

- Divisão celular em 1 (um), 2 (dois) ou mais planos perpendiculares
- Podem ser planctônicas, bentônicas, terrestres ou subaerófitas;
- As células (individualmente) ou um grupo de células (colônias) podem apresentar envoltório mucilaginoso ou sistemas de hastes mucilaginosas.

4.2.2.2 Oscillatoriales

- Apresentam organização filamentosa;
- Não possuem células especializadas (heterócitos ou acinetos);
- As células são arranjadas em seqüências unisseriadas, denominada tricoma;
- Podem apresentar ou não bainha mucilaginosa;
- As células se dividem ao longo do eixo do tricoma em 1 (um) plano;
- A reprodução ocorre por fragmentação (quebra) do tricoma.

Obs.: O filamento é constituído pelo conjunto tricoma e bainha de mucilagem. Entre as células do filamento há troca de substâncias.

4.2.2.3 Nostocales

- Filamentos sem ramificações verdadeiras (podem ocorrer falsas ramificações);
- Tricomas unisseriados e divisão celular em 1 (um) plano;
- Apresentam células diferenciadas das células vegetativas: **Heterócitos** - células responsáveis pela fixação do N₂; **Acinetos** - células de resistência, responsáveis pela reprodução do organismo após períodos em situação adversa;
- Algumas espécies apresentam bainha mucilaginosa.

4.2.2.4 Stigonematales

- Organismos filamentosos uni ou plurisseriados com ramificações verdadeiras e presença de bainha mucilaginosa;
- Divisão celular em mais de 1 (um) plano, irregular;
- Podem apresentar heterócitos e acinetos;
- Talo micro ou macroscópico;
- Seu habitat geralmente é em locais preservados (bentônicos, subaerófitos e terrestres);

Obs.: Não é comum encontrar Stigonematales no plâncton.

4.3 Florações de cianobactérias

As florações de cianobactérias caracterizam-se pelo crescimento exagerado de uma ou mais espécies em curtos espaços de tempo. Ao contrário do que se imagina, as florações não são exclusividade das cianobactérias, sendo um fato comum a outros grupos da comunidade fitoplanctônica. No entanto, não há dúvidas de que em ecossistemas aquáticos continentais o desenvolvimento acelerado desses organismos trazem maior inquietação. As florações podem permanecer no ambiente por um breve período, ou mesmo, perdurar ao longo de todo o ano, isso dependendo das condições favoráveis encontradas no ambiente. O enriquecimento nutricional do ecossistema aquático é o principal fator de contribuição para ocorrência de florações de cianobactérias, estando as atividades humanas relacionadas diretamente a crescente eutrofização desses sistemas. Embora se tenha a certeza de que o fator mais agravante relacionado as florações diz respeito ao potencial tóxico intrínseco às cianobactérias, há ainda outras consequências danosas relevantes: déficit de oxigênio, degradação das características cênicas do ambiente, liberação de substâncias que produzem odor e sabor desagradáveis na água, quebra do equilíbrio do ecossistema, diminuição de espécies algais, etc. Nesse sentido, algumas destas peculiaridades expressam sinais visíveis para o reconhecimento das florações. O aspecto esverdeado da água formando muitas vezes massas espessas desses organismos podem constituir claras evidências de florações. O odor e sabor característico de geosmina, substância química liberada por algumas espécies de cianobactérias e que proporciona o que popularmente se conhece "por cheiro ou gosto de terra", também observado em peixes, configura-se como mais uma evidência de que a floração também pode ser de cianobactérias. É válido salientar que apesar desses indícios passíveis de observação, o diagnóstico de uma floração deve sempre ser acompanhado por uma análise laboratorial qualitativa e quantitativa.

4.4 características gerais das cianotoxinas

As cianobactérias apresentam potencial produção de metabólitos secundários de ação farmacológica. De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grupos: os peptídeos cíclicos hepatotóxicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. Entretanto, por sua ação farmacológica, as duas principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são: neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas (LPS).

4.41 Neurotoxinas

a) Anatoxina-a

b) Anatoxina-a (s)

c) Saxitoxinas e neosaxitoxina

- *Cylindrospermopsis* (Lagos *et al.*, 1999)
- *Anabaena* (Carmichael *et al.*, 1990);
- *Aphanizomenon* (Mahamood e Carmichael, 1986);
- *Oscillatoria* (Sivonen *et al.*, 1989),
- *Trichodesmium* (Hawser *et al.*, 1991);
- *Lyngbya* (Onodera *et al.*, 1997).

d) Homoanatoxina-a

4.4.2 Hepatotoxinas

a) Microcistinas (heptapeptídeos cíclicos)

- *Microcystis*
- *Anabaena*
- *Oscillatoria*
- *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (Carmichael, 1994).

b) Nodularinas (pentapeptídeos cíclicos)

- *Nodularia*

c) Cilindrospermopsina (alcalóide hepatotóxico)

- *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ohtani *et al.*, 1992);
- *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1994);
- *Aphanizomenon ovalisporum* (Banker *et al.*, 1997).

4.4.3 Dermatotoxinas (Lipopolissacarídeos – LPS)

Os LPS (Lipopolissacarídeos) são também comumente encontrados nas membranas celulares de bactérias Gram negativas. Esses LPS são endotoxinas pirogênicas, irritantes ao contato com a pele e comparados às demais toxinas produzidas pelas cianobactérias, são causadoras de danos menores.

5. Coleta de cianobactérias

A realização correta de uma amostragem, em qualquer área do conhecimento, que requer tal procedimento, consiste em uma etapa de fundamental importância para representação significativa do ambiente e/ou ecossistema estudado. Nesse sentido, para o estudo das cianobactérias a adoção de técnicas seguras e convencionais representam o alicerce principal para as análises qualitativa e quantitativa desses organismos. Atualmente, o monitoramento de cianobactérias, além de servir uma exigência legal, é uma das ferramentas mais eficientes na predição de florações e suas conseqüentes complicações, possibilitando alternativas preventivas e amenizando seus efeitos.

A coleta deve ser definida de acordo com a necessidade de sua realização, ou seja, em concordância com sua finalidade. A partir de uma amostragem pode-se definir ou inferir inúmeras suposições sobre a comunidade estudada e/ou o ambiente avaliado. A estratégia de amostragem é fundamental para que as respostas ou objetivos do pesquisador possam se revelar. A estratégia também definirá as ferramentas de coleta (instrumentos de coleta) a serem utilizadas durante a amostragem que, por sua vez, variam de acordo com o objetivo proposto.

5.1 Equipamentos e ferramentas de amostragem

Toda coleta de material biológico necessita de equipamentos ou instrumentos adequados para amostragem, nesse sentido veremos a seguir alguns dos equipamentos e ferramentas auxiliares utilizados em coletas fitoplantônicas e próprios para o atendimento dos planos de amostragem contidos na portaria n°518/04/GM.

5.1.1 Rede de plâncton

As redes de plâncton são mais conhecidas na sua forma cônica com abertura circular, apesar de existirem outras formas como a cilíndrica-cônica e com aberturas quadrada ou retangular. As redes apresentam um recipiente de coleta terminal (final da rede) que armazena todo o material filtrado. Podem ser utilizadas para o estudo quantitativo de organismos zooplânctônicos, bem como, fitoplânctônicos, desde que o volume filtrado seja determinado (conhecido). Para o fitoplâncton sua utilização está mais adequada ao estudo qualitativo. Constituída por um tecido filtrante de nylon com diferentes aberturas de poro (calibração da malha), as redes selecionam e concentram os organismos de acordo com suas dimensões, sendo para o fitoplâncton recomendado malhas de 20 a 25 µm (micrômetros). As amostras são obtidas através de arrastos que podem ocorrer horizontalmente, verticalmente ou de forma oblíqua (diferentes angulações). Deve-se antes da amostragem lavar a rede com a água do próprio ambiente de coleta.

5.1.2 Garrafa de coleta em profundidade

Existem algumas variedades de garrafas para coleta de água em profundidades, tais como as garrafas de Nansen, Nisken, Van Dorn, etc., todas desenvolvidas com a mesma finalidade. A garrafa de Van Dorn é bastante utilizada em coletas de fitoplâncton: trata-se de um equipamento de fácil manuseio e eficiência na obtenção de amostras em profundidade, apropriada para análise quantitativa. Constituída por um tubo cilíndrico, com volume determinado, a garrafa de Van Dorn apresenta um conjunto de tampas ligadas a um sistema mecânico de pressão. No momento do uso, o sistema deve ser ativado abrindo-se as tampas e encaixando-as a um suporte. Em seguida, a garrafa é submergida até a profundidade desejada através de uma corda graduada. Posteriormente, um instrumento denominado mensageiro é lançado através da corda para desativar o sistema e coletar a água. A garrafa é ideal para utilização em mananciais de abastecimento que apresentam pontos de captação em profundidades.

5.1.3 Recipiente com abertura larga (boca larga)

Qualquer recipiente que apresente abertura larga pode ser utilizado para coleta de organismos fitoplânctônicos na superfície (lâmina da água até cerca de 25cm de profundidade) de um ambiente aquático. A utilização de um balde é uma boa opção para esse tipo de coleta, na qual a amostra obtida é indicada para análise quantitativa. Antes do procedimento deve-se lavar o balde ou recipiente coletor com a água do próprio ambiente e mergulhá-lo na superfície para obtenção da amostra. Pode-se utilizar uma corda amarrada a alça do balde para alcançar pontos de captação de água próximos aos paredões de reservatórios

5.1.4 Funil de vidro ou metal

Um funil de vidro ou metal configura-se como um importante instrumento auxiliar no momento de coleta, utilizado na ocasião de transposição da amostra do instrumento coletor para o recipiente de acondicionamento. Antes da transferência da amostra deve-se lavar o funil com a água do próprio ambiente.

5.2 Soluções de preservação

A preservação de organismos fitoplânctônicos pode ser realizada de inúmeras formas e a escolha da solução fixadora dependerá das vantagens e desvantagens inerentes ao seu uso. Veremos a seguir a viabilidade de algumas soluções, ressaltando que o uso do formol e do lugol são largamente aplicados e este último mais recomendado.

Transeau – Constituída por seis partes de água, três de álcool etílico 95% e uma parte de formalina (6:3:1), a solução de Transeau é vantajosa com relação à preservação das estruturas fitoplânctônicas, sendo inclusive capaz de conservar flagelos. No entanto, devido à proporção de uso na razão de 1:1 (uma parte da solução para uma da amostra), sua utilização torna-se desvantajosa, uma vez que necessita de um volume elevado.

Formaldeído – O formol pode ser utilizado na amostra em sua forma comercial, de 37% ou 40%, ou ainda, a partir de uma solução estoque de 20%, considerando que a concentração final da amostra apresente-se entre 2% e 4%. A neutralização do formol é uma recomendação importante. Nesse sentido, deve-se usar tetraborato de sódio (bórax Na₂B₄O₇·10H₂O), 50mL por litro de formol ou bicarbonato de sódio (Na HCO₃), 50mL por litro de formol. O formaldeído tem como vantagem o longo período de estocagem da amostra e a manutenção da cor original das células. Por outro lado, provoca a perda de flagelos, o que não representa um grande problema para fixação das cianobactérias, mas é uma substância muito tóxica quando ingerida, inalada ou ainda, quando em contato com a pele, por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea.

Glutaraldeído – Comercializado a 25% ou 50%, o Glutaraldeído é uma substância altamente tóxica, sendo essa a sua principal desvantagem. Apesar da baixa volatilidade, é irritante para as mucosas e requer muito cuidado no manuseio. A seu favor ressalta-se a baixa alteração nas células e a possibilidade de uso em epifluorescência. As amostras devem apresentar concentração final de 1%.

Lugol – O preparo do lugol deve ser realizado da seguinte forma:

Dissolver 20g de iodeto de potássio em 200 mL de água destilada (misturar completamente); posteriormente, adicionar 10g do iodo sublimado (puro).

5.3 Procedimento de coleta

Para cada ponto de coleta é necessário o recolhimento de três (03) amostras:

I - Amostra viva:

Utilizada para a observação de movimentos que algumas cianobactérias apresentam, os quais são importantes para definição da espécie (análise qualitativa). Pode ser coletada de forma direta com o auxílio de um recipiente de boca larga, com rede de plâncton ou com garrafa de profundidade. A amostra deve ser acondicionada em um recipiente de polietileno denso (150 - 300mL), sem a presença de fixador, preenchendo dois terços do volume, mantendo-a sob refrigeração desde o momento pós coleta até o andamento da análise.

II - Amostra fixada com formol:

Reservada para análise qualitativa, deve ser coletada diretamente com o auxílio de um recipiente de boca larga, garrafa de profundidade ou ainda, concentrada com rede de plâncton. A amostra deve ser acondicionada em um recipiente de polietileno denso (150 - 300mL), preservada em formol, de forma que a concentração final corresponda entre 2 - 4% do volume total.

III - Amostra fixada com lugol:

Destinada à análise quantitativa das cianobactérias, tal amostra deve ser coletada diretamente com o auxílio de um recipiente de boca larga na superfície e com garrafa para as profundidades. O acondicionamento deverá ser em recipiente de vidro ou plástico do tipo âmbar (150 - 300mL) e fixadas com lugol acético (1%). Pode ser utilizado também um recipiente de plástico denso, envolvido com papel alumínio ou madeira, desde que evite a incidência de luz. Quanto ao transporte, se mantido sob refrigeração, o lugol conserva melhor suas características de preservação.

5.4 Transporte e armazenamento de amostras

Amostras fixadas podem ser transportadas em qualquer caixa ou suporte que lhes conservem o abrigo da luz ou até mesmo em uma caixa térmica, sob refrigeração. Para amostras não fixadas, deve-se mantê-las resfriadas. Os recipientes devem estar bem fechados e quando utilizados recipientes de vidro, deve-se ter o cuidado para preencher os espaços entre os mesmos, a fim de evitar impactos e possível perda de amostra.

Quanto ao armazenamento, antes ou após a análise de uma amostra, dependendo do tipo de fixador utilizado e dos cuidados durante o manuseio, pode-se armazená-la por longos períodos. No caso de amostras conservadas com formol ou lugol, desde que sejam mantidas em condições de baixa luminosidade (ou totalmente escuro), com periódica renovação dos fixadores, podem ser preservadas durante anos. Amostras não fixadas mantidas sob refrigeração (4°C) podem conservar os organismos vivos durante 48 a 72h.

6. Análise Qualitativa

A análise qualitativa consiste na identificação de espécies fitoplancônicas e baseia-se na observação das características morfológicas, crescimento da medição dos organismos e de algumas de suas estruturas. A seguir veremos os equipamentos, acessórios e substâncias, essenciais ou não, utilizados para a análise qualitativa de cianobactérias, assim como algumas importantes características citológicas, morfológicas, estruturais e morfométricas para definição dos táxons:

A) Equipamentos e acessórios

- Microscópio óptico binocular;
- Centrífuga;
- Ocular de medição (acessório acoplado ao microscópio);
- Câmara clara (acessório acoplado ao microscópio);
- Câmara fotográfica (acessório acoplado ao microscópio);
- Sistema de epifluorescência (acessório acoplado ao microscópio);
- Caixas de lâminas e lamínulas;
- Pipetas Pasteur (não estéril).

B) Características Taxonômicas

Disposição celular (unicelulares, coloniais ou filamentos)

Organismos unicelulares ou coloniais

Formas e medidas celulares (comprimento, largura ou diâmetro); Plano de divisão celular; Arranjo celular (enfileiradas, agregadas, frouxas, etc.); Presença, forma, textura e arranjo da mucilagem; Presença, forma e disposição de hastes mucilaginosas; Conteúdo celular (granuloso, presença de aerótopos, etc.); Etc.

Organismos unicelulares ou coloniais

Forma e medidas celular (comprimento, largura ou diâmetro); Forma, medida e arranjo (emaranhado, isolado, paralelos, etc.) dos tricomas e filamentos; Presença de ramificações; Ramificações verdadeiras ou falsas; Presença de células especializadas (heterócito e acinetos); Presença, forma, textura e arranjo da

mucilagem; Conteúdo celular (granuloso, presença de aerótopos, etc.); Tricomas com ápices iguais ou diferentes (isso ou heteropolares); Séptos evidentes ou não; Etc.

C) Substâncias auxiliares da análise qualitativa

- Cloreto de zinco iodado (para visualização dos séptos): Preparar duas soluções separadamente e misturar uma gota de cada uma na lâmina, sobre uma gota da amostra, antes de sobrepor a lamínula (Fórmula: solução 1 – cloreto de zinco, 20g de $ZnCl_2$ + 85mL de água destilada. Dissolver a uma temperatura entre 50-60°C; solução 2 – iodeto de potássio, 3g de KI + 1,5g de I₂ + 60mL de água destilada);
- Tinta nanquim (para visualização da bainha mucilaginosa e flagelos);
- Azul de metileno (para visualização da bainha mucilaginosa).

Obs.: Existem outras substâncias auxiliares mais adequadas a outros grupos fitoplanctônicos;

7. Análise quantitativa

Existem algumas técnicas de quantificação de células fitoplanctônicas, bem como de cianobactérias, as quais são ajustadas ao uso do microscópio biológico comum, como no caso das câmaras de Sedwick Rafter, Palmer Maloney, Petroff Hausser e Neubauer, e ao microscópio invertido, câmara de Utermöhl. Por se tratar do método mais difundido e aceito pelos pesquisadores da área, no presente instrumento iremos detalhar apenas acerca da câmara de Utermöhl.

O princípio da contagem com câmaras de Utermöhl é a sedimentação dos organismos dentro de um volume predeterminado. O método, descrito por Utermöhl (1958), consiste na quantificação dos organismos em campos aleatórios ou campos alinhados em transectos verticais ou horizontais.

7.1 Cálculo da densidade de cianobactérias

Para aplicação do cálculo de densidade de cianobactérias vamos conhecer a fórmula do fator descrita na Norma Técnica CETESB/L5.303 (2005).

Para aplicação da fórmula, inicialmente se faz necessário três valores; a) valor da área do fundo da cubeta; b) valor da área do campo da objetiva utilizada para contagem; e c) o volume inicial da amostra sedimentado na cubeta de Utermöhl.

Fórmula do Fator de densidade células= $A/a/v$

A = área da cubeta;

a = área contada (área da objetiva x nº de campos contados);

v = volume sedimentado.

Exemplo da aplicação da fórmula:

Situação:

Considerando que durante uma análise quantitativa foram contadas **500** células de cianobactérias da amostra, em uma cubeta com volume de **10mL**, utilizando uma objetiva com aumento de 40X, onde foram contados um total de **20** campos da objetiva (considerar $V = 4,9$ cm² e área do campo da objetiva = **0,002** cm²)

Organizando os dados:

Área do fundo da cubeta (**V**): 4,9cm²;

Área do campo da objetiva: 0,002;

Área contada (**a**): 0,04cm² (20 x 0,002);

Volume sedimentado (**v**): 10mL.

Fator = $V/a/v$

Fator = 4,9/ 0,04/ 10

Fator = 12,5;

Com o cálculo do fator, multiplica-se o valor pelo nº de células contadas:

=12,5 x 500;

Logo, o Nº de células de cianobactérias por mL será igual a **6.259 cél./mL**.

Incerteza do método

Quando se está quantificando cianobactérias, sempre ocorre a seguinte indagação: "Até quantos organismos ou campos devo contar?". Para resolver tal questão deve-se seguir a orientação estatística proposta no *Standard Methods* (2006):

No processo de quantificação das cianobactérias deve-se trabalhar com um erro menor igual a 20%. Para calcular tal erro faz-se uso da seguinte fórmula: $(2/\sqrt{N} - \text{dois, dividido por raiz de } N) \times 100$, onde "N" é o número total de organismos filamentosos ou coloniais quantificados.

Exemplo:

De acordo com a aplicação da fórmula acima, ao contar 100 organismos filamentosos ou coloniais, se estará trabalhando com um erro de 20%, maior erro admissível; com N = 400 organismos, esse erro será de 10%; e com N = 800 organismos, erro de 7%, e assim por diante.

8. Legislação

A questão das cianobactérias foi incorporada à legislação brasileira pela primeira vez em 29 de dezembro de 2000, a partir da homologação da portaria nº1469/00/MS. Na ocasião, o Brasil tornava-se o primeiro país do mundo a incorporar tal assunto às normas de potabilidade da água para consumo humano regidas em território nacional. Atualmente, os critérios relacionados às cianobactérias encontram-se estabelecidos pela portaria nº518/GM de 25 de março de 2004, que revoga a portaria nº1469/00/GM Segue abaixo os planos de amostragem:

Artigo 18...

§ 5º Sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder 20.000 células/ml (2mm³/L de biovolume), durante o monitoramento que trata o § 1º do artigo 19, será exigida a análise semanal de cianotoxinas na água na saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, sendo que esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta por meio da realização semanal de bioensaios em camundongos.

Artigo 19...

§ 1º O monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer frequência mensal, quando o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/ml (ou 1mm³L de biovolume), e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor.

Conclusões

Considerando que há um consenso entre pesquisadores que estudam comunidades algais e cianobactérias, que diz ser necessário pelo menos dois anos para o pleno desenvolvimento das análises relacionadas a estes organismos com um mínimo de segurança, algumas características de formação profissional devem ser apreciadas. Desta forma, a exigência de profissionais de nível superior, sendo estes de preferência, Bacharéis em Ciências Biológicas ou áreas afins, que tenham em algum momento de sua formação cursado disciplinas relacionadas ao tema, como por exemplo, sistemática de criptógamos. O perfil individual do profissional também deve ser levado em consideração, pois o desenvolvimento de pesquisa com organismos microscópicos requer bastante paciência e afinidade. Para que os resultados obtidos com o curso de capacitação em métodos de análise qualitativa e quantitativa de cianobactérias possam surtir efeitos positivos, o corpo técnico envolvido deve se dedicar diariamente ao estudo das cianobactérias e do fitoplâncton e, se possível, dedicarem-se exclusivamente a essas análises na rotina do laboratório.

Referências Bibliográficas:

- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. 1988. Modern approach to the classification system of Cyanophyta, 3: Oscillatoriales. **Algological Studies** 80 (1/4): 327-472.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. 1990. Modern approach to the classification system of Cyanophyta, 5: Stigonematales. **Algological Studies** 59: 1-73.
- APHA, AWWA, WEF. 2006. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. on line – www.standardmethods.org
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysed treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, v. 181/182, p. 441-446, 2002.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. 1994. First report of microcystins from a Brazilian isolated the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology** 6: 261-265.

- BANKER, P.D., CARMELI, S., HADAS, O., TELTSCH, B., PORAT, R. and SUKENIK, A. 1997 Identification of Cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **J. Phycol.**, **33**, 613-616.
- BICUDO, C.E.M.; Menezes, M. **Algas de águas continentais brasileiras: Chave para identificação e descrições**. São Paulo: ed.Rima, São Carlos, 2006.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. Cianobactérias Invasoras. Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento, v.30, p. 82-90. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde Portaria nº 518, de 03/2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.
- CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A., 2006. Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais. Rima. Brasil. pp 118.
- CARMICHAEL, W.W, MAHMOOD, N.A, HYDE, E.G. 1990 Natural toxins from cyanobacteria (bluegreen algae). In: Hall S, Strichartz G, editors. Marine toxins: origin, structure, and molecular pharmacology. Washington, D.C.; **American Chemical Society**, p.87-106.
- CARMICHAEL, W.W. 1994 The toxins of Cyanobacteria. **Scientific American**, 270 (1):78-86.
- CARVALHO, L. R.; SANT'ANNA, C. L.; GEMELGO, M. C. P.; AZEVEDO, M. T. P. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. Revista Brasileira de Botânica, v.30, n.1, p.139-146. 2007.
- CETESB. 2005 **Fitoplâncton de água doce. Métodos qualitativo e quantitativo**. São Paulo, Normas Técnicas (CETESB/L5.303),. 23p.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in water. A Guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon. 416pp.
- COSTA, I. A. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; SENNA, P. A. C.; BERNARDO, R. R., COSTA, S. M.; CHELLAPPA, N. T. Occurrence of Toxin-Producing Cyanobacteria Blooms in a Brazilian Semiarid Reservoir Brazilian Journal Biology, v. 66 n.1B, p. 211-219. 2006.
- ESTEVES, F. A. 1998 **Fundamentos da Limnologia**. Rio de Janeiro, Interciência, 602p.
- HARADA, K.I., OHTANI, I., IWAMOTO, K., SUZUKI, M., WATANABE, M.F., WATANABE, M. and TERAO, K. 1994 Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. **Toxicon**, **32**, 73-84.
- HAWSER, S.P., CODD, G.A., CARPENTER, E.J. and CAPONE, D.G. 1991 A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*. **Toxicon**, **29**, 277-278.

- HUSZAR, V.L.M., SILVA, L.H.S., MARINHO, M., DOMINGOS, P., SANT'ANNA, C.L. 2000 Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. *Hydrobiologia* 424:67-77.
- INFANTE, A. 1988 Natural food of herbivorous zooplankton of lake valencia (Venezuela), *arch. Hidrobiol.*, v.52, p.347-358.
- JOCHIMSEN E.M., CARMICHAEL W.W., AN J., CARDO D., COOKSON S.T., HOLMES C.E.M., ANTUNES M.B.C., MELO FILHO D.A., LYRA T.M., BARRETO V., AZEVEDO S.M.F.O., Jarvis W.R. 1998 Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, 36: 373-378.
- LAGOS N, ONODERA H, ZAGATTO PA, ANDRINOLO D, AZEVEDO SMFO, OSHIMA Y. 1999 The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon*, 37:1359 -1373.
- MAHMOOD, N.A. and Carmichael, W.W. 1986 Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5. *Toxicon*, **24**, 175-186.
- MOLICA, R.; OLIVEIRA, E. J. A.; CARVALHO, P. V. V. C.; COSTA, A. N. S. F.; CUNHA, M. C. C.; MELO, G. L.; AZEVEDO, A. M. F. O. Occurrence of saxitoxins and anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae*, v. 4, p. 743-753. 2005.
- MOLICA, R.; ONODERA, M.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, v. 41, p. 606-611. 2002.
- OHTANI, I., MOORE, E., RUNNEGAR, M.T.C. 1992 Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxic from the blue-green algae *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal American Chemistry Society*, 114:7941.
- ONODERA, H., OSHIMA, Y., HENRIKSEN, P. and YASUMOTO, T. 1997 Confirmation of anatoxin-a(s) in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii* as the cause of bird kills in Danish lakes. *Toxicon*, **35**, 1645-1648.
- REVIERS, B., 2006. **Biologia e filogenia das algas**: 1-280. Artmed, Porto Alegre.
- SANT'ANNA, C. L; AZEVEDO, M. T. P.; WERNER, V. R., DOGO, C. R.; RIOS, F. R.; CARVALHO, L. R. Review of toxic of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, Stuttgart, v. 126, p. 215-265. 2008.
- SIVONEN, K., HIMBERG, K., LUUKKAINEN, R., NIEMELÄ, S.I., POON, G.K. and CODD, G.A. 1989 Preliminary characterization of neurotoxic blooms and strains from Finland. *Tax. Assess.*, **4**, 339-352.

- SOTERO-SANTOS, R. B.; CARVALHO, E. G.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). *Harmful Algae*, v. 7, p. 590–598. 2008.
- UTHERMOHL, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton - Methodic. Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie 9: 1-38
- WETZEL, R. G. 1975. *Limnology*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, and Toronto. 743 p.