

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

MILENE VIANA BRITO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
COMUNIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM UMA LAGUNA
COSTEIRA EUTROFIZADA**

SÃO LUÍS, MA

2020

PPGOceano



MILENE VIANA BRITO

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA COMUNIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM UMA LAGUNA COSTEIRA EUTROFIZADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do grau em Mestre em Oceanografia.

Orientador: Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol

Co-orientador: Dr. Marco Valério Jansen Cutrim

SÃO LUÍS, MA

2020



Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Viana Brito, Milene.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA COMUNIDADE DE
CIANOBACTÉRIAS EM UMA LAGUNA COSTEIRA EUTROFIZADA :
Diversidade molecular e microscópica de procariontes
planctônicos de uma laguna hipereutrofizada na costa norte
do Brasil / Milene Viana Brito. - 2020.

65 p.

Coorientador(a): Marco Valério Jansen Cutrim.

Orientador(a): Leonardo Teixeira DallAgnol.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Oceanografia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São
Luís-MA, 2020.

1. Cianobactérias. 2. Florações tóxicas. 3. Laguna
costeira. 4. Vias biossintéticas. 5. Westiellopsis
prolifera. I. Jansen Cutrim, Marco Valério. II. Teixeira
DallAgnol, Leonardo. III. Título.



Milene Viana Brito

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA
COMUNIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM UMA LAGUNA
COSTEIRA EUTROFIZADA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Oceanografia
da Universidade Federal do Maranhão
como requisito para obtenção do grau
em Mestre em Oceanografia.

Aprovada em ___/___/___

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol
(Orientador-UFMA)

Prof. Dr. Andrei Santos Siqueira
(1º Avaliador -UNAMA)

Prof. Dr. Alex Ranieri Jerônimo Lima
(2º Avaliador -Instituto Butantan)

São Luís – MA

2020

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Viana e José Brito (in memoria), por serem sempre uma referência de dedicação, força e fé pra mim. Ao meu marido Willian Souza que sempre me apoia na carreira acadêmica, a minha filha Maysa por ser a minha motivação todos os dias em busca de um futuro melhor, e as minhas irmãs por serem as minhas melhores amigas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me fortalecido e me sustentado nesses dois anos de aprendizado e pesquisa científica, e por nunca ter me abandonado até nos momentos em que pensei que não conseguiria aguentar, a Ele toda honra e toda glória!

Minha gratidão eterna a minha mãe Maria Viana e meu pai José Brito (in memoria) por todos os ensinamentos e por sempre me incentivarem a buscar o melhor e realizar os meus sonhos. Com eles eu aprendi a ser forte e a não ter medo de tentar e recomeçar.

Agradeço ao meu marido Willian pela paciência, dedicação e apoio que foi fundamental para que eu seguisse no mestrado e finalizasse mais uma etapa na minha carreira acadêmica. A minha princesinha Maysa, que é a luz dos meus dias e a razão pela qual eu lutarei em busca dos meus objetivos e de um futuro melhor.

Aos meus orientadores Leonardo Dall’Agnol e Marco Cutrim, por acreditarem em mim e por terem me mostrado o quanto eu sou capaz de vencer as dificuldades e aprender com cada uma delas. Pelo apoio nos momentos de desespero e pelas palavras de incentivo, não tenho palavras para descrever a minha admiração por vocês!

As minhas amigas do Laboratório de Ficologia da UFMA: Ana Karoline, Lisana, Francinara e Denise (por todos os conselhos, apoio científico e palavras de motivação), Queidy, Taiza, Adryanne, Nágela, Cybelle e Silvinha. Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos de descontração, pelos ensinamentos e por toda ajuda que vocês me ofereceram nesses anos de análises e pesquisa científica.

Também não poderia deixar de citar os meus amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA: Santinha, Patrícia, Robson, Ricardo, Gustavo, Rosinha, Emily e Vera, em especial os meus amigos do grupo de pesquisa em biodiversidade, bioprospecção e biotecnologia (GB³): Iolanda, Malena, Amanda (minhas companheiras de aventuras e de PCR), Mairla, Ana Letícia, Cristiane, Raissa, Mariene, Karina, Lucas, Pedro e Isaías. Obrigada por todos os momentos de bancada, de repiques de cultura, extrações de DNA e por todos os dias que vocês me ajudaram a finalizar experimentos até tarde da noite. Eu não conseguiria sem o incentivo e o apoio de vocês.

Agradeço imensamente aos meus estagiários Igor e George, que foram excelentes profissionais e ajudaram a dar conta das análises para que eu pudesse me dedicar as disciplinas e para que o trabalho não parasse. Que Deus recompense cada um de vocês!

Aos meus amigos de turma Débora, Juliana, Cadijatu, Marcos Eduardo, Walterly, Erlik e Gabriel pela ajuda durante as disciplinas e por todo apoio nos momentos mais tensos da nossa formação.

As minhas irmãs Josiane, Josinete, Mileide, Marisa e Nayara por toda ajuda em orações, palavras de incentivo e por torcerem sempre por mim. As minhas amigas Luciana Coutinho e Vanessa França por serem tão auxiliadoras, compreensivas, carinhosas, preocupadas e dispostas a me ouvir e aconselhar nos momentos de angústia (que não foram poucos).

A professora Andrea Azevedo, por ter me incentivado a fazer a prova do mestrado, pelo apoio na hora de estudar para a seleção, pelos livros emprestados, pelas inúmeras mensagens de preocupação e de carinho. Não é novidade a minha admiração e respeito pela pessoa e profissional que você é. Eu não tenho dúvida que Deus colocou você na minha vida!

Ao professor Leonardo Paucar por toda paciência comigo e pela sensibilidade ao me atender na sua sala várias vezes e perceber as minhas necessidades no momento em que eu precisei urgentemente de uma bolsa de estudos. A bolsa foi essencial para a minha permanência no programa de mestrado.

A professora Hivana Dall'Agnol por ter me apoiado muitas vezes nas análises no laboratório, esclarecendo dúvidas, por sempre me aconselhar, me corrigir nos momentos certos e por ter me ajudado na força tarefa da organização dos documentos da bolsa no último dia de submissão dos mesmos. Foi uma aventura que nunca vou esquecer, muito obrigada!

Aos professores Luís Fernando Carvalho Costa (Biologia) e Denise Fernandes Coutinho (Farmácia) por gentilmente ter fornecido todo o apoio com materiais e equipamentos de seus laboratórios (o termociclador e o transiluminador led) que foram extremamente importantes para o desempenho deste estudo científico.

Gostaria de agradecer a todos os professores do programa de pós-graduação em Oceanografia, com suas aulas muito engrandecedoras, por serem professores responsáveis com o ensino e a pesquisa no Maranhão, por estarem sempre disponíveis para nós alunos e pelas palavras de incentivo. A esta universidade pela formação como mestre, a FAPEMA pelo auxílio financeiro e a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram para que fosse possível a conclusão desse trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A laguna da Jansen é um ambiente artificialmente criado após o represamento de uma área de manguezal na cidade de São Luís, nordeste brasileiro. Neste estudo foi realizada a análise fitoplanctônica e caracterização morfo-molecular de cianobactérias potencialmente tóxicas, buscando relacionar as condições ambientais com maior influência sobre a diversidade e ocorrência de florações. Foram coletadas amostras em cinco pontos da laguna durante os anos de 2018 e 2019 de maneira a representar diferentes regimes pluviométricos. Alíquotas foram inoculadas em meio de cultura ASM-1, BG-11 e BG-11N (sem nitrogênio) e também preservadas em formalina para análise do fitoplâncton. As linhagens potencialmente tóxicas identificadas preliminarmente por chaves de identificação morfológica, foram isoladas e identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo posteriormente testadas para detecção de genes das vias biossintéticas da anatoxina, cilindropermopsina, nodularina, microcistina e saxitoxina. Na análise fitoplanctônica foram identificadas 39 espécies de cianobactérias, com a presença de 11 gêneros de cianobactérias possivelmente tóxicas, das quais foram obtidas sete cepas isoladas pertencentes aos gêneros *Anabaena*, *Anagnostidinema*, *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Westiellopsis*. As características físico-químicas observadas durante este estudo, revelaram aspectos típicos de um ambiente altamente eutrofizado, com excesso de compostos nitrogenados, principalmente a amônia, que podem ter favorecido a maior ocorrência de florações e espécies tóxicas. As principais variáveis ambientais preditivas, selecionadas através do modelo de regressão linear múltipla (GLM) e dos gráficos de dispersão, evidenciaram o aumento da temperatura da água e da salinidade para explicar a variação da densidade das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU). A distribuição das OTUs 1 e 2, correlacionaram-se com essas variáveis principais e a distribuição da OTU 3 teve maior correlação com as concentrações mais elevadas de nitrogênio total. Esta é a primeira descrição de ocorrência do gênero *Westiellopsis* nessa região, na qual foi detectada a presença dos genes *mcyA* e *mcyE* relacionados a produção de microcistina nessa linhagem. Os resultados confirmam a presença de linhagens toxigênicas de cianobactérias e indicam a necessidade de um monitoramento contínuo mais detalhado da laguna, haja vista o uso pela população do entorno como local de pesca de subsistência.

Palavras-chaves: Cianobactérias, Florações tóxicas, laguna costeira, Vias biossintéticas, *Westiellopsis prolifica*.

ABSTRACT

The urbanized Jansen lagoon has resulted after the damming of a mangrove area on the Brazilian Amazon coast. The influence of abiotic factors on the diversity and occurrence of toxigenic blooms of cyanobacteria were evaluated, as well as the morpho-molecular characterization of potentially toxic cyanobacteria isolates was also performed. Samples were collected at five points in the lagoon during 2018 and 2019 to represent different rainfall regimes. For the phytoplankton analysis, 39 species of cyanobacteria were identified, with 11 genera of possibly toxic cyanobacteria. All samples were inoculated in ASM-1, BG-11, and BG-11N (without nitrogen). After the incubation period, the potentially toxic strains were selected based on morphology and a total of seven unicyanobacterial cultures belonging to the genera *Anabaena*, *Anagnostidinema*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, and *Westiellopsis* were obtained. Potentially toxigenic strains were identified by 16S rRNA gene sequencing and tested for the presence of genes involved in the biosynthetic pathways five toxins (anatoxin, cylindrospermopsin, nodularin, microcystin, and saxitoxin). The physical and chemical characteristics reported during this study revealed aspects of a highly eutrophic environment, with an excess of nitrogen compounds, mainly ammonia, which may have favored the higher occurrence of blooms and toxic species. The main predictive environmental variables, selected using the multiple linear regression model (GLM) and dispersion graphs, showed an increase in water temperature and salinity to explain the variation in the abundance of the operational taxonomic units (OTUs). The distribution of OTUs 1 (Nostocales) and 2 (Chroococcales) correlated with these main variables, and the distribution of OTU 3 (Oscillatoriales) had a higher correlation with the higher concentrations of total nitrogen. That is the first description of the occurrence of the genus *Westiellopsis* in this region, with the confirmation of the *mcyA* and *mcyE* genes related to microcystin production by DNA sequencing. This study reported the presence of toxigenic strains of cyanobacteria, indicating the need for continuous monitoring, because the riverside population uses this lagoon as a subsistence fishing site.

Keywords: Biosynthetic pathways; Coastal lagoon; cyanobacteria; Toxic blooms; *Westiellopsis prolifica*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA e dos genes relacionados à produção de cianotoxinas	34
Tabela 2. Variação espacial e sazonal das variáveis ambientais e valores de p (< 0,05) para os testes de Kruskal Wallis e Anova. * Kruskal Wallis. OD = Oxigênio Dissolvido, MPS= Material Particulado em Suspensão, NO ₂ ⁻ = Nitrito, NO ₃ ⁻ = Nitrato, NH ₄ ⁺ = Íon Amônio, NT= Nitrogênio total, NID= Nitrogênio inorgânico Dissolvido, PID= Fósforo inorgânico dissolvido, PT= Fósforo total.	36
Tabela 3. Contribuição da densidade de cianobactérias e o índice de Constância durante os períodos sazonais na laguna da Jansen, onde: IC – Índice de Constância, CO – Constante, ACE – Acessória, ACI – Acidental.	39
Tabela 4. Cianobactérias potencialmente tóxicas isoladas da laguna da Jansen.	40
Tabela 5. Relação das OTUs de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e variáveis ambientais. Temp = Temperatura, NO ₂ ⁻ = Nitrito, STD = Sólidos Totais Dissolvidos, NO ₃ ⁻ = Nitrato, NT = Nitrogênio Total, PT = Fósforo Total, Nível = p>0,05*, p<0,01**	47
Tabela S1. Localização dos pontos de coleta na laguna da Jansen.	66
Tabela S2. Identificação molecular das linhagens de cianobactérias potencialmente tóxicas da laguna por homologia de sequência	67
Tabela S3. Identidade nucleotídica das sequências dos genes mcyA e mcyE da via biossintética da microcistina detectados na linhagem GBBB09	68

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Laguna da Jansen no município de São Luís-MA. **Fonte:** Google Earth..... 17
- Fig. 2.** Média histórica de precipitação pluviométrica mensal (dos últimos 30 anos) e precipitação pluviométrica mensal dos anos de 2018 e 2019..... 18
- Figura 1.** Localização da área de estudo e pontos de amostragens (L1-L5) na laguna da Jansen, Maranhão – Brasil. Seta = canal de entrada da água marinha. 32
- Figura 2.** Contribuição percentual dos grupos de cianobactérias considerando os períodos de coleta na laguna da Jansen, São Luís – Maranhão..... 38
- Figura 3.** Variação espacial dos valores de densidade do fitoplâncton (céls. L⁻¹), diversidade (bits céls⁻¹) e índices de uniformidade e riqueza na laguna da Jansen. 40
- Figura 4.** Espécies de cianobactérias isoladas para os testes de detecção de cianotoxinas. A -*Westiellopsis prolifica* GBBB09; B – *Anabaena circinales* GBBB10; C – *Microcystis aeruginosa* GBBB11; D – *Microcystis* sp₁ GBBB12; E – *Microcystis* sp₂ GBBB13; F – *Anagnostidinium amphibium* GBBB14; G – *Oscillatoria limosa* GBBB15 41
- Figura 5.** Árvore de Aproximação de Vizinhos construída no MEGA X baseada no gene 16S rRNA de cianobactérias isoladas da laguna da Jansen (marcadas com •). Sequências de cianobactérias obtidas do GenBank com indicação do seu número de acesso entre parênteses. Valores de bootstrap menores que 50% foram colapsados..... 44
- Figura 6.** Árvores de diversidade gênica *mcyA* (A) e *mcyE* (B) construídas pelo método de Aproximação de Vizinhos (AV). Sequências de *Westiellopsis prolifica* GBBB09 isolada da laguna da Jansen (destacadas com □). Sequências de cianobactérias obtidas do GenBank com indicação do seu número de acesso entre parênteses. Valores de bootstrap menores que 50% foram colapsados. Números de acessos *mcyA* (MT795720) e *mcyE* (MT795721)..... 46
- Figura 7.** Gráfico de dispersão tridimensional da densidade cianotóxica e de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU1, 2 e 3) com as variáveis ambientais selecionadas pelos GLMs..... 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
REFERÊNCIAS.....	21
ARTIGO PARA SUBMISSÃO	27
RESUMO.....	28
1 Introdução	29
2 Materiais e métodos.....	31
2.1 Área de estudo e estratégia de amostragem	31
2.2 Caracterização física e química	32
2.3 Identificação morfológica da comunidade de cianobactérias e índices ecológicos	33
2.4 Obtenção dos isolados, extração, amplificação e sequenciamento de DNA ..	33
2.5 Identificação molecular e construção de árvores filogenéticas e gênicas	35
2.7 Análise estatística	36
3 Resultados.....	36
3.1 Avaliação Ambiental da laguna da Jansen.....	36
3.2 Diversidade, densidade e ecologia de Cianobactérias	37
3.4 Cepas isoladas	40
3.4.1 Morfologia e comportamento em cultura	40
3.4.2 Identificação molecular e filogenia	43
3.5 Prospecção e identificação molecular de genes de cianotoxinas.....	44
3.6 Interrelação das Cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e as variáveis ambientais	47
4 Discussão.....	49
4.1 Relação das variáveis ambientais e a diversidade de cianobactérias toxigênicas	49
4.2 Monitoramento da presença de cianotoxinas por métodos moleculares	52
5 Conclusões	54
Agradecimentos	54
Referências	54
Material Suplementar	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias são microrganismos procariontes fotossintetizantes encontrados em praticamente todos os ecossistemas do planeta, devido a sua longa história evolutiva (primeiros registros fósseis datam de 3,5 bilhões de anos). São encontrados com maior frequência habitando o plâncton de ambientes dulcícolas e marinhos. Constituem um grupo taxonômico e filogenético único, onde muitos gêneros possuem morfologia diferenciada e são capazes inclusive de fixar nitrogênio atmosférico (CALIJURI et al., 2006; SILVA et al., 2014).

Em ecossistemas aquáticos, quando as condições são favoráveis, as cianobactérias podem se multiplicar rapidamente, formando florações. A biomassa acumulada nessas florações aumenta a turbidez, reduzindo a qualidade da água, que pode inclusive alterar a diversidade aquática (PAERL e HUISMAN, 2008). Ações antropogênicas, como o desmatamento, adubação do solo, urbanização desordenada e consequentemente o lançamento de esgotos *in natura* no ambiente, causam a eutrofização de muitas massas de água, levando a uma intensificação desses eventos (SILAMBARASAN et al., 2012).

As cianobactérias são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos (ROUHIAINEN et al., 2000). Com aplicações biotecnológicas e na saúde, porém alguns deles são conhecidos pelos efeitos tóxicos a biota (WHO, 2003; WALL et al., 2014). Dentre os aproximadamente 150 gêneros descritos, 40 estão relacionados com a produção de algum tipo de toxina. No entanto, à medida que novas pesquisas são feitas a detecção da capacidade de produção de cianotoxinas, seja por métodos moleculares ou químicos, tem expandido o número de espécies nessa lista. Contudo é importante ressaltar que a identificação taxonômica não garante a produção, haja vista algumas espécies reconhecidamente produtoras apresentarem cepas com vias biossintéticas incompletas ou devido a condições ambientais não propiciarem a ativação das mesmas (BRASIL, 2015).

De acordo com Hernandez et al. (2009), os compostos mais estudados têm sido as cianotoxinas que podem ser incluídas em três categorias: neurotoxinas (alcalóides e organofosforados); hepatotoxinas (peptídeos); e dermatotoxinas (lipopolissacarídeos - LPS). A classe das toxinas dermatotóxicas podem ser sintetizadas por todos os gêneros de cianobactérias (CALIJURI et al., 2006, HERNANDO et al., 2018). Biologicamente

essas cianotoxinas são acumuladas na teia trófica e podem causar impactos negativos duradouros ao ecossistema (SANT'ANNA e AZEVEDO, 2000).

As hepatotoxinas causadoras de distúrbios gastrointestinais e hepáticos, são as toxinas cianobacterianas mais prevalentes, seguidas pelas neurotoxinas que afetam o sistema nervoso e causam rapidamente a morte de muitos organismos aquáticos (KLISCH e HAADER, 2008, HARKE et al., 2016).

Já foram descritos vários episódios de intoxicações por cianotoxinas em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (FALCONER et al., 1994). No Brasil, tem sido confirmada a ocorrência de cepas tóxicas de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público, lagoas salobras e rios; e os bioensaios de toxicidade recomendados pela OMS, têm demonstrado que aproximadamente 75% das cepas estudadas apresentam-se tóxicas (AZEVEDO, 1998; COSTA et al., 2009).

O grupo das hepatotoxinas inclui as microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas. As microcistinas são as mais conhecidas, tendo recebido esse nome devido ao primeiro organismo do qual foram isoladas - *Microcystis aeruginosa*, no entanto podem ser produzidas por outros gêneros, tais como: *Anabaena*, *Fisherella*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Planktothrix* (COSTA et al., 2009; MEREL et al. 2013)

Em 1996 um surto de insuficiência hepática ocorrido em pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise em uma clínica na cidade de Caruaru (Pernambuco) foi o caso mais marcante no Brasil, onde dos 131 pacientes intoxicados, 76 faleceram. As análises clínicas comprovaram a presença de microcistinas e cilindrospermopsina, nos filtros de carvão ativado da clínica, no soro sanguíneo e no tecido hepático dos pacientes (ANDRADE et al., 2009; CARMICHAEL et al., 2001; YUAN et al., 2006).

Alguns estudos vêm demonstrado que todas as hepatotoxinas são inibidoras de proteínas fosfatases de células eucariontes. Estas toxinas são consideradas potentes promotores de alterações histopatológicas hepáticas, podendo afetar também os rins (BRANDÃO e DOMINGOS, 2006; BOUAÏCHA et al., 2019; PHAM e UTSUMI, 2018)

Os dois tipos mais comuns de neurotoxinas cianobacterianas são: saxitoxinas e anatoxina-a. As neurotoxinas são alcalóides ou organofosforados que agem na transmissão de impulsos nervosos, inibindo-os em decorrência do bloqueio aos canais de sódio, afetando a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas (CARMICHAEL et al., 2001; O'NEIL et al., 2012). Molica e Azevedo (2009) apontam

como principais produtores envolvidos nestas intoxicações os gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Gloeotrichia* e *Schizothrix*.

Alguns desses gêneros são comuns em reservatórios de abastecimento de água potável do Brasil, nos estados de Natal (RN) e Recife (PE) após um período de seca severa ocorreu o aumento de populações de cianobactérias produtoras de saxitoxina (FONSECA et al., 2015). Alguns estudos (GLADWYN-NG et al., 2018; BARRETO et al., 2016; MLAKAR et al., 2016) têm sugerido que a contaminação por saxitoxina (stx) pode estar associada aos casos de crianças com microcefalia, que ocorreram de forma representativa em pacientes gestantes e infectadas pelo vírus da Zika no Brasil (TEIXEIRA et al., 2016). Nestes casos a cianotoxina teria agido como um co-fator de sinergismo relacionado os danos cerebrais mais severos, que ocorreram em sua maioria em pacientes da região nordeste (PEDROSA et al., 2019).

A produção de toxinas é frequentemente identificada e quantificada por meio de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), e análises químicas sensíveis, como a cromatografia líquida ou gasosa, podendo ou não ser acopladas à espectrometria de massas (CHEN et al., 2012; LEGRAND et al., 2016). Recentes avanços na tecnologia molecular tornaram possível identificar e caracterizar agrupamentos de genes de biossíntese (SHIH et al., 2013; LIU et al., 2018). Essas técnicas foram melhorando sua eficiência e acurácia ao longo dos anos. Apesar destes avanços, vários autores reconheceram que a ecofisiologia e o papel mais amplo da produção de toxinas pelas cianobactérias permanece ainda muito pouco claro (KRIENITZ et al., 2003; TANABE et al., 2018).

No entanto, a identificação de uma espécie reconhecida como produtora de cianotoxina em um dado ambiente, não sugere necessariamente um perigo para o ecossistema ou saúde humana, desde que estejam presentes em pequena quantidade, e/ou as linhagens específicas não possuam os agrupamentos gênicos necessários para produção da toxina (CAPELLI et al., 2018). Embora a maioria das espécies tóxicas documentadas sejam espécies de água doce, elas em geral são todas halotolerantes e podem florescer em estuários e águas salgadas (BAXA et al., 2010, GIANNUZZI et al., 2012; CUTRIM et al., 2019a).

As lagunas costeiras são sistemas dinâmicos e naturalmente estressados que sofrem frequentes perturbações e flutuações ambientais (BRITO et al., 2010; CUTRIM

et al., 2019a; PEREIRA et al., 2012). Estes ambientes lagunares vêm sofrendo constantes degradações em todo o mundo, pois oferecem serviços ecossistêmicos importantes para o lazer e o turismo. Além de também serem alvo da urbanização, que vem acontecendo de forma acelerada (CHRISTIA et al., 2014; COTOVICZ JUNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2017).

Na ilha de São Luís situa-se a laguna da Jansen (Fig. 1), uma laguna costeira que se formou devido a várias mudanças antrópicas do ambiente, que anteriormente fora cercado de manguezal (CUTRIM et al., 2019a). Esta laguna é um ambiente que vem sofrendo, desde a década de 70, intensos processos de eutrofização antrópica. Onde a urbanização da área, que modificou o sistema natural de drenagem, agravada pela ocupação desordenada das áreas de mangues, e com as construções de grandes avenidas e dos conjuntos habitacionais, tem contribuído para o aumento dessas pressões antropogênicas que causam episódios de florações de microalgas e cianobactérias neste ambiente (SANTOS et al., 2014, CUTRIM et al., 2019b).

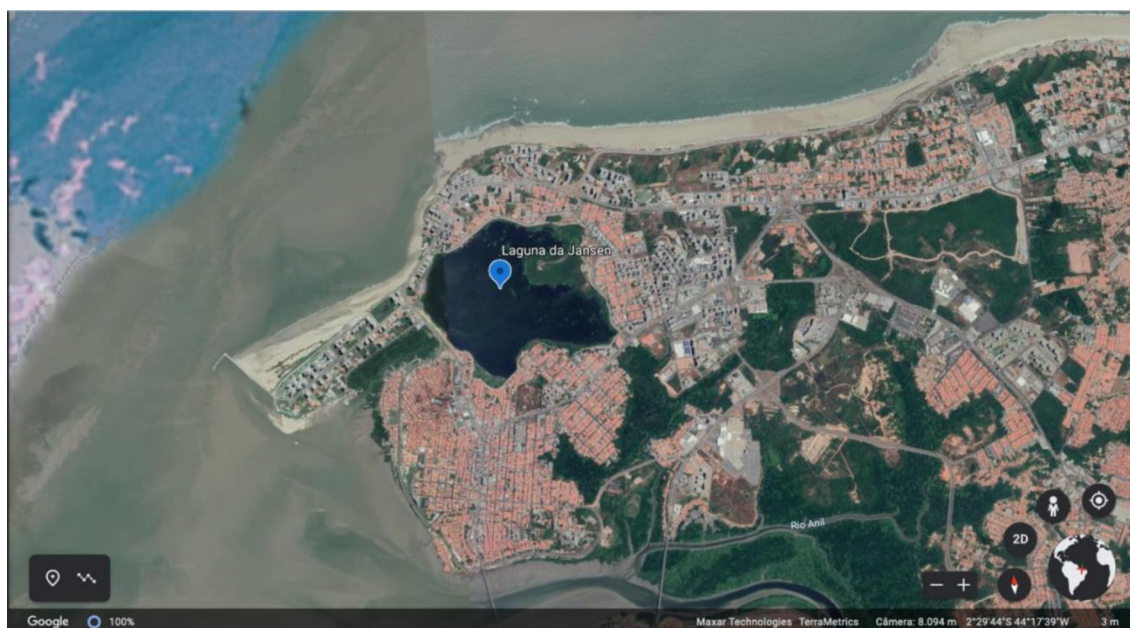


Fig. 1. Laguna da Jansen no município de São Luís-MA. **Fonte:** Google Earth.

A laguna da Jansen é um ambiente costeiro de águas salinas que foi construído após sucessivas mudanças antrópicas, o que foi diminuindo sua extensa cobertura de manguezais. A construção de uma via urbana situada acima do nível do mar alterou a drenagem local ocasionando o represamento da água marinha e formação da laguna, devido a uma interceptação na conexão dos igarapés Ana Jansen e Jaracati com o mar. Possui uma extensão de 140 hectares e uma profundidade média de 1,5 metro e ainda é

cercada ao leste por uma floresta de mangue (CUTRIM et al., 2019a; SANTOS et al., 2014).

A laguna mantém uma conexão com o mar através de uma entrada restrita, onde o fluxo de água entre a laguna e a baía de São Marcos é conectado por duas entradas (ou saídas), onde a água do mar flui para a laguna a partir do lado sudoeste através de um canal. A salinidade máxima da laguna varia em média de 28,34 no período seco e 24,35 no período chuvoso (CUTRIM et al., 2019b).

O entorno da laguna é altamente urbanizado, possuindo vários estabelecimentos comerciais e condomínios residenciais, com 45 pontos de lançamento direto de esgoto, de acordo com levantamento feito pela SEMA (2018). Esse lançamento de esgoto *in natura* concede características eutróficas à lagoa.

A laguna da Jansen, por estar situada próximo a baía de São Marcos, sofre influência direta do sistema de macromarés semidiurnas, com amplitudes que podem ultrapassar 7 metros. A troca de água na área ocorre somente nas marés de sizígia quando o nível da maré ultrapassa o piso da galeria, pois a movimentação do fluxo hidráulico pela ação das marés ficou restrito aos períodos de fases ascendentes e descendentes da preamar, próximo de seu limite máximo, e na estação chuvosa, quando o grande aporte de água doce garante o fluxo em direção ao mar (MASULLO et al., 2009).

Os dados climatológicos de pluviosidade obtidos no site do INMET, demonstraram que os anos de 2018 e 2019 superaram a média histórica de 30 anos (2199,9 mm), apresentando média anual de 2330,8 mm e 2753,1 mm respectivamente (Fig. 2). Revelando também um ciclo sazonal anual bem definido, com chuvas concentradas nos meses de janeiro a julho, e estiagem nos meses de agosto a dezembro, sendo que em dezembro de 2018 choveu um volume três vezes maior que o esperado

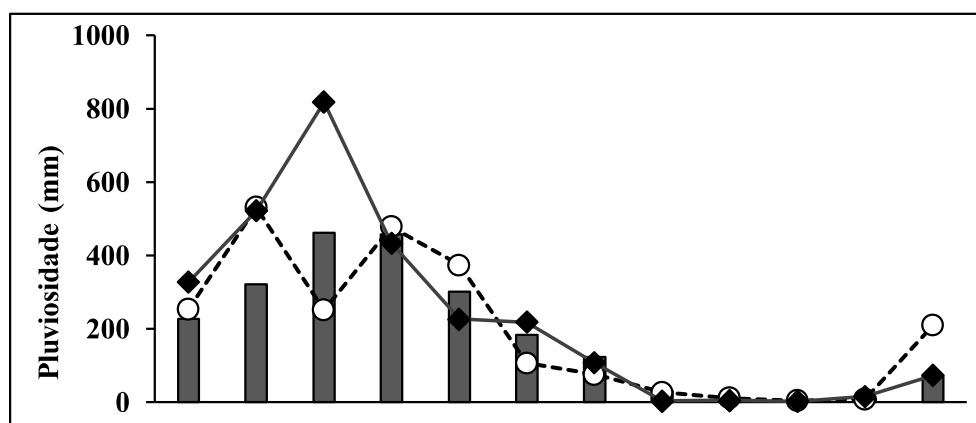


Fig. 2. Média histórica de precipitação pluviométrica mensal (dos últimos 30 anos) e precipitação pluviométrica mensal dos anos de 2018 e 2019.

(209,8 mm), devido a esta condição considerou-se o mês de dezembro de 2018 como transição entre os períodos de estiagem e chuvoso.

As consequências dessas florações algais ainda tem sido pouco explorada nos trabalhos desenvolvidos nesta área, tendo os mesmos se concentrado na análise da comunidade fitoplanctônica, assim como os efeitos nocivos ao ecossistema (CUTRIM et al., 2019a; CUTRIM et al., 2019b). Com o crescimento populacional, aumenta a produção de resíduos que são lançados nesses ambientes, gerando grandes quantidades de nutrientes, principalmente o nitrogênio amoniacal e o fósforo. Quando as concentrações desses nutrientes aumentam, o fitoplâncton acelera seu crescimento, podendo gerar florações algais (PAERL et al., 2011; SANTOS et al., 2014; STEFFEN et al., 2014).

Estes nutrientes, que por um lado contribuem para a proliferação de algumas espécies de cianobactérias, também podem atuar como inibidores do crescimento de outras espécies do fitoplâncton, em função de suas concentrações na água que podem estar escassas ou elevadas em determinado momento pela biossíntese de cianobactérias fixadoras de nitrogênio e dos efeitos de competição por recursos ambientais tais como a intensidade luminosa e salinidade. Podendo levar assim a um desequilíbrio na comunidade fitoplanctônica (VALLINA et al., 2014).

Diante do exposto, torna-se fundamental verificar se as alterações do ambiente da laguna, que tem fortes características eutróficas, favorecem o crescimento de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas. Assim como identificar essas espécies por marcadores filogenéticos e moleculares específicos para cianotoxinas, visando contribuir para a prospecção de toxinas e uma correta avaliação da qualidade e saúde ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Caracterizar a diversidade das cianobactérias e genes produtores de cianotoxinas presentes na laguna da Jansen.

2.2 Específicos

- Descrever a diversidade de cianobactérias na Laguna da Jansen;
- Relacionar a influência da sazonalidade e outros fatores ambientais na comunidade fotossintetizante da Laguna;
- Cultivar e caracterizar as linhagens potencialmente tóxicas de cianobactérias utilizando marcadores morfológicos e moleculares;
- Confirmar a presença de agrupamentos gênicos relacionados à cianotoxinas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.M.de., GOMES, C.T. da S., ARAGÃO, N.K.C.V., SILVA, E.M., LIRA, G.A. da S.T. de., Estrutura da comunidade fitoplanctônica com ênfase em Cyanobactéria no reservatório de Tapacurá-PE. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 68(1), 109-117, 2009.
- AZEVEDO, S.M.F.O., Toxinas de Cianobactérias: Causas e Consequências para a Saúde Pública. **Medicina On line**, 1(I), 3. 1998. Disponível em: http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm Acesso em 24/08/2019.
- BARRETO, M.L., BARRAL-NETTO, M., STABELI, R., ALMEIDA-FILHO, N., VASCONCELOS, P.F., TEIXEIRA, M., ... e GADELHA, P.E., Zika virus and microcephaly in Brazil: a scientific agenda. **The Lancet**, 387(10022), 919-921, 2016.
- BAXA, D.V., KUROBE, T., Ger, K.A., LEHMAN, P.W., TEH, S.J., Estimating the abundance of toxic Microcystis in the San Francisco Estuary using quantitative real-time PCR. **Harmful algae**, 9(3), 342-349, 2010.
- BOUAÏCHA, N., MILES, C.O., BEACH, D.G., LABIDI, Z., DJABRI, A., BENAYACHE, N.Y., NGUYEN-QUANG, T., Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. **Toxins**, 11(12), 714, 2019.
- BRANDÃO, L.H., DOMINGOS, P., Fatores Ambientais para Floração de Cianobactérias Tóxicas. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, 1(2), 40-50, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Cianobactérias/cianotoxinas: procedimentos de coleta, preservação e análise** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 106 p.: il., 2015.
- BRITO, A.C.; QUENTAL, T.; COUTINHO, T.P.; BRANCO, A.M.C.; FALCÃO, M.; NEWTON, A.; ICELY, J.; MOITA, T. Phytoplankton dynamics in southern Portuguese coastal lagoons during a discontinuous period of 40 years: An overview. **Estuarine Coastal Shelf Science**. v. 110, p. 147-156, 2012.
- CALIJURI, M.C., ALVES, M.S.A., SANTOS, A.A. **Cianobactérias e Cianotoxinas Águas Continentais**. Editora Rima, São Carlos, 2006.

CAPELLI, C., CERASINO, L., BOSCAINI, A., SALMASO, N. Molecular tools for the quantitative evaluation of potentially toxigenic *Tychonema bourellyi* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) in large lakes. **Hydrobiologia**, 824(1), 109-119, 2018.

CARMICHAEL, W.W., AZEVEDO, S.M.F.O., AN, J.S., MOLICA, R.J.R., JOCHIMSEN, E.M., LAU, S., RINEHART, K.L., SHAW, G.R., EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, 109(7), 663-668, 2001.

CHEN, J., YAN, T., XU, J., HE, S., ZHAO, P., YAN, X. Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, 35(9), 1094-1101, 2012.

CHRISTIA, C., GIORDANI, G., PAPASTERGIADOU, E. Assessment of ecological quality of coastal lagoons with a combination of phytobenthic and water quality indices. **Marine Pollution Bulletin**, 86(1-2), 411-423, 2014.

COSTA, I.A.S., CUNHA, S.R.S., PANOSSO, R., ARAÚJO, M.F.F., MELO, J.L.S., ESKINAZI-SANT'ANNA, E.M. Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. **Revista Oecologia Brasiliensis**, 13(2), 382-401, 2009.

COTOVICZ JUNIOR, L.C., BRANDINI, N., KNOPPERS, B.A., MIZERKOWSKI, B.D., STERZA, J.M., OVALLE, A.R.C., MEDEIROS, P.R.P. Assessment of the trophic status of four coastal lagoons and one estuarine delta, eastern Brazil. **Environmental Monitoring Assessment**, 185, 3297-3311, 2013.

CUTRIM, M.V.J., FERREIRA, F.S., SANTOS, A.K.D., CAVALCANTI, L.F., ARAUJO, B.O., AZEVEDO-CUTRIM, A.C.G., FURTADO, J.A., OLIVEIRA, A.L.L., Trophic state of an urban coastal lagoon (Northern Brazil), seasonal variation of the phytoplankton community and environmental variables. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Florida, 216, 98-109, 2019a.

CUTRIM, M.V.J., FERREIRA, F.S., CAVALCANTI, L.F., SÁ, A.K.D.S, AZEVEDO-CUTRIM, A.C.G., SANTOS, R.L. Phytoplankton biomass and environmental descriptors of water quality of an urban lagoon. In: Pan, J., Devlin, A. (Eds.), **Estuaries and Coastal Zones - Dynamics and Response to Environmental Changes**. IntechOpen, London, 2019b.

FALCONER, I.R., BURCH, M.D., STEFFENSEN, D.A., CHOICE, M., COVERDALE, O.R., Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. **Journal Environmental Toxicology Water** Environmental Toxicology and Water Quality, 9(2), 131-139, 1994.

FONSECA, J.R., VIEIRA, P.C.S., KUJBIDA, P., COSTA, I.A.S.D. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystins and saxitoxins in reservoirs of the Brazilian semi-arid. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 27(1) 78-92, 2015.

GLADWYN-NG, I., CORDÓN-BARRIS, L., ALFANO, C., CREPPE, C., COUDERC, T., MORELLI, G., BONNIÈRE, M., THELEN, N., AMERICA, M., BESSIÈRES, B., ENCHA-RAZAVI, F., BONNIÈRE, M., SUZUKI, I.K., FLAMAND, M., VANDERHAEGHEN, P., THIRY, M., LECUIT, M., NGUYEN, L. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus-associated microcephaly. **Nature neuroscience**, 21(1), 63-71, 2018.

HARKE, M.J., STEFFEN, M.M., GOBLER, C.J., OTTEN, T.G., WILHELM, S.W., WOOD, S.A., PAERL, H.W. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful Algae**, 54, 4-20, 2016.

HERNANDO, M.M., MINAGLIA, C.C., MALANGA, G., HOUGHTON, C., ANDRINOLO, D., SEDAN, D., ROSSO, L., GIANNUZZI, L. Physiological responses and toxin production of *Microcystis aeruginosa* in short-term exposure to solar UV radiation. **Photochemical & Photobiological Sciences**, 17, 69-80, 2018.

KLISCH, M., HADER, D.P. Mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum*: induction by ultraviolet irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 55, 178-182, 2008.

KRIENITZ, L., BALLOT, A., KOTUT, K., WIEGAND, C., PÜTZ, S., METCALF, J.S., CODD, G.A., PFLUGMACHER, S. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of lesser flamingos at Lake Bogoria, Kenya. **FEMS Microbiology Ecology** 43, 141-148, 2003.

LEGRAND, B., LESOBRE, J., COLOMBET, J., LATOUR, D., SABART, M., Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. **Harmful Algae**, 58, 16-22, 2016.

LIU, P., WEI, J., YANG, K., MASSEY, I.Y., GUO, J., ZHANG, C., YANG, F. Isolation, molecular identification, and characterization of a unique toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. found in Hunan Province, China. **Journal of toxicology and environmental health, part A**, 81(21), 1142-1149, 2018.

MASULLO, Y.A.G., OLIVEIRA SANTOS, B.A.M., SILVA, E.G., ARAÚJO FERREIRA, A.J. Caracterização e risco ambiental na área da laguna da Jansen, São Luís–Maranhão. XIII Simpósio de Geografia Física Aplicada. **Anais Eletrônicos** [...]Viçosa, Brasil, p. 06-10, 2009. Disponível em: http://www.geomorfologia.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/resumos_expandidos/eixo12/032.pdf. Acesso em 22 de fevereiro de 2020.

MEREL, S., WALKER, D., R. CHICANA, SNYDER, S., BAURÈS, E., THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment international**. 59, 303-327, 2013.

MLAKAR, J., KORVA, M., TUL, N., POPOVIĆ, M., POLJŠAK-PRIJATELJ, M., MRAZ, J., VIZJAK, A. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, 374(10), 951-958, 2016.

MOLICA, R., AZEVEDO, S.M.F.O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecol. Bras**, 13(2), 229-246, 2009.

O'NEIL, J.M., DAVIS, T.W., BURFORD, M.A., GOBLER, C.J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**. 14, 313-334, 2012.

PAERL, H., W., HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**, 320, 57-58, 2008.

PAERL, H.W., XU, H., MCCARTHY, M.J., ZHU, G., QIN, B., LI, Y., GARDNER, W.S. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): the need for a dual nutrient (N & P) management strategy. **Water Research**, 45(5), 1973-1983, 2011.

PEDROSA, C. S., C., SOUZA, L. R., de LIMA, C. V., LEDUR, P. F., KARMIRIAN, K., GOMES, T. A., ANDRES, J. B; COSTA, M.; LARA, F. A.; TANURI, A.; GARCEZ, P. P.; BARBOSA, A. P.; TOVAR-MOLL, F.; MOLICA, R. J. R.; REHEN, S. K. The cyanobacterial saxitoxin exacerbates neural cell death and brain malformations induced by Zika virus. **BioRxiv**, p. 755066, 2019.

PEREIRA, P., BOTELHO, M.J., CABRITA, M.J., VALE, C., MOITA, M.T., GONÇALVES, G. Winter-summer nutrient composition linkage to algae-produced toxins in shellfish at a eutrophic coastal lagoon (Óbidos lagoon, Portugal). **Estuarine Coastal and Shelf Science**, 112, 61-72, 2012.

PHAM, T.L., UTSUMI, M. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. **Jornal Environ. Manag.** 213, 520-529, 2018.

ROUHIAINEN, L., PAULIN, L., SUOMALAINEN, S., HYYTIANEN, H., BUIKEMA, W., HASELKORN, R., SIVONEN, K. Genes Encoding Synthetases of Cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in Anabaena Strain 90. **Molecular Microbiology**, 37(1), 156-167, 2000

SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, 71, 359-385, 2000.

SANTOS, D., MELO, M., MENDES, D., ROCHA, I.B., SILVA, J., CANTANHÊDE, S., MELETTI, P. Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 11(12), 12927-12937, 2014.

SEMA. Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Naturais do Maranhão. **Lauda geoambiental e biológico para reavaliação do Parque Ecológico da Lagoa da Jansen:** Segundo a Lei estadual nº 9.413/2011. Governo do Estado de São Luís do Maranhão, p. 35. 2018.

SHIH, P.M., WU, D., LATIFI, A., AXEN, S.D., FEWER, D.P., TALLA, E., CALTEAU, A., CAI, F., TANDEAU DE MARSAC, N., RIPPKA, R., HERDMAN, M., SIVONEN, K., COURSIN, T., LAURENT, T., GOODWIN, L., NOLAN, M., DAVENPORT, K.W., HAN, C.S., RUBIN, E.M., EISEN, J.A., WOYKE, T., GUGGER, M., KERFELD, C.A. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. 110, 1053-1058, 2013.

SILAMBARASAN, G., RAMANATHAN, T., KATHIRESAN, K. Diversity of marine cyanobacteria from three mangrove environment in Tamil Nadu Coast, South East Coast of India. **Current Research Journal of Biological Sciences**.4, 235-238, 2012.

SILVA, C.S.P., GENUÁRIO, D.B., VAZ, M.G.M.V., FIORE, M.F. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Systematic and applied microbiology**, 37(2), 100-112, 2014.

SILVA, V.E.C., FRANCO, D., FONSECA, A.L.F., FONTES, M.L., ALEJANDRO RODOLFO DONNANGELO, A.R. Space time evolution of the trophic state of a subtropical lagoon: Lagoa da Conceição, Florianópolis Island of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira Recursos Hídricos**. 22, 1-17, 2017.

STEFFEN, M.M., ZHU, Z., MCKAY, R.M.L., WILHELM, S.W., BULLERJAHN, G.S. Taxonomic assessment of a toxic cyanobacteria shift in hypereutrophic Grand Lake St. Marys (Ohio, USA). **Harmful Algae**, 33, 12-18, 2014.

TANABE, Y., HODOKI, Y., SANO, T., TADA, K., WATANABE, M. M. Adaptation of the freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to brackish water is driven by recent horizontal transfer of sucrose genes. **Frontiers in microbiology**, 9, 1150, 2018.

TEIXEIRA, M.G., da CONCEIÇÃO N., COSTA, M., de OLIVEIRA, W.K., NUNES, M.L., RODRIGUES, L.C. The epidemic of Zika virus–related microcephaly in Brazil: detection, control, etiology, and future scenarios. **American journal of public health**, 106(4), 601-605, 2016.

VALLINA, S.M., FOLLOWS, M.J., DUTKIEWICZ, S., MONTOYA, J.M., CERMENO, P., LOREAU, M. Global relationship between phytoplankton diversity and productivity in the ocean. **Nature communications**, 5(1), 1-10, 2014.

WALL, J.M., WOOD, S.A., ORLOVICH, D.A., RHODES, L.L., SUMMERFIELD, T.C. Characterisation of freshwater and marine cyanobacteria in the Hokianga region, Northland, New Zealand. **Journal of Marine and Freshwater Research**, 48(2), 177-193, 2014.

WHO. C. Algae and cyanobacteria in fresh water. Geneva, World Health Organization. **Guidelines for safe recreational water environments**. Volume 1, Coastal and Fresh Waters. 2003.

YUAN, M., CARMICHAEL, W.W., HILBORN, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brasil 1996. **Toxicon**, Elmsford, 48(6), 627-640, 2006.

ARTIGO PARA SUBMISSÃO
REVISTA HARMFUL ALGAE

Diversidade molecular e microscópica de procariontes planctônicos de uma laguna hipereutrofizada na costa norte do Brasil

Milene Viana Brito^a, Marco Valério Jansen Cutrim^a, Leonardo Teixeira Dall’Agnol^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Oceanografia – PPGOceano - UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, N°1966, Bacanga - CEP. 65080-805, São Luís - MA, Brasil.

RESUMO

A laguna da Jansen é um ambiente artificialmente criado após o represamento de uma área de manguezal na cidade de São Luís-MA, Brasil. Neste estudo foi realizada a análise fitoplanctônica e caracterização morfo-molecular de cianobactérias potencialmente tóxicas, buscando relacionar as condições ambientais com maior influência sobre a diversidade e ocorrência de florações. Foram coletadas amostras em cinco pontos da laguna durante os anos de 2018 e 2019 de maneira a representar diferentes regimes pluviométricos. Alíquotas foram inoculadas em meio ASM-1, BG-11 e BG-11N (sem nitrogênio) e também preservadas em formalina para análise do fitoplâncton. As linhagens potencialmente tóxicas identificadas preliminarmente por chaves de identificação morfológica, foram isoladas e identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo posteriormente testadas para detecção de genes das vias biossintéticas da anatoxina, cilindropermopsina, nodularina, microcistina e saxitoxina. Na análise fitoplanctônica foram identificadas 39 espécies de cianobactérias, com a presença de 11 gêneros de cianobactérias possivelmente tóxicas (*Anabaena*, *Anagnostidinema*, *Calothrix*, *Geitlerinema*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Planktolyngbya*, *Scytonema* e *Westiellopsis*), das quais foram obtidas sete cepas isoladas pertencentes aos gêneros *Anabaena*, *Anagnostidinema*, *Microcystis*, *Oscillatoria* e *Westiellopsis*. As características físico-químicas observadas durante este estudo, revelaram aspectos típicos de um ambiente altamente eutrofizado, com excesso de compostos nitrogenados, principalmente a amônia, que podem ter favorecido a maior ocorrência de florações e espécies tóxicas. As principais variáveis ambientais preditivas, selecionadas através do modelo de regressão linear múltipla (GLM) e dos gráficos de dispersão, evidenciaram o aumento da temperatura da água e da salinidade para explicar

a variação da densidade das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU). A distribuição das OTUs 1 e 2, correlacionaram-se com essas variáveis principais e a distribuição da OTU 3 teve maior correlação com as concentrações mais elevadas de nitrogênio total. Esta é a primeira descrição de ocorrência do gênero *Westiellopsis* nessa região, na qual foi detectada a presença dos genes *mcyA* e *mcyE* relacionados a produção de microcistina nessa linhagem. Os resultados confirmam a presença de linhagens toxigênicas de cianobactérias e indicam a necessidade de um monitoramento contínuo mais detalhado da laguna, haja vista sua importância para a saúde ambiental, bem como do ponto de vista sociocultural para a região.

Palavras-chaves: Cianobactérias, Florações tóxicas, laguna costeira, Vias biossintéticas, *Westiellopsis prolifica*.

1 Introdução

As lagunas costeiras são ecossistemas estuarinos que apresentam grande importância em função dos serviços proporcionados, entre os quais: lazer, controle de inundações, recepção de esgoto doméstico e rejeito industrial, beleza cênica e harmonia paisagística (Pérez-Ruzafa et al., 2011; Garcia et al., 2017). Por serem ambientes dinâmicos e de uso múltiplo, sofrem frequentes perturbações e flutuações ambientais (Chapman, 2012; Cutrim et al., 2019a), além de serem alvo da urbanização, que vem acontecendo de forma acelerada (Brito et al., 2012; Cotovicz Junior et al., 2013; Christia et al., 2014).

As comunidades microbianas que habitam os sistemas de transição aquática receberam relativamente pouca atenção no passado (Bazin et al., 2014). A maioria das investigações foi baseada em abordagens morfológicas e realizada em estuários conhecidos e vastos do mundo, concentrando-se geralmente nas grandes frações fitoplanctônicas (Muylaert et al., 2009) ou restritas a uma parte específica do estuário (Lionard et al. 2008). Até o momento, foram realizadas poucas pesquisas de diversidade usando técnicas moleculares no fitoplâncton e em outros protistas que habitam rios ou zonas de transição de água doce-marinha, exceto por alguns estudos recentes restritos a um único ponto e seguindo a dinâmica temporal (Herfort et al., 2011; Xiao et al., 2014; Bazin et al., 2014; Moreno-Pino et al., 2018; Tragin et al., 2018).

Em ambientes lagunares, os eventos de florações algais são frequentes (Santos et al., 2014; Paerl et al., 2011; Steffen et al., 2014), ocorrendo sob condições de temperaturas

acima de 20°C, pH alcalino e excesso de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) oriundos de esgotos urbanos, efluentes de atividades agropastoris e industriais (Zhang et al., 2018). Nessas condições, as cianobactérias tornam-se a parcela dominante do crescimento do fitoplâncton por apresentarem rápido crescimento e adaptação a ambientes eutróficos (Paerl e Otten, 2013). As florações de cianobactérias tendem a serem intensificadas neste século devido ao processo de aquecimento global que causa o aumento da temperatura média do ar e da água em ecossistemas aquáticos (Burford et al., 2020; Gobler, 2020; Griffith e Gobler, 2020).

Florações de cianobactérias são muito prejudiciais ao ambiente, uma vez que, esses microrganismos são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos (Bullerjahn et al., 2016; Harke et al., 2016), sendo que os compostos mais conhecidos são relacionados aos efeitos tóxicos a biota (He et al., 2016; Wall et al., 2014). Em ambientes de águas fluviais os procariontes são os principais microrganismos que estão envolvidos em eventos de proliferação tóxica, também conhecidos como CyanoHABs (Roué et al., 2018). Essa proliferação de cianobactérias nocivas (CyanoHABs) é descrita como biomassa tóxica e irritante, que vem aumentando no mundo inteiro devido a eutrofização das águas e a intensificação nas condições de mudança climática (Philps et al., 2012; Visser et al., 2016).

Durante as florações é frequente encontrar gêneros que produzem cianotoxinas, cuja classificação é realizada de acordo com os órgãos-alvo: hepatotoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas (Merel et al., 2013; Stumphf et al., 2016). Entre essas cianotoxinas, as microcistinas (MCs) promotoras de alterações histopatológicas são as mais comumente encontradas em florações de cianobactérias e são consideradas um dos grupos mais perigosos em todo o mundo (Pham e Utsumi, 2018; Bouaïcha et al., 2019). O interesse nas MCs aumentou devido aos riscos já bem conhecidos para animais, pesca, aquicultura, e saúde humana, através da exposição em águas potáveis, ambientais e de lazer (Corbel e Bouaïcha, 2014; Puddick et al., 2014; Testai et al., 2016). A maioria das espécies tóxicas documentadas são espécies de água fluviais, no entanto as cianobactérias em geral são todas halotolerantes e podem se desenvolver em estuários e águas salgadas (Baxa et al., 2010; Giannuzzi et al., 2012; Cutrim et al., 2019a).

A identificação de cianobactérias com base na morfologia (microscopia óptica), para algumas espécies ainda é pouco eficiente e bastante problemática, devido a taxonomia complexa dos gêneros que possuem flexibilidade fenotípica (Gkelis et al., 2005; Xiao e Reynolds, 2018). Nesta situação encontra-se a família Stigonematales que

possui as espécies morfológicamente mais complexas, com até quatro tipos distintos de células: células vegetativas; heterocistos, hormogônios e acinetos (Finsinger et al., 2008). Possuem reprodução por tricomas multiseriados de ramificação verdadeira e se conhece bem pouco da fisiologia desses organismos, em parte devido à falta de cepas que possam servir de modelos para caracterização das espécies (Pattnaik e Samad, 2018).

Para resolver essas dificuldades, tem-se adotado o uso de dados morfológicos, ecofisiológicos, filogenéticos e moleculares em uma abordagem polifásica para melhor identificação das CyanoHABs (Komárek et al., 2014; Komárek, 2018). A atribuição de táxons a sequências gênicas ainda é um desafio nos métodos de classificação molecular aplicado a amostras ambientais (Bazin et al., 2014; De Oliveira et al., 2019). Contudo, tornou-se mais confiável, rápido e efetivo o uso de abordagens moleculares, baseadas em genes de reação em cadeia de polimerase (PCR) envolvidos na biossíntese de cianotoxinas (Neilan et al., 2013; Legrand et al., 2016).

Neste estudo buscou-se compreender quais são as relações entre as condições ambientais que favorecem o crescimento e florações de cianobactérias em uma laguna costeira hipereutrofizada da região Nordeste do Brasil. Os objetivos foram (i) realizar o levantamento da diversidade de cianobactérias deste ambiente, (ii) verificar se as fortes características eutróficas contribuem para o crescimento de espécies potencialmente tóxicas, e (iii) realizar a prospecção de toxinas por meio do uso de marcadores moleculares específicos para diferentes cianotoxinas, visando contribuir para uma correta avaliação da qualidade ambiental desse local.

2 Materiais e métodos

2.1 Área de estudo e estratégia de amostragem

A laguna da Jansen fica situada na ilha de São Luís do Maranhão, sendo, pois, resultado de sucessivas mudanças antrópicas, que foram diminuindo a sua extensa cobertura de manguezais. Possui uma extensão de 140 hectares e uma profundidade média de 1,5 metro, mantém uma conexão com o mar através de um canal para entrada/saída do fluxo de água entre a laguna e a baía de São Marcos (Cutrim et al., 2019a; Santos et al., 2014).

Este ambiente está classificado na seção II de águas salobras de acordo com a Resolução nº 357/2005 CONAMA (2015) que estabelece os padrões de qualidade da água no Brasil, baseados nos seus parâmetros orgânicos e inorgânicos. Nos quais as condições de qualidade da água não se encontram visivelmente preservadas, pois o entorno da

laguna é altamente urbanizado possuindo vários estabelecimentos comerciais e condomínios residenciais, com vários pontos de lançamento direto de esgoto. Esse lançamento de esgoto *in natura* concede as características eutróficas à laguna.

As coletas foram realizadas na preamar em maré de quadratura, em cinco pontos da laguna, onde já é conhecida a maior ocorrência de cianobactérias e florações algais (L1, L2, L3, L4 e L5), de acordo com os estudos de Cutrim et al. (2019a). Realizaram-se coletas, no período de transição (dezembro/2018), no chuvoso (maio/2019) e na estiagem (outubro/2019). A disposição dos pontos está na Figura 1 e na Tabela S1 do material suplementar.

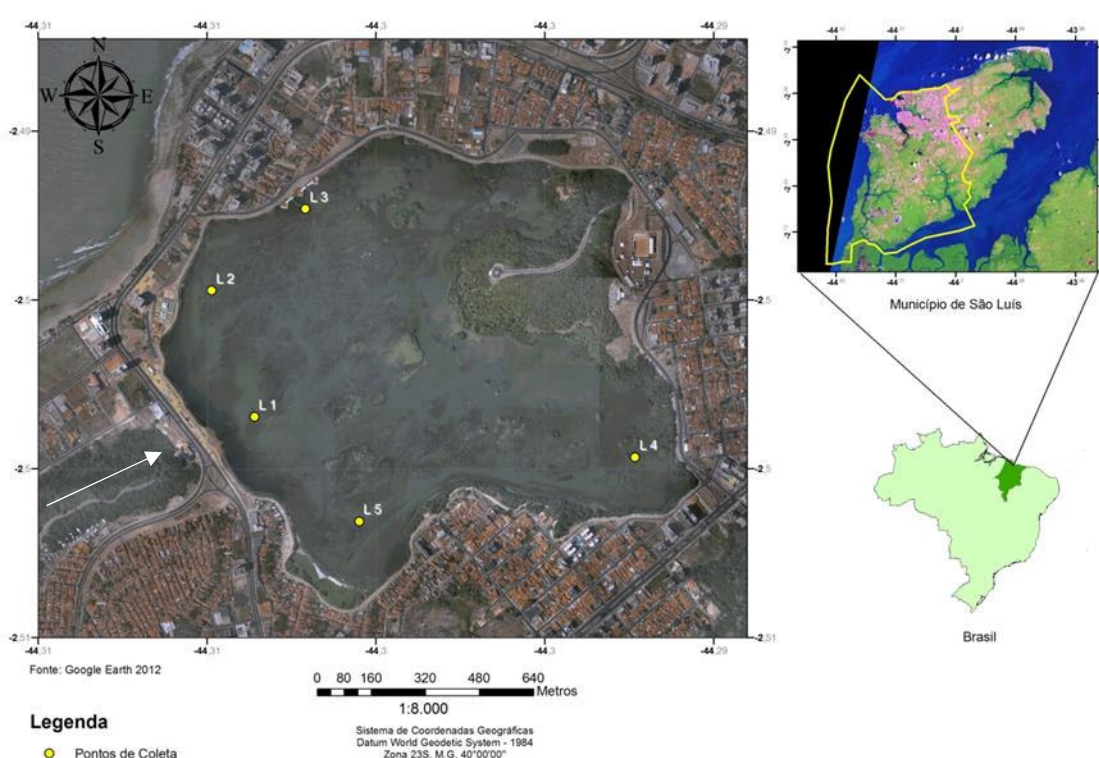


Figura 1. Localização da área de estudo e pontos de amostragem (L1-L5) na laguna da Jansen, Maranhão – Brasil. Seta = canal de entrada da água marinha.

2.2 Caracterização física e química

A análise dos parâmetros físicos e químicos como temperatura da água, pH, salinidade e sólidos totais dissolvidos (TDS), foram obtidos com o auxílio de uma sonda multiparâmetros (Hanna-9878). A transparência da água foi obtida usando o disco Secchi, todos esses parâmetros foram analisados *in situ*.

Para a análise de nutrientes foi coletado um litro de água na camada subsuperficial (50 cm de profundidade) e realizada em laboratório a quantificação de DIN (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), DIP (PO_4^{3-}) e fósforo total (TP) seguindo a metodologia descrita em

APHA (2012). Fósforo total e os nitratos foram determinados utilizando a metodologia descrita por Koroleff (1983).

Na determinação de nitrito usou-se o método de Strickland e Parsons (1972), silicato e ortofosfato seguiu Grasshoff et al. (1983). O oxigênio dissolvido foi determinado pelo método químico de Winkler modificado por Golterman et al. (1978).

2.3 Identificação morfológica da comunidade de cianobactérias e índices ecológicos

Para as primeiras observações da comunidade de cianobactérias foram coletadas amostras de água em arrastos subsuperficiais na zona eufótica com rede de malha de 45 µm, fixadas com formalina a 4%. A identificação foi feita através da montagem de lâminas semipermanentes, utilizando bibliografias específicas e atuais como Komarék et al. (2014), Malone et al. (2015), Vaz et al. (2015) e Guiry e Guiry (2019) para a atualização taxonômica.

Para obtenção da densidade de células (céls. L⁻¹), as amostras foram colocadas para sedimentar por 24 horas, em câmaras de sedimentação de 5 ml e coradas com rosa de bengala (Throdnsen, 1978). As contagens foram feitas em microscópio invertido ZEISS em aumento de 400x, seguindo a técnica de Utermöhl (1958), contagem mínima de 100 campos sistematizados em cruz, calculando-se ao final o total de células existentes em toda a câmara de sedimentação, utilizando a fórmula de Villafañe e Reid (1995).

A comunidade cianobacteriana foi analisada em termos de riqueza de espécies (Margalef, 1958), diversidade (Shannon e Weaver, 1963) e uniformidade (Pielou, 1966). O índice de constância foi expresso em porcentagem em três categorias: constante (> 70%), acessória (70 – 50%) e acidental (<50%), de acordo com Rezende et al. (2015).

2.4 Obtenção dos isolados, extração, amplificação e sequenciamento de DNA

As amostras de água da laguna, para isolamento cianobacteriano, foram coletadas em tubos falcons de 50 ml e mantidas em gelo até o processamento em laboratório. As amostras foram homogeneizadas e inoculadas em três meios de cultura diferentes numa proporção de 1:9: BG-11, BG-11 sem nitrogênio (BG-11S/N) e ASM-1 (Gorham et al., 1964; Rippka et al., 1979). As culturas foram mantidas em uma câmara de fotoperíodo a 28°C com exposição a luz (13h/11h; claro/escuro). Após a triagem preliminar das amostras enriquecidas, através da identificação morfológica das espécies, foram selecionadas sete espécies (*Anabaena circinales*, *Anagnostidinema amphibium*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis* sp₁, *Microcystis* sp₂, *Oscillatoria limosa* e *Westiellopsis prolifica*) mais abundantes e descritas na literatura como produtoras de

cianotoxinas para isolamento e caracterização polifásica. Todas as linhagens isoladas foram depositadas na coleção do Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospeção e Biotecnologia (GBBB) da Universidade Federal do Maranhão.

Adotaram-se duas estratégias principais para isolar as cepas consideradas como potencialmente tóxicas: o método de Rippka et al. (1981) sendo adaptada neste trabalho com diluição seriada em placas de vinte e quatro cavidades (fundo chato), e a separação de tricomas individuais por micromanipulação (Waterbury, 2006). Neste último método aplicou-se a modificação feita por De Oliveira et al., 2019.

O DNA genômico (gDNA) foi extraído com o kit Power Plant (MoBio, California, EUA). A integridade e qualidade do DNA foi conferida através de gel de agarose 1% e leitura em NanoDrop 1000. O DNA foi amplificado por PCR com o termociclador Veriti 96 well (gradiente). Para a amplificação parcial do 16S rRNA foi utilizado o Supermix (Invitrogen, New Jersey, EUA), 0,6 μ M dos iniciadores (Tabela 1), e 50 ng de DNA das amostras.

As condições de amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA foram: (i) 5 minutos a 94 ° C; (ii) 1 min a 94 ° C, 60 ° C por 1min e 72 ° C por 1 min (35 ciclos); (iii) 72 ° C por 10 min.

O potencial tóxico foi testado nas sete cepas isoladas em culturas unialgais não-axênicas usando conjuntos de iniciadores envolvidos na produção de anatoxina (anxC, anaC-gen e anxgen2), cilindrospermopsina (*psM* e *pksM*), microcistina (*mcyA* e HEP), e saxitoxina (*sxtA*), conforme indicado na Tabela 1.

As condições de amplificação foram testadas de acordo com as referências, ocorrendo a seguinte modificação na temperatura de ligação do iniciador *mcyA-cd1* para 54°C.

Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificados com o kit de purificação Illustra GFX™ PCR e Gel (GE Healthcare, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados unidirecionalmente por sequenciamento do tipo Sanger em um prestador de serviço (ACTGene/RS).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA e dos genes relacionados à produção de cianotoxinas

Gene	Iniciador	Sequência	Amplicon	Fonte
16S	CYA106 F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA		

Anatoxina-a	CYA781 R	GACTACWGGGGTATCTAATCCCWT	675pb	(Nübel et al., 1997)
	anxC F	TGAGGGAACAAGTGAGTT		(Rantala-Ylinen et al., 2011)
	anxC R	ATCATCTCCGATCCCAATCC	813pb	
	anaC-gen F	TCTGGTATTCAGTCCCCTCTAT		(Legrand et al., 2016)
	anaC-gen R	CCCAATAGCCTGTCATCAA	366pb	
	anxgen2 F	ATGGTCAGAGGTTTTACAAG		(Legrand et al., 2016)
Cilindropermopsina	anxgen2 R	CGACTCTTAATCATGCGATC	861pb	
	pks M4	GAAGCTCTGGAATCCGGTAA		(Vassas et al., 2013)
	pks M5	AATCCTTACGGGATCCGGTGC	422pb	
	psM13	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC		(Lopes et al., 2012)
Microcistina	psM14	GATGGAACATCGCTCACTGGTG	597pb	
	mcyA-cd1 F	AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA		(Fastner et al., 2003)
	mcyA-cd1 R	AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	297pb	
	HEP F	TTTGGGGTAACTTTTTTGGGCATAGTC		(Jungblut e Neilan, 2006)
Saxitoxina	HEP R	AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT	472pb	
	sxtA F	GATGACGGAGTATTTGAAGC		(Al-Tebrineh et al., 2010)
	sxtA R	CTGCATCTTCTGGACGGTAA	125pb	

2.5 Identificação molecular e construção de árvores filogenéticas e gênicas

As sequências obtidas foram analisadas quanto a qualidade no programa BioEdit (Hall, 2011), tendo sido eliminadas as regiões com baixa qualidade de sequenciamento. Após a edição as sequências foram submetidas ao banco de dados do GenBank utilizando a ferramenta BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificação por homologia, e obtenção das sequências mais próximas visando a construção de árvores filogenéticas e gênicas. As sequências das amostras da laguna foram alinhadas com sequências obtidas no GenBank utilizando a ferramenta ClustalW (Thompson et al., 1994) e os alinhamentos editados manualmente no programa BioEdit (Hall, 2011).

As árvores filogenéticas e gênicas foram inferidas usando o método de Aproximação de Vizinhos (AV) com 1000 réplicas de bootstraps e as distâncias evolutivas foram calculadas utilizando os métodos de Kimura-2-parâmetros no software

MEGA X (Saitou e Nei, 1987; Kimura, 1987; Kumar et al. 2018). Todas as posições que continham lacunas e dados ausentes foram eliminadas, e todas as sequências desse estudo foram depositadas no GenBank.

2.7 Análise estatística

Para análise estatística dos dados ambientais e biológicos, foram realizadas análises individuais de variância ANOVA One – Way (paramétrico) e Kruskal Wallis (não paramétrico), a fim de verificar diferenças espaciais e sazonais das amostras com nível de significância $p < 0,05$. Para cada variável foram testadas a normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) usando o software SPSS (versão 24.0).

O modelo de regressão linear múltipla (GLM), com seleção retroativa de variáveis (usando $p < 0,05$ como inclusão e/ou critério de rejeição), foi aplicada para explorar as relações entre a comunidade das cianobactérias (cepas estudadas/ selecionadas para os testes de toxicidade) citotóxicas, e estas, foram identificadas de acordo com a unidade taxonômica operacional (OTU) das ordens de cianobactérias e as variáveis ambientais, utilizando software Statistic (8.0).

3 Resultados

3.1 Avaliação Ambiental da laguna da Jansen

As principais características físicas e químicas das águas da laguna da Jansen estão resumidas na Tabela 2, com as diferenças significativas espacial e sazonal das variáveis.

Tabela 2. Variação espacial (Esp.) e sazonal (Saz.) das variáveis ambientais e valores de p ($< 0,05$) para os testes de Kruskal Wallis e Anova. * Kruskal Wallis. OD = Oxigênio Dissolvido, MPS= Material Particulado em Suspensão, NO_2^- = Nitrito, NO_3^- = Nitrato, NH_4^+ = Íon Amônio, NT= Nitrogênio total, NID= Nitrogênio inorgânico Dissolvido, PID= Fósforo inorgânico dissolvido, PT= Fósforo total.

Variáveis		Período de Transição			Período Chuvoso			Período de Estiagem			Valores de p	
		MED±DP	MAX.	MIN.	MED±DP	MAX.	MIN.	MED±DP	MAX.	MIN.	Esp.	Saz.
Salinidade	--	22,6±2,1	25	20	8,88±0,36	9,3	8,5	30,7±0,09	30,81	30,6	0,98*	0,002
Temperatura	°C	28,7±0,91	29,66	27,44	28,78±0,65	29,37	28,06	33,7±0,94	34,8	32,5	0,85*	0,009
OD	mg L ⁻¹	3,89±0,75	4,75	3,17	0,97±0,47	1,4	0,36	2,58±0,66	3,6	1,96	0,93*	0,004
pH	--	8,2±0,20	8,57	8,03	7,56±0,55	7,9	6,6	7,94±0,09	8,1	7,9	0,79	0,001*
MPS	mg L ⁻¹	41,08±14,23	64,2	29,2	18,8±2,9	21,2	14,4	82,52±40,95	155,2	55,8	0,57	0,1*
Secchi	cm	46,6±16,38	66	25	66±25,06	95	41	74±13,91	94	55	0,54	0,56

NO ₂ ⁻	μmol L ⁻¹	0,22±0,04	0,28	0,18	0,12±0,08	0,20	0,022	0,12±0,02	0,14	0,10	0,74*	0,009
NO ₃ ⁻	μmol L ⁻¹	3,67±2,2	7,58	2,40	1,56±0,31	2,08	1,29	6,63±8,3	21,45	2,58	0,45*	0,02
NH ₄ ⁺	μmol L ⁻¹	1,04±0,65	2,05	0,50	2,30±0,30	2,57	1,80	37,93±83,81	186,95	0,61	0,43	0,01
NT	μmol L ⁻¹	429,78±89,6	521,16	314,12	289,85±95,8	449,77	214,17	466,90±75,3	556,86	378,38	0,32*	0,04
NID	μmol L ⁻¹	4,70±2,04	8,27	3,29	2,91±0,6	3,56	1,94	44,69±91,95	208,52	3,34	0,84	0,009
PID	μmol L ⁻¹	0,36±0,06	0,45	0,30	2,24±0,19	2,41	1,97	0,56±0,32	0,873	0,22	0,94	0,004
PT	μmol L ⁻¹	27,19±3,59	30,02	20,98	11,68±0,9	12,59	10,65	22,34±7,82	29,37	12,26	0,49	0,44*

Em relação a variação sazonal das variáveis físico-químicas da água, a salinidade (30,7±0,09), a temperatura (33,7±0,94 °C) e o Secchi (74±13,91 cm) apresentaram maiores valores durante o período de estiagem com diferenças significativas. A concentração de oxigênio dissolvido (3,89±0,75 mg L⁻¹) registrou as maiores concentrações no período de transição com significativa diferença sazonal. A distribuição espacial das variáveis ambientais para os pontos de coletas, não apresentou diferenças significativas.

Quanto aos nutrientes, os compostos nitrogenados nitrato (6,63±8,3 μmol L⁻¹), amônia (37,93±83,81 μmol L⁻¹), nitrogênio total (466,90±75,3 μmol L⁻¹) e o NID (44,69±91,95 μmol L⁻¹) foram significativamente maiores na estiagem. Enquanto que, nitrito (0,22±0,04 μmol L⁻¹) foi significativamente maior no período de transição e o PIN (2,24±0,19 μmol L⁻¹) no período chuvoso. Dentre estes, a amônia contribuiu com 77,01% sendo a fração mais representativa do NID. De acordo com a razão de Redfield, o nitrogênio foi o nutriente limitante em 87% das amostras, exceto pelo ponto L1 que no período de transição e estiagem apresentou como limitante o fósforo.

3.2 Diversidade, densidade e ecologia de Cianobactérias

A estrutura da comunidade de cianobactérias da laguna da Jansen foi representada por 39 táxons distribuídos em 4 ordens: Nostocales (5), Chroococcales (12), Oscillatoriales (11) e Synechococcales (11) e 18 gêneros. Sazonalmente, tais ordens ocorreram em todos os períodos de coleta, todavia, no período chuvoso foi observado maior número de táxons (32) em comparação aos períodos de transição (26) e estiagem (25) (Tabela 3).

No período de transição e no período chuvoso, Nostocales (52,7% e 44,09%, respectivamente) e Synechococcales (22,92% e 32,34%, respectivamente) foram os

grupos mais dominantes, enquanto que na estiagem Oscillatoriales (30,56%) e Nostocales (29,02%) foram os grupos mais representativos (Figura 2).

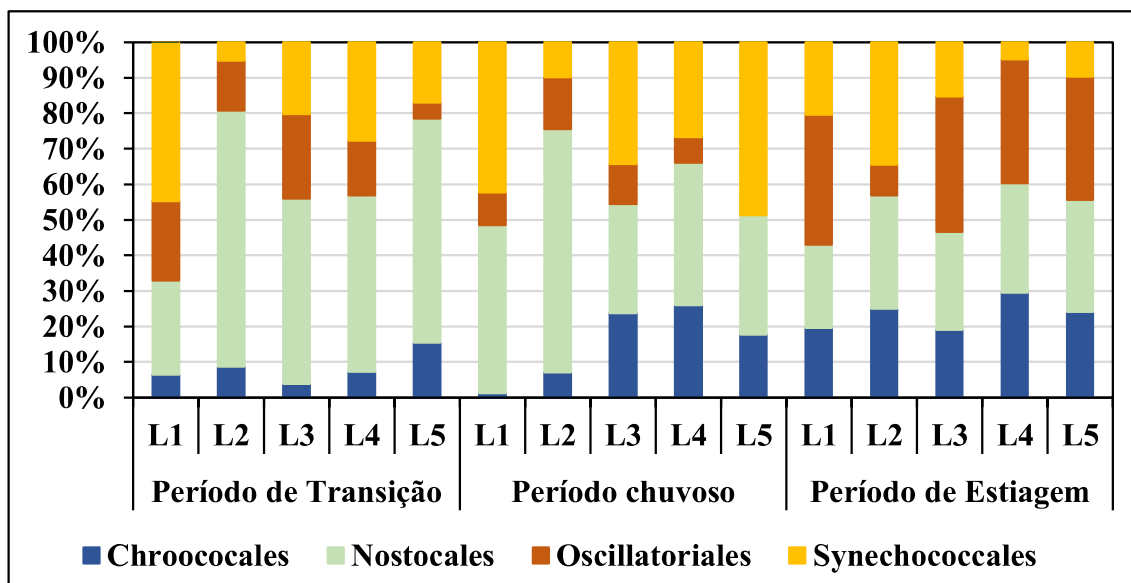


Figura 2. Contribuição percentual dos grupos de cianobactérias considerando os períodos de coleta na laguna da Jansen, São Luís – Maranhão.

A densidade da comunidade de cianobactérias foi maior durante o período de estiagem (4.301×10^4 cells. L^{-1}), onde as espécies *Westiellopsis prolifica*, *Anagnostidinema amphibium*, *Planktolyngbya limnetica*, *Aphanocapsa incerta*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis botrys*, *Chroococcus limneticus* e *Anabaena circinales* apresentaram maiores valores. (Tabela 3)

Vale ressaltar, que neste período foram observados eventos de florações em todos os pontos de coleta, com a contribuição de *Westiellopsis prolifica* e *Planktolyngbya limnetica*, em L1, *Aphanocapsa* sp. e *Westiellopsis prolifica* em L2, *Westiellopsis prolifica* e *Geitlerinema* sp. Em L3, *Westiellopsis prolifica* e *Anagnostidinema amphibium* em L4, *Aphanocapsa incerta* e *Westiellopsis prolifica* em L5.

Dentre as espécies de cianobactérias identificadas, 46% foram consideradas acidentais, 31% acessórias e 23% constantes. Em relação as espécies constantes, destacam-se *Anabaena circinales*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria limosa* e *Westiellopsis prolifica* com ocorrência maior que 50% (Tabela 3). De acordo com a literatura especializada, estas espécies são consideradas potencialmente produtoras de cianotoxinas (citotóxicas) e foram agrupados em Unidades Taxonômica Operacionais (OTUs), sendo posteriormente testadas para genotoxicidade.

Tabela 3. Contribuição da densidade de cianobactérias e o índice de Constância durante os períodos sazonais na laguna da Jansen, onde: IC – Índice de Constância, CO – Constante, ACE – Acessória, ACI – Acidental.

TÁXONS	Densidade (10^4 cel. L ⁻¹) - Espacial					Densidade (10^4 cel. L ⁻¹) - Sazonal			IC
	L1	L2	L3	L4	L5	Transição	Chuvoso	Estiagem	
	Nostocales								
<i>Anabaena circinales</i>	-	53,42	48,61	23,10	50,06	7,70	28,40	139,10	CO
<i>Calothrix brevissima</i>	2,89	3,85	14,44	4,33	-	11,07	14,44	-	ACE
<i>Calothrix fusca</i>	2,41	0,96	20,70	16,37	6,26	13,00	13,00	20,70	ACE
<i>Scytonema</i> sp.	-	-	3,85	-	-	-	3,85	-	ACI
<i>Westiellopsis prolifica</i>	199,74	142,99	139,10	142,50	146,84	13,47	124,70	631,01	CO
Chroococcales									
<i>Aphanothece</i> sp.	32,73	42,84	124,18	35,62	46,69	18,29	139,58	124,18	ACE
<i>Asterocapsa</i> sp.	0,96	-	-	-	-	-	0,96	-	ACI
<i>Chroococcus dispersus</i>	20,70	69,79	86,16	32,73	40,43	67,39	26,47	155,95	ACE
<i>Chroococcus limneticus</i>	169,91	39,47	30,32	52,95	97,71	38,99	91,45	259,91	CO
<i>Chroococcus minimus</i>	106,37	17,33	47,65	31,29	50,54	-	114,07	139,10	CO
<i>Chroococcus turgidus</i>	2,41	2,41	2,89	-	0,96	4,33	1,93	2,41	ACI
<i>Chroococcus</i> sp.	11,55	14,44	30,80	-	-	56,80	-	-	ACE
<i>Microcystis aeruginosa</i>	7,22	98,67	15,40	117,44	52,46	77,01	44,76	169,43	CO
<i>Microcystis botrys</i>	0,96	72,20	0,96	0,96	63,53	1,93	0,96	135,73	ACE
<i>Microcystis viridis</i>	-	-	3,85	-	1,44	-	5,29	-	ACI
<i>Microcystis proctocystis</i>	3,85	2,41	6,26	-	1,93	5,29	9,15	-	ACE
<i>Microcrocis pulchella</i>	-	-	17,33	5,29	-	-	17,33	5,29	ACI
Oscillatoriales									
<i>Anagnostidinema amphibium</i>	182,42	61,13	82,31	132,85	98,19	21,18	38,02	497,69	CO
<i>Geitlerinema</i> sp.	1,44	-	138,14	-	-	1,44	-	138,14	ACI
<i>Oscillatoria limosa</i>	1,93	2,89	0,48	2,89	1,44	6,26	0,96	2,41	CO
<i>Oscillatoria perornata</i>	-	-	2,41	-	-	-	0,48	1,93	ACI
<i>Oscillatoria princeps</i>	-	2,41	2,89	1,44	0,96	3,85	1,44	2,41	ACI
<i>Oscillatoria</i> sp.	0,96	-	-	-	0,96	1,93	-	-	ACE
<i>Phormidium tergestinum</i>	-	0,96	0,48	0,48	-	-	1,44	0,48	ACI
<i>Phormidium</i> sp.	22,14	9,63	5,29	-	-	1,44	0,48	35,14	ACE
<i>Planktothrix agardhii</i>	-	-	0,96	3,37	2,89	3,37	-	3,85	ACE
<i>Planktothrix isothrix</i>	0,96	-	-	-	-	-	0,96	-	ACI
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	195,90	13,00	131,88	44,76	79,90	38,51	38,51	388,43	CO
Synechococcales									
<i>Aphanocapsa incerta</i>	128,99	62,09	82,31	-	142,47	-	170,39	245,48	ACE
<i>Aphanocapsa</i> sp.	25,51	162,69	76,05	63,05	23,10	61,61	50,06	238,74	ACE
<i>Leptolyngbya faveolarum</i>	2,41	17,81	11,55	-	-	2,41	-	29,36	ACI
<i>Leptolyngbya</i> sp.	95,78	14,92	37,54	33,69	43,80	18,29	78,46	128,99	CO
<i>Merismopedia glauca</i>	27,92	-	-	-	-	-	27,92	-	ACI
<i>Merismopedia tenuissima</i>	38,02	-	-	-	-	-	38,02	-	ACI
<i>Pseudoanabaena galeata</i>	-	13,48	-	-	-	-	-	13,48	ACI
<i>Rhabdoderma lineare</i>	-	-	12,51	11,55	-	24,07	-	-	ACI
<i>Synechococcus</i> sp.	-	-	18,77	-	14,92	-	33,69	-	ACI
<i>Synechocystis aquatilis</i>	-	-	3,85	-	4,81	3,85	4,81	-	ACI
<i>Synechocystis</i> sp.	11,55	-	-	-	-	11,55	-	-	ACI

A diversidade das espécies entre os pontos variou em média de $2,09 \pm 0,24$ bits. Cél.L⁻¹ para todos os períodos estudados, com valor mínimo de 1,5 bits. Cél.L⁻¹ no período

de transição e máximo de 2,3 bits. Cél.L⁻¹ na estiagem. Assim foi considerada como média diversidade de espécies. A riqueza obteve maior valor na transição (2,7) e menor na estiagem (1,1) indicando um ambiente de baixa riqueza de espécies. A equitabilidade apresentou maior registro na estiagem (0,89) e menor na transição (0,57), considerou-se esta distribuição relativamente uniforme e equitativa, pois acima de 0,5 e ao se aproximar de 1 a comunidade tende a estar mais bem distribuída no ambiente (Figura 3).

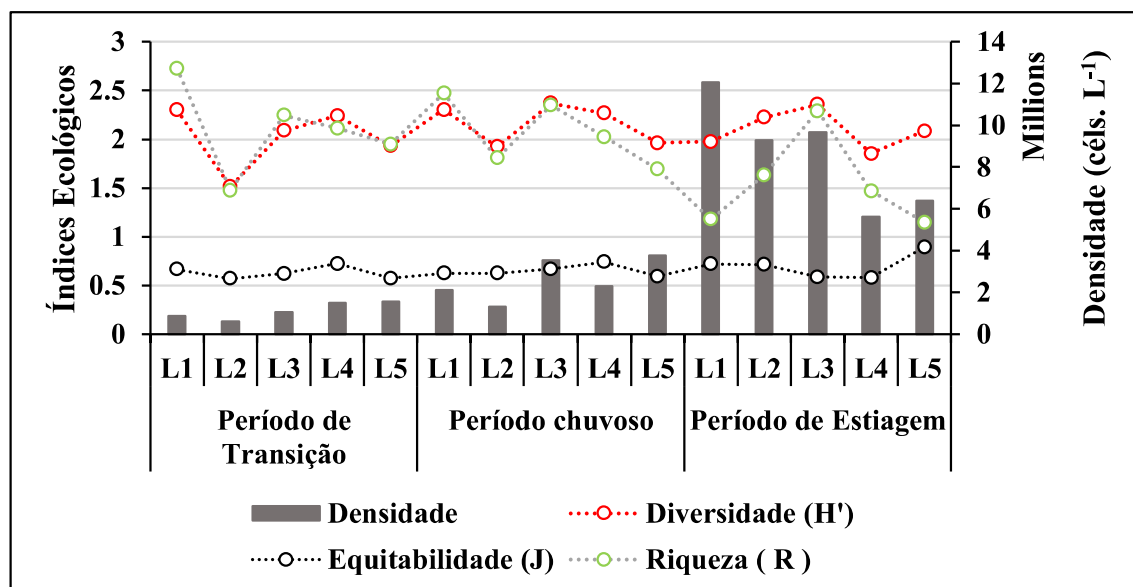


Figura 3. Variação espacial dos valores de densidade do fitoplâncton (cél. L⁻¹), diversidade (bits célula⁻¹) e índices de uniformidade e riqueza na laguna da Jansen.

3.4 Cepas isoladas

3.4.1 Morfologia e comportamento em cultura

Sete cepas potencialmente tóxicas foram isoladas (Figura 4). Dentre elas, quatro apresentam estrutura filamentosa, sendo duas destas filamentosas heterocitadas, e três cepas foram cocóides coloniais. A análise morfológica permitiu a identificação das mesmas como pertencente as ordens Chroococcales, Nostocales e Oscillatoriales (Tabela 4).

Tabela 4. Cianobactérias potencialmente tóxicas isoladas da laguna da Jansen.

Ordem	Espécie	Ponto de amostragem	nº de acesso	Cepa	Cultura
Chroococcales	<i>Microcystis aeruginosa</i>	L3	MT792731	GBBB11	ASM-1
	<i>Microcystis</i> sp ₁	L3	MT792732	GBBB12	ASM-1
	<i>Microcystis</i> sp ₂	L2	MT792733	GBBB13	ASM-1
Nostocales	<i>Anabaena circinalis</i>	L2	MT792730	GBBB10	BG-11 s/n

	<i>Westiellopsis prolifica</i>	L2	MT792729	GBBB09	BG-11 s/n
Oscillatoriales	<i>Anagnostidinium amphibium</i>	L3	MT792734	GBBB14	BG-11
	<i>Oscillatoria limosa</i>	L3	MT792735	GBBB15	BG-11

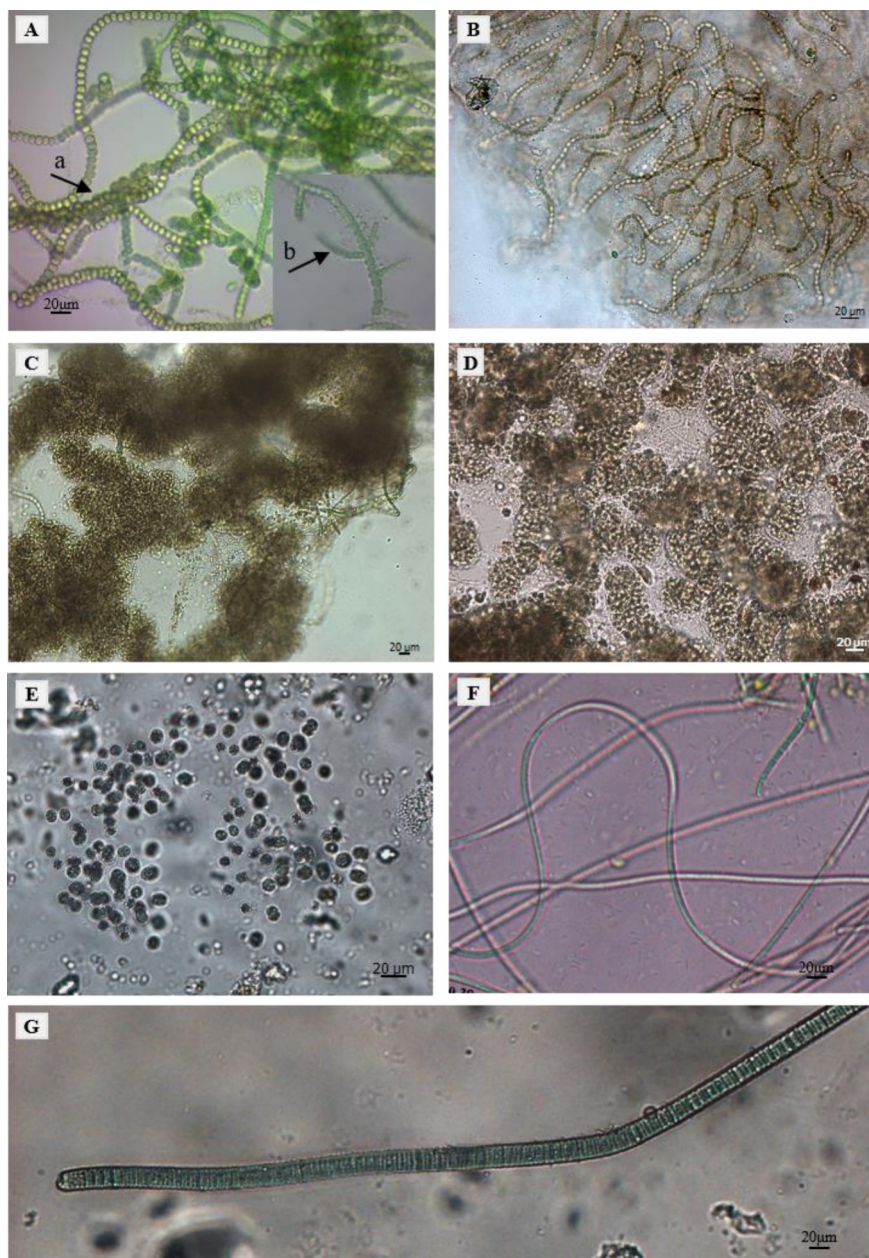


Figura 4. Espécies de cianobactérias isoladas para os testes de detecção de cianotoxinas. A -*Westiellopsis prolifica* GBBB09; B - *Anabaena circinalis* GBBB10; C - *Microcystis aeruginosa* GBBB11; D - *Microcystis* sp₁ GBBB12; E - *Microcystis* sp₂ GBBB13; F - *Anagnostidinium amphibium* GBBB14; G - *Oscillatoria limosa* GBBB15

Westiellopsis prolifica – Janet (1941) Komárek et al. (2014) (Figura 4A) - **Cepa**

GBBB09

Descrição: A cultura é formada por biomassa colonial de filamentos de tom verde claro, composta por tricomas flutuantes que possuem células arredondadas vegetativas e em formato de barril, heterocitadas com disposição ordenada intercalar (12-18 células vegetativas e um heterocisto), com pseudohormocistos (a) que são divisões longitudinais dos ramos e com ramificação do tipo T (b). As células são mais largas (7-9 μm) do que longas (5-7 μm) e com pigmentos dispersos visíveis em microscopia óptica, com acinetos oblongos e de comprimento maior (10 – 15 μm).

Anabaena circinales – Rabenhorst (1863) (Figura 4B) - **Cepa** **GBBB10**

Descrição: A cultura é formada por biomassa densa colonial de filamentos simples ou pouco ramificados, com coloração verde escuro acastanhado, bainha difluente e heterocistos intercalares (8-12 células vegetativas e um heterocisto), os acinetos em formato arredondado e diâmetro celular muito maior (5-7 μm) do que os das demais células. As células vegetativas são mais longas (4-7 μm) do que largas (4-6 μm).

Microcystis aeruginosa – (Kützing) Kützing (1846) (Figura 4C) - **Cepa** **GBBB11**

Descrição: Na cultura as colônias são flutuantes, com disposição irregulares ou lobadas, de tom verde azulado, células de formato redondo com diâmetro celular de 3 a 4,7 μm , com vários aerótopos e mucilagem inconspícua, formando as vezes espaços vazios e cobertos de mucilagem entre as colônias.

*Microcystis sp*₁– (Kützing) Lemmermann (1907) (Figura 4D) - **Cepa** **GBBB12**

Descrição: Na cultura as colônias formam aglomerados flutuantes de tom verde escuro, células de formato redondo com diâmetro de 4 – 6,5 μm e com aerótopos visíveis. A mucilagem é conspícua formando grupos bem delimitados e sobrepostos em uma biomassa densa.

*Microcystis sp*₂– Kützing (Lemmermann, 1907) (Figura 4E) - **Cepa** **GBBB13**

Descrição: Na cultura as colônias são flutuantes de tom verde brilhante, células de formato redondo com diâmetro de 6-7 μm e com aerótopos visíveis. A mucilagem nas colônias é conspícua formando grupos delimitados com células mais separadas.

Anagnostidinema amphibium – (Agardh ex Gomont 1892) Strunecky et al. 2017 (Figura 4F) - **Cepa GBBB14**

Descrição: A cultura apresentou filamentos dispostos em biofilme verde escuro, com muita mucilagem. Tricomas solitários, longos e muito finos, com células subquadráticas mais longas (7,2 – 8,2 μm) do que largas (2,8 – 3,1 μm), levemente curvos no ápice e móveis, com presença de pequenos grânulos dispersos em todo o conteúdo celular.

Oscillatoria limosa – C.Agardh ex Gomont (1892).

(Figura 4G) - **Cepa GBBB15**

Descrição: A cultura apresentou filamentos disposto em biofilme flutuante de coloração verde claro. Os tricomas são solitários, longos, com células estreitas (2,4 – 2,9 μm) e mais largas (8,6 – 9,4 μm), filamentos não constrictos, sem bainha e com célula apical levemente atenuadas e curva. Os tricomas possuem acima de 50 células.

3.4.2 Identificação molecular e filogenia

Os resultados de identificação molecular por homologia de sequência com o banco de dados do GenBank estão disponíveis na Tabela S2 (material suplementar). As cepas GBBB09 (*Westiellopsis prolifica*), 10 (*Nostoc* ou *Anabaena*) e 11 (*Microcystis aeruginosa*) apresentaram boa concordância com a identificação morfológica, com altos valores de cobertura e identidade. As cepas GBBB12 e 13 também apresentaram valores altos tanto de identidade e cobertura, porém discordando da identificação morfológica. Já as cepas GBBB14 e 15 apresentaram valores de cobertura e/ou identidade abaixo do necessário para fechar uma identificação molecular confiável.

Para o marcador 16S rRNA a construção da árvore pelo método de AV envolveu 41 sequências nucleotídicas e um total de 648 posições no conjunto de dados final (Figura 5).

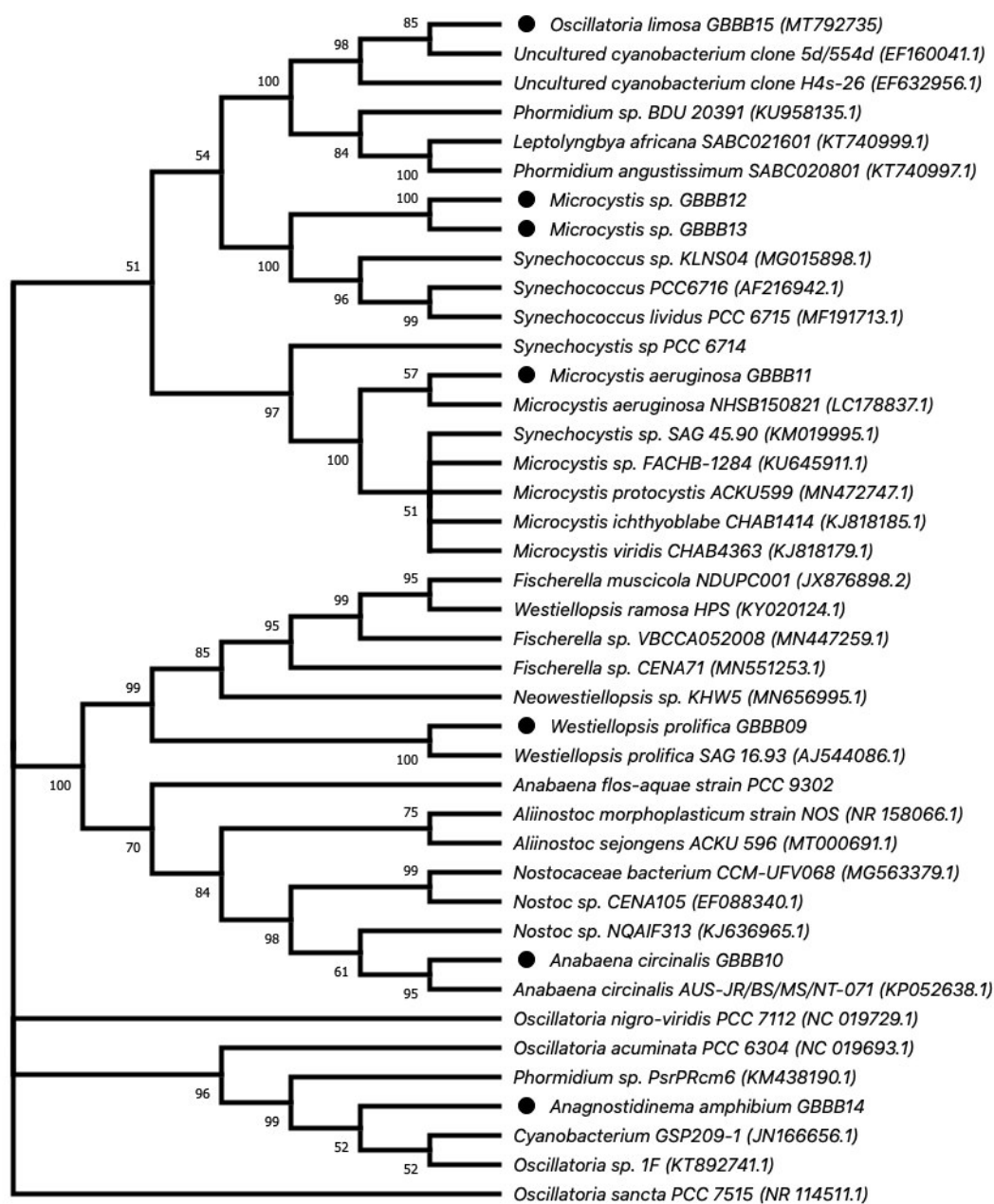


Figura 5. Árvore de Aproximação de Vizinhos construída no MEGA X baseada no gene 16S rRNA de cianobactérias isoladas da laguna da Jansen (marcadas com •). Sequências de cianobactérias obtidas do GenBank com indicação do seu número de acesso entre parênteses. Valores de bootstrap menores que 50% foram colapsados.

3.5 Prospecção e identificação molecular de genes de cianotoxinas

Não foi possível obter amplificação com os iniciadores *pksM*, *psM*, *anxC*, *anaC*-gen, *anxgen-2* e *sxtA* nas amostras testadas. O marcador *mcyA* que é o gene envolvido na primeira etapa de produção de microcistina, apresentou amplicon no tamanho esperado (297pb) e foi detectado apenas na cepa *Westiellopsis prolifica* GBBB09.

O HEP é um iniciador desenhado para identificar as cianobactérias que tem o domínio da aminotransferase do gene *mcyE*, compartilhado também com a via de biossíntese da nodularina. O mesmo apresentou amplificação positiva (472 pb) para a amostra da cepa GBBB09, reafirmando a via metabólica da produção de microcistina nesse isolado.

Os resultados de identificação molecular por homologia de sequência com o banco de dados do GenBank estão disponíveis na Tab. S3 (material suplementar). Em ambos os marcadores houve alta cobertura e identidade (>98%) com genes da via da microcistina do gênero *Fischerella*. Este resultado pode ser explicado pelo fato de não haver sequências dos genes *mcyA* e *mcyE* relacionadas ao gênero *Westiellopsis* depositadas no GenBank para comparar com as nossas amostras.

Para a construção das árvores gênicas com os marcadores *mcyA/mcyE* a análise envolveu 26/24 sequências nucleotídicas e um total de 245/425 posições no conjunto de dados final, respectivamente (Figura 6).

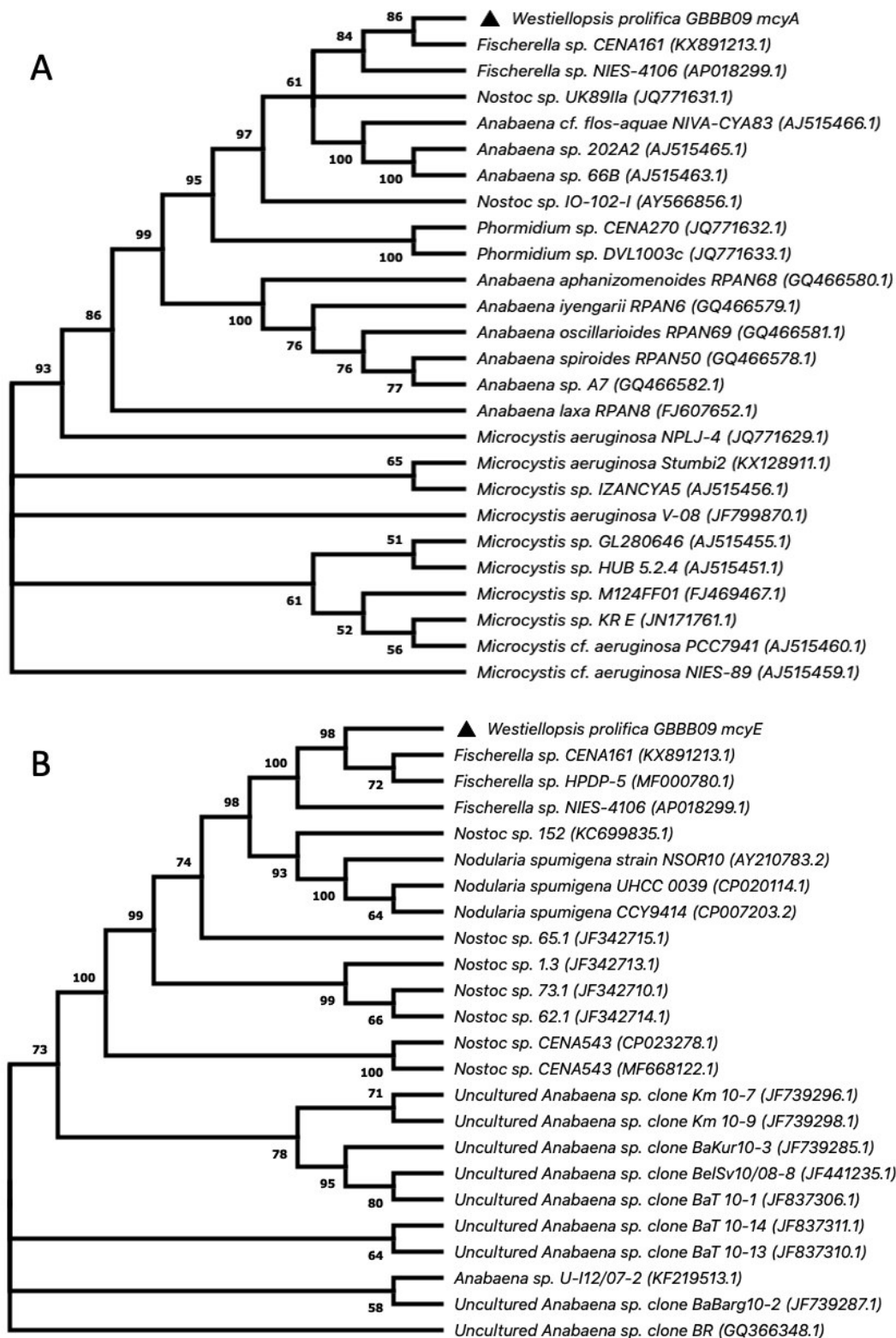


Figura 6. Árvores de diversidade gênica *mcyA* (A) e *mcyE* (B) construídas pelo método de Aproximação de Vizinhos (AV). Sequências de *Westiellopsis prolifica* GBBB09 isolada da laguna da Jansen (destacadas com ▲). Sequências de cianobactérias obtidas do GenBank com indicação do seu número de acesso entre parênteses. Valores de bootstrap

menores que 50% foram colapsados. Números de acessos *mcyA* (MT795720) e *mcyE* (MT795721).

3.6 Interrelação das Cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e as variáveis ambientais

As análises de modelos de regressão linear múltipla (GLMs), foram realizadas para identificar as principais variáveis preditivas, em função da densidade de cada unidade taxonômica operacional (OTU), de cianobactérias potencialmente produtoras de cianotoxinas (citotóxicas), das ordens: Nostocales (OTU 1), Chroococcales (OTU 2) e Oscillatoriales (OTU 3) está resumida na Tabela 5.

Tabela 5. Relação das OTUs de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas e variáveis ambientais. Temp = Temperatura, NO₂⁻ = Nitrito, STD = Sólidos Totais Dissolvidos, NO₃⁻ = Nitrato, NT = Nitrogênio Total, PT = Fósforo Total, Nível = p>0,05*, p<0,01**

		Coefficiente	Erro Padrão	Tolerância	t	Valor de p
OTU 1	Densidade	0,418500	0,074039	0,121515	5,65240	0,002407**
	Temp.	0,824610	0,107850	0,057268	7,64589	0,000609**
	Secchi	0,195545	0,060855	0,179870	3,21328	0,023642*
	NO₂⁻	-0,404961	0,081489	0,100314	-4,96955	0,004213**
	STD	0,236071	0,058228	0,196466	4,05424	0,009784**
	Pluv	-0,476779	0,161050	0,025682	-2,96045	0,031503*
OTU 2	Temp.	3,92457	0,639944	0,010249	6,13269	0,008718**
	NT	0,95607	0,169188	0,146637	5,65093	0,010970*
	PT	1,20830	0,199933	0,105005	6,04351	0,009086**
	NO₂⁻	1,19097	0,249505	0,067425	4,77333	0,017471*
	Salinidade	-3,55929	0,971471	0,004448	-3,66381	0,035151*
OTU 3	NT	0,696863	0,310681	0,411393	2,24302	0,048754*

A partir dos GLMs, o modelo 1 demonstrou maior precisão, com R² ajustado de 0,991, sendo a densidade das cianobactérias citotóxicas fortemente correlata com a dominância da OTU 1. Dentre as variáveis ambientais, a temperatura, STD e a transparência da água foram as responsáveis pela alta dominância da OTU 1 com uma relação direta e altamente significativa, e inversamente com o nitrito confirmando sua participação no processo de desnitrificação realizado por esta OTU.

Já a densidade da OTU 2 (R² ajustado = 0,941) também revelou uma relação de dependência com a temperatura da água, porém menos significativo quando comparado ao modelo 1. Além disso, o modelo 2 selecionou os compostos fosfatados (PT) e nitrogenados (NT e NO₂⁻) como variáveis explicativas. E por fim, no modelo 3, o número de variáveis ambientais selecionadas como variáveis explicativas para a ocorrência da

OTU 3 foi menor que os modelos anteriores com um R^2 ajustado de 0,444, selecionando apenas o nitrogênio total como sua variável preditiva.

Os gráficos de dispersão, plotados a partir das variáveis selecionadas pelos GLMs (Figura 7), retomam que a densidade da comunidade citotóxica é influenciada pelas flutuações da temperatura da água e salinidade, evidenciando a formação de dois grupos de táxons condicionados por uma faixa de temperatura (ZX) e de salinidade (ZY). Quando os valores dessas variáveis estiveram elevados na laguna, a maior densidade celular foi registrada e conseqüentemente o crescimento dessa comunidade (Figura 7a).

Corroborando com o GLM, a OTU 1 foi considerada como principal contribuinte da densidade citotóxica, formada por espécies que preferem temperaturas mais elevadas (32 a 35°C), baixas concentrações de STD (20 a 30 mg. L⁻¹), maior transparência da água (50 a 90 cm) e na faixa de concentrações de 0,10 a 0,20 μmol. L⁻¹ de nitrito (Figura 7b,c).

A Figura 7d indicou que a OTU 2 aumenta a sua densidade em uma faixa similar de temperatura (33 a 35°C) quando comparada com a OTU 1. Em relação ao PT, NO₂ e NT, ela ocorre em uma faixa ampla de distribuição sem preferências nutricionais (Figura 7d,e). A Figura 7f mostrou que 80% da densidade da OTU 3 não apresenta a temperatura como um fator condicionante para a sua distribuição, possuindo melhor afinidade com concentrações de nitrogênio total na faixa de 300 a 550 μmol. L⁻¹.

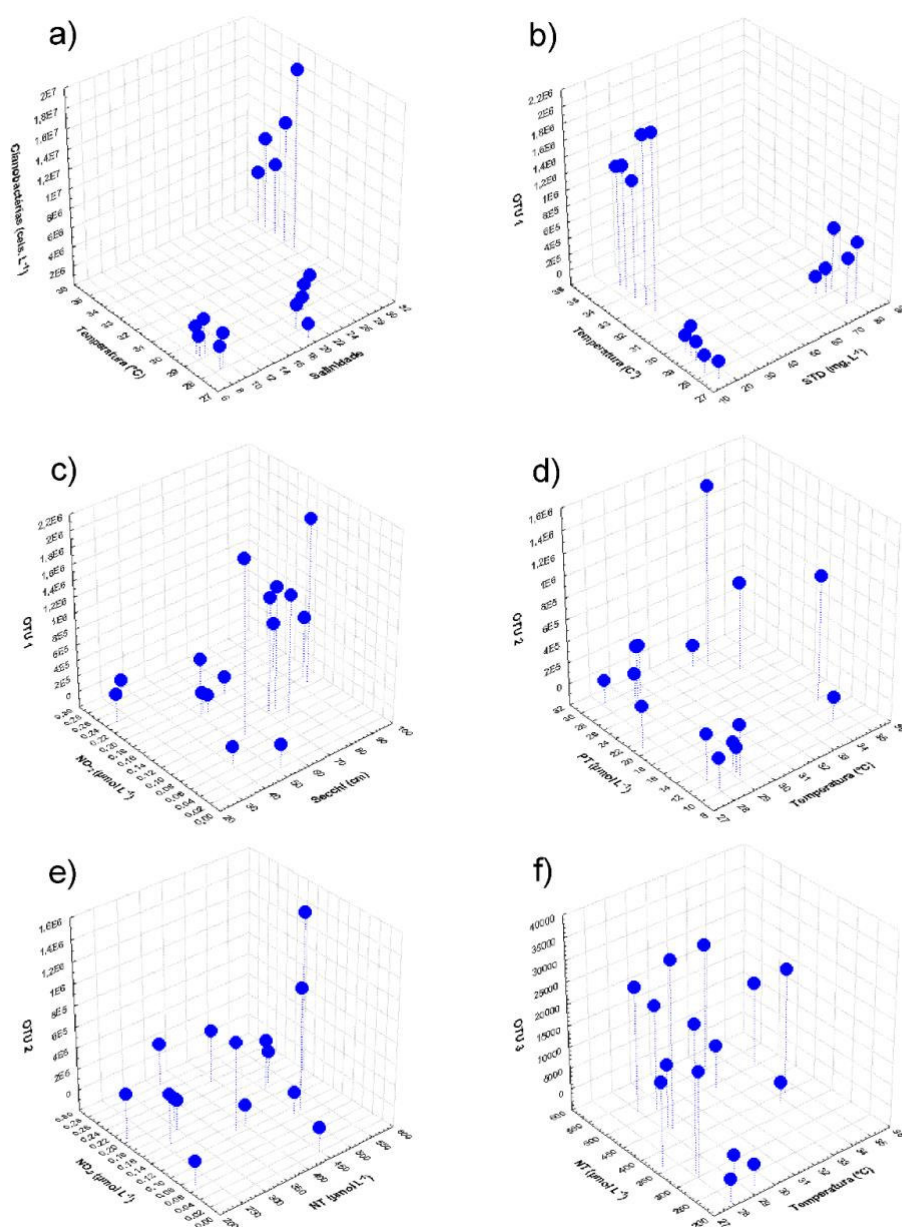


Figura 7. Gráfico de dispersão tridimensional da densidade cianotóxica e de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU1, 2 e 3) com as variáveis ambientais selecionadas pelos GLMs.

4 Discussão

4.1 Relação das variáveis ambientais e a diversidade de cianobactérias toxigênicas

A laguna da Jansen é um ambiente com várias fontes de estresse antropogênicos, onde o crescimento populacional foi intensificando os graves problemas ambientais que acontecem no entorno, principalmente o lançamento de esgoto doméstico, acarretando prejuízos como a eutrofização deste ambiente (Cutrim et al., 2019a; Cutrim et al., 2019b).

As características físicas e químicas observadas na laguna durante este estudo variaram significativamente de forma sazonal e revelaram aspectos que são típicos de águas salobras e de um ambiente altamente eutrofizado. Demonstrados pelos altos níveis de material particulado em suspensão (MPS), elevadas temperaturas, baixa profundidade de Secchi, baixa taxa de oxigênio dissolvido e pH alcalino, assim como observado em outras lagunas costeiras estuarinas (Coutinho et al., 2012; Coelho et al., 2015).

De acordo com (Beversdorf et al., 2013; Knoche et al., 2017) o nitrito é utilizado no metabolismo de alguns grupos de cianobactérias, entre esses, Nostocales. Na laguna da Jansen, as análises de GLM demonstraram que a OTU 1 (Nostocales) relacionou-se negativamente com o nitrito, permitindo inferir que esse nutriente pode ser utilizado por esse grupo de cianobactéria no seu metabolismo. Em relação a salinidade, Ma et al. (2014), demonstraram que as Chroococcales apresentam preferência por baixas salinidades, o mesmo verificado na laguna da Jansen com a OTU 2, composta pelas espécies de *Microcystis*. Sabe-se que salinidade interfere na formação da bainha mucilaginosa, condicionando assim essa preferência das Chroococcales por ambientes fluviais (Kruk e Segura, 2012).

Em condições de temperaturas mais elevadas, as cianobactérias citotóxicas da OTU 1 e OTU 2 demonstraram, pelos gráficos de dispersão (Figura 7a, b,c,d), que são os grupos mais facilmente adaptados a este cenário no ambiente lagunar, e dessa forma tem contribuído significativamente para a aumento da densidade cianobacteriana, principalmente na estiagem. Enquanto a OTU 3(Figura 7f) tem maior afinidade com as concentrações mais elevadas de nitrogênio total. Em relação a estas condições, Gobler et al. (2016), revelaram que em temperaturas elevadas e principalmente excessos de nutrientes nitrogenados as cianobactérias tóxicas dominam sobre o fitoplâncton e sobre as cepas que não produzem toxinas devido a adaptação rápida a ambientes eutróficos.

Como estabelece a Resolução CONAMA nº 357/2005 (2015) os valores de compostos inorgânicos mensurados nesse estudo (nitrito, nitrato, amônia, nitrogênio total e fósforo total) estão todos acima dos limites aceitáveis para a classe II, na qual está enquadrada a laguna, independente do período sazonal situado. Isto tem evidenciado que apesar do fechamento de alguns pontos de lançamento de esgotos, as águas deste ambiente não estão adequadas para práticas de lazer ou de pesca, e tais atividades foram observadas em todas as coletas deste estudo.

Das 39 espécies identificadas neste trabalho, 30 foram citadas pela primeira vez quando comparada ao trabalho de Cutrim et al. (2019a). Dessas, foi registrada a co-

ocorrência de 11 gêneros de cianobactérias possivelmente tóxicas neste ambiente (*Anabaena*, *Anagnostidinema*, *Calothrix*, *Geitlerinema*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Planktolyngbya*, *Scytonema* e *Westiellopsis*, de acordo com Bukowska et al. (2017), Buratti et al. (2017). A respeito disso Metcalf e Codd (2020) apontaram que a co-ocorrência de gêneros potencialmente produtores de toxinas em ambientes aquáticos eutrofizados tem aumentado o risco de contaminação a muitas espécies aquáticas.

Esta é a primeira descrição de ocorrência do gênero *Westiellopsis* para esse ambiente, e também é a primeira vez que se demonstra a presença de genes da via metabólica de microcistina na região da laguna. A espécie *Westiellopsis prolifica* obteve densidade representativa durante a análise quantitativa deste estudo, e foi considerada constante neste ambiente demonstrando ser bem adaptada ao mesmo. Vale ressaltar, que essa espécie é típica de ambientes dulcícolas e águas limpas (Finsinger et al., 2008), porém a qualidade da água da laguna da Jansen é enquadrada como hipereutrófica (Cutrim et al., 2019a) com presença marcante de lançamentos de esgotos domésticos na área do entorno. De acordo com Abed et al. (2013), essa espécie é capaz de crescer em águas de esgotos podendo usar várias substâncias orgânicas para o seu metabolismo, entre esses, o nitrito que é considerado como uma forma tóxica no ambiente (Flores et al., 2005; Knoche et al., 2017), transformando-o em amônia ou nitrato, o que justifica as altas concentrações destes componentes durante todos os períodos sazonais estudados.

De acordo com a última atualização dos táxons de cianobactérias descritos no trabalho de Komárek et al. (2018) esta espécie encontrada em densidade alta durante os episódios de floração, pertence a ordem Nostocales e de família já conhecida (*Hapalosiphonaceae*) por apresentar táxons produtores de vários tipos de toxinas (Belykh et al., 2011; Cirés et al., 2014).

Os estudos moleculares são ferramentas suplementares de alta sensibilidade na identificação morfológica dos procariontes clorofilados (Li et al., 2019), no qual, o uso da análise do gene 16S rRNA das sete amostras isoladas permitiu a confirmação das cepas GBBB09 (*Westiellopsis prolifica*), GBBB10 (*Anabaena circinalis*), e GBBB11 (*Microcystis aeruginosa*) e ainda revelou a presença de táxons crípticos nas cepas GBBB12 (*Microcystis* sp1.), GBBB13 (*Microcystis* sp2.), e incerteza na classificação nas cepas GBBB14 (*Anagnostidinema amphibium*) e GBBB15 (*Oscillatoria limosa*).

O gene 16S rRNA é utilizado como marcador genético universal para estudos filogenéticos bacterianos, porém é reconhecido na literatura que o mesmo apresenta baixa

resolução para grupos proximamente relacionados ou que divergiram recentemente. Nesses casos é necessário utilizar outros marcadores como o operon da ficocianina, a RNA polímera, a RuBisCO ou regiões intergênicas como ITS (Dall'Agnol et al., 2012; Řeháková et al., 2014). Em nosso estudo as cepas GBBB12 e 13 apresentaram resultados discordantes da identificação morfológica (*Synechococcus* x *Microcystis*), porém ambos os gêneros apresentam alta homologia nesse marcador. Já as cepas GBBB14 e a GBBB15 obtiveram baixa similaridade com sequências do banco de dados. Em ambos os casos será necessário analisar mais marcadores para poder inferir com segurança sua identificação molecular.

Presume-se que as cepas GBBB12 e GBBB13 sejam espécies bem próximas ou irmãs (Li et al., 2019), pois ambas agruparam em um cluster filogenético bem forte. Já a cepa GBBB14 supõe-se que este táxon seja uma espécie que tenha separado recentemente do grupo das Oscillatorias e não possua ainda dados registrados no GenBank, e a cepa GBBB15 pode ser uma espécie cuja identidade ainda é desconhecida no banco de dados, portanto, considera-se como uma espécie que ainda precisa ser estudada e descrita.

Os táxons críticos deste estudo foram identificados pela avaliação polifásica das cepas baseadas nas suas características morfológicas, ecofisiológicas e moleculares. Por isso os estudos polifásicos desses organismos são bastante utilizados, e cada vez mais demonstram sua importância para o delineamento da espécie e para a caracterização dos mecanismos de adaptação das cianobactérias em seus diferentes habitats e nichos (Saber et al., 2017).

4.2 Monitoramento da presença de cianotoxinas por métodos moleculares

A partir dos resultados de PCR constatou-se que a linhagem GBBB09 (*Westiellipsoidia prolifica*) apresentou genes relacionados à via metabólica da microcistina com a presença de dois marcadores moleculares diferentes, um mais amplo (HEP) e outro específico (*mcyA*), ambos confirmados através do sequenciamento das amostras e construção da árvore de diversidade gênica.

O gênero *Westiellipsoidia* é um gênero ainda pouco estudado, especialmente em relação a detecção e produção de cianotoxinas. Os trabalhos de Abed et al. (2013) e Abed et al. (2019) no Rio Tigre no Iraque foram os únicos registros de detecção dos genes da via biossintética da microcistina nesse grupo, ainda que apenas por amplificação por PCR e sem confirmação por sequenciamento. As sequências obtidas em nosso estudo constituem o primeiro registro de sequência para essa via biossintética no gênero.

Conseqüentemente, a ausência de registro da sequência gênica, faz com que não esteja presente na lista de espécies toxigênicas brasileiras (Brasil, 2015). Apesar de ser descrita como potencialmente tóxica, *W. prolifica* também possui importância ecológica/biotecnológica sendo capaz de realizar atividades metabólicas de bioacumulação e bioadsorção de metais pesados, por exemplo, com aplicação em processos de biorremediação (Kumar et al., 2015).

Ao contrário do que afirmam os estudos cianotóxicos de que as microcistinas são principalmente encontradas em espécies do gênero *Microcystis* (Harke et al., 2016; He et al., 2016; Roué et al., 2018), na laguna da Jansen, em nenhuma linhagem isolada deste gênero foi detectado o gene de microcistina utilizando os marcadores listados. No entanto, não podemos descartar a possibilidade dos isolados obtidos apresentarem alguma mutação no sítio de ligação dos iniciadores (Kurmayer e Christensen, 2009). Portanto é importante realizar um monitoramento permanente com uma gama maior de iniciadores para as cianotoxinas conhecidas (anatoxinas, cilindropermopsinas, microcistinas, saxitoxinas, etc).

A simples identificação de espécies potencialmente tóxicas ou a detecção da presença dos genes das vias biossintéticas de cianotoxinas não significa que esteja havendo a produção efetiva das mesmas, ou que haja risco iminente (Capelli et al., 2018). Isso ocorre devido a vários fatores entre os quais podemos citar: (i) nem todas as linhagens de determinada espécie possuem as vias biossintéticas completas; (ii) as condições de expressão gênica dependem de fatores ambientais; e (iii) a concentração de células efetivamente produtoras na comunidade podem ser baixa. Além disso, em situações estáveis, como em culturas de laboratório, com ausência de competição algumas espécies tendem a perder genes envolvidos nas vias biossintéticas de cianotoxinas (Beverdorf et al., 2015) ao longo das passagens de cultura. Dito isso, a maneira mais eficaz de se realizar o monitoramento ambiental é através da quantificação da expressão gênica, seja através da detecção do mRNA (PCR quantitativo em tempo real) ou do produto final (cromatografia líquida) (Kumayer et al., 2015).

É importante ressaltar que a laguna da Jansen é um ecossistema eutrofizado que apresenta florações frequentes de cianobactérias e onde a pesca de peixes e crustáceos são realizadas pela comunidade adjacente. E considerando que foram identificadas várias linhagens pertencentes a espécies potencialmente tóxicas, sendo que em uma delas foi detectado genes relacionados à microcistina, e que esta cianotoxina é bioacumulável e biomagnificada em organismos aquáticos podendo chegar até os organismos terrestres

através da teia trófica (Sant'Anna et. al, 2011). Faz se necessário implementar um monitoramento regular utilizando ensaios moleculares (qPCR) e químicos desse ecossistema para avaliar os riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

5 Conclusões

Este trabalho analisou a diversidade de cianobactérias do fitoplâncton aliando técnicas liminológicas e de caracterização morfológica e moleculares, de maneira a avaliar a qualidade ambiental desse ambiente e o risco à saúde da população. Através de uma abordagem polifásica foi possível associar quais parâmetros físico-químicos estão associados aos grupos de maior relevância toxigênica e também fornecer uma caracterização mais detalhada dos isolados. As maiores concentrações de compostos nitrogenados no período de estiagem, como amônia e nitrato, associados ao aumento da temperatura e a salinidade, favoreceram as maiores densidades de *Westiellopsis prolifica*. Esta espécie também foi considerada constante no ambiente e tendo sido confirmada a sua toxigenicidade pela amplificação de genes *mcyA* e *mcyE* da via da microcistina. Podendo ser esta espécie uma das principais cianobactérias produtoras de ploriferações tóxicas (CyanoHABs) nas águas salobras da laguna da Jansen. Por fim, os resultados reforçam a urgência na adoção de medidas de saneamento e monitoramento visando a qualidade ambiental e a segurança da população.

Agradecimentos

MVB recebeu bolsa de estudos financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA). Este projeto teve apoio da FAPEMA através dos projetos [Grant numbers UNIVERSAL-00845/16 e COOPI-07813/17,] e apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) CAPES FINANCE CODE 001.

Referências

- Abed, I.J., Jawad, A.M., Abdulhasan, G.A., Al-Hussieny, A.A., Moushib, L.I., 2013. Molecular detection of toxigenic new record cyanobacterium: *Westiellopsis prolifica* in Tigris River. Int. J. Sci. Res, 2(11), 87-89. ISSN 2277-8616.
- Abed, I.J., Abdulhasan, G.A., Moushib, L.I., 2019. Molecular and Immunological Methods to Confirm Toxigenicity (Microcystin Production) of *Westiellopsis Prolifica* Isolated from Tigris River–Iraq. Baghdad Sci. J., 16(4), 978-985. [https://doi.org/10.21123/bsj.2019.16.4\(Suppl.\).0978](https://doi.org/10.21123/bsj.2019.16.4(Suppl.).0978).

Al-Tebrineh, J., Mihali, T.K., Pomati, F., Neilan, B.A., 2010. Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(23), 7836-7842. <https://doi.org/10.1128/AEM.00174-10>.

American Public Health Association (APHA). 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22nd ed. Washington: American Public Health Association.

Baxa, D.V., Kurobe, T., Ger, K.A., Lehman, P.W., Teh, S.J., 2010. Estimating the abundance of toxic *Microcystis* in the San Francisco Estuary using quantitative real-time PCR. *Harmful algae*, 9(3), 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.01.001>.

Bazin, P., Jouenne, F., Deton-Cabanillas, A.F., Pérez-Ruzafa, Á., Véron, B., 2014. Complex patterns in phytoplankton and microeukaryote diversity along the estuarine continuum. *Hydrobiologia* 726(1), 155-178. <https://doi.org/10.1007 / s10750-013-1761-9>.

Bazin, P., Jouenne, F., Friedl, T., Deton-Cabanillas, A.F., Le Roy, B., Véron, B., 2014. Phytoplankton diversity and community composition along the estuarine gradient of a temperate macrotidal ecosystem: combined morphological and molecular approaches. *PloS one*, 9(4), e94110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094110>.

Belykh, O.I., Sorokovikova, E.G., Fedorova, G.A., Kaluzhnaya, O.V., Korneva, E.S., Sakirko, M.V., Sherbakova, T.A., 2011. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region). *Hydrobiologia*, 671(1), 241-252. <https://doi.org/10.1007 / s10750-011-0724-2>.

Beversdorf, L.J., Chaston, S.D., Miller, T.R., McMahon, K.D., 2015. Microcystin *mcyA* and *mcyE* gene abundances are not appropriate indicators of microcystin concentrations in lakes. *PloS one* 10(5), e0125353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125353>.

Beversdorf, L.J., Miller, T.R., McMahon, K.D., 2013. The role of nitrogen fixation in cyanobacterial bloom toxicity in a temperate, eutrophic lake. *PloS one*, 8(2), e56103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056103>.

Bouaïcha, N., Miles, C.O., Beach, D.G., Labidi, Z., Djabri, A., Benayache, N.Y., Nguyen-Quang, T., 2019. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins*, 11(12), 714. <https://doi.org/10.3390/toxins11120714>.

Brasil. Ministério da Saúde. 2015. *Cianobactérias/cianotoxinas: procedimentos de coleta, preservação e análise* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 106 p.: il. ISBN 978-85-334-2218-6.

Brito, A.C., Quental, T., Coutinho, T.P., Branco, A.M.C., Falcão, M., Newton, A., Icely, J., Moita, T., 2012. Phytoplankton dynamics in southern Portuguese coastal lagoons

during a discontinuous period of 40 years: An overview. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 110, 147-156. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.04.014>.

Bukowska, A., Kaliński, T., Koper, M., Kostrzevska-Szlakowska, I., Kwiatowski, J., Mazur-Marzec, H., Jasser, I., 2017. Predicting blooms of toxic cyanobacteria in eutrophic lakes with diverse cyanobacterial communities. *Sci. Rep.*, 7(8342), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08701-8>.

Bullerjahn, G.S., McKay, R.M., Davis, T.W., Baker, D.B., Boyer, G.L., D'Anglada, L.V., Kudela, R.M., 2016. Global solutions to regional problems: Collecting global expertise to address the problem of harmful cyanobacterial blooms. A Lake Erie case study. *Harmful Algae*, 54, 223-238. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.003>.

Buratti, F.M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E., 2017. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.*, 91(3), 1049-1130. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6>.

Burford, M.A., Carey, C.C., Hamilton, D.P., Huisman, J., Paerl, H.W., Wood, S.A., Wulff, A., 2020. Perspective: Advancing the research agenda for improving understanding of cyanobacteria in a future of global change. *Harmful algae*, 91, 101601. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.04.004>.

Capelli, C., Cerasino, L., Boscaini, A., Salmaso, N., 2018. Molecular tools for the quantitative evaluation of potentially toxigenic *Tychonema bourrellyi* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) in large lakes. *Hydrobiologia*, 824(1), 109-119. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3513-3>.

Chapman, P.M., 2012. Management of coastal lagoons under climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 110, 32-35. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.01.010>.

Christia, C., Giordani, G., Papastergiadou, E., 2014. Assessment of ecological quality of coastal lagoons with a combination of phytobenthic and water quality indices. *Mar. Pollut. Bull.*, 86(1-2), 411-423. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.038>.

Cirés, S., Alvarez-Roa, C., Wood, S.A., Puddick, J., Loza, V., Heimann, K., 2014. First report of microcystin-producing *Fischerella* sp. (Stigonematales, Cyanobacteria) in tropical Australia. *Toxicon*, 88, 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.010>.

Coelho, S., Pérez-Ruzafa, A., Gamito, S., 2015. Phytoplankton community dynamics in an intermittently open hypereutrophic coastal lagoon in southern Portugal. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.07.022>.

CONAMA, 2015. Resolução CONAMA Nº. 357/2005, Ministério do meio ambiente, BRASIL, capítulo 4, artigo 34, Andamp; 5.

Corbel, S., Mougín, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere* 96, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056>.

Cotovicz Junior, L.C., Brandini, N., Knoppers, B.A., Mizerkowski, B.D., Sterza, J.M., Ovalle, A.R.C., Medeiros, P.R.P., 2013. Assessment of the trophic status of four coastal lagoons and one estuarine delta, eastern Brazil. *Environ. Monit. Assess.*, 185, 3297-3311. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2791-x>.

Coutinho, M.T.P., Brito, A.C., Pereira, P., Gonçalves, A.S., Moita, M.T., 2012. A phytoplankton tool for water quality assessment in semi-enclosed coastal lagoons: open vs closed regimes. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 110, 134-146. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.04.007>.

Cutrim, M.V.J., Ferreira, F.S., Santos, A.K.D., Cavalcanti, L.F., Araujo, B.O., Azevedo-Cutrim, A.C.G., Furtado, J.A., Oliveira, A.L.L., 2019. Trophic state of an urban coastal lagoon (Northern Brazil), seasonal variation of the phytoplankton community and environmental variables. *Estuar. Coast Shelf Sci.*, Florida, 216, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.08.013>.

Cutrim, M.V.J., Ferreira, F.S., Cavalcanti, L.F., Sá, A.K.D.S, Azevedo-Cutrim, A.C.G., Santos, R.L., 2019. Phytoplankton Biomass and Environmental Descriptors of Water Quality of an Urban Lagoon. In: Pan, J., Devlin, A. (Eds.), *Estuaries and Coastal Zones - Dynamics and Response to Environmental Changes*. IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87955>.

Dall'Agnol, L. T., Ghilardi-Junior, R., Mcculloch, J. A., Schneider, H., Schneider, M. P., & 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. *J. Plankton Res.*, 34(3), 245-257. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbr109>.

De Oliveira, E.D.C., Da Cunha, A.C., Da Silva, N.B., Castelo-Branco, R., Morais, J., Schneider, M.P.C., Vasconcelos, V., 2019. Morphological and molecular characterization of cyanobacterial isolates from the mouth of the Amazon River. *Phytotaxa*, 387(4), 269-288. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.387.4.1>.

Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I., 2003. *Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 42, 313-321. [https://doi.org/10.1016 / s0041-0101 \(03\) 00150-8](https://doi.org/10.1016 / s0041-0101 (03) 00150-8).

Finsinger, K., Scholz, I., Serrano, A., Morales, S., Uribe-Lorio, L., Mora, M., Sittenfeld A., Weckesser, J., Hess, W.R., 2008. Characterization of true-branching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. *Appl. Environ. Microbiol.*, 10(2), 460-473. <https://doi.org/10.1111 / j.1462-2920.2007.01467.x>.

Flores, E., Frías, J.E., Rubio, L.M., Herrero, A., 2005. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth Res* 83, 117-133. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-5830-9>.

Garcia, A.M., Claudino, M.C., Mont'Alverne, R., Pereyra, P.E.R., Copertino, M., Vieira, J.P., 2017. Temporal variability in assimilation of basal food sources by an omnivorous

fish at Patos Lagoon Estuary revealed by stable isotopes (2010–2014). *Mar. Biol. Res.*, 13(1), 98-107. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1206939>.

Giannuzzi, L., Carvajal, G., Corradini, M.G., Andrade, A., C., Echenique, R., Andrinolo, D., 2012. Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in Rio de la Plata Estuary, Argentina: field study and data analysis. *J. Toxicol. Environ.*, 2012(9), 373618. <https://doi.org/10.1155/2012/373618>.

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. *Microb. Ecol.*, 49(1), 176-182. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2030-7>.

Gobler, C.J., Burkholder, J.M., Davis, T.W., Harke, M.J., Johengen, T., Stow, C.A., Van de Waal, D.B., 2016. The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.010>.

Gobler, C.J., 2020. Climate change and harmful algal blooms: insights and perspective. *Harmful Algae*, 91, 101731. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101731>.

Golterman, H.L. Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M., 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Gomont, M. (1892 '1893'). *Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées)*. Deuxième partie. - Lyngbyées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série 7* 16: 91-264, pls 1-7. BHL Collections: New York Botanical Garden, Coden: Asnvai, ISSN: 0003-4320, ISSN: 0150-9314.

Gorham, P., McLachlan, J., Hammer, U.T., Kim, W.K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *SIL Proceedings*, 15(2), 796-804. <https://doi.org/10.1080/03680770.1962.11895606>.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of seawater analysis*, 2nd ed. Verlag Chemie, New York.

Griffith, A.W., Gobler, C.J., 2020. Harmful algal blooms: a climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. *Harmful Algae*, 91, 101590. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.008>.

Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 29 August 2019.

Hall, T., Biosciences, I., Carlsbad, C., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull. of Biosci.*, 2(1), 60-61.

Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A., Paerl, H.W., 2016. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic

cyanobacterium, *Microcystis* spp. Harmful Algae, 54, 4-20.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>.

He, X., Liu, Y.L., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L.K., Dionysiou, D.D., Lenhardt, J.J., Mouser, P.J., Szlag, D., Walker, H.W., 2016. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. Harmful algae, 54, 174-193.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001>.

Herfort, L., Peterson, T.D., McCue, L., Zuber, P., 2011. Protist 18S rRNA gene sequence analysis reveals multiple sources of organic matter contributing to turbidity maxima of the Columbia River estuary. Mar. Ecol. Prog. Ser. 438, 19-31. <https://doi.org/10.3354/meps09303>.

Janet, M., 1941. *Westiellopsis prolifica*, gen. et sp. nov., a new member of the Stigonemataceae. Ann. Bot., 5(17),1671-70.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087379>.

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. Arch. Microbiol., 185(2), 107-114. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0073-5>.

Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16:111-120.
<https://doi.org/10.1007/BF01731581>.

Knoche, K.L., Aoyama, E., Hasan, K., Minter, S.D., 2017. Role of nitrogenase and ferredoxin in the mechanism of bioelectrocatalytic nitrogen fixation by the Cyanobacteria *Anabaena variabilis* SA-1 mutant immobilized on indium tin oxide (ITO) electrodes. Electrochim. Acta, 232,396-403.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.02.148>.

Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J.R., 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using to the polyphasic approach. Preslia, 86(4), 295-335.

Komárek, J., 2018. Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system. Hydrobiologia, 811(1), 7-17. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3379-9>.

Koroleff, K., 1983. Determination of phosphorus. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. (Eds.), Methods of sea water analysis. 2nd ed. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 125-139. <https://doi.org/10.1002/iroh.19850700232>.

Kruk, C., Segura, A.M., 2012. The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. In: Phytoplankton responses to human impacts at different scales. Springer, Dordrecht, pp. 191-202. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1072-6>.

Kumar, N., Khushboo, B., Kumar, R., 2015. Effect of mercury on growth and pigment content of Cyanobacteria: *Westiellopsis prolifica* Janet. Bhavsar et al. Int. J. Res. Chem. Environ. 5(4), 70-75. ISSN 2248-9649.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol., 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Kurmayer, R., Christiansen, G., 2009. The genetic basis of toxin production in cyanobacteria. Freshw. Rev., 2, 31-50. <https://doi.org/10.1608/FRJ-2.1.2>.

Kurmayer, R., Blom, J.F., Deng, L., Pernthaler, J., 2015. Integrating phylogeny, geographic niche partitioning and secondary metabolite synthesis in bloom-forming *Planktothrix*. ISME J., 9, 909-921. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.189>.

Kützing, F.T., 1846. *Tabulae phycologicae; oder, Abbildungen der Tange*. Vol. I, fasc. 1 pp. 1-8, pls 1-10. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4971>.

Legrand, B., Lesobre, J., Colombet, J., Latour, D., Sabart, M., 2016. Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. Harmful Algae, 58, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.07.002>.

Lemmermann, E., 1907. Algen I (Schizophyceen, Flagellaten, Peridineen). In: *Kryptogamenflora der Mark Brandenburg und angrenzender Gebiete* herausgegeben von dem Botanischen Verein der Provinz Brandenburg. Dritter Band. (Eds), pp. 1-304. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.4953>.

Li, X., Qiu, D., Chen, S., Luo, C., Hu, D., Zeng, J., Chen, H., Li, S., Yu, X., 2019. Importance of messenger RNA stability of toxin synthetase genes for monitoring toxic cyanobacterial bloom. Harmful algae, 88, 101642. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101642>.

Lionard, M., Muylaert, K., Hanoutti, A., Maris, T., Tackx, M., Vyverman, W., 2008. Inter-annual variability in phytoplankton summer blooms in the freshwater tidal reaches of the Schelde estuary (Belgium). Estuar. Coast. Shelf. Sci., 79(4), 694-700. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.06.013>.

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. Mar. Environ. Res., 73, 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.005>.

Ma, J., Brookes, J.D., Qin, B., Paerl, H.W., Gao, G., Wu, P., et al., 2014. Environmental factors controlling colony formation in blooms of the cyanobacteria *Microcystis* spp. in Lake Taihu, China. Harmful Algae, 31, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.10.016>.

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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65(9). <https://doi.org/10.1099 / ijs.0.000369>.
- Margalef, R. 1958. Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. In: Buzzati-Traverso, A.A. (Ed.), *Perspectives in Marine Biology*. University of California Press, Berkeley, pp. 323-349.
- Merel, S., Walker, D., R. Chicana, Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.*, 59, 303-327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.
- Metcalf, J. S., & Codd, G. A., 2020. Co-occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins with other environmental health hazards: impacts and implications. *Toxins*, 12(10), 629. <https://doi.org/10.3390/toxins12100629>.
- Moreno-Pino, M., Krock, B., De la Iglesia, R., Echenique-Subiabre, I., Pizarro, G., Vásquez, M., Trefault, N., 2018. Next Generation Sequencing and mass spectrometry reveal high taxonomic diversity and complex phytoplankton-phyco toxins patterns in Southeastern Pacific fjords. *Toxicon*, 151(1), 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.078>.
- Muyllaert, K., Sabbe, K., Vyverman, W., 2009. Changes in phytoplankton diversity and community composition along the salinity gradient of the Schelde estuary (Belgium/The Netherlands). *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 82(2), 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.01.024>.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Muenchhoff, J., Moffitt, M.C., Dittmann, E., 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.*, 15(5), 1239-1253. <https://doi.org/10.1111 / j.1462-2920.2012.02729.x>.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Muyzer, G., 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Environ. Microbiol.*, 63(8), 3327-3332. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3327-3332.1997>.
- Paerl, H.W., Xu, H., McCarthy, M.J., Zhu, G., Qin, B., Li, Y., Gardner, W.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): the need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Res.*, 45(5), 1973-1983. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.018>.
- Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microb. Ecol.*, 65(4), 995-1010. <https://doi.org/10.1007 / s00248-012-0159-y>.
- Pattnaik, S., Samad, L.K., 2018. Morphological and biochemical characterization of sub-aerial cyanobacteria isolated from building facades and monuments of Odisha. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7(6), 556-571. <https://doi.org/10.20546 / ijcmas.2018.706.064>.
- Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C.P, Pérez-Ruzafa, I.M., Pérez-Marcos, M., 2011. Coastal lagoons: “transitional ecosystems” between transitional and coastal waters. *J Coast. Conserv.*, 15(3), 369-392. <https://doi.org/10.1007/s11852-010-0095-2>.

Pham, T.L., Utsumi, M., 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *J. Environ. Manag.* 213, 520-529. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.077>.

Phlips, E.J., Badylak, S., Hart, J., Haunert, D., Lockwood, J., O'Donnell, K., Sun, D., Viveros, P., Yilmaz, M., 2012. Climatic influences on autochthonous and allochthonous phytoplankton blooms in a subtropical estuary, St. Lucie Estuary, Florida, USA. *Estuaries Coast.*, 35(1), 335-352. <https://doi.org/10.1007/s12237-011-9442-2>.

Pielou, E.C., 1966. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. *J. Theor. Biol.*, 10(2), 370-383. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90133-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90133-0).

Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A.F., Cary, S.C., Hamilton, D.P., 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Mar. Drugs*, 12(11), 5372-5395. <https://doi.org/10.3390/md12115372>.

Rabenhorst, L., 1863. Kryptogamen-Flora von Sachsen , Ober-Lausitz, Thüringen und Nord-Böhmen, mit Berücksichtigung der benachbarten Länder: erste Abtheilung: Algen im weitesten Sinne, Leber und Laubmoose. pp. i-xx, 1-653. <https://doi.org/10.1002/ardp.18631640340>.

Rantala-Ylinen, A., A., Känä, S., Wang, H., Rouhiainen, L., Wahlsten, M., Rizzi, E., Sivonen, K. 2011. Anatoxin-a synthetase gene cluster of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain 37 and molecular methods to detect potential producers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(20), 7271-7278. <https://doi.org/10.1128 / AEM.06022-11>.

Řeháková, K., Johansen, J. R., Bowen, M. B., Martin, M. P., Sheil, C.A., 2014. Variation in secondary structure of the 16S rRNA molecule in cyanobacteria with implications for phylogenetic analysis. *Fottea*, 14(2), 161-178. <https://doi.org/10.5507 / fot.2014.013>.

Rezende, K.R.V.D., Hatherly, M.M.F., Pimenta, C.M.M., Eduardo, J., Vianna, S.D.C., Mangiavacchi, N., 2015. Phytoplankton community structure in one sector of Guanabara Bay (RJ, Brazil) during 2011 and 2012. *Braz. J. Oceanogr.*, 63(3), 239-254. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592015086506303>.

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. <https://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. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-98>.

Roué, M., Darius, H., Chinain, M., 2018. Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) Technology for the Monitoring of Aquatic Toxins: A Review. *Toxins*, 10(4), 167. <https://doi.org/10.3390/toxins10040167>.

Saber, A.A., Cantonati, M., Mareš, J., Anesi, A., Guella, G., 2017. Polyphasic characterization of *Westiellopsis prolifica* (Hapalosiphonaceae, Cyanobacteria) from the El-Farafra Oasis (Western Desert, Egypt). *Phycologia*, 56(6), 697-709. <https://doi.org/10.2216/16-107>.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

Sant'Ana, C.L., De Carvalho, L.R., Fiore, M.F., Silva-Stenico, M.E., Lorenzi, A.S., Rios, F.R., Konno, K., Garcia, C., Lagos, N., 2011. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain, isolated from São Paulo-Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. *Neurotox. Res.*, 19(3), 389-402. <https://doi.org/10.1007/s12640-010-9177-z>.

Santos, D., Melo, M., Mendes, D., Rocha, I.B., Silva, J., Cantanhêde, S., Meletti, P., 2014. Histological changes in gills of two fish species as indicators of water quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). *Int. J. Environ. Res. Public. Health.*, 11(12), 12927-12937. <https://doi.org/10.3390/ijerph111212927>.

Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. University Illinois Press, Urbana.

Steffen, M.M., Zhu, Z., McKay, R.M.L., Wilhelm, S.W., Bullerjahn, G.S., 2014. Taxonomic assessment of a toxic cyanobacteria shifts in hypereutrophic Grand Lake St. Marys (Ohio, USA). *Harmful Algae*, 33, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.12.008>

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R.A., 1972. *Practical handbook of seawater analysis*. Bulletin: Fisheries Research Board of Canada. 157, 2nd edition, 310 p.

Strunecky, O., Bohunická, M., Johansen, J.R., Capková, K., Raabová, L., Dvorák, P. & Komárek, J., 2017. A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (Oscillatoriothycidae, Cyanobacteria). *Fottea*, Olomouc 17(1): 114-126. <https://doi.org/10.5507/fot.2016.025>.

Stumpf, R.P., Davis, T.W., Wynne, T.T., Graham, J.L., Loftin, K.A., Johengen, T. H., Gossiaux, D., Palladino, D., Burtner, A., 2016. Challenges for mapping cyanotoxin patterns from remote sensing of cyanobacteria. *Harmful Algae*, 54, 160-173. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.005>.

Testai, E., Buratti, F.M., Funari, E., Manganelli, M., Vichi, S., Arnich, N., Biré, R., Fessard, V., Sialehaamo, A., 2016. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. EFSA Supporting Publication EN-998. European Food Safety Authority. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.PT-998>.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Comput. Appl. Biosci.*, 10(1), 19-29. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.1.19>.

Thronsen, J., 1978. Preservation and storage: monographs on oceanographic methodology. In: Sournia, A. (Ed.), 6. Phytoplakton manual. UNESCO, Norwich, pp. 69-74.

Tragin, M., Zingone, A., Vaultot, D., 2018. Comparison of coastal phytoplankton composition estimated from the V4 and V9 regions of the 18S rRNA gene with a focus on photosynthetic groups and especially Chlorophyta. *Environ. Microbiol.*, 20(2), 506-520. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13952>.

Utermöhl, H., 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Mitteilungen, 9(1), 1-38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>.

Vasas, G., Surányi, G., Bácsi, I., Márta, M., Máthé, C., Gonda, S., Borbely, G., 2013. Alteration of cylindrospermopsin content of *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanobacteria, Nostocales) due to step-down from combined nitrogen to dinitrogen. *Adv. Microbiol.*, 3(08), 557-564. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.38075>.

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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 65(Pt 1), 298-308. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070110-0>.

Villafañe, V.E., Reid, F.M.H., 1995. Métodos de microscopia para lacuantificación del fitoplâncton. In: Alvear, K., Ferrario, M.E., Oliveira Filho, E.C., Sars, E. (Eds.), Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción, Chile, pp. 169-185.

Visser, P.M., Verspagen, J.M.H., Sandrini, G., Stal, L.J., Matthijs, H.C.P., Davis, T.W., Paerl, H.W., Huisman, J., 2016. How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145-159. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.006>.

Wall, J.M., Wood, S.A., Orlovich, D.A., Rhodes, L.L., Summerfield, T.C., 2014. Characterisation of freshwater and marine cyanobacteria in the Hokianga region, Northland, New Zealand. *Mar. Freshw. Res.*, 48(2), 177-193. <https://doi.org/10.1080/00288330.2013.854814>.

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. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_38.

Xiao, M., Li, M., Reynolds, C.S., 2018. Colony formation in the cyanobacterium *Microcystis*. *Biol. Rev.*, 93(3), 1399-1420. <https://doi.org/10.1111 / brv.12401>.

Xiao, X., Sogge, H., Lagesen, K., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K. S., Rohrlack, T., 2014. Use of high throughput sequencing and light microscopy show contrasting results in a study of phytoplankton occurrence in a freshwater environment. *PloS one*, 9(8), e106510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106510>.

Zhang, Y., Qin, B., Zhu, G., Shi, K., & Zhou, Y., 2018. Profound changes in the physical environment of Lake Taihu from 25 years of long-term observations: Implications for algal bloom outbreaks and aquatic macrophyte loss. *Water Resour. Res.*, 54(7), 4319-4331. <https://doi.org/10.1029/2017WR022401>.

Material Suplementar

Tabela S1. Localização dos pontos de coleta na laguna da Jansen.

PONTO	DESCRIÇÃO
<p style="text-align: center;">L1</p> <p style="text-align: center;">2°30'12''S 44°18'04''W</p>	<p>Área de frente à Avenida Maestro João Nunes, sendo o local onde se encontram as galerias de acesso que fazem a comunicação da laguna com o ambiente marinho da baía de São Marcos, permitindo a entrada de água salgada durante as marés altas e escoamento de água oriunda da chuva e drenagem pluvial.</p>
<p style="text-align: center;">L2</p> <p style="text-align: center;">2°30'07''S 44°17'40''W</p>	<p>Segmento da orla da laguna voltada para a recreação com a presença de quadra de esportes e outras estruturas para lazer. Possuindo ainda, prédios com finalidade comercial e residencial em sua proximidade.</p>
<p style="text-align: center;">L3</p> <p style="text-align: center;">2°29'40''S 44°18'13''W</p>	<p>Parte da laguna que está mais próxima de empreendimentos comerciais, além de prédios residenciais e antigos bares. Com pouca vegetação mangue.</p>
<p style="text-align: center;">L4</p> <p style="text-align: center;">2°29'56''S 44°18'23''W</p>	<p>Área com mais vegetação em seu entorno. Próximo de muitos prédios empresariais e hotéis.</p>
<p style="text-align: center;">L5</p> <p style="text-align: center;">2°30'03''S 44°18'18''W</p>	<p>Região sul, margens com pouca vegetação do tipo mangue, bem urbanizada, com a presença de muitas residências e bastante lixo nas encostas.</p>

Tabela S2. Identificação molecular das linhagens de cianobactérias potencialmente tóxicas da laguna por homologia de sequência

Linhagem GBBB	BLASTn - GenBank	Nº de acesso	Cobertura (%)	Identidade (%)
09	<i>Westiellopsis prolifica</i> SAG 16.93	AJ544086.1	99	99.67
	<i>Hapalosiphon welwitschii</i> UH IC-52-3	KJ767019.1	99	98.84
	<i>Westiella intricata</i> UH HT-29-1	KJ767016.1	99	98.84
	<i>Nostochopsis lobatus</i> SULS-F1	KP792333.1	99	98.51
	<i>Hapalosiphon delicatulus</i> IAM M-266	AB093484.1	99	98.35
	<i>Fischerella</i> sp. NK1-16	MK625314.1	99	98.03
10	<i>Nostoc</i> sp. NQAIF313	KJ636965.1	99	99.50
	Nostocaceae bacterium CCM-UFV068	MG563379.1	99	98.84
	<i>Nostoc</i> sp. CENA105	EF088340.1	99	98.84
	<i>Anabaena circinalis</i> AUS- JR/BS/MS/NT-071	KP052638.1	94	99.65
	<i>Aliinostoc morphoplasticum</i> NOS	KY403996.1	99	96.21
11	<i>Microcystis aeruginosa</i> NHSB150821	LC178837.1	99	99.67
	<i>Microcystis</i> sp. FACHB-1284	KU645911.1	99	99.67
	<i>Microcystis protocystis</i> ACKU599	MN472747.1	99	99.51
	<i>Microcystis ichthyoblabe</i> CHAB1414	KJ818185.1	99	99.51
	<i>Microcystis viridis</i> CHAB4363	KJ818179.1	99	99.51
	<i>Synechocystis</i> sp. SAG 45.90	KM019995.1	99	99.51
	<i>Westiellopsis prolifica</i> SAG 16.93	KF481973.1	99	99.51
12	<i>Synechococcus</i> sp. KLNS04	MG015898.1	99	96.45
	<i>Synechococcus lividus</i> PCC 6715	MF191713.1	100	95.67
	<i>Candidatus Synechococcus calcipolaris</i> G9	KJ566932.1	100	95.50
	<i>Thermosynechococcus</i> sp. NK55	CP006735.1	99	95.64
13	<i>Synechococcus</i> sp. KLNS04	MG015898.1	100	96.44
	<i>Synechococcus lividus</i> PCC 6715	MF191713.1	99	95.79
	<i>Candidatus Synechococcus calcipolaris</i> G9	KJ566932.1	99	95.62
	<i>Thermosynechococcus</i> sp. NK55	CP006735.1	99	95.77
14	<i>Phormidium</i> sp. PsrPRcm6	KM438190.1	94	97.78
	<i>Cyanobacterium</i> GSP209-1	JN166656.1	83	98.92
	<i>Oscillatoria</i> sp. 1F	KT892741.1	87	99.44
	<i>Phormidium</i> sp. LEGE 06072	HM217077.1	87	94.01
	<i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304	CP003607.1	87	93.98
15	Uncultured cyanobacterium clone 5d/554d	EF160041.1	97	97.19
	Filamentous cyanobacterium GSL035	GQ243430.1	99	93.21
	Pseudanabaenaceae cyanobacterium Lake-2_11	MH918156.1	99	92.73
	<i>Phormidium</i> sp. BDU 20391	KU958135.1	99	92.73
	<i>Halomicronema excentricum</i> strain TFEP1	NR_114591.1	97	93.21
	<i>Halomicronema</i> sp. SCyano39	DQ058860.1	97	93.03
	<i>Euryhalinema mangrovii</i> AP9F	MK402979.1	99	92.39
	<i>Leptolyngbya tenuis</i> BDU 46241	KX452367.1	99	92.39

Tabela S3. Identidade nucleotídica das sequências dos genes *mcyA* e *mcyE* da via biossintética da microcistina detectados na linhagem *Westiellopsis prolifica* GBBB09

Gene	BLASTn - NCBI	Nº de acesso	Cobertura (%)	Identidade (%)
<i>mcyA</i>	<i>Fischerella</i> sp. CENA161 biosynthetic gene cluster	KX891213.1	99	98.78
	<i>Fischerella</i> sp. NIES-4106 plasmid plasmid1 DNA	AP018299.1	99	94.31
	Uncultured cyanobacterium clone 03LO-OS10 McyA (<i>mcyA</i>)	EF424371.1	99	77.82
	<i>Anabaena laxa</i> RPAN8 microcystin synthetase (<i>mcyA</i>) gene	FJ607652.1	99	77.51
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPLJ-4 peptide synthetase (<i>mcyA</i>) gene	JQ771629.1	99	77.02
	<i>Microcystis smithii</i> CHAB2183 McyA (<i>McyA</i>) gene	GQ496081.1	99	76.52
<i>mcyE</i>	<i>Fischerella</i> sp. HPDP-5 microcystin synthetase (<i>mcyE</i>) gene	MF000780.1	99	98.82
	<i>Fischerella</i> sp. CENA161 biosynthetic gene cluster	KX891213.1	99	97.88
	<i>Fischerella</i> sp. NIES-4106 plasmid plasmid1 DNA	AP018299.1	99	92.71
	<i>Nodularia spumigena</i> UHCC 0039	CP020114.1	99	88.24
	<i>Nostoc</i> sp. 152 microcystin synthetase gene cluster	KC699835.1	99	88.24
	<i>Nostoc</i> sp. 73.1 NdaF (<i>ndaF</i>) gene	JF342710.1	99	88.24
	<i>Anabaena</i> sp. U-I12/07-5 microcystin synthetase (<i>mcyE</i>) gene	KF219516.1	99	87.00