

**VII-074 - AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE LISE CELULAR E EXTRAÇÃO DE MICROCISTINA EM AMOSTRAS DE ÁGUAS COM CIANOBACTÉRIAS****Daisy Cristina Martins Cardoso<sup>(1)</sup>**

Bióloga (Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2009) e Técnica em Química (Instituto Federal do Espírito Santo- IFES, 2007). Aluna de iniciação científica bolsista Cnpq do Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES, 2009.

**Sérvio Túlio Alves Cassini:**

Biólogo (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 1975), PhD Microbiologia pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSSU), EUA (1988), Pós Doutorado em Microbiologia Ambiental pela Universidade do Tennessee – EUA (1997), Professor Adjunto da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Pesquisador responsável pelo Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES.

**Georgette Cristina Salvador Lázaro**

Bióloga (Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Licenciatura em 2007 e Bacharelado em 2008) e Tecnóloga em Saneamento Ambiental (Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, 2008). Mestranda em Engenharia Ambiental (UFES). Pesquisadora do Laboratório de Saneamento (LabSan) da UFES e Laboratório de Fitoplâncton (LabFito) da UFES.

**Regina Keller**

Bióloga (Universidade Estadual do Rio de Janeiro- UERJ). Mestre em Bioquímica (Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ). Doutora em Microbiologia com especialização em Virologia (Universidade Paris VII França).

**Sara Aparecida Francisco**

Graduando em Engenharia Ambiental (Universidade Federal do Espírito Santo). Aluna de iniciação científica do Laboratório de Saneamento (LabSan) da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Fernando Ferrari, nº 514, Laboratório de Saneamento, Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo – Goiabeiras - Vitória – ES - Brasil – CEP: 29075-910 - Tel: +55 (27) 4009-2165 - e-mail: [daisycriss@yahoo.com.br](mailto:daisycriss@yahoo.com.br)

**RESUMO**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é amplamente utilizada na detecção e quantificação de microcistinas em amostras de águas. Contudo, para submeter as amostras a essa técnica é necessário um preparo prévio, que consiste na extração e concentração da microcistina presente nas amostras. A proposta deste estudo foi avaliar diferentes metodologias que podem ser utilizadas na extração e concentração de amostras de cultivo de cianobactérias, uma vez que essas etapas pré-CLAE são essenciais para obtenção de resultados confiáveis. Foram testadas seis metodologias diferentes fazendo a combinação de, três técnicas de rompimento celular (congelar/descongelar, fervura ao microondas e sonificação por ultra-som) e duas técnicas de concentração das amostras (liofilização e extração em fase sólida-SPE). Para isso foram utilizadas amostras de culturas de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 descrita como produtora de microcistina-LR. As amostras foram analisadas por CLAE e os resultados mostraram que a melhor extração foi a que usou fervura ao microondas e SPE. A metodologia proposta estabelece um método de extração para análise e identificação de microcistina-LR e outras variantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cianobactérias, Microcistina, Método de extração, CLAE.

**INTRODUÇÃO**

As cianobactérias são microorganismos procarióticos, aeróbios e fotoautótrofos, podendo ser unicelulares, filamentosas ou coloniais (YOO et al., 1995). Sabe-se que esses organismos possuem uma grande diversidade metabólica, que, aliado às suas características fisiológicas, permite, sob determinadas circunstâncias, o crescimento exuberante em determinados ambientes aquáticos, promovendo o que se denominam florações de cianobactérias (TOWNSEND et al., 1996; ESTEVES, 1998).

Geralmente, estas florações têm grande impacto negativo nos corpos d'água, alterando seu odor e sabor. Além disso, podem apresentar metabólitos secundários denominados genericamente de cianotoxinas, que são produzidos por certos gêneros de cianobactérias. As principais cianotoxinas são classificadas, primariamente, quanto ao local de ataque nos organismos-alvo, principalmente animais superiores, e são divididas em 3 grupos: hepatoxinas, neurotoxinas e dermatotoxinas.

As hepatoxinas são peptídeos cíclicos cuja ocorrência já foi notificada em todos os continentes, dentre esse grupo as mais encontradas são as microcistinas (SIVONEN e JONES, 1999), que foram primeiramente isoladas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (CARMICHAEL et al., 1988). No entanto, cepas tóxicas dos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix* (YOO et al., 1995), *Aphanocapsa* (DOMINGOS et al., 1999), *Synechocystis* (NASCIMENTO; AZEVEDO, 1999) e *Oscillatoria* (BRITTAİN et al., 2000) já foram citadas em literatura como produtoras desta toxina.

No Brasil, as ocorrências de florações de algas tóxicas estão comumente relacionadas aos representantes do gênero *Microcystis* sendo os principais causadores de efeitos tóxicos em águas continentais. Florações desse gênero, em especial de *Microcystis aeruginosa*, têm sido descritas em diferentes reservatórios lacustres (JARDIM et al., 2000) e em lagoas costeiras no país (YUNES et al., 1996; HUSZAR et al., 2000).

Neste contexto, a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (MS), publicada em 25 de março de 2004 estabelece a obrigatoriedade do monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas com ênfase nas toxinas hepatotóxicas (microcistinas e cilindrospermopsinas) em águas de mananciais destinadas ao consumo humano. Enquanto que a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) prevê análise quantitativa e a determinação do biovolume de cianobactérias.

A detecção e quantificação de microcistinas em amostras de águas são importantes para avaliar a qualidade da água, para isso são utilizados métodos imunológicos e físico-químicos: a) Bioensaios; b) CLAE; c) Imunoensaios (ELISA); d) Inibição da Fosfatase; e) biologia molecular. O método físico-químico mais usado é o que combina CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência- e detectores de UV ou diodo, porém sua utilização requer tratamento prévio das amostras.

As metodologias utilizadas para isso visam eficiência na lise celular (visto que a microcistina é uma endotoxina), extração, concentração e clareamento das amostras, a fim de obter valores de toxina o mais próximo do real. Neste subprojeto diferentes procedimentos foram verificados e comparados com a finalidade de aperfeiçoar e ajustar as técnicas utilizadas no pré-tratamento de amostras. A avaliação e aperfeiçoamento dessas técnicas são essenciais para a produção de cromatogramas confiáveis. Estudos demonstram (RAPALA et al., 2002; LAWTON et al., 1994) que diferentes processos de pré-tratamento da amostra, tais como a técnica de extração, concentração e purificação de toxinas, assim como os solventes envolvidos, apresentam significativa diferença na quantificação de algumas variáveis de microcistina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados 6 ensaios com amostras de cultivo de *M. aeruginosa*, fazendo-se a combinação de 3 procedimentos de lise celular (ultrassom, fervura ao microondas e congelar/descongelar) e 2 procedimentos de concentração das amostras (Extração em fase sólida-SPE e liofilização).

**Tabela 1: Combinação de tratamentos realizados em cada experimento.**

EXPERIMENTO	PROCEDIMENTO 1	PROCEDIMENTO 2
1	Ultrassom	SPE
2	Ultrassom	Liofilização
3	Fervura ao microondas	SPE
4	Fervura ao microondas	Liofilização
5	Congelar/descongelar	SPE
6	Congelar/descongelar	Liofilização

### Condições de cultivo das cepas de *Microcystis aeruginosa*

Para avaliar os métodos de extração de microcistina, foram utilizadas amostras de cultivo de cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* Kützinger (NPLJ-4). As cepas, com características axênicas, foram cultivadas em 3 erlenmeyers de 2 L com 1,5 L de meio ASM-1 em cada um (GORHAM et al., 1964), sendo mantidas em incubadora de fotoperíodo regulado, com temperatura a  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , iluminação proveniente de luz fria fluorescente na faixa de  $60 \text{ a } 75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro e pH  $7,5 \pm 0,05$ . Sendo mantidas sob essas condições pelo período de 30 dias.



Figura 1: Fotografia da cultura 30 dias após a repicagem.

### Tratamentos de lise celular

Após o período de 30 dias o cultivo dos 3 erlenmeyers foram misturados em um béquer e foi retirado amostras de 200mL para os 6 experimentos em triplicata. Nos experimentos 1 e 2 as amostras foram submetidas a sonda de ultrassom (ultrasonic homogenizer, modelo 300v/t, biologics, Inc) por 3 minutos na frequência máxima de 20 kHz, em seguida a amostra foi filtrada em filtro de fibra de vidro (GF-1, 47 mm). O filtrado foi armazenado em frasco plástico e congelado até a etapa de concentração.

Nos experimentos 3 e 4 as amostras foram transferidas para um Becker de 500 mL e levadas ao microondas na potência máxima até a ebulição. Esse procedimento foi repetido 3 vezes, em seguida o conteúdo do béquer foi filtrado em filtro de fibra de vidro (GF-1, 47 mm); e o filtrado foi armazenado em frasco plástico e congelado até a próxima etapa.

Nos experimentos 5 e 6 as amostras foram armazenadas em frascos plásticos e mantidas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foram realizados 3 ciclos de congelar/descongelar agitando-se 5 vezes entre cada ciclo. Ao fim deste procedimento as amostras foram descongeladas e filtradas em filtros de fibras de vidro (GF-1, 47 mm); e o filtrado foi armazenado em frascos plásticos e congelado até a próxima etapa.

### Concentração e clareamento das amostras

Para o procedimento de extração em fase sólida (SPE), realizado nos experimentos 1, 3 e 5, os cartuchos de SPE foram condicionados por eluição de 6 mL de metanol 100% e, em seguida, 6 mL de água milli-Q. As amostras tiveram seu pH previamente ajustado para  $3,1 \pm 0,05$  e em seguida foram submetidas à SPE e após a passagem das amostras cada cartucho foi “lavado” com 20 mL das seguintes soluções: água milli-Q 100%; metanol 10%; metanol 20% e metanol 30%. Em seguida cada cartucho foi eluído com 20 mL da solução metanol:água:TFA (89,9:10:0,1%); e o líquido percolado no cartucho foi levado ao banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$ , em capela de exaustão até secar por completo. Os elenmeyers “secos” foram ressuspensos com metanol 100%. O material ressuspensão foi filtrado (Millex 0,45um) e armazenado em vial identificado para posterior análise no HPLC.

Para o procedimento de liofilização, realizado para os experimentos 2, 4 e 6, as amostras ainda congeladas foram introduzidas no liofilizador (labconco, freezon<sup>R</sup> 6 liter benchtop, modelo 7752020) até que fossem totalmente liofilizadas. Em seguida o material resultante da liofilização foi ressuspenso com metanol 100%, filtrado (Millex 0,45µm) e armazenado em vial identificado para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A análise da microcistina-LR foi realizada por cromatografia de fase reversa utilizando coluna escala analítica (ZORBAX Eclipse XDB - C18, 250c3, 0 mm, 5 µm) com a separação realizada pelo gradiente de água e metanol acidificados com TFA (0,1%). O tempo de eluição total foi de 50 minutos, no fluxo de 0,25 mL.min<sup>-1</sup>. O gradiente crescente de metanol variou de 30 a 70%, entre 0 e 5 minutos; de 70 a 82%, entre 5 e 20 minutos; de 82 a 30%, entre 20 e 20.5 minutos e permaneceu em 30% de metanol até o fim da corrida. O volume de amostra injetado no cromatógrafo foi de 30 µL e a temperatura da coluna foi mantida constante, a 40°C. A detecção da microcistina foi realizada por análise em fotodiodo (PDA) com o espectro de absorção em uma faixa de 190 a 300 nm. Os picos referentes às variantes de microcistinas foram identificados por máxima absorção no comprimento de onda de 238 nm.

## RESULTADOS

Foram obtidos 3 cromatogramas para cada experimento, contudo, os cromatogramas que melhor representam as triplicatas estão representados neste trabalho. Para efeito comparativo, aplicou-se um mix de 3 padrões de microcistinas (myc-RR, myc-LR e myc-LA) a 11 µg/mL, mas o foco do subprojeto é a microcistina LR.

### Cromatogramas comparativos dos tratamentos de SPE e Liofilização

Para confrontar os resultados obtidos em cada um dos tratamentos (SPE e liofilização) foram plotados no mesmo gráfico os cromatogramas das amostras que foram submetidas ao mesmo procedimento de rompimento celular. A figura 2(A), mostra o cromatograma completo dos experimentos 1 e 2 em que destaca-se a presença de um pico acentuado no início do cromatograma referente ao experimento 2.

Na figura 2 (B) o fragmento do cromatograma em que ocorrem os picos de 3 tipos de microcistinas, observa-se que a detecção de microcistina-LR foi maior na amostra do experimento 1 tratada com SPE.

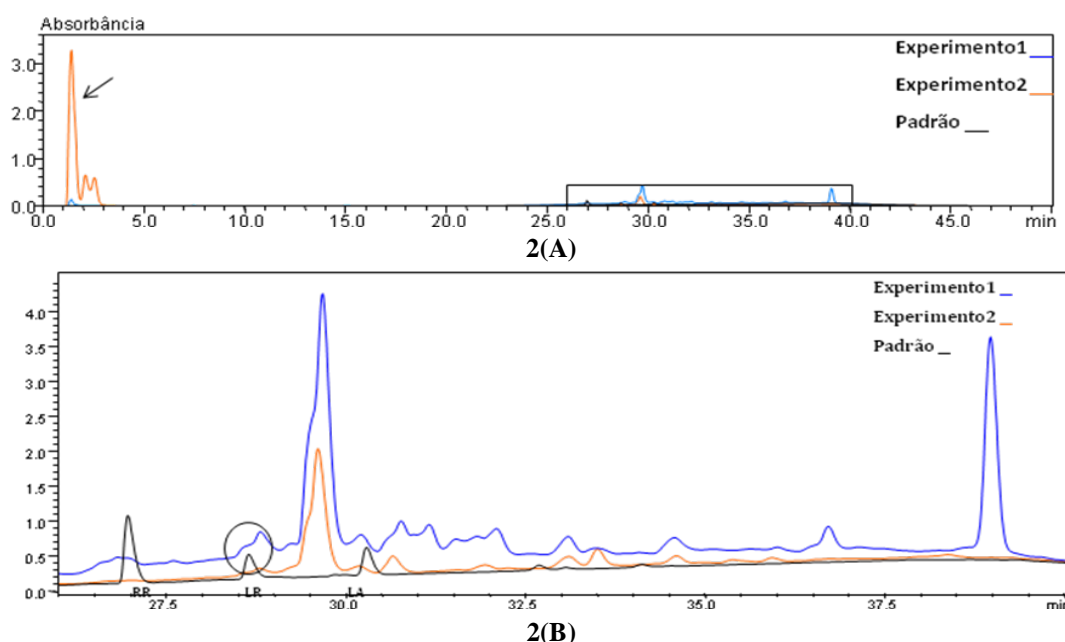
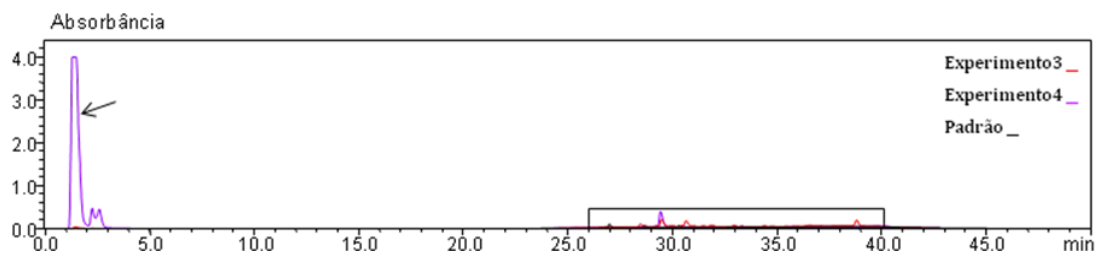
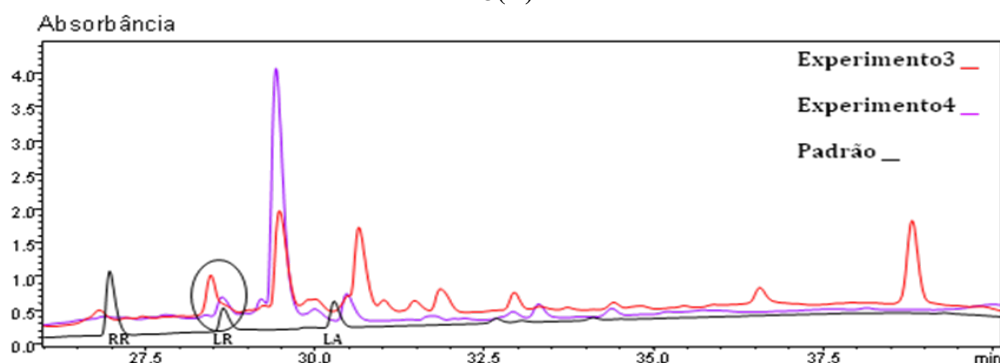


Figura 2: (A) Cromatograma completo dos experimentos 1 e 2, (B) Fragmento do cromatograma que apresenta os picos de 3 tipos de microcistina em destaque o pico da microcistina-LR.

Na figura 3(A) também destaca-se a presença de um pico acentuado no início do cromatograma referente ao experimento 4, o qual a amostra foi liofilizada e na figura 3 (B) observa-se picos semelhantes aos do padrão para os dois experimentos, contudo, no experimento 3 em que as amostras foram tratadas com SPE a detecção de microcistina foi maior.



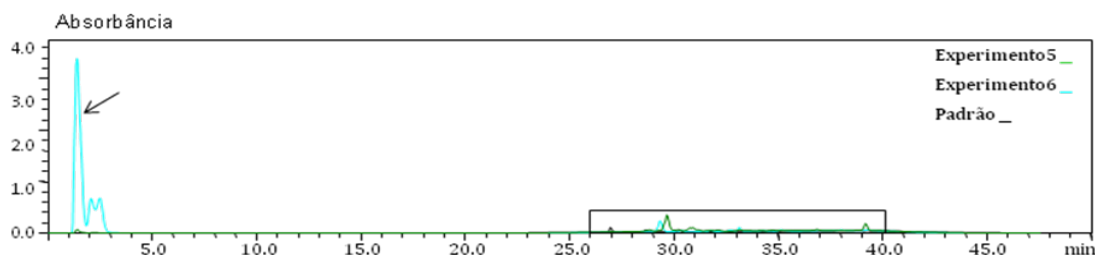
3(A)



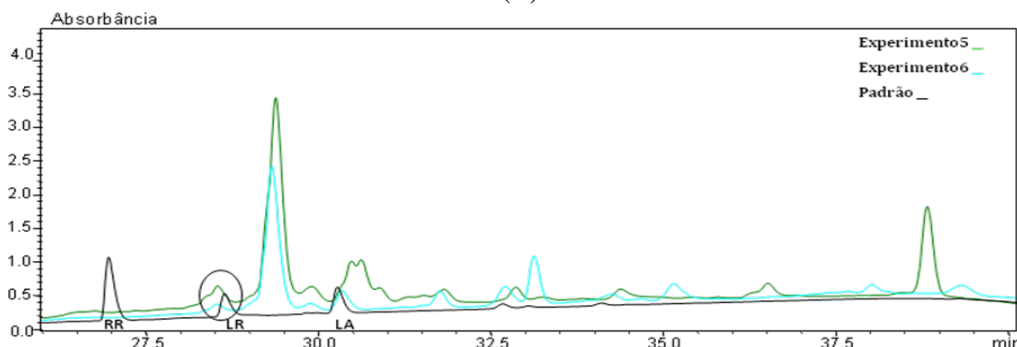
3(B)

**Figura 3: (A) Cromatograma completo dos experimentos 3 e 4, (B) Fragmento do cromatograma que apresenta os picos de 3 tipos de microcistina em destaque o pico da microcistina-LR.**

Na figura 4 (A), seguindo o padrão dos experimentos em que as amostras foram liofilizadas também apresenta um pico acentuado no início do cromatograma referente ao experimento 6. Na figura 4 (B) o pico da microcistina-LR foi maior no experimento 5, em que a amostra foi tratada com SPE.



4(A)



4(B)

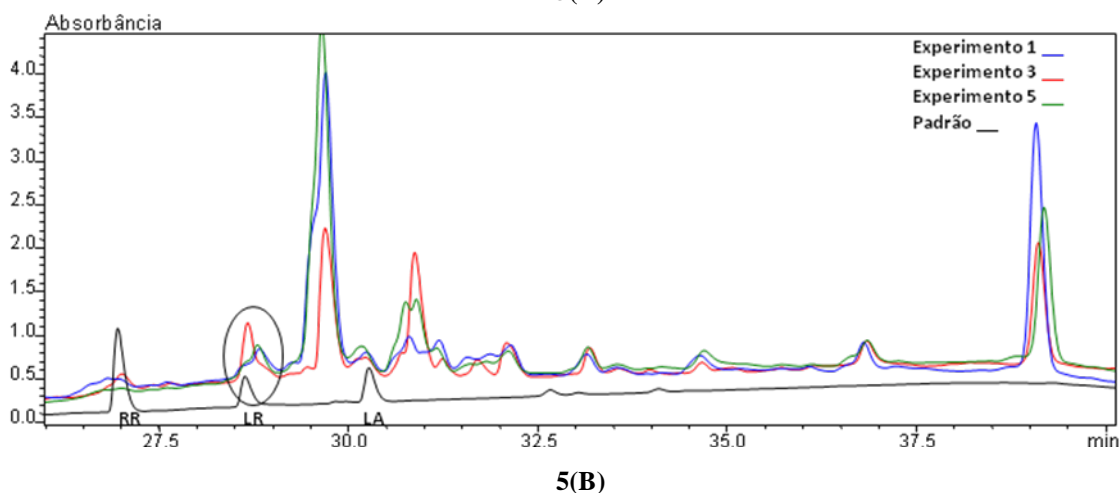
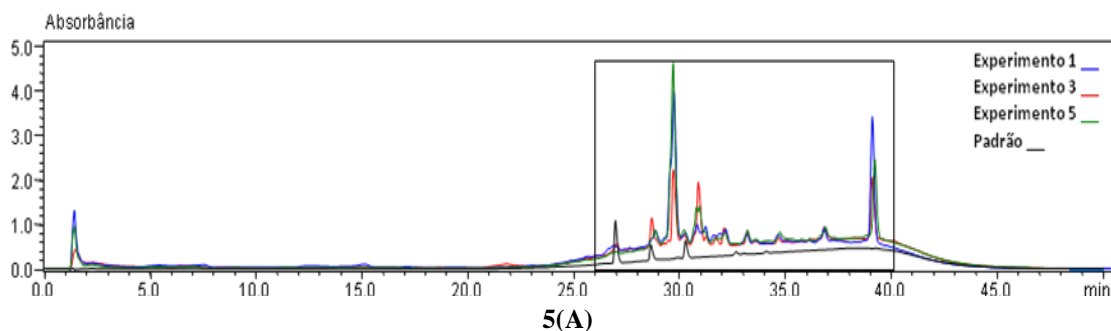
**Figura 4: (A) Cromatograma completo dos experimentos 3 e 4, (B) Fragmento do cromatograma que apresenta os picos de 3 tipos de microcistina em destaque o pico da microcistina-LR.**



### Cromatogramas comparativos dos tratamentos de rompimento celular

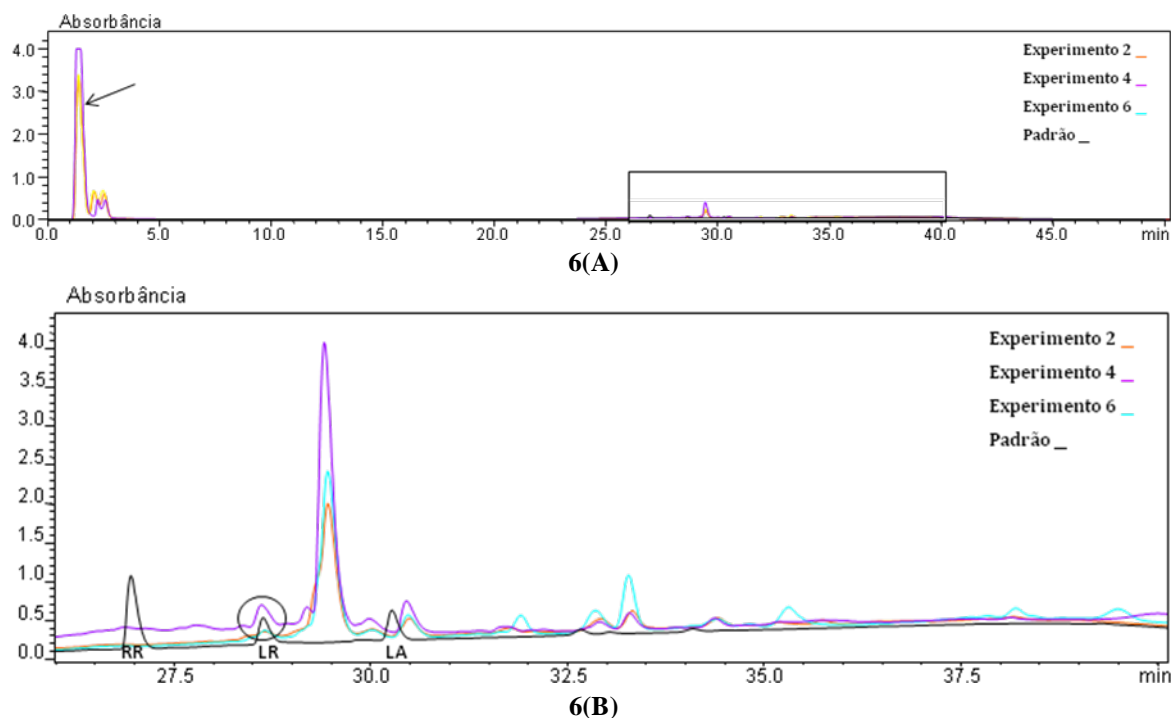
Para confrontar os resultados obtidos em cada um dos tratamentos de lise celular foram plotados no mesmo gráfico os cromatogramas das amostras que foram submetidas ao mesmo procedimento de concentração das amostras e diferentes tratamentos de lise celular.

Na figura 5(A) tem-se o cromatograma completo dos experimentos 1, 3 e 5 cujas amostras foram concentradas via SPE. Observa-se que no início da corrida existem picos de absorvância relativamente pequenos demonstrando que as amostras apresentam poucos interferentes em sua composição. A figura 5(B) mostra que o pico da microcistina-LR é maior no experimento 3 e que nos experimentos 1 e 5 são bem semelhantes.



**Figura 5(A) Cromatograma completo dos experimentos 1, 3 e 5, todos tratados por SPE (B) Fragmento do cromatograma que apresenta os picos de 3 tipos de microcistina em destaque o pico da microcistina-LR.**

A figura 6 (A) mostra o cromatograma completo dos experimentos 2, 4 e 6 cujas amostras foram concentradas via liofilização. Observa-se que no início da corrida existem grandes picos de absorvância demonstrando que as amostras apresentam muitos interferentes em sua composição. A figura (B) mostra que o pico da microcistina-LR é maior no experimento 4 e que nos experimentos 2 e 6 são bem semelhantes.



**Figura 6 (A) Cromatograma completo dos experimentos 2, 4 e 6 todos tratados por liofilização (B) Fragmento do cromatograma que apresenta os picos de 3 tipos de microcistina em destaque o pico da microcistina-LR.**

Durante as corridas os padrões de microcistina injetados juntamente com as amostras mostram que o tempo de retenção da microcistina-LR é de aproximadamente 28 minutos, o que observamos nas amostras dos 6 experimentos. A partir dos cromatogramas foi possível calcular a concentração de microcistina detectadas nas amostras e comprovar que a maior concentração de toxina foi detectada no experimento 3 (3,25 mg/L).

**Tabela 2- Tempo de retenção das amostras dos 6 experimentos e a concentração de toxina detectada. Em destaque as concentrações dos experimentos tratados via SPE.**

EXPERIMENTO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	CONCENTRAÇÃO DE MICROSCISTINA-LR ( $\mu\text{g/L}$ )
E1	28.635	<b>2,83</b>
E2	28.781	0,11
E3	28.448	<b>3,25</b>
E4	28.614	1,31
E5	28.804	<b>2,10</b>
E6	28.521	0,65

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Segundo os dados obtidos nas análises por CLAE as amostras que foram tratadas por SPE apresentaram cromatogramas mais “limpos”, ou seja, tiveram menos picos desconhecidos. Isso pode ser observado nas figuras 2 (A), 3 (A) e 4 (A), que visivelmente tem picos acentuados nos cromatogramas dos experimentos que tiveram suas amostras liofilizadas. Indicando que o tratamento por SPE conseguiu eliminar possíveis interferentes que constituem as amostras e que poderiam alterar os resultados reais das quantidades de microcistina-LR.

A eficiência do tratamento por SPE é confirmada pelos resultados obtidos nos cromatogramas representados nas figuras 2(B), 3(B), 4(B) e na tabela 2 que destacam os picos e as concentrações microscistina-LR. Ao

comparar os experimentos 1 e 2 (figura 2(B)) que tiveram suas amostras sonificadas, observa-se que visivelmente o pico do experimento 1 é muito maior, ou seja, a quantidade de toxina detectada é muito maior quando a amostra recebe o tratamento sonificação/SPE do que o tratamento sonificação/SPE. Isso se confirma quantitativamente, como mostra a tabela 2, onde a concentração de E1 (2,83mg/L) é muito superior que a de E2 (0,11mg/L).

Se forem feitas as mesmas análises de dados para os experimentos 3 e 4, conclui-se que o tratamento fervura ao microondas/SPE é melhor que o tratamento microondas/liofilização. E para os experimentos 5 e 6 conclui-se que o tratamento congelar-descongelar/SPE é melhor que o tratamento congelar-descongelar/liofilização.

Ao analisar os resultados observados nas figuras 5(B) e 6(B) conclui-se que os experimentos 3 e 4 que receberam o tratamento fervura ao microondas/SPE e fervura ao microondas/liofilização, respectivamente, apresentaram picos maiores quando comparados com outros experimentos que receberam o mesmo tratamento para concentração da amostra. Isso indica que tanto para amostras liofilizadas como para amostras tratadas via SPE, a fervura ao microondas teve melhor eficiência na extração da toxina, o que é confirmado pela concentração de toxina encontrada para o experimentos 3 (3,25mg/L) e 4 (1,31mg/L).

Desta forma é possível concluir que a metodologia de fervura ao microondas/ SPE é a mais eficiente para extração e concentração de microcistina-LR entre as demais testadas neste subprojeto. Sendo a mais indicada para se utilizar em amostras com grande quantidade de células, como é observado em amostras de cultivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Saúde – MS. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (MS). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.
- BRITAIN, S. et al. Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont. **Toxicon**, Oxford, v. 38, n. 12, p. 1759- 1771, Dec., 2000.
- CARMICHAEL, W.W. Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. In: OWNBY, C.L.; ODELL, G.V. (Eds.). **Nature toxins: characterization, pharmacology and therapeutics**. London: Pergamon Press., p. 3-16, 1988.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, K.T.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeastern Brazilian drinking water supply. **Environ. Toxicol.** n. 14, p. 31–35, 1999.
- ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1998.
- GORHAM, P.R. et. al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb., **Internat. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, n. 15, p. 796-804, 1964.
- HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, p. 369-405, 1999.
- HUSZAR, V.L.M. et al. **Cyanoprokaryota assemblages in the eighth productive tropical Brazilian waters**. *Hydrobiologia*, Dordrecht, v. 424, n. 1/3, p. 67-77, Apr., 2000
- JARDIM, F.A. et al. **A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água** - Minas Gerais - Brasil. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 27., 2000. Porto Alegre, RS. **Anais...** Porto Alegre: Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS)/Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES), 2000. Disponível em: <www.ciplima.org.pe/sanitaria/xxvii\_con/tema02/ii-034.pdf>. Acesso em 15 de junho de 2010.
- LAWTON, L. A.; EDWARDS, C.; CODD, G. A. (1994) Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystin in raw and treated waters. **Analyst**, v. 119, p. 1525-1530.



12. NASCIMENTO, S.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Changes in cellular component in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios – an ecophysiological study. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 14, n. 1, p. 37-44, Feb., 1999.
13. RAPALA, J. et al (2002). Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay - Comparison of methods. **Analytica Chimica**, v. 466, p. 213-231.
14. SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon., p. 369-405, 1999.
15. TOWNSEND, S.A.; LUONG-VAN, J.T.; BOLAND, K.T. Retention time as a primary determination of colours and light attenuation in two tropical **Australian reservoirs**. **Freshwater Biology**, Oxford, v.36, n. 1, p. 57-69, Aug., 1996
16. YOO, R.S. et al. **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide**. Denver: WWA Foundation and the American Water Works Association, 1995.
17. YUNES, J.S. et al. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil. **Journal of Aquatic Ecosystem Health**, Dordrecht, v. 5, p. 223-229. 1996.