

ANA LUIZA FONSECA FORTES FURTADO

Isolamento, morfologia, análises moleculares e testes toxicológicos de cianobactérias em lagoa facultativa de sistema de estabilização (Cajati-SP)

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Hidráulica e Saneamento.

Área de Concentração: Hidráulica e Saneamento
Orientadora: Profa. Titular Maria do Carmo Calijuri

São Carlos
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Furtado, Ana Luiza Fonseca Fortes

F992i Isolamento, morfologia, análises moleculares e testes toxicológicos de cianobactérias em lagoa facultativa de sistema de estabilização (Cajati-SP) / Ana Luiza Fonseca Fortes Furtado ; orientadora Maria do Carmo Calijuri. — São Carlos, 2007.


Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.


1. Toxinas. 2. Cianobactérias. 3. Lagoas de estabilização. 4. Peptídeos. 5. Metabólitos secundários. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO


Candidata: Ecóloga **ANA LUIZA FONSECA FORTES FURTADO**

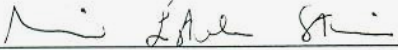
Tese defendida e julgada em 01/10/2007 perante a Comissão Julgadora:


Prof.^a. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI (Orientadora)** Aprovada
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)


Prof.^a. Dr.^a. **ROSANA FILOMENA VAZOLLER** Aprovada
(Colaboradora – Instituto de Ciências Biomédicas/USP)


Prof.^a. Dr.^a. **MARLI DE FATIMA FIORE** Aprovada
(Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP)


Prof. Dr. **AUGUSTO ETCHEGARAY JUNIOR** APROVADA
(Pontifícia Universidade Católica/PUC-Campinas)


Dr.^a. **MARIA ESTELA STENICO** Aprovada
(Pós-Doutoranda/FAPESP – Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP)


Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia (Hidráulica e Saneamento)


Prof. Associado **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

***Dedico este trabalho a minha
mãe, Gislaine F.F. Furtado,
meu alicerce, e ao meu filho,
Jean Michel Furtado M'Peko,
minha fonte de vida.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas, acadêmicas ou não, que estiveram envolvidas neste trabalho e nesta etapa de minha vida.

A minha orientadora, Dra. Maria do Carmo Calijuri, pela oportunidade oferecida e pela paciência e compreensão durante os períodos difíceis.

A Dra. Marli de Fátima Fiore (CENA-USP), a qual me permitiu trabalhar em seu laboratório e me ensinou muito sobre biologia molecular e cianobactérias, com seus conselhos e diálogos positivos.

Ao doutorando Ricardo Y. Honda e mestrando Diego B. Genuário, pela ajuda com a identificação das linhagens isoladas. Ao Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda, pelo uso do microscópio no Laboratório de Carbono-14 (CENA-USP).

A doutoranda Adriana Sturion Lorenzi, pela ajuda para seqüenciar as linhagens com os genes analisados neste estudo.

A Dra. Maria Estela Stênico pela orientação nos testes de bioatividade, análises no Q-TOF juntamente com o Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (USP-Ribeirão Preto) e pela ajuda na interpretação dos resultados.

Ao Dr. Martin Welker (Alemanha), Dr. Emanuel Carrilho (IQSC-USP) e Dr. Alexander Andrade (ESALQ-USP) pelas sugestões na interpretação dos espectros de Q-TOF.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactéria do CENA-USP em Piracicaba, Adriana Sturion Lorenzi, Caroline S. Pamplona da Silva, Karla N. Marques, Diego Bisson, Diego B. Genuário, Cristina Martine, Tânia K. Shishido, Daniele del Rio, Ricardo Y. Honda, Maria Estela Stênico e os novos estagiários (Talita, Victor e Felipe) pela ajuda e companheirismo constantes em todas as etapas do trabalho, além de saídas extra-acadêmicas muito divertidas.

Aos funcionários da EESC – USP, principalmente as secretárias do SHS Sá e Pavi e a Rose, por toda a ajuda durante este período.

A FAPESP, através do projeto temático “Estudo dos sistemas naturais e artificiais redutores de cargas poluidoras para a sustentabilidade dos recursos

hídricos do Baixo Ribeira de Iguape, SP”, processo nº 02/13449-1. A equipe deste temático, pelo trabalho de grandes proporções.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A minha família, por tudo e mais um pouco e principalmente, meu anjo, amor da minha vida, meu filho Jean Michel, o qual nasceu durante o período deste doutorado para me dar uma luz guia e fazer tudo valer a pena.

Tudo o que eu encontrar, sei que vou gritar...

Eureka, eureka

A palavra grega antiga, sempre vou gritar.

Eureka.

Uma delícia para o cientista, é quando ele acha uma pista...

É o momento que ele grita

Eureka.

A melhor palavra do mundo, quando desanimar diga:

Eureka.

Sem desanimar.

EUREKA – Episódio de Backyardigans

RESUMO

FURTADO, A.L.F.F. (2007). *Isolamento, Morfologia, Análises Moleculares e Testes Toxicológicos de Cianobactérias em Lagoa Facultativa de Sistema de Estabilização (Cajati-SP)*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

Os sistemas de lagoas de estabilização constituem uma tecnologia de tratamento de esgoto atraente para pequenas e médias comunidades, principalmente devido ao baixo custo, simplicidade operacional e boa eficiência de remoção de poluentes orgânicos e patógenos. Entretanto, apresentam elevadas concentrações de algas, cianobactérias e outras bactérias em seus efluentes. Neste trabalho, três coletas foram realizadas na lagoa facultativa no município de Cajati – São Paulo – Brasil em 16 de dezembro de 2004, 25 de janeiro e 13 de abril de 2005. A população de cianobactérias foi estimada usando as técnicas de Número Mais Provável (NMP) e isolamento em meio de cultura BG-11 com e sem nitrogênio. O NMP da população de Cajati na lagoa facultativa variou em torno de $2,3 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^4$ células/mL. Um total de 10 linhagens, pertencentes a cinco gêneros de cianobactérias (*Synechococcus*, *Merismopedia*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix* e *Nostoc*), foi isolado e identificado morfológicamente e por análises moleculares. A identificação morfológica das linhagens isoladas foi congruente com análises filogenéticas baseadas nas seqüências do gene RNAr 16S. A amostra ambiental coletada no dia 16 de dezembro de 2004 foi também analisada por meio da construção de uma mini-biblioteca do espaço intergênico (IGS) juntamente com suas regiões flanqueadoras dos genes *cpcB* e *cpcA* do *operon* da ficocianina. Somente três seqüências de *cpcBA*-IGS de boa qualidade foram obtidas dos 112 clones gerados, as quais apresentaram baixa similaridade com seqüências do GenBank. Testes foram realizados para avaliar microcistinas nas cianobactérias isoladas e nas amostras ambientais usando o método ELISA e a detecção do gene *mcyA*. Resultados acima de $0,1 \mu\text{g/L}$ de microcistinas foram obtidos em seis das dez linhagens isoladas e em duas amostras ambientais. Não foram observadas amplificações por PCR do gene *mcyA* em todas as linhagens e amostras ambientais analisadas. Testes de bioatividade para

detectar a presença de substâncias bioativas foram conduzidos usando extratos intra e extracelulares de cianobactérias obtidos com diferentes solventes orgânicos. Alguns extratos mostraram atividades inibitórias contra *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus pasteuri* e *Staphylococcus aureus*. O DNA genômico dos isolados foi analisado por PCR para seqüências similares ao domínio da cetosintase (KS) do tipo I do gene da policetídeo sintase, obtendo resultado positivo para as linhagens *Leptolyngbya* CENA 103, *Nostoc* CENA 105, *Nostoc* CENA 107, *Synechococcus* CENA 108, *Limnothrix* CENA 109, *Limnothrix* CENA 110, *Limnothrix* CENA 111 e *Leptolyngbya* CENA 112. Espectrometria de massa (Q-TOF) dos isolados de cianobactérias revelou espectros de cianopeptídeos putativos. Esses resultados mostraram que as cianobactérias de lagoas facultativas produzem uma variedade de metabólitos secundários bioativos de funções desconhecidas.

Palavras-chave: cianobactérias, cianotoxinas, lagoas de estabilização, peptídeos e metabólitos secundários.

ABSTRACT

FURTADO, A.L.F.F. (2006). Isolation, morphology, molecular analyses and toxicology assays of cyanobacteria from facultative pond of waste stabilization (*Cajati-SP*). Thesis (PhD) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

Stabilization ponds systems constitute a sewage treatment technology attractive to small and medium communities, mainly due to low cost, operational simplicity and good efficiency of removing organic pollutants and pathogens. However, high concentrations of algae, cyanobacteria and other bacteria are present in their effluent. In this work, three samplings were carried out at the facultative pond from Cajati city - São Paulo - Brazil in December 16, 2004, January 25 and April 13, 2005. The cyanobacterial population was estimated using the Most Probable Number (MPN) and isolation in BG-11 culture medium (with and without nitrogen) techniques. The MPN of the population from Cajati facultative pond varied from 2.3×10^2 to 1.5×10^4 cells/mL. A total of 10 strains, belonging to five cyanobacteria genera (*Synechococcus*, *Merismopedia*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix* and *Nostoc*) was isolated and identified by morphological and molecular analyses. The morphological identification of the strains was congruent with their phylogenetic analyses based on 16S rDNA gene sequences. The environmental sample collected in December 16, 2004 was also analyzed through the construction of a mini-library of the intergenic spacer (IGS) together with its flanking regions of the *cpcB* and *cpcA* genes of the phycocyanin operon. Only three *cpcBA*-IGS sequences with good qualities were obtained from 112 clones, which showed low similarities with sequences from GenBank. Tests were carried out to evaluate microcystins in the cyanobacterial isolates and environmental samples, using ELISA assay and detection of *mcyA* gene. Results above of 0.1 µg/L of microcystin were obtained in six of the ten isolate strains and in two environmental samples. No PCR amplification of *mcyA* gene was observed in all strains and environmental samples analyzed. Bioactivity test to detect the presence of bioactive compounds were conducted using intra and extracellular cyanobacterial extracts obtained with different organic solvents. Some extracts showed

inhibitory activities against *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus pasteurii* and *Staphylococcus aureus*. The genomic DNA of isolates was analyzed by PCR for sequence similarities to the ketosynthase (KS) domain of type I polyketide synthase with positive results for *Leptolyngbya* CENA 103, *Nostoc* CENA 105, *Nostoc* CENA 107, *Synechococcus* CENA 108, *Limnothrix* CENA 109, *Limnothrix* CENA 110, *Limnothrix* CENA 111, and *Leptolyngbya* CENA 112. Mass spectrometry (Q-TOF) of the cyanobacterial isolates revealed spectra of putative cyanopeptides. These results showed that cyanobacteria of facultative pond produce a variety of bioactive secondary metabolites of unknown functions.

Key words: cyanobacteria, cyanotoxins, stabilization ponds, peptides and secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura geral da microcistina (SIVONEN et al., 1992).	17
Figura 2	– Estrutura geral da nodularina (SIVONEN e JONES, 1999).	17
Figura 3	– Organização do operon do RNA ribossômico.	23
Figura 4	– Aparato fotossintético, com destaque para a região de ficocianina (PC). Fonte: Kyoto <i>Encyclopedia of Genes and Genomes</i> .	24
Figura 5	– Representação esquemática do operon PC – setas indicativas da posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores das sub-unidades β (PC β F) e α (PC α R).	24
Figura 6	– Módulos pertencentes aos domínios de policetídeos e os oligonucleotídeos utilizados.	27
Figura 7	– Representação esquemática do operon <i>mcy</i> A-J em <i>Microcystis</i> sp.	27
Figura 8	– Organização estrutural da microcistina sintetase nas regiões flangeadoras.	28
Figura 9	– O agrupamento de genes <i>mcy</i> para a biossíntese da microcistina em <i>Anabaena</i> (ROUHIAINEN et al., 2004), <i>Microcystis</i> (TILLET et al., 2000), <i>Planktothrix</i> (CHRISTIANSEN et al., 2003) e <i>nda</i> de nodularina para <i>Nodularia</i> (MOFFITT e NEILAN, 2004).	29
Figura 10	– Ionização por <i>electrospray</i> . Fonte: NERC <i>Life Sciences Mass Spectrometry Facility</i> (LSMSF) (2007).	32
Figura 11	– Etapas deste estudo.	38
Figura 12	– Localização do município de Cajati – SP. Fonte: SABESP, 2007.	40
Figura 13	– Pontos de coleta (1, 2 e 3) na lagoa facultativa da Estação de Tratamento de Esgoto de Cajati e (4) na área de lançamento para o rio, no tanque de cloração. Foto: Mario D. Domingues.	41
Figura 14	– Tubos com meio BG-11 em triplicata com sete diluições em cada ponto da lagoa.	42

- Figura 15** – Gráfico de chuva acumulada mensal por dias de chuva para o período de 2004. 53
- Figura 16** – Gráfico de chuva acumulada mensal por dias de chuva para o período de 2005. 54
- Figura 17** – Morfotipos de cianobactérias isolados em cultura do sistema de lagoas de estabilização de Cajati – A. *Leptolyngbya* CENA103, B. *Leptolyngbya* CENA104, C. *Nostoc* CENA105, D. *Merismopedia* CENA106, E. *Nostoc* CENA107, F. *Synechococcus* CENA108, G. *Limnothrix* CENA109, H. *Limnothrix* CENA110, I. *Limnothrix* CENA111, J. *Leptolyngbya* CENA112. Escala = 5 µm. 59
- Figura 18** – Extração de DNA genômico das amostras isoladas. 1- marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III, 2- ponto 1 (16dez), 3- ponto 2 (16dez), 4- ponto 3 (16dez), 5- ponto 4 (16dez), 6- ponto 1 (25jan), 7- ponto 2 (25jan), 8- ponto 3 (25jan), 9- ponto 4 (25jan), 10- ponto 1 (13abr), 11- ponto 2 (13abr), 12- ponto 3 (13abr) e 13- ponto 4 (13abr). 63
- Figura 19** – Extração de DNA genômico das amostras ambientais. 1- marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III, 2- *Merismopedia* CENA106, 3- *Leptolyngbya* CENA104, 4- *Synechococcus* CENA108, 5- *Limnothrix* CENA109, 6- *Limnothrix* CENA111, 7- *Leptolyngbya* CENA112, 8- *Limnothrix* CENA110, 9- *Leptolyngbya* CENA103, 10- *Nostoc* CENA105, 11- *Nostoc* CENA107. 63
- Figura 20** – Produtos de amplificação (oligonucleotídeos iniciadores 27F1/1494R) do gene RNAr 16S das amostras isoladas. 1- Marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2- *Merismopedia* CENA106, 3- *Leptolyngbya* CENA104, 4- *Synechococcus* CENA108, 5- *Limnothrix* CENA109, 6- *Limnothrix* CENA111, 7- *Leptolyngbya* CENA112, 8- *Limnothrix* CENA110, 9- *Leptolyngbya* CENA103, 10- *Nostoc* CENA105, 11- *Nostoc* CENA107, 12- controle negativo (sem DNA), 13- marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* 64

- III.
- Figura 21** – Árvore filogenética do gene que codifica para o RNAr 16S 67
 construída pelo método *Neighbor-Joining* usando o
 programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 64238,
 Modelo Kimura 2-*parameter*, número de nucleotídeos 1280.
 Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram
 desconsiderados.
- Figura 22** – Árvore filogenética do gene que codifica para o RNAr 16S 68
 construída pelo método da Máxima Parsimônia usando o
 programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*=64238,
 número de nucleotídeos 1280. Valores de *bootstrap*
 inferiores a 50% foram desconsiderados.
- Figura 23** – Produtos de amplificação usando oligonucleotídeos 70
 iniciadores para a região *cpcBA* da lagoa facultativa de
 Cajati. 1-marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2-
 afluente (16dez), 3- centro (16dez), 4- efluente (16dez).
- Figura 24** – Produtos de amplificação (oligonucleotídeos iniciadores 71
 M13R/M13F) de 112 clones oriundos da lagoa facultativa de
 Cajati. Br – controle negativo (sem DNA). As amostras
 destacadas com a numeração de seus respectivos clones
 foram seqüenciadas.
- Figura 25** – Árvore filogenética baseada na seqüência de *cpcBA*-IGS de 73
 cianobactérias construída pelo método *Neighbor-Joining*
 usando o programa MEGA, com 1000 replicações;
seed=75906, modelo Kimura-2 *parameter*, número de
 nucleotídeos 492. Valores de *bootstrap* inferiores a 50%
 foram desconsiderados.
- Figura 26** – Árvore filogenética baseada na seqüência de *cpcBA*-IGS de 73
 cianobactérias construída pelo método da Máxima
 Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000
 replicações; *seed*=20522, número de nucleotídeos 492.
 Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram
 desconsiderados.

- Figura 27** – Produtos de amplificação do gene *mcyA* das cianobactérias isoladas. 1- Marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2- ponto 1 (16dez), 3- ponto 2 (16dez), 4- ponto 3 (16dez), 5- ponto 4 (16dez), 6- ponto 1 (25jan), 7- ponto 2 (25jan), 8- ponto 3 (25jan), 9- ponto 4 (25jan), 10- ponto 1 (13abr), 11- ponto 2 (13abr), 12- ponto 3 (13abr) e 13- ponto 4 (13abr), 14- *Synechococcus* CENA106, 15- *Leptolyngbya* CENA104, 16- *Merismopedia* CENA108, 17- *Limnothrix* CENA109, 18- *Limnothrix* CENA111, 19- *Leptolyngbya* CENA112, 20- *Limnothrix* CENA110, 21- *Leptolyngbya* CENA103, 22- *Nostoc* CENA105, 23- *Nostoc* CENA107, 24- controle negativo (sem DNA), 25- Marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 26- controle positivo. 75
- Figura 28** – Produtos de amplificação do gene para NRPS. 1- Marcador molecular 100 pb DNA *Ladder*, 2- *Leptolyngbya* CENA103, 3- *Leptolyngbya* CENA104, 4- *Nostoc* CENA105, 5- *Synechococcus* CENA106, 6- *Nostoc* CENA107, 7- *Merismopedia* CENA108, 8- *Limnothrix* CENA109, 9- *Limnothrix* CENA110, 10- *Limnothrix* CENA111, 11- *Leptolyngbya* CENA112, 12- controle negativo (sem DNA). 76
- Figura 29** – Produtos de amplificação do gene para PKS. 1- Marcador molecular 100 pb DNA *Ladder*, 2- *Leptolyngbya* CENA103, 3- *Leptolyngbya* CENA104, 4- *Nostoc* CENA105, 5- *Synechococcus* CENA106, 6- *Nostoc* CENA107, 7- *Merismopedia* CENA108, 8- *Limnothrix* CENA109, 9- *Limnothrix* CENA110, 10- *Limnothrix* CENA111, 11- *Leptolyngbya* CENA 112, 12- controle negativo (sem DNA). 77
- Figura 30** – Estrutura química e *operon* de Nostopeptolida. Fonte: *NPBiogene*. 79
- Figura 31** – Estrutura química e *operon* de Curacina. Fonte: *NPBiogene*. 80
- Figura 32** – Estrutura química e *operon* de Barbamida. Fonte: *NPBiogene*. 81
- Figura 33** – Estrutura química e *operon* de Microcistina. Fonte: 82

- NPBiogene*.
- Figura 34** – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construídas pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 64238, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 159. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados. 84
- Figura 35** – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construídas pelo método Máxima Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 50257, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 159. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados. 85
- Figura 36** – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construída pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 35531, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 87. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados. 88
- Figura 37** – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construída pelo método Máxima Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 30326, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 87. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados. 88
- Figura 38** – Estrutura química e *operon* de Chivosazol. Fonte: *NPBiogene*. 89
- Figura 39** – Extratos de duas linhagens de *Leptolyngbya*, CENA 103 (A) e CENA 112 (B). Extratos obtidos com clorofórmio (1), 92

acetato de etila (2) e metanol (3).

- Figura 40** – Teste de bioatividade. Extratos: 1. *Limnothrix* CENA110 93
clorofórmio, 2. *Limnothrix* CENA111 clorofórmio, 3. Meio BG-
11 – teste negativo, 4. *Synechococcus* CENA106 célula, 5.
Merismopedia CENA108 célula, 6. *Limnothrix* CENA109
célula, 7. *Limnothrix* CENA110 célula e 8. *Limnothrix* CENA
111 célula.
- Figura 41** – Espectros obtidos por Q-TOF (MS) em modo positivo para 94
os extratos de *Leptolyngbya* CENA103, *Leptolyngbya*
CENA104, *Nostoc* CENA105, *Synechococcus* CENA106 e
Nostoc CENA107. Círculo: peptídeos putativos.
- Figura 42** – Espectros obtidos por Q-TOF (MS) em modo positivo para 94
os extratos de CENA108, *Limnothrix* CENA109, *Limnothrix*
CENA110, *Limnothrix* CENA111 e *Leptolyngbya* CENA112.
Círculo: peptídeos putativos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação das cianobactérias (CASTENHOLZ, 2001).	7
Tabela 2	– Concentrações médias efluentes e eficiências típicas de remoção dos principais poluentes de interesse nos esgotos domésticos por lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa.	12
Tabela 3	– Características gerais das cianotoxinas	16
Tabela 4	– Principais classes de peptídeos de cianobactérias (WELKER e DÖHREN, 2006).	20
Tabela 5	– Descrição de projeto das lagoas do Sistema de Lagoas de Estabilização de Cajati – SP.	40
Tabela 6	– Dados SEADE sobre o município de Cajati – SP	52
Tabela 7	– Dados climatológicos do município de Jacupiranga	53
Tabela 8	– Gêneros isolados da lagoa facultativa e seus respectivos pontos e datas	55
Tabela 9	– Lista de cianobactérias isoladas da lagoa facultativa de Cajati-SP e mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, CENA – USP	55
Tabela 10	– Descrição dos morfotipos das cianobactérias isoladas neste estudo, incluindo os dados de variabilidade morfométrica das linhagens	58
Tabela 11	– Número Mais Provável obtido de culturas com meio BG-11.	61
Tabela 12	– Número Mais Provável obtido de culturas com meio BG-11 sem nitrogênio.	61
Tabela 13	– Número de acesso no GenBank das linhagens isoladas.	65
Tabela 14	– Análise BLAST realizada para as seqüências de RNAr 16S das amostras isoladas da lagoa facultativa de Cajati-SP.	66
Tabela 15	– Identidade através de BLAST das seqüências geradas com o gene de ficocianina.	72
Tabela 16	– Resultado dos Domínios de Peptídeos para as linhagens isoladas quando comparadas com o banco de dados disponível em NPBiogene	78

Tabela 17	–	BLAST realizado com seqüências transcritas em proteínas das linhagens isoladas para o gene PKS	83
Tabela 18	–	Resultados obtidos com o teste ELISA para as amostras ambientais	90
Tabela 19	–	Resultados obtidos com o teste ELISA para as cianobactérias isoladas.	90
Tabela 20	–	Resultados dos extratos contra as bactérias analisadas	92
Tabela 21	–	Descrição dos compostos putativos encontrados dos espectros das linhagens isoladas (MS)	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>cpcBA</i> :	Genes Beta e Alfa da ficocianina e respectivo espaço intergênico
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO:	Demanda Química de Oxigênio
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
EDTA:	Etilenodiaminotetraacetato dissódico (<i>Ethylene diamine tetraacetate</i>)
ELISA:	Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima
ETE:	Estação de Tratamento de Esgoto
HPLC:	cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
kb:	Kilobase, de DNA
<i>mcy</i> :	Gene para a toxina microcistina
NMP:	Número Mais Provável
NRPS:	Peptídeo Sintetase Não-Ribossômica (<i>Nonribosomal peptide synthetase</i>)
ORF:	Quadros Abertos de Leitura (<i>Open Reading Frames</i>)
pb:	Pares de bases, de DNA
PCR:	Reação de Polimerização em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH:	Potencial hidrogeniônico
PKS:	Policetídeo Sintase (<i>Polyketide synthase</i>)
Q-TOF:	Quadrupolo – Tempo de Vôo (<i>Quadrupole – Time of Fly</i>)
RFLP:	Polimorfismo nos fragmentos de restrição do DNA (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA:	Ácido ribonucléico
RNAr:	RNA ribossômico
TDH:	Tempo de Detenção Hidráulico
TE:	Tris – tampão EDTA
TEB:	Tris – ácido bórico – EDTA

LISTA DE SÍMBOLOS

A:	Ampere, unidade de corrente elétrica
°C:	Graus Celsius (escala centígrada)
g:	Gramas, unidade de massa
<i>g</i> :	Unidade gravitacional de força, 1 <i>g</i> = a força gravitacional da Terra
m:	Metros, unidade de medida
M:	Molar, unidade de concentração; moles de soluto por litros de solução
mA:	Miliampere, 1 mA = 10 ⁻³ A
μg:	Micrograma, 1 μg = 10 ⁻⁶ g
mg:	Miligrama, 1 mg = 10 ⁻³ g
μL:	Micro litro, 1 μL = 10 ⁻⁶ L
mL:	Mililitros, 1 mL = 10 ⁻³ L
mM:	Milimolar, 1 mM = 10 ⁻³ M
N:	Normal, a solução contendo um peso equivalente do constituinte em questão em 1 litro de solução
ng:	Nanograma, 1 ng = 10 ⁻⁹ g
pmol:	Picomole, 1 pmol = 10 ⁻¹² g
rpm:	Rotação por minuto
S:	Unidade de Svedberg, unidade de razão de sedimentação
V:	Volts, unidade de diferença elétrica potencial

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
SUMÁRIO	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Iniciais	1
1.2 A Pesquisa e seus Objetivos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 As Cianobactérias	5
2.2 As Cianotoxinas	13
2.3 Identificação Molecular de Cianobactérias	22
2.4 Genes Envolvidos na Biossíntese de Metabólitos Secundários	25
2.5 Métodos para Detecção de Metabólitos Secundários	30
3. METODOLOGIA	37
3.1 Etapas da Pesquisa	37
3.2 Área de Estudo	39
3.3 Coletas das Amostras na Lagoa Facultativa	41
3.4 Isolamento e cultivo	42
3.5 Número Mais Provável (NMP)	43
3.6 Análises moleculares	44
3.6.1 Extração de DNA genômico	44
3.6.2 Amplificação por PCR	44
3.6.3 Clonagem e transformação	45
3.6.4 Seqüenciamento	47
3.7 Construção de Mini-biblioteca de Amplicons da região <i>cpcBA</i>	47
3.8 Alinhamento e análises filogenéticas	48
3.9 Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (ELISA)	49
3.10 Bioatividades das linhagens isoladas	50

3.11 Espectrometria de Massas (Q-TOF)	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.3 Município de Cajati	52
4.2 Cultivo e isolamento das amostras ambientais	55
4.3 Biomassa – Número Mais Provável (NMP)	61
4.4 Extração de DNA Genômico	62
4.5 Amplificação do DNAr 16S por PCR das linhagens isoladas	63
4.6 Seqüenciamento dos amplicons de DNAr 16S e Análise Filogenética das linhagens isoladas.....	64
4.7 Mini-Biblioteca de amplicons da Região <i>cpcBA</i>	70
4.8 Detecção do domínio NMT do gene <i>mcyA</i>	74
4.9 Distribuição dos genes PKS e NRPS	75
4.10 ELISA	90
4.11 Teste de bioatividade usando bactérias, fungo e levedura	91
4.12 Espectrometria de Massas.....	94
5. CONCLUSÕES	98
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
APÊNDICE A – Seqüências geradas dos genes DNAr 16S, PKS e ficocianina neste estudo.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A contaminação dos recursos hídricos e dos mananciais de abastecimento público por rejeitos oriundos das atividades antrópicas tem sido um dos maiores fatores de risco para a saúde humana, especialmente em regiões com condições inadequadas de saneamento e suprimento de água.

Outra conseqüência decorrente das atividades antrópicas nos ecossistemas aquáticos é a ocorrência acentuada de processos de eutrofização, causando um enriquecimento artificial desses ecossistemas pelo aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados. Esse fato tem resultado em grande aumento dos processos naturais de produção biológica em rios, lagos e reservatórios. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como sendo as descargas de esgotos domésticos e industriais dos centros urbanos e das regiões agricultáveis.

O tratamento dos esgotos domésticos representa atualmente um grande desafio para os órgãos competentes. Várias possibilidades de tratamento que visam minimizar seu impacto na natureza encontram-se disponíveis, desde o tratamento considerado natural, como, por exemplo, por lagoas de estabilização, até tratamentos com desenvolvimento tecnológico de elevado custo e equipamentos sofisticados.

As lagoas de estabilização nos países tropicais, onde o clima é favorável para o tratamento, são em maior número se comparadas a outros tratamentos para águas residuárias. Mas esses sistemas apresentam condições propícias para a intensa proliferação de cianobactérias, como disponibilidade de nutrientes, luminosidade e águas relativamente calmas. Vários gêneros e

espécies de cianobactérias podem produzir uma grande variedade de compostos tóxicos nesse ambiente, incluindo hepatotoxinas e neurotoxinas, podendo afetar a biota aquática e gerar graves problemas na saúde de humanos e animais. Nesse contexto, as microcistinas, caracterizadas como hepatotoxinas, têm sido as mais estudadas por causarem problemas no mundo todo.

As vantagens da utilização de sistemas de lagoas de estabilização são a não utilização de energia elétrica, baixo custo comparado com outros sistemas de tratamento, não há necessidade de manutenção constante e eficiência é satisfatória de acordo com as normas vigentes, de maneira natural e sustentável.

Foram realizados vários estudos para a melhoria desse tratamento na área de engenharia, como a quantidade de fluxo de esgoto afluente e efluente do sistema, carga máxima do fluxo de esgoto no sistema, tamanho e profundidade das lagoas, o número de lagoas ideal, dentre outros.

O sistema de tratamento por lagoas de estabilização pode ser composto por lagoa anaeróbia, lagoa facultativa e lagoa de maturação. Após o tratamento nessas lagoas deve ocorrer a desinfecção, como cloração, por exemplo, apresentando resultado final considerado satisfatório para o descarte dessa água nos corpos d'água.

As bactérias, dentre elas as cianobactérias e as algas são importantes nesse tratamento como componentes ecológicos, já que esses microrganismos desempenham um papel essencial no processo de retirada de nutrientes em excesso da água.

As cianobactérias são produtoras de oxigênio através da fotossíntese, mantendo, junto com as algas fotossintéticas, o meio aeróbio das lagoas facultativas. Mas estas mesmas cianobactérias são conhecidas como potencialmente tóxicas quando em ambientes eutróficos.

Até o presente momento, poucos estudos foram realizados no mundo em relação à diversidade de cianobactérias em sistemas de lagoas de estabilização. Estudos taxonômicos das espécies presentes, o papel que exercem nesse tratamento, a interação com os demais microrganismos e a alteração da estrutura de sua comunidade precisam ser melhor documentados.

Além disso, o potencial tóxico das espécies presentes e o impacto do descarte destas toxinas, quando produzidas, nas águas dos corpos receptores constitui um problema de saúde pública, uma vez que em vários municípios brasileiros considerados populosos, a coleta de água ocorre próxima ao local de descarte de efluentes resultantes dos tratamentos de águas residuais do município a jusante.

Por este motivo, o estudo mais detalhado da ocorrência de cianobactérias e uma melhor compreensão dos gêneros e/ou espécies presentes e sua inter-relação com outros organismos em sistemas de lagoas de estabilização, assim como seu potencial para a produção de metabólitos secundários bioativos e o descarte do mesmo no ecossistema circundante, faz-se necessário.

Foi realizado estudo da dinâmica de sistemas redutores de cargas poluidoras nas microbacias dos rios Jacupiranga e Pariquera-Açu, no Baixo Ribeira de Iguape, visando o desenvolvimento com sustentabilidade dos recursos hídricos dessa região, através de Projeto Temático financiado pela Fapesp, processo nº 02/13449-1. Dentre esses sistemas, encontra-se o de lagoas de estabilização do município de Cajati-SP, objeto dessa tese.

1.2 A Pesquisa e seus Objetivos

Esta presente pesquisa tem como objetivo principal o estudo de cianobactérias presentes na lagoa facultativa do sistema de lagoas de estabilização do município de Cajati – SP, Vale do Ribeira de Iguape, através de:

- Isolamento em laboratório das espécies encontradas nas amostras coletadas, para conhecimento da população presente na lagoa;
- análise do gene *mcyA*, responsável pela produção de microcistinas, das amostras ambientais e das culturas isoladas;

- análise de toxinas pelo método ELISA, tanto das amostras ambientais como das culturas isoladas;
- identificação por microscopia tradicional dos gêneros de cianobactérias isoladas;
- testes moleculares através dos genes DNAr 16S e ficocianina, para estudo de filogenia;
- Seqüenciamento do domínio da cetosintase (KS) de policetídeo sintase (PKS) tipo I das culturas isoladas, para análise de compostos bioativos;
- ensaio de bioatividade, para detecção de possíveis compostos bioativos produzidos pelas espécies isoladas e
- espectrometria de massas (Q-TOF) dos extratos das linhagens isoladas, para análise dos peptídeos produzidos por cianobactérias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As Cianobactérias

As cianobactérias possuem longa história evolutiva na face da Terra e constituem um dos grupos mais diversos e abundantes de microrganismos (WILMOTTE, 1994). Elas apresentam estrutura celular bacteriana e realizam fotossíntese oxigênica, assim como as plantas e algas (SMITH, 1983; CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989; STAL e MOEZELAAR, 1997). As células contêm clorofila-*a* e outros pigmentos acessórios característicos (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) em tilacóides, que lhes conferem a coloração verde-azulada. Várias espécies possuem a enzima nitrogenase e fixam nitrogênio atmosférico (STEWART, 1973; RAI, 1990), além de serem capazes de precipitar carbonato de cálcio e formarem estruturas conhecidas como estromatólitos (SHOPF e WALTER, 1982).

A classificação das bactérias é recente e dinâmica. Os microscópios dos séculos 17 e 18 não possibilitavam sua identificação, sendo classificados como “infusão de animáculos”. No final do século 18, Otto Muller foi o primeiro a tentar desenvolver um sistema para microrganismos em dois gêneros, *Monas* e *Vibrio*. Em 1870, Ferdinand Cohn ainda possuía a idéia de que as formas de bactérias eram constantes, independentes das condições ambientais, mas já reconheceu a existência de similaridade entre cianobactéria e bactéria (ROSSELLÓ-MORA e AMANN, 2001).

Até a comprovação de sua natureza tipicamente bacteriana por meio de microscopia eletrônica e análises bioquímicas, as cianobactérias eram geralmente consideradas como algas e estudadas por botânicos e ficologistas (WILMOTTE, 1994). Assim, vários nomes já foram usados para designar esses organismos, como cianobactéria, cianofícea, cianófitas e algas verde-azuladas.

Morfologicamente, as cianobactérias exibem variedade de formas e arranjos, de cocos unicelulares à bacilos e mesmo coloniais, filamentosas ou filamentosas ramificadas multicelulares (WHITTON e POTTS, 2000), com tamanhos variando de 1 a 100 μm de diâmetro (BROCK, 1973). Elas são cosmopolitas, sendo encontradas inclusive em ambientes extremos, tais como lagos da Antártica, fontes termais, desertos áridos e solos ácidos tropicais (CASTENHOLZ, 1973; SKULBERG, 1995; DOR e DANIN, 1996).

Nas espécies filamentosas, os filamentos podem estar envolvidos em uma bainha mucilaginosa em forma de tubo (tricoma). Outras, unicelulares, apresentam-se envolvidas por uma mucilagem, formando agregados celulares visualizados a olho nu (ex: *Microcystis* sp.).

Por formarem um grupo morfologicamente diverso de organismos, sua classificação tem sido tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos, tais como estrutura da colônia, presença de acinetos e heterocitos, os quais podem variar de acordo com os ambientes ou condições de crescimento ou até mesmo serem perdidos durante longos períodos de cultivo (LYRA et al., 2001).

Algumas particularidades fisiológicas importantes desse grupo incluem resistência a vários metais pesados em ambientes poluídos (FIORE et al., 2000) e produção de metabólitos secundários (SILVA, 2006), incluindo potentes toxinas.

A classificação de cianobactérias está em constante aprimoramento e modificação. Dentre as existentes, três se destacam: a do Manual de Bacteriologia *Bergey* (CASTENHOLZ, 2001), a classificação de Rippka et al. (1979) e a de Komárek (2003). Na sistemática atual, *Cyanobacteria* é considerado como um Filo dentro do domínio *Bacteria* (CASTENHOLZ, 2001). A classificação das cianobactérias segundo o Manual de *Bergey* de Sistemática Bacteriológica está apresentada na Tabela 1 (retirado de MARQUES, 2006).

Tabela 1 – Classificação das cianobactérias (CASTENHOLZ, 2001).

ORDEM		GÊNEROS
Subseção I	Chroococcales	<i>Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeobacter, Gloeocapsa, Gloeothece, Microcystis, Prochlorococcus, Prochloron, Synechococcus, Synechocystis</i>
Subseção II	Pleurocapsales	
	subgrupo I	<i>Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus</i>
	subgrupoll	<i>Chroococcidiopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa, Hyella, Solentia</i>
Subseção III	Oscillatoriales	<i>Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix, Prochlorothrix, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema</i>
Subseção IV	Nostocales	
	subgrupo I	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira, Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc, Scytonema</i>
	subgrupo II	<i>Calothrix, Rivularia, Tolypothrix</i>
Subseção V	Stigonematales	<i>Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Iyengariella, Nostochopsis, Stigonema</i>

As toxinas produzidas por cianobactérias em florações nos reservatórios eutrofizados e lagoas não possuem o seu alto potencial tóxico em um simples contato com a pele de pessoas ou com animais (podendo causar, nesse caso, alergias e pequenas intoxicações). Mas, sob condições especiais, podem levar a morte se acumuladas e ingeridas em água para consumo (KOMÁREK, 2001). Os humanos são mais expostos a microcistinas através de consumo de água contaminada ou atividades recreacionais, como por exemplo, a natação (McETHINEY e LAWTON, 2005).

Durante as duas últimas décadas, ocorreu a conscientização do problema causado pelas florações tóxicas de cianobactérias, principalmente em função dos inúmeros incidentes, como por exemplo a morte de mais de 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru (PE), a qual foi atribuída à presença de cianotoxinas na água usada para diálise (ZAGATTO et al., 1997; JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998; AZEVEDO, 2001). Alguns casos de mortandade de animais domésticos no Estado de São Paulo

também foram relacionados às florações (BEYRUTH et al., 1992). Os vários episódios relatados na literatura contribuíram para aumento substancial nas pesquisas sobre cianobactérias e suas toxinas. Como resultado, várias informações sobre toxidez e estruturas das cianotoxinas, assim como de métodos analíticos para sua determinação estão disponíveis.

Dentre as hepatotoxinas, as microcistinas têm recebido maior atenção, uma vez que são encontradas com mais frequência nos corpos d'água. Nesse ambiente, os gêneros mais conhecidos são *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Planktothrix* (SIVONEN e JONES, 1999).

Normalmente, os levantamentos sobre ocorrência de cianobactérias nos corpos d'água são realizados através de técnicas convencionais de observação em microscópio óptico das amostras coletadas e/ou isolamento e cultivo dos microrganismos. No entanto, a identificação de espécies por meio da análise morfológica não permite que a mesma seja relacionada com a produção de toxinas. Numa mesma população, as linhagens presentes podem apresentar diferenças quanto à toxicidade. Por exemplo, *Microcystis aeruginosa* possui linhagens tóxica e não tóxica (MEISSNER et al., 1996), sendo necessária a análise da toxina.

Sant'Anna et al. (2004) analisaram as cianobactérias do estado de São Paulo, reservatórios da região do Alto Tietê, para a Ordem Chroococcales, identificando 26 espécies, pertencentes às famílias Chroococcaceae (*Chroococcus dispersus* e *Chroococcus distans*), Merismopediaceae (*Aphanocapsa delicatissima*, *Aphanocapsa elachista*, *Aphanocapsa holsatica*, *Aphanocapsa incerta*, *Aphanocapsa koordersii*, *Coelosphaerium evidentermarginatum*, *Coelomoron* cf. *tropicale*, *Coelosphaeriosis* sp, *Merismopedia glauca*, *Merismopedia punctata*, *Merismopedia tenuissima*, *Sphaerocavum brasiliense*), Microcystaceae (*Microcystis aeruginosa*, *Microcystis botrys*, *Microcystis novacekii*, *Microcystis panniformis*, *Microcystis protocystis*, *Microcystis wesenbergii* e *Microcystis* sp.) e Synechococcaceae (*Aphanothece conglomerata*, *Bacularia gracilis*, *Radiocystis fernandoi*, *Rhabdoderma lineare*, *Rhabdogloea ellipsoidea*). Dentre essas, seis são potencialmente tóxicas: *Aphanocapsa incerta*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis botrys*, *Microcystis panniformis*, *Microcystis wesenbergii* e *Radiocystis fernandoi*.

Lorenzi (2004) isolou *Microcystis* sp., *Pseudanabaena* sp. e *Limnothrix* sp. em monoculturas, identificou através de mini-biblioteca de *amplicons* da região do *cpcBA* cinco linhagens de *Microcystis aeruginosa* e duas de *Anabaena* sp. Através de maior identidade pela análise BLAST e pelo método DGGE com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cianobactéria, identificou *Microcystis* sp., *Gleiterinema* sp. e *Synechococcus* sp. de amostras providas das represas Billings e Guarapiranga, estado de São Paulo.

Nas lagoas de estabilização são freqüentes as cianobactérias das classes Oscillatoriales (filamentosas), Chroococcales (colônias) e Nostocales (filamentosas). A seguir, encontra-se uma breve descrição dos gêneros mais freqüentes em lagoas de estabilização (BENTO, 2005):

1. *Oscillatoria* e *Planktothrix* – Ambas freqüentemente dominam o plâncton nas lagoas de maturação. Também ocorrem nas lagoas facultativas com baixa taxa de aplicação superficial. Têm hábitos planctônicos e perifíticos, ficando aderidas em chicanas ou outras partes submersas da lagoa;
2. *Microcystis* – Freqüentes em lagoas com baixa turbulência e elevada concentração de DBO;
3. *Merismopedia* – Presentes em águas com baixa turbulência, elevada turbidez e alta concentração de DBO;
4. *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Spirulina*, *Phormidium*, *Anabaena* e *Lyngbya* são espécies já relatadas em lagoas de estabilização na literatura científica.

Peinador (1999) estudou dois rios receptores de águas tratadas em sistemas de lagoas de estabilização nas cidades de Cañas e de Libéria, na Costa Rica. Realizou coletas em quatro pontos de amostragem (montante 40 metros da lagoa de estabilização, na lagoa de estabilização, em seu ponto de descarga no rio e 100 metros a jusante da lagoa) durante cinco anos e meio. Na cidade de Cañas, os gêneros encontrados na lagoa de estabilização e descarga no rio foram: *Anabaena* sp., *Aphanocapsa* sp., *Chroococcus* sp., *Gloeocapsa* sp., *Leptolyngbya* sp., *Limnothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Planktothrix* sp., *Porphyrosiphon* sp., *Pseudanabaena* sp. e *Synechocystis* sp. Na cidade de Libéria, os gêneros encontrados na lagoa de estabilização e descarga no rio foram: *Aphanocapsa* sp., *Aphanothece* sp., *Chroococcus* sp., *Cyanodictyon* sp., *Gloeocapsa* sp.,

Leptolyngbya sp., *Limnothrix* sp., *Lyngbya* sp., *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Planktolyngbya* sp., *Planktothrix* sp. e *Pseudanabaena* sp. O autor conclui que em ambas as cidades, na lagoa de estabilização, a cianobactéria predominante em 25 de 28 amostragens foi do gênero *Phormidium* sp., além de aumento na frequência de cianobactérias em lugares com maior contaminação. Contudo, neste estudo, o autor apenas menciona os gêneros encontrados, mas sem a descrição pormenorizada das amostras.

Em Marrakech, Marrocos, o sistema de lagoas de estabilização foi amplamente estudado. Esse sistema é composto por duas lagoas ovais interligadas em série e recebem uma parte do esgoto municipal. A primeira lagoa é anaeróbia, profundidade de 2,3 m e a segunda é facultativa, profundidade 1,5 m. O fluxo é mantido em 5,4 L/s, com tempo de detenção hidráulico (TDH) total em torno de 18 dias (10,5 dias na primeira lagoa e 7,5 dias na segunda). Oufdou et al. (2000) determinaram a relação entre bactérias e cianobactérias neste sistema, estudando duas culturas axênicas dos gêneros *Synechocystis* sp. e *Pseudanabaena* sp. isoladas da lagoa facultativa, concluindo que estas cianobactérias estimulam o crescimento e a sobrevivência de bactérias heterotróficas. Oudra et al. (2000) estudaram o potencial tóxico de *Synechocystis* sp. desse mesmo sistema de lagoas de estabilização de Marrakech, tendo como resultado que a floração tóxica desse gênero ocorreu neste sistema, podendo gerar o comprometimento do tratamento por sua repercussão no zooplâncton, nas bactérias e nas algas presentes. Oudra et al. (2002) detectaram e quantificaram microcistinas de linhagens de cianobactéria desse mesmo sistema de lagoas de estabilização, com presença de *Synechocystis* sp. e *Pseudanabaena galeata* e toxicidade de 150-350 LD₅₀-mg/kg avaliado em bioensaios com ratos, 15-56,0 µg/g por ELISA e 842,5 µg/g por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* – HPLC) para duas linhagens de *Synechocystis* sp. e 57 µg/g por HPLC para *Pseudanabaena galeata*.

Vasconcelos e Pereira (2001) verificaram a presença de microcistina hepatotóxica em concentrações que variaram no ano entre 2,3 µg/L a 56 µg/L no efluente final de uma série de lagoas em Esmorin, no norte de Portugal. Essas lagoas são compostas por dois conjuntos formados de lagoas anaeróbia, facultativas e de maturação, com área de 12 ha, projetadas para receberem

fluxo máximo de efluente de 3.200 m³/dia e carga orgânica máxima de 1.285 Kg DBO₅/dia, podendo atender a uma população de 25.000 habitantes. As espécies encontradas no efluente foram *Planktothrix mougeotti*, *Microcystis aeruginosa* e *Pseudanabaena mucicola* em densidade máxima de 2,7 x 10⁶ células/mL e a toxicidade foi atribuída a *Microcystis aeruginosa*.

Na Austrália, Hamilton et al. (2005) estudaram um sistema de lagoas de estabilização em Melbourne constituído de cento e quarenta e cinco lagoas, TDH de 9 dias para cada uma, sem dados de profundidade das mesmas, mas estimadas pelos autores como de 80-90 cm cada. Estudaram cinco séries de sete lagoas, nas quais não foram observadas florações de cianobactérias.

Cruz et al. (2003) analisaram três sistemas de lagoas de estabilização em Vitória, Espírito Santo, sendo dois deles primários (profundidade das lagoas facultativas de 1,6 e 1,11 m, área útil de 17,69 e 13,479 m², vazão média 22,0 e 4,4 L/s, TDH 17,9 e 39,4 dias, respectivamente) e o terceiro um sistema australiano (profundidade da lagoa anaeróbia de 2,02 e facultativa de 1,5 m, área útil 3,346 m², vazão média 1,81 L/s, TDH 32,1 dias). Os gêneros encontrados foram *Merismopedia* sp., *Microcystis* sp. e *Oscillatoria* sp. Análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas, com resultado negativo nas águas da lagoa, mas positivo nos efluentes de uma lagoa primária (0,49 µg/L) e no sistema australiano (média de 227 µg/L), não atendendo ao permitido por lei pelo Ministério da Saúde.

Em Porto Alegre, Maizonave et al. (2005) verificaram a presença da cianobactéria *Sphaerocavum brasiliense*, recentemente descrita a partir de populações de reservatórios eutróficos de São Paulo (SP) na comunidade planctônica das lagoas de maturação da Estação de Tratamento de Esgoto Lami. A espécie foi acompanhada de outras cianobactérias, dentre as quais estava *Cylindrospermopsis raciborskii*, constituindo-se no primeiro registro da espécie *Sphaerocavum brasiliense* no estado do Rio Grande do Sul.

Furtado (2003) analisou a lagoa facultativa de um sistema australiano no município de São Lourenço da Serra, SP, com 106,34 Kg DBO/hab., vazão de 4.293,21 m³.d⁻¹ e TDH de 21 dias. Encontrou floração de cianobactérias nesse local, predominando as espécies *Microcystis aeruginosa* e *Radiocystis fernandoi* (anteriormente descrita como *Microcystis flos-aquae*), as quais apresentaram potencial tóxico em estudos posteriores.

Distintos sistemas de lagoas de estabilização foram objetos de pesquisa em quatro universidades para avaliação dessa técnica de tratamento, inseridos no Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB). A USP trabalhou em uma lagoa em escala real em Lins (SP), a UFES em sistema piloto de reator anaeróbio compartimentado + lagoa de polimento, UFPE sistema de reator UASB + lagoas de polimento em escala piloto e UFV em lagoas em série em escala piloto. O sistema australiano de Lins registrou incapacidade para o atendimento ao padrão de emissão de nitrogênio amoniacal, além de apresentar coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* na ordem de 10^6 e 10^5 org/100mL, respectivamente. As lagoas avaliadas na UFES e UFPE obtiveram resultados semelhantes, exceção à ausência de ovos de helmintos ou atendimento para irrigação. Já o sistema avaliado pela UFV enquadrou-se nos padrões exigidos. Concluem em relação aos padrões de qualidade da água do corpo receptor que podem ser previstas dificuldades para a descarga em águas de qualidade mais restritivas, principalmente em termos de fósforo e clorofila *a* (CHERNICHARO et al., 2006). Segundo esses autores, a qualidade média do efluente e eficiência média de remoção para lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações médias efluentes e eficiências típicas de remoção dos principais poluentes de interesse nos esgotos domésticos por lagoa anaeróbia seguida de lagoa facultativa.

	DBO ₅	DQO	SS	Amônia-N	N total	P total	CTer	Ovos Helm.
Qualidade								
média do efluente	50-80 (mg/L)	120-200 (mg/L)	60-90 (mg/L)	>15 (mg/L)	>20 (mg/L)	>4 (mg/L)	10^6 - 10^7 (NMP/100 mL)	<1 (ovo/L)
Eficiência								
média de remoção	75-85 (%)	65-80 (%)	70-80 (%)	<50 (%)	<60 (%)	<35 (%)	1-2 (unid. log)	

Este mesmo sistema de lagoas de estabilização do município de Cajati, objeto de estudo dessa tese, foi avaliado em função de seu funcionamento em diferentes épocas do ano. Como não há monitoramento de vazão na ETE, uma estimativa foi realizada com dados de 2005, observando-se que a vazão ficou

abaixo daquela projetada para o sistema ($54,18 \text{ L.s}^{-1}$). A carga orgânica obtida foi abaixo da calculada no projeto para esse sistema, o que pode ter interferido no seu desempenho. Além disso, TDH foi maior do que o calculado em projeto, tornando a lagoa anaeróbia em facultativa e a facultativa apresentando 49,5 dias de TDH. A DBO esteve abaixo em todos os períodos analisados, com dados muito abaixo dos descritos na literatura. A eficiência de redução do sistema de tratamento foi maior em abril de 2005 do que outubro de 2004 (46,9 e 43,8%, respectivamente), mas na lagoa facultativa, devido à presença de matéria orgânica e organismos fitoplanctônicos, não foi observada redução de DQO. As cianobactérias foram dominantes em todas as estações na lagoa facultativa (MIWA, 2007). As maiores remoções de sulfato, matéria orgânica e fósforo total na lagoa facultativa foram verificadas em abril de 2005, tendo como consequência maior diversidade dos diferentes microrganismos avaliados (AGUILA, 2007).

2.2 As Cianotoxinas

O estado dos corpos d'água caracterizado como eutrófico, isto é, com excesso de nutrientes, como o fósforo e o nitrogênio, por exemplo, é uma das causas de proliferações acentuadas de cianobactérias, conhecidas como florações ou *blooms*. Dependendo das espécies presentes nessas florações, e se suas linhagens são tóxicas, pode ocorrer produção de toxinas, as quais estarão presentes no meio aquático, afetando desta maneira a biota e vindo a causar problemas de saúde na população humana (FURTADO, 2003).

As cianobactérias em florações podem degradar a qualidade da água de várias maneiras. A biomassa elevada como resultado pode contribuir para problemas estéticos com a formação de espuma e baixa transparência. Durante sua decomposição, a desoxigenação é observada, afetando os animais aquáticos. E o efeito considerado mais sério é a possibilidade de produção de toxinas por estes organismos (TARKZINSKA et al., 2001).

A contaminação de recursos hídricos e de abastecimento de água por excretas humanas permanece o maior desafio na saúde humana. Mesmo com a eutrofização tendo sido reconhecida como problema desde 1950, as toxinas

de cianobactérias somente atualmente foram identificadas como conseqüência desse processo (BARTRAM et al., 1999).

Um artigo na revista *Nature*, em 1878, foi considerado como o primeiro registro documentado de envenenamento por cianotoxinas em animais, causado por uma floração de *Nodularia* sp. (DOW e SWOBODA, 2000).

O primeiro registro em saúde pública com cianobactérias ocorreu em um caso de gastroenterite afetando a população que consumia água de uma fonte comum, ocorrida no Rio Ohio, em 1931. Um estudo epidemiológico mais recente, na cidade de Haimen, China, encontrou correlação direta entre a incidência de câncer primário no fígado e o uso de água para consumo, provindas de lagoas e tanques, sendo encontradas microcistinas nestes locais. Na Austrália, na Ilha Palm, 140 pessoas foram afetadas, principalmente crianças, depois que floração de cianobactérias foi tratada com sulfato de cobre, causando vômitos, doenças hepáticas e disfunção dos rins, sendo o organismo causador identificado como *Cylindrospermopsis raciborskii* (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM USA, 2003).

Eventos de florações de cianobactérias foram freqüentes em locais de abastecimento de água no Brasil. Em fevereiro de 1996, no centro de hemodiálise de Caruaru – Pernambuco, ocorreu sintomas de intoxicação em 110 pacientes após tratamento de rotina, relatados como hepatotóxicos, atribuídas à chamada “Síndrome de Caruaru” (LAGOS et al., 1999). De 17 a 26 de maio de 1996, 116 dos 130 pacientes (89%) após o tratamento no centro de hemodiálise tiveram distúrbios visuais, náuseas e vômitos (KOMÁREK et al., 2001). Nas primeiras duas semanas após o episódio, 23 pacientes haviam falecido com sintomas neurológicos ou de falência do fígado (HAIDER et al., 2003). O sangue desses pacientes foi analisado por HPLC, sendo que todos os expostos foram positivos para microcistina (KUIPER-GOODMAN et al., 1999). Análise do fitoplâncton do Reservatório de Tabocas, o qual abastece a região de Caruaru, demonstrou que o principal grupo presente, em março de 1996, era de cianobactéria (99% da densidade total) (CARMICHAEL et al., 2001). Os números de pacientes atendidos e do resultado fatal variam de acordo com a fonte, mas o fato relevante é que essas mortes foram resultado de efeitos de toxinas produzidas por cianobactérias.

Na região de Paulo Afonso, na Bahia, após a construção do reservatório de Itaparica em 1988, ocorreram 2.000 casos de gastroenterite, sendo que 88 resultaram em mortes. Amostras de sangue e fezes dos pacientes indicaram presença de toxinas produzidas por cianobactéria. Os gêneros *Anabaena* sp. e *Microcystis* sp. estiveram presentes na água bruta numa concentração de 1.104 a 9.755 colônias por mL (DEBERT, 2002).

Os dois eventos mais letais mundiais com toxinas atribuídos as cianobactérias ocorreram no Brasil, conforme descritos acima: o caso do reservatório de Itaparica em 1988 e o de Caruaru, no centro de hemodiálise (HAIDER et al., 2003).

As cianobactérias têm demonstrado serem produtoras de ampla variedade de compostos tóxicos (BAKER et al., 2002). Em todo o mundo, cerca de 60% de todas as amostras de cianobactérias investigadas demonstraram conter toxinas (WHO, 1998).

A produção de metabólitos bioativos como os alcalóides neurotóxicos (anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas), alcalóides hepatotóxicos (cilindrospermopsinas) e peptídeos cíclicos hepatotóxicos (microcistinas, nodularinas) causam impactos no aspecto social, econômico e ambiental através de florações de cianobactérias (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM USA, 2003).

Segundo Wilson et al. (2000), as hepatotoxinas podem causar danos ao fígado, as neurotoxinas afetam os nervos, as citotoxinas atuam nas células, algumas toxinas causam reações alérgicas, além da cilindrospermopsina, que causa danos ao fígado (semelhantes aos sintomas de hepatite).

Programas regionais e nacionais de amostragem de cianobactérias e análises de sua toxicidade começaram a acontecer em vários países, principalmente depois de danos associados à saúde humana. A alta incidência de detecção de toxinas associada com programas de monitoramento, além do reconhecimento de problemas em saúde em animais e humanos, aumentou a necessidade de se desenvolver políticas de redução das populações de cianobactérias e diminuir o risco de exposição a estas toxinas (CODD, 2000). Os humanos são mais expostos a microcistinas através de consumo de água contaminada ou atividades recreacionais, como a natação (McELHINEY e LAWTON, 2005). Durante a fase de crescimento, a produção de cianotoxinas

ocorre dentro das células e a maior proporção destas permanece nesse espaço intracelular, cerca de 90%, até a decomposição dos microrganismos, quando a toxina é liberada para o meio. Nesse momento aumenta a probabilidade de danos associados à saúde caso ocorra contato com essa toxina liberada.

As cianotoxinas estão divididas em três grandes grupos de estruturas químicas: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolisacarídeos (LPS), conforme descrito na Tabela 3 (SIVONEN e JONES, 1999).

Tabela 3 – Características gerais das cianotoxinas (SIVONEN e JONES, 1999).

GRUPO DE TOXINA	ÓRGÃO ALVO PRELIMINAR	GÊNERO ¹ DE CIANOBACTÉRIA
NOS MAMÍFEROS		
Peptídeos cíclicos		
Microcistinas	Fígado	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis</i>
Nodularina	Fígado	<i>Nodularia</i>
Alcalóides		
Anatoxina-a	Sinapse do nervo	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
Anatoxina-a(S)	Sinapse do nervo	<i>Anabaena</i>
Aplisiatoxinas	Pele	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Cilindrospermopsinas	Fígado ²	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Lyngbyatoxina-a	Pele, intervalo gastro-intestinal	<i>Lyngbya</i>
Saxitoxinas	Sinapse do nervo	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
Lipopolisacarídeos (LPS)	Irritante potencial; afeta todo o tecido exposto	Todas

1. Não produzido por todas as espécies do gênero em particular

2. Células inteiras de espécies tóxicas causam os danos difundidos do tecido, incluindo os danos ao rim e ao tecido linfóide.

A estrutura geral da microcistina está na Figura 1 e da nodularina na Figura 2.

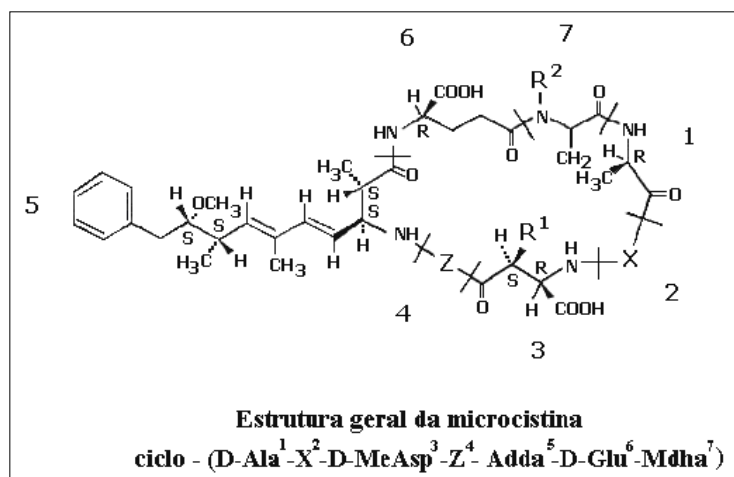


Figura 1 – Estrutura geral da microcistina (SIVONEN et al., 1992).

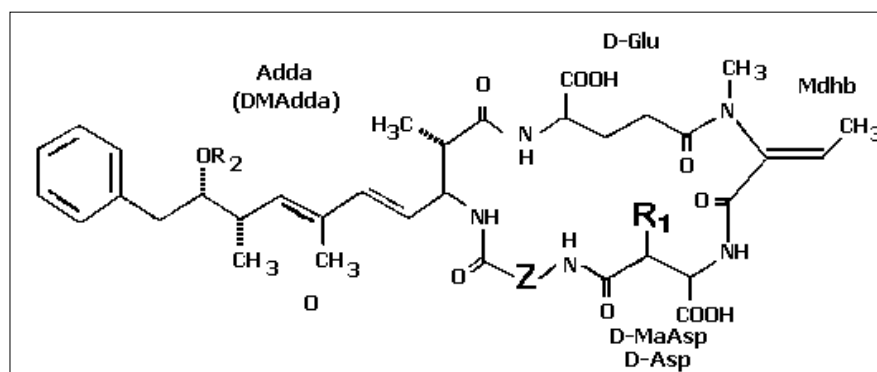


Figura 2 – Estrutura geral da nodularina (SIVONEN e JONES, 1999).

Organismos responsáveis pela produção de cianotoxinas incluem 40 gêneros estimados, mas os principais são *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (*Planktothrix*) (LI et al., 2001).

A toxicidade de florações de cianobactérias pode apresentar uma variação temporal, desde intervalos de tempo curtos, sazonais e até espaciais. Casos de ocorrência de florações tóxicas ocorreram em todos os continentes, mas observa-se uma grande dominância de relatos em países do hemisfério norte, pelo maior interesse e investimentos em pesquisas sobre o potencial tóxico das cianobactérias. No Brasil, 82% das linhagens isoladas no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro se mostraram tóxicas com testes de bioensaios ou análises químicas, com 9,7% sendo neurotóxicas enquanto as demais hepatotóxicas (FUNASA, 2003). Dentre essas linhagens na Universidade Federal do Rio de Janeiro, os principais gêneros já isolados são *Microcystis* sp. (51,6%), *Cylindrospermopsis* sp. (9,7%), *Synechocystis* sp. (6,5%),

Leptolyngbya sp. (6,5%) e *Synechococcus* sp. (3,2%), além do Picoplâncton (incluídas em um único grupo devido a dificuldades de identificação) (22,6%).

Já na Alemanha os dois gêneros tóxicos mais freqüentes são *Microcystis* sp. e *Planktothrix* sp., com amostras de campo desses gêneros tóxicos sempre contendo microcistina, mas *Planktothrix* sp. usualmente com maior concentração de microcistina do que *Microcystis* sp. As neurotoxinas investigadas foram raramente detectadas e, quando o foram, em pequenas concentrações (CHORUS, 2002).

Estes compostos tóxicos foram isolados pela primeira vez da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e por isso suas toxinas foram nomeadas de microcistinas. Em torno de 60 variantes das estruturas de microcistina foram caracterizadas de amostras de florações e linhagens isoladas. Foi identificada uma estrutura muito similar a microcistina na *Nodularia spumigena*, chamada de nodularina, a qual tem mesmo tipo de atuação e ocorre como pentapeptídeo cíclico (SIVONEN e JONES, 1999).

As microcistinas foram descritas como produzidas pelos gêneros planctônicos *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc* e *Anabaenopsis* e terrestre *Hapalosiphon* e a nodularina somente por *Nodularia spumigena* (SIVONEN e JONES, 1999).

Duas espécies de cianobactérias envolvidas em vários casos reportados como causa de morte em animais são *Microcystis aeruginosa* e *Nodularia spumigena*. Os três gêneros considerados mais tóxicos são *Microcystis* sp., *Nodularia* sp. e *Oscillatoria* sp. A maioria dos gêneros de cianobactérias produz mais do que um tipo de toxinas (HAIDER et al., 2003).

Relatos anteriores apontavam para 12 espécies pertencentes a 9 gêneros como responsáveis pelos casos ocorridos de intoxicação em animais por cianobactérias, mas as mais citadas foram *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae* e *Aphanizomenon flos-aquae* no Canadá, Estados Unidos da América, América do Sul, Europa, Ásia, África do Sul e Austrália (CARMICHAEL e BENT, 1981).

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por W.W. Carmichael, levando-se em conta as variações qualitativas observadas em seus dois L-aminoácidos, por exemplo, microcistina-LR (leucina-arginina), mas atualmente

leva-se também em conta o grau de metilação dos aminoácidos, bem como variáveis isométricas no aminoácido Adda (FUNASA, 2003).

Em 1972, Carol S. Huber e Oliver E. Edward determinaram a estrutura química da toxina de cianobactéria pela primeira vez derivada de *Aphanizomenon flos-aquae* e a denominaram anatoxina a (HAIDER et al., 2003).

As microcistinas e nodularinas são as cianotoxinas mais freqüentes no mundo. Em ensaios com camundongos, os quais são utilizados para detectar toxicidade de amostras de campo e de laboratório, cianotoxinas hepatotóxicas (toxinas do fígado) causam morte por hemorragia do fígado em algumas poucas horas em doses agudas (SIVONEN e JONES, 1999).

A diversidade estrutural dos oligopeptídeos de cianobactérias somente sugere a grande diversidade de vias biossintéticas e seus respectivos genes. Peptídeo sintetase aparenta ser parte essencial da evolução e fisiologia desses organismos. As principais classes desses peptídeos produzidos com base na estrutura molecular são apresentadas na Tabela 4 abaixo (WELKER e DÖHREN, 2006).

Tabela 4 – Principais classes de peptídeos de cianobactérias (WELKER e DÖHREN, 2006).

CLASSE	SINÔNIMOS	ORIGEM
Aeruginosinas	microcina e espumigina	<i>Microcystis, Planktothrix e Nodularia</i>
Microgininas	cianostatina, oscilaginina e nostoginina	<i>Microcystis, Planktothrix e Nostoc</i>
Anabaenopeptinas	Oscilamida, ácido ferintóico, nodulapeptina, plectamida e schizopeptina	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis, Planktothrix, Plectonema, Nodularia e Schizothrix</i>
Cianopeptolinas	Aeruginopeptina, anabaenopeptilida, hofmannolina, microcistilida, micropeptina, nostociclina, nostopeptina, oscilapeptilida, oscilapeptina, plaktopeptina, scipolina, somamida, simplostatina, tasipeptina	<i>Anabaena, Lyngbya, Microcystis, Planktothrix, Scytonema e Symploca</i>
Microcistinas	Nodularina	<i>Anabaena, Hapalosiphon, Microcystis, Nodularia, Nostos, Planktothrix</i>
Microvidirinas		<i>Microcystis, Planktothrix e Nostoc</i>
Ciclamideas	Aaniasciclamida, dendroamida, microciclamida, nostociclamida, raociclamida, tenueciclamida, ulongamida e westielamida	<i>Lyngbya, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Stigonema e Westelliopsis</i>

As hepatotoxinas apresentam ação mais lenta se comparada com as neurotoxinas, podendo causar a morte num intervalo de poucas horas a poucos dias, mas são as mais comuns em intoxicação envolvendo cianobactérias (FUNASA, 2003).

As hepatotoxinas variam de compostos extremamente tóxicos, como microcistina-LR (D.L.₅₀=50 µg.kg⁻¹ peso corpóreo em rato, injeção intraperitoneal) e a nodularina (D.L.₅₀=30 µg.kg⁻¹ peso corpóreo em rato, injeção intraperitoneal) até a formas não tóxicas de microcistinas, tendo como sinais de intoxicação em mamíferos a diarreia, vômitos, calafrios, fraqueza e extrema palidez (BRIAND et al., 2003).

A toxicidade da microcistina e nodularina em mamíferos ocorre através de sua forte ligação com enzimas celulares chamadas de fosfatases. Estas

cianotoxinas adotaram uma “forma” química que é similar a estas enzimas (SIVONEN e JONES, 1999).

Codd et al. (2005) publicaram dados sobre as fontes de toxinas de cianobactérias e suas toxicidades agudas e, através de ensaios em camundongos, obtiveram dados onde demonstraram que estas diferentes fontes apresentaram resultados diferentes também em sua toxicidade. Gêneros de cianobactérias em populações naturais apresentaram resultados para anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxina, microcistina, nodularina e cilindrospermopsina, com 23 gêneros tóxicos, assim como as monoculturas de cianobactérias, mas não axênicas, com 19 gêneros. Quando analisadas em monoculturas e axênicas, isto é, livres de outras bactérias, apenas 5 gêneros apresentaram toxicidade, para somente anatoxina-a, microcistina e nodularina, concluindo que não se pode excluir a possibilidade de essa associação com bactérias heterotróficas exercer um papel na produção de toxinas.

Não se sabe ao certo se a produção de cianotoxinas é induzida por fatores físico-químicos, como a luz (KAEBERNICK et al., 2000; WIEDNER et al., 2003) ou se está também relacionada ao processo de crescimento seletivo de cianobactérias (HU et al., 2004).

Por ser ainda desconhecido o que desencadeia a produção de cianotoxinas em uma floração tóxica, vários estudos continuam sendo gerados, tanto fisiológicos como bioquímicos, pois, algumas vezes, as espécies presentes no ambiente e em cultura possuem o gene para a toxina, mas não a estão expressando.

Fischer et al. (2005) identificaram o polipeptídeo transportador de ânion orgânico (Oatp1b2, OATP1A2, OATP1B1 e OATP1B3) como transportadores de microcistina-LR em camundongos e humanos, explicando a toxicidade preferencial orgânica de microcistinas no fígado e no cérebro, indicando que uma opção terapêutica, quando ocorrer danos ao fígado ou neurotóxicos por pacientes intoxicados por microcistina é a utilização de co-substratos com alta afinidade a OATP1A2, OATP1B1 e OATP1B3.

Em 2005, Paul Alan Cox et al. descobriram uma nova neurotoxina produzida por cianobactérias, a BMAA (β -N-metilamino-L-alanina). Pesquisas realizadas com várias espécies em 2005 demonstraram que, ao contrário do

que se supunha, esta nova toxina pode ser produzida por praticamente todos os gêneros de cianobactérias conhecidos, incluindo as simbióticas e as de vida-livre, indicando potencial de exposição humana de largo alcance. Estudos com determinadas populações da Ilha de Guam, inicialmente, indicaram que humanos com a doença de esclerose lateral amiotrófica/complexo de mal de Parkinson–demência (*amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism–dementia complex*) apresentaram nos tecidos do cérebro esta toxina.

2.3 Identificação Molecular de Cianobactérias

Woese et al. (1990) nos ensinaram que seqüências moleculares podem revelar relações evolucionárias de maneira e extensão que critérios clássicos fenotípicos, e mesmo funções moleculares, não o podem. Somente na estrutura molecular pode ser visto como o mundo vivo se divide em três grupos primários distintos. Para cada sistema molecular bem caracterizado existem características de eubacteria, archeobacteria e eucariotos (Bacteria, Archaea e Eucaria), o qual todos os membros de cada grupo dividem entre si.

Estudos de filogenia molecular, utilizando o gene que codifica para o RNA da subunidade pequena do ribossomo (SSU DNAr, também chamada de 16S nos procariontes e 18S nos eucariontes), transformaram a dicotomia eucarioto/procarionte em um sistema de três domínios: Bacteria, Archaea e Eucaria (OLIVEIRA e MENCK, 2001).

Macromoléculas, ácidos nucléicos e proteínas são cópias ou traduções da informação genética e por isso devem ser consideradas como as melhores ferramentas para inferir relações filogenéticas, pois DNAr 16S são moléculas universais, possuem função essencial para a vida da célula, são altamente conservadas na estrutura secundária e são moléculas longas (WILMOTTE, 1994). A organização do *operon* do RNA ribossômico encontra-se na Figura 3 (retirado de LORENZI, 2004).

Comparação de padrões de fragmentos restritos depois de digestão com enzimas de PCR para os genes DNAr 16S apresenta-se como ferramenta útil em estudos de filogenia entre espécies próximas relacionadas, porque apresentam padrões claros distinguíveis de restrição, além de ser útil também para estudos

em mudanças de composição de comunidades microbianas em ecossistemas complexos (RAMÍREZ-MORENO et al., 2003).

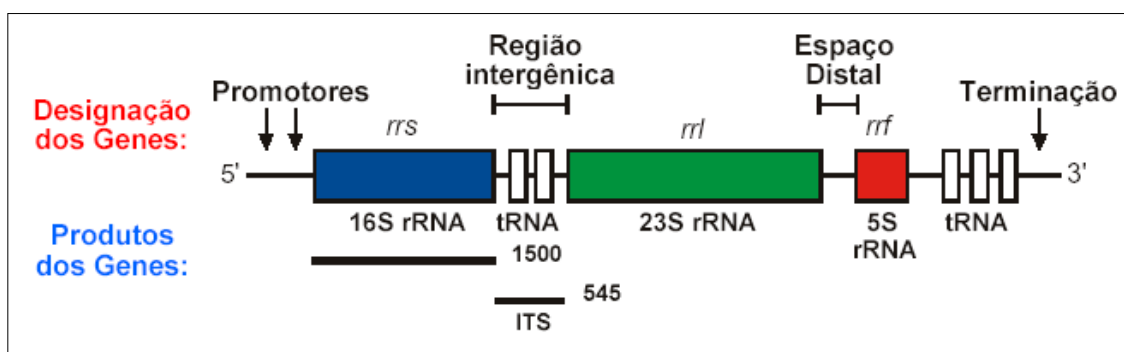


Figura 3 – Organização do operon do RNA ribossômico.

Lyra et al. (1997) utilizaram padrões de PCR/RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, Polimorfismo nos fragmentos de restrição do DNA) do gene DNAr 16S para diferenciar linhagens filamentosas e planctônicas tóxicas e não tóxicas. O RFLP analisado com as linhagens de referência apresentou distâncias genéticas similares, concluindo que este método providencia de uma maneira rápida o agrupamento de isolados e a comparação entre eles.

Lorenzi (2004) estudou alguns locais das represas Billings e Guarapiranga. Realizou a diferenciação entre as cianobactérias através de RFLP e/ou seqüenciamento dos produtos de PCR. O RFLP foi realizado com 99 *amplicons* do DNAr 16S, os quais foram digeridos com a enzima de restrição *Hae* III e para ficocianina foram selecionados 84 *amplicons*, os quais foram digeridos com a enzima de restrição *Alu* I. A mini-biblioteca construída com os *amplicons* de DNAr 16S obtidos usando os iniciadores 27F1/1494Rc produziu seqüências de outro grupo de bactéria (Actinobacteria), indicando a inespecificidade desses iniciadores para estas amostras. Entretanto, na mini-biblioteca construída com os *amplicons* de *cpcBA* obtidos usando os iniciadores PCβF/PCαR, somente seqüências de cianobactérias foram geradas. Nessa mini-biblioteca foram identificadas várias linhagens de *Microcystis aeruginosa* (98-100% de idendidades) e também de *Anabaena* (89% de identidade).

A análise de seqüências da região espaçadora intergênica do operon de ficocianina (*cpcBA*) (Figura 4) é um marcador específico genético para

cianobactérias. Usualmente, o comprimento de produto de PCR que recobre os genes de ficocianina (subunidades α e β) possui em torno de 650 pares de bases. O uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cianobactérias para regiões como o *operon* para ficocianina (a maior proteína acessória na fotossíntese II), através de sua região espaçadora intergênica altamente polimórfica, fornece ferramenta para discriminar e identificar cianobactérias (POMATI et al., 2000).

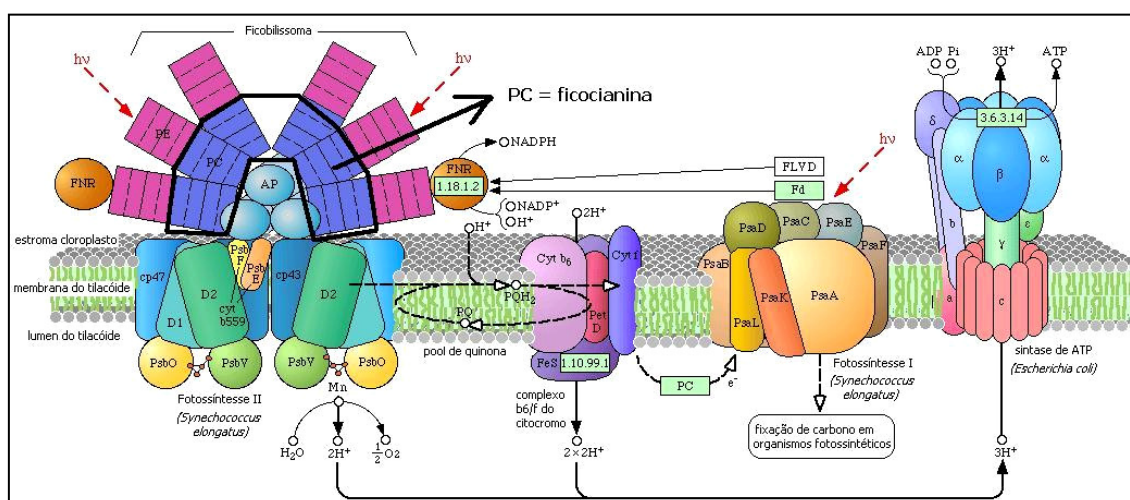


Figura 4 – Aparato fotossintético, com destaque para a região de ficocianina (PC). Fonte: Kyoto *Encyclopedia of Genes and Genomes*.

Estudos têm demonstrado que a seqüência da região espaçadora intergênica (IGS) entre β e α das sub-unidades ORFs (*cpcBA*), os quais decodificam ficocianinas *b* e *a*, respectivamente, podem ser usados para diferenciar espécies de cianobactérias (BAKER et al., 2001). Tem-se na Figura 5 a representação esquemática do *operon* de ficocianina, com seus espaços intergênicos entre os genes, sendo as setas indicativas da posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores das sub-unidades β ($PC\beta F$) e α ($PC\alpha R$) (NEILAN, JACOBS e GOODMAN, 1995).

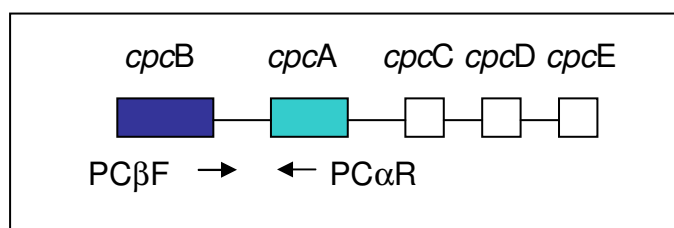


Figura 5 – Representação esquemática do operon PC – setas indicativas da posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores das sub-unidades β ($PC\beta F$) e α ($PC\alpha R$).

Estudos realizados por Baker et al. (2001) com PCR amplificando a região *cpcBA* obtiveram sempre sucesso para as espécies tóxicas mais comuns de cianobactérias que ocorrem na Austrália, sendo que freqüentemente as florações não são mono-específicas e contêm dois ou mais ecotipos de cianobactérias. Nesse trabalho, quando examinadas as regiões *cpcBA* em culturas de referência e amostras ambientais, estes autores descobriram que o comprimento desta região é altamente conservado dentro de um gênero.

2.4 Genes Envolvidos na Biossíntese de Metabólitos Secundários

As cianobactérias são capazes de produzir ampla variedade de metabólitos que não são utilizados no metabolismo primário, isto é, na divisão celular ou para produção de energia, por este motivo, classificado como metabólitos secundários. Dentre esses metabólitos secundários encontram-se as cianotoxinas, que são formadas por substâncias de estrutura peptídica, as quais são elaboradas por um mecanismo enzimático paralelo a sintetase protéica, conhecido como peptídeo sintetase não-ribossômica. Essa síntese não-ribossômica utiliza ampla variedade de substratos, muito dos quais são aminoácidos não-protéicos, hidroxíácidos e substâncias policetônicas, especialmente elaborados para serem incorporados na estrutura desses peptídeos. Na estrutura de cianobactérias observam-se, em uma mesma molécula, ligações peptídicas, funções cetônicas, insaturações e funções aromáticas (FIORE et al., 2005).

Os peptídeos cíclicos são pequenas moléculas com massa molecular variando entre 800 a 1000 Da. A maioria dos seus congêneres é hidrofílica e geralmente não é capaz de penetrar a membrana celular de um vertebrado e requer ser transportada via adenosina trifosfato. Por este motivo, a toxicidade da microcistina e da nodularina fica restrita aos órgãos dependentes do transporte orgânico de ânion em suas membranas celulares, como o fígado (HAIDER et al., 2003).

Investigações filogenéticas têm indicado uma ocorrência antiga e com ampla distribuição dos genes envolvidos na síntese não-ribossômica peptídica, incluindo a síntese de microcistina. A distribuição desta síntese em

cianobactérias existente aparenta ter acontecido por repetições de perdas de genes para a biossíntese de microcistina em linhagens derivadas mais recente desses organismos (COX et al., 2005).

Policetídeos sintase (PKS) e peptídeos sintetase não ribossomais (NRPS) são classes amplas de produtos naturais que se agrupam para uma simples acil-coenzima A ou monômero de aminoácido. As duas apresentam biossíntese por megassintase polifuncionais organizadas em unidades funcionais repetidas conhecidas como módulos, os quais têm a responsabilidade por um estágio ou alongamento da cadeia de policetídeo ou polipeptídeo. Dentro de cada módulo ocorrem domínios independentes, coordenados por proteínas responsáveis por alguma combinação de modificação de grupos característicos funcionais em cada ciclo do alongamento da cadeia. Cada módulo de PKS ou NRPS possui pelo menos um conjunto de três módulos mandatórios ou domínios centrais, dois dos quais são catalíticos e um age como transportador (CANE e WALSH, 1999). Peptídeos não ribossomais são biossintetizados por condensação seqüencial de monômeros de aminoácidos e os policetídeos são feitos de adições repetitivas de duas unidades de carbonos cetônicos derivados de tioésteres de acetato ou outro ácido carboxílico pequeno (ANSARI et al., 2004).

Os PKS podem ser divididos em três classes. PKS tipo I contém domínios de cetosintase (KS, alongação), acil transferase (AT, ativação do monômero) e acil proteína carreadora (ACP, carreador), necessariamente. Entre esses domínios, podem ocorrer domínios modificados de desidrase (DH), enoil redutase (ER) e cetoredutase (KR), dentre outros (NPBIOGENE, 2007), conforme Figura 6. PKS são enzimas multifuncionais, responsáveis por um ciclo de alongação da cadeia e são representativas em todas as cianobactérias. PKS tipo II são complexos cíclicos multienzimáticos, tipicamente envolvidos na biossíntese de antibióticos aromáticos de outras bactérias. PKS tipo III são enzimas homodiméricas de condensação responsáveis por uma variedade de flavonóides não usuais e compostos de chalcona (BARRIOS-LLERENA et al., 2007).

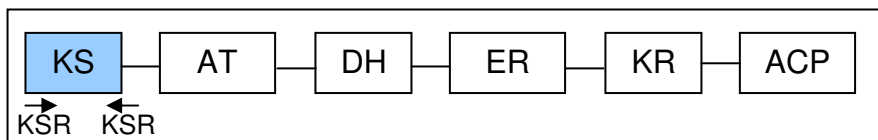


Figura 6 – Módulos pertencentes aos domínios de policetídeos e os oligonucleotídeos utilizados.

As linhagens tóxicas de cianobactéria contêm genes para síntese peptídica específica para a produção de microcistina, sendo demonstrado que as linhagens produtoras e as não produtoras de toxinas de *Microcystis aeruginosa* diferem em seus genomas, gerando, desta maneira, o desenvolvimento de alvos moleculares para a detecção de toxicidade das espécies capazes de produzirem microcistina (BAKER et al., 2001).

Mais de 70 formas estruturais de microcistina com vários graus de toxicidade foram identificadas (CODD et al., 2005). Esta toxina apresenta em sua estrutura NRPS e PKS e, recentemente, seus genes foram identificados e seqüenciados, apresentando 55 kbases em dez ORFs (quadros abertos de leitura – *Open Reading Frames*), formando o gene *mcyA-J* em *Microcystis* sp. (TILLET et al., 2000; KAEBERNICK et al., 2002).

O mecanismo de biossíntese de NRPS foi elucidado estudando-se a formação de drogas, tais como a penicilina, vancomicina e ciclosporina. Vários compostos bioativos de cianobactérias possuem PKS ou cadeias de ácidos graxos (DITTMANN et al., 2001).

Análise com *Microcystis aeruginosa* identificou este metabólito como um híbrido de NRPS/PKS (TILLET et al., 2000). O alinhamento dos genes para microcistina, *mcyA-J*, é transcrito como *mcyABC* e *mcyD-J*, de um promotor bi-direcional, situado entre *mcyA* e *mcyD* (Figura 7) (KAEBERNICK et al., 2002).

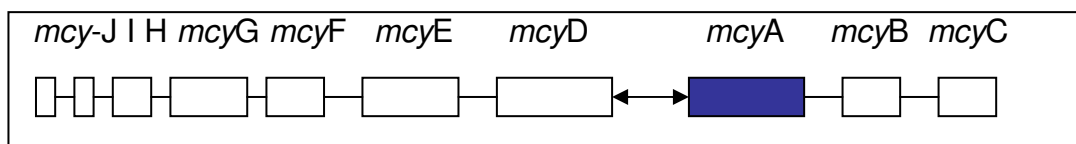


Figura 7 – Representação esquemática do operon *mcy A-J* em *Microcystis* sp.

Essas ORFs são flanqueadas em ambos os lados por genes que não estão envolvidos na biossíntese da toxina (*dna N* e *uma 1-6*) e apresentam alta

similaridade com genes localizados no cromossomo de *Synechocystis* sp. PCC6803 (LORENZI, 2004).

Das quarenta e oito reações seqüenciais envolvidas na biossíntese de microcistina, quarenta e cinco podem ser determinadas em domínios catalíticos dentro de seis grandes sintases/sintetases multienzimas (*mcyA-E,G*). *Mcy A-C* são três NRPS que contém cinco dos sete módulos necessários para a biossíntese da microcistina. *Mcy E* e *G* são enzimas híbridas, com módulos de NRPS/PKS. Policetídeos sintetase determinam as unidades de acetato ou propionato dentro das estruturas de policetídeos (DITTMANN e BÖRNER, 2005).

Kaebnick et al. (2000) demonstraram aumento na transcrição do gene para microcistina em NRPS e PKS como resultado da intensidade luminosa. A qualidade de luz de 16 e 400 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a uma intensidade constante por duas horas, no espectro vermelho, foi responsável por este efeito envolvendo os genes na biossíntese de microcistina durante todo o crescimento. Os níveis de transcritos foram reduzidos em algumas condições artificiais de estresse. Mas, pelo número de processos alterados pela luz, não puderam concluir que a luz é o fator único nestes resultados.

Um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores de PCR foi desenhado para amplificar a seqüência que codifica o domínio único de *N*-metiltransferase (NMT) do gene *mcyA*, conforme Figura 8 (TILLET et al., 2001). O domínio *N*-metiltransferase está envolvido na acilação do aminogruppo com um grupamento metila e está presente somente no *mcyA* (FIORE, 2005), tornando-o, desta maneira, um bom marcador molecular.

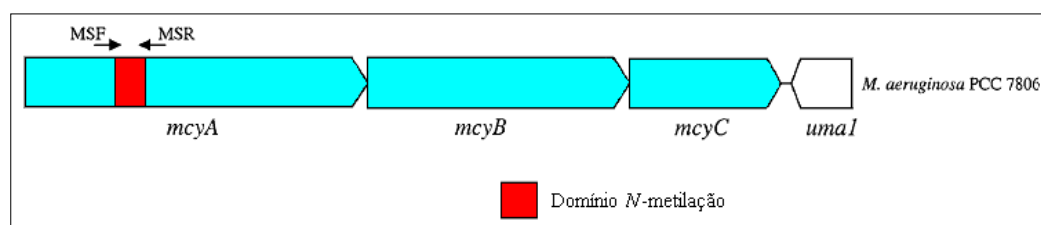


Figura 8 – Organização estrutural da microcistina sintetase nas regiões flancoadoras.

O agrupamento de genes para a biossíntese de microcistina já foi descrito em quatro espécies diferentes: *Microcystis aeruginosa* K-139 (NISHIZAWA et al., 2000) e *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (TILLET et al.,

2000), com *Planktothrix agardhii* CYA 126 (CHRISTIANSEN et al., 2003), *Anabaena* linhagem 90 (ROUHIAINEN et al., 2004) e *Nodularia* (MOFFITT e NEILAN, 2004), demonstrando claramente que muito ainda precisa ser compreendido, já que cada gênero apresenta suas características particulares.

Inicialmente, vários estudos utilizaram o agrupamento de genes para a microcistina sintetase (*mcy*) para identificação de linhagens tóxicas (JANSE et al., 2004). Estes autores encontraram correlação positiva da produção de microcistina com a presença do gene *mcyB*, *mcyA* ou domínios de adenilação, porém algumas anomalias foram encontradas. Atualmente, sabe-se que essa correlação positiva pode não ser válida. O agrupamento responsável pela biossíntese de microcistinas que já foi descrito para três gêneros (*Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena*) pode apresentar grande variação estrutural (número e ordem dos genes), de acordo com a figura 9 (DITTMANN e BÖRNER, 2005). Isso pode ser resultado da ocorrência de regiões homólogas aos genes *mcy* ou mesmo domínios de adenilação similares aos descritos para o *operon* da microcistina nas linhagens não tóxicas. Além disso, elementos de transposição já foram descritos na inativação dos agrupamentos de síntese de microcistina em *Planktothrix* (CHRISTIANSEN et al., 2006).

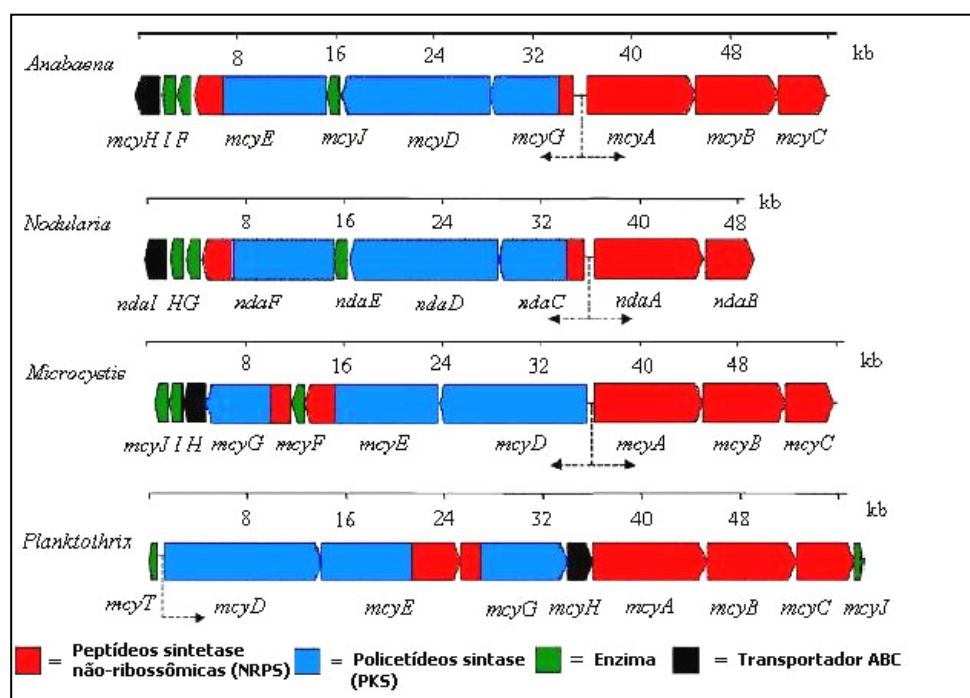


Figura 9 – O agrupamento de genes *mcy* para a biossíntese da microcistina em *Anabaena* (ROUHIAINEN et al., 2004), *Microcystis* (TILLET et al., 2000), *Planktothrix* (CHRISTIANSEN et al., 2003) e *nda* de nodularina para *Nodularia* (MOFFITT e NEILAN, 2004).

A região do *mcyB* possui alta similaridade com outros *loci* de NRPS, apresentando, desta maneira, discrepância nos resultados. Por isso, alguns estudos de detecção de toxicidade para microcistinas estão utilizando o domínio único da NMT, decodificado pela microcistina sintetase do gene *mcyA* (TILLET et al., 2001).

Lorenzi et al. (2007) desenvolveram uma metodologia utilizando PCR em Tempo Real duplex específico e quantitativo para análise do gene *mcyA* e ficocianina de amostras ambientais do gênero *Microcystis*. O número de células de *Microcystis* pode ser utilizado para inferir a proporção média dos genótipos de *mcy*. Esses autores avaliaram a metodologia em amostras coletada em Salto Grande-Americana-SP.

A via biossintética da cilindrospermopsina foi recentemente desvendada por Mihali et al. (2007). Essa toxina possui efeito neurotóxico, hepatotóxico e citotóxico. Esses autores analisaram seis espécies de distribuição global de *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon fos-aquae*, *Umezakia natans*, *Raphidiopsis curvata* e *Anabaena bergii*. Descobriram que cilindrospermopsina é um alcalóide derivado da via de policetídeos. O agrupamento de *Cylindrospermopsis raciborskii* AWT205 possui 43 Kb que decodificam todas as funções requeridas para sua biossíntese, regulação e para exportar essa toxina.

2.5 Métodos para Detecção de Metabólitos Secundários

Mais de 800 peptídeos ou metabólitos peptídicos de cianobactérias foram descritos para vários taxa. A ocorrência e estruturas de metabólitos secundários dentro das sub-seções têm sido estudadas. Mais de 80 tipos estruturais de compostos foram definidos, ocorrendo em mais de 30 gêneros em todas as cinco sub-seções. A maioria dos compostos foi isolada de Oscillatoriales e Nostocales, seguido por Chroococcales e Stigonematales e poucos metabólitos são conhecidos de Pleurocapsales. Porém, essa distribuição reflete a disponibilidade de linhagens e biomassa ao invés do potencial de cada gênero dentro das sub-seções (WELKER e DÖHREN, 2006).

Até recentemente, princípios tóxicos dominavam os estudos sobre atividades biológicas, embora a ecologia sugeriria que agentes antimicrobiais e

antivirais eram os compostos mais freqüentes isolados de cianobactérias (BURJA et al., 2001).

Os peptídeos cíclicos podem apresentar funções antibióticas ou imunossupressoras, gerando, desta maneira, interesse em estudá-los. A análise estrutural desses peptídeos tornou-se maior após a disponibilidade de métodos de ionização de desorção. A primeira notificação de análise de espectrometria de massa de peptídeos data da década de 60, com maiores estudos após a invenção de Massa por Bombardeamento Rápido de Átomos (FAB – *Fast Atom Bombardment*), depois modificado para espectrometria de massa líquida de íons secundários (LSIMS – *Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*), permitindo a aplicação de diferentes técnicas de espectrometria de massa em tandem (MS-MS), seguido de ionização por *electrospray* (ESI) (ECKART, 1994).

O espectrômetro de massa é um instrumento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (Figura 10). Permite determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. As fontes de ionização são *Electrospray* (ESI) e MALDI (*Matrix-Assited Laser Desporption Ionization*). Os analisadores de massa têm como função básica separar os íons formados de acordo com a relação m/z , tais como quadrupolos, íon-*traps* e tempo de vôo (TOF – *Time of Flight*), dentre outros, podendo ser acoplados entre si, dando origem a equipamentos denominados de híbridos (CANTÚ et al., no prelo). Exemplo de equipamento híbrido é o Q-TOF (quadrupolo com tempo de vôo, ESI MS/MS).

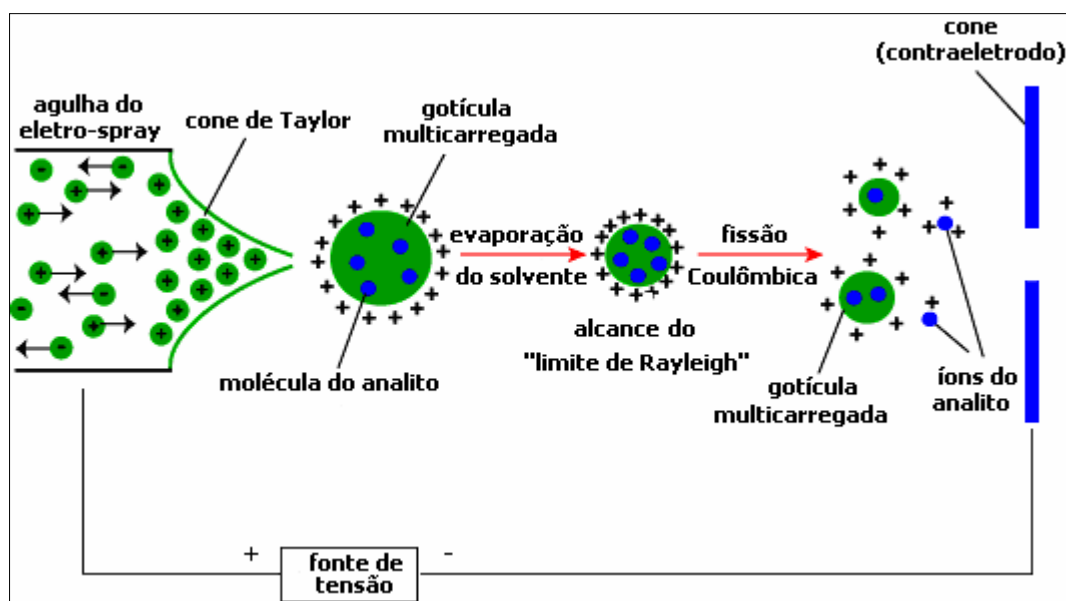


Figura 10 – Ionização por *electrospray*. Fonte: NERC Life Sciences Mass Spectrometry Facility (LSMSF) (2007).

A fissão Coulômbica ocorre porque a evaporação do solvente faz com que a repulsão eletrostática entre as espécies carregadas torne-se altíssima. Nesse mecanismo, sucessivas explosões coulômbicas ocorrem de modo que as gotículas contendo apenas um único íon são formadas. Dessa maneira, uma vez evaporado o solvente, o íon é transferido para a fase gasosa. Assim, a tensão superficial da gota é incapaz de sustentar tantas cargas (limite de Rayleigh), induzindo a transferência (expulsão) dos íons para a fase gasosa (CANTÚ et al., no prelo).

Estudos para detecção de anatoxina-a através de comparação de métodos de espectrometria de massas foram realizados com propósito de análises forenses em casos de suspeita de envenenamento neurotóxico (FUREI et al., 2005). Para tal fim, analisaram: LC fluorimétrica seguida de derivatização usando 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazola (NBD-F); MS múltiplo *tandem* usando íon-*trap* quadrupolo (LC-MS); híbrido MS quadrupolo com tempo de voo (Q-TOF) e metilação usando diazometano antes da determinação por LC-MS. O produto de íon esperado obtido com Q-TOF MS/MS foi altamente superior comparado àquele gerado em fragmentação de instrumento TOF de fase única. Esse resultado é conseqüência da alta especificidade da fragmentação que é alcançada através da seleção de poucos precursores de variação de m/z dos íons no quadrupolo. James et al. (2005)

analisaram seis variantes de anatoxina-a por Q-TOF híbrido e espectrômetro de massas quadrupolo íon-*trap*, obtendo padrões de fragmentação determinados complementares e confirmação das estruturas de íons principais e respectivas fórmulas, concluindo que as investigações forenses de suspeita de envenenamento por anatoxina foi facilitada por estudos com MS e sua posterior confirmação inequívoca através da presença de compostos naturais na amostra.

Amostras de água do Lago *Dried Meat* no Canadá foram coletadas e analisadas por LC-Q-TOF-MS com detector IDA (*Information-Dependent Acquisition*) para detecção de microcistina RR e LR. Nenhum pico para essa toxina foi encontrado e a obtenção de resultados precisos com quantidades menores de amostra em microgramas por litro quando comparada com outros métodos foi ressaltada como ponto positivo do método (ZHAO et al., 2006).

Análise de frações lipídicas de amostras complexas naturais foram caracterizadas por HPLC acoplado a espectrômetro de massas híbrido Q-TOF com o gênero *Spirulina platensis* por Herrero et al. em 2007. Obtiveram identificação direta de quatro ácidos graxos livres e nove lipídeos polares na matriz complexa analisada sem pré-tratamento da amostra, concluindo que esse tipo de análise para caracterização de componentes de atividades biológicas naturais é uma alternativa expressiva.

Outra abordagem para a detecção de compostos metabólicos secundários produzidos por cianobactéria pode ser desenvolvido através de testes de bioatividade. É amplamente estudada a habilidade de produção de compostos antifúngicos e antibacterianos em cianobactérias para possível desenvolvimento de compostos farmacológicos e na agricultura.

Metabólitos secundários bioativos devem ser vistos como resposta evolucionária à pressão exercida por organismos competidores, tais como fungos e *grazing* de outros animais (PICCARDI et al., 2000). Esses autores conduziram um estudo para potencial antibacteriano, antifúngico e de atividade citotóxica do gênero *Nostoc* em 50 linhagens de *habitats* diferentes, como em simbiose, no solo, plantação de arroz, água doce e marinha. A biomassa liofilizada foi extraída através de uma mistura de etanol:água (3:7, v:v) para obter extrato hidrofílico e então com diclorometano:isopropanol (1:1, v:v) para obter extrato lipofílico, secos e ressuspendidos em água ou etanol. A atividade

antifungal foi testada com *Rhizoctonia solani*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium roseum* e *Phoma* sp. em tubos de ensaio e a antibacteriana com *Agrobacterium vitis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermidis* em placas de petri, além de ensaios com *Artemia salina*. Vinte e oito das cinquenta linhagens de *Nostoc* testadas apresentaram atividade contra pelo menos um dos organismos alvo. Bioatividade foi praticamente igualmente distribuída entre linhagens simbióticas e de vida livre. Atividades antibacterianas foram menos freqüentes do que atividades antifúngicas. Os diferentes padrões apresentados pelos extratos sugerem que diferentes moléculas são responsáveis pela bioatividade.

Biondi et al. (2004) analisaram o potencial de *Nostoc* ATCC 53789 com 12 fungos (*Armillaria* sp., *Colletotrichum coffeanum*, *C. trifolii*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *Penicillium expansum*, *Phytophthora cambivora*, *P. cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium albo-atrum*), 2 bactérias (*Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas aeruginosa*) e 2 insetos (*Galleria mellonella* and *Helicoverpa armigera*), também com *Caenorhabditis elegans* e *Artemia salina* utilizados como modelos de organismos para atividade nematocida e citotóxica. O extrato foi obtido após a filtragem da amostra e extraído *overnight* em metanol. Como resultado, o extrato obtido de *Nostoc* ATCC 53789 foi ativo para 9 dos 12 fungos testados, não foi ativo para as bactérias analisadas mas foi para *Helicoverpa armigera*, também como nematocida e para *Artemia salina*. Essa linhagem de *Nostoc* foi inicialmente pesquisada em 1990 pela Merck & Com. e como resultado obtiveram o isolamento de novo depsipeptídeo, demonstrando potente atividade contra fungos filamentosos e leveduras. Esse resultado foi patenteado e a linhagem depositada como ATCC 53789.

Outra abordagem para detecção é por imunoensaio ELISA (ensaio imunossorvente ligado à enzima). Foram desenvolvidos para determinar poluentes ambientais, incluindo toxinas. Várias pesquisas demonstraram que anticorpos monoclonal e policlonal podem ser gerados contra microcistinas. Técnicas analíticas baseadas em ELISA possuem alta sensibilidade, todavia, a atividade cruzada de várias microcistinas e nodularinas depende da similaridade da estrutura química para a microcistina contra o anticorpo que foi utilizado, geralmente microcistina-LR e não em sua toxicidade. Dependendo

desta atividade cruzada e da toxicidade da microcistina analisada, este método pode tanto estimar a mais como a menos a concentração de toxina em termos equivalentes a toxicidade de microcistina-LR. Por esta razão, não pode ser considerado como um ensaio quantitativo, mas sim, útil como ferramenta de *screening* se utilizado para monitoramento de água para consumo, por poder ocorrer um resultado sub-estimado e gerar, desta maneira, um possível risco à saúde humana, além de resultados falso positivo (NICHOLSON e BURCH, 2001; FIGUEIREDO et al., 2004).

Os níveis de detecção tornam o método ELISA útil para análise de concentrações de microcistinas, inclusive em relação ao que a Organização Mundial de Saúde sugere, de 1 µg/L de microcistina em água de abastecimento (FIGUEIREDO et al., 2004).

Chu et al. (1989) produziram e caracterizaram anticorpos contra a microcistina para a variante LR, apresentando atividades cruzadas com outras variantes de microcistinas, se ligando fortemente com microcistina-RR e de maneira fraca com microcistina-LA.

O método descrito por Chu et al. não está disponível comercialmente e detecta somente uma única toxina, no caso, microcistina-LR, além de apresentar problemas com atividade cruzada. Utilizando este método, o pesquisador W.W. Carmichael encontrou que as microcistinas mais importantes reagem com o anticorpo, mas cerca de 10% não. Por este motivo, outros métodos são sugeridos para serem utilizados pelo governo canadense para que a legislação daquele país seja atingida, que é de 0,0015 mg/L (1,5 µg/L), levando-se em consideração a saúde da população (HEALTH CANADA FEDERAL, 1998).

Lindner et al. (2004) desenvolveram até um ensaio rápido de um único passo com ELISA através da inibição de antígeno imobilizado para a microcistina-LR utilizando um *kit* que é comercializado e o modificando.

O método ELISA demonstra grande especificidade se comparado com o ensaio de inibição da proteína fosfatase mas não indica a toxicidade relativa das variantes de microcistinas e nodularinas (METCALF, BELL e CODD, 2001).

O teste ELISA é utilizado em escala mundial para a detecção de microcistinas por estar disponível em *kits* comerciais e, desta maneira, ser possível a comparação dos resultados obtidos. É sem dúvida o método mais

promissor para detecção de microcistinas por sua sensibilidade, especificidade e fácil de ser trabalhado (HARADA et al., 1999), útil como detecção rotineira de águas com contaminação de toxinas, em situações onde a amostra está bem caracterizada (NICHOLSON e BURCH, 2001), sendo o de maior aceitação para detecção toxicológica de cianobactérias (LORENZI, 2004). Pode ser utilizado pela maioria dos laboratórios e ser utilizado também para detecção de exposição humana a microcistina (HILBORN, 2005). Entretanto, estes anticorpos utilizados no ELISA não geram resultados positivos com florações de *Oscillatoria* e *Anabaena*, tendo sua melhor resposta positiva com florações de *Microcystis aeruginosa* tóxica (DOW e SWOBODA, 2000).

As vantagens da utilização desse teste é que não é caro se comparado a outros testes, como HPLC, sua utilização em *kits* é rápida conseguindo-se resultados em algumas horas e não necessita de pré-tratamento nas amostras analisadas. As desvantagens são que, até o momento, desenvolveram poucos anticorpos contra cianotoxinas em *kits*, os quais utilizam três variantes, que são as mais comuns de ocorrer (LR, YR e RR) e também podem gerar resultados falso-positivos.

Além dos testes citados, estudos de toxinas podem ser realizados por bioensaios e teste de proteína-fosfatase.

3. METODOLOGIA

3.1 Etapas da Pesquisa

As amostras foram coletadas em três datas distintas na lagoa facultativa do sistema de lagoas de estabilização de Cajati-SP, nos dias 16 de dezembro de 2004, 25 de janeiro e 13 de abril de 2005. Em seguida, foram isoladas e cultivadas para análise do Número Mais Provável (NMP). As linhagens isoladas foram seqüenciadas usando o gene DNAr 16S, analisadas tanto morfológicamente quanto filogeneticamente. A construção de uma mini-biblioteca usando o espaço intergênico do operon da ficocianina (*cpcBA*) também foi obtida para as amostras ambientais (16 dez 04). Em ambas as situações (amostras isoladas e ambientais), análises do potencial de toxicidade foram realizadas através do teste ELISA e de marcador molecular específico para microcistina (gene *mcyA*). Adicionalmente, para as amostras isoladas, avaliou-se a distribuição dos domínios NRPS e PKS, além da realização de teste de bioatividade e espectrometria de massa (Q-TOF).

A Figura 11 mostra as etapas desenvolvidas nesse estudo.

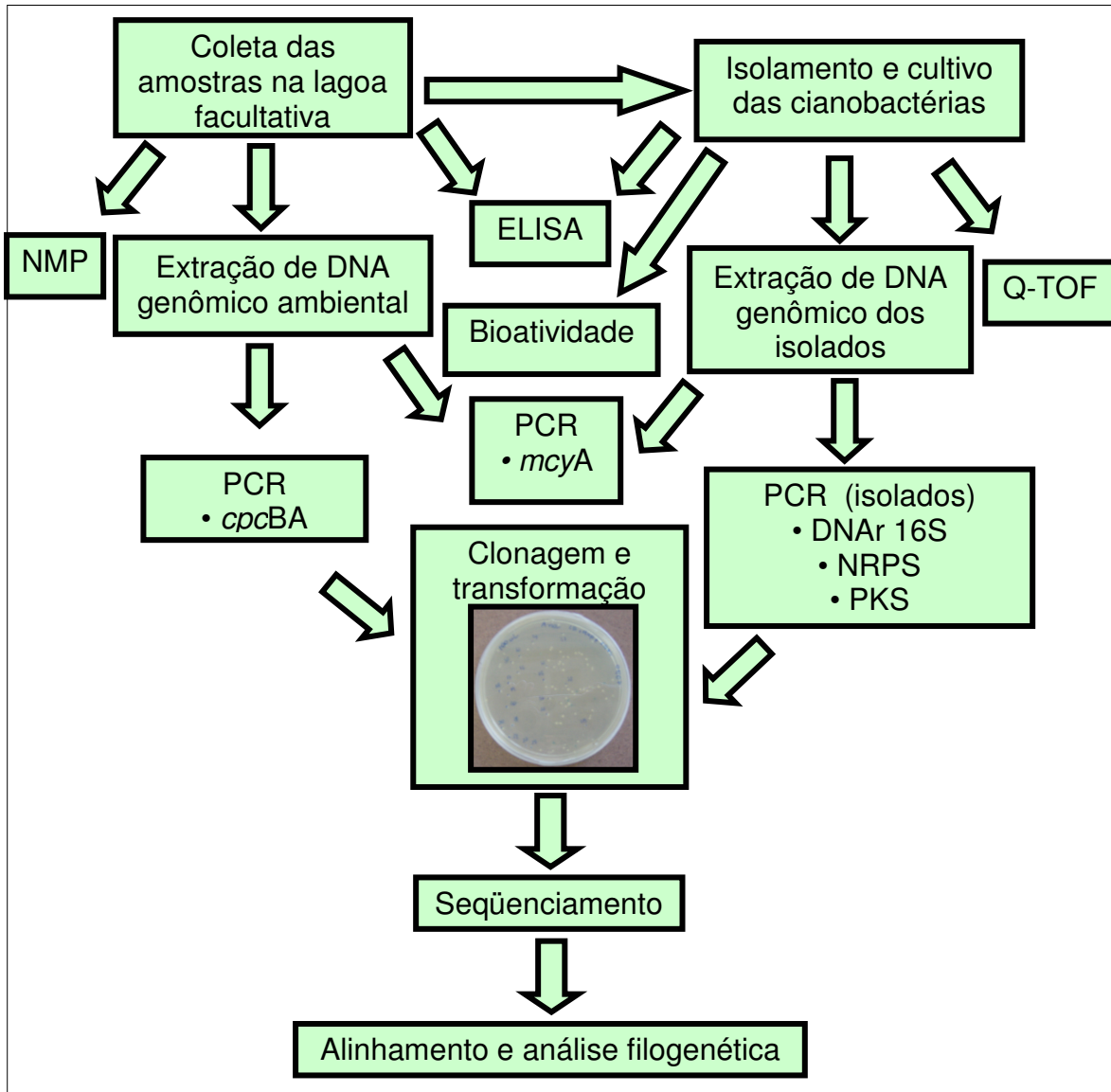


Figura 11 – Etapas deste estudo.

3.2 Área de Estudo

O distrito de Cajati foi criado em 30 de novembro de 1944, no povoado de Corrente, território do município de Jacupiranga, por sua vez fundado em 1864. A ocupação de suas terras teve início com a chegada ao Porto de Cananéia de alguns portugueses em busca de ouro. Dentre eles, estava Mathias de Pontes, que se instalou num local conhecido, inicialmente, por Cachoeirinha, onde viria a se assentar a futura cidade de Cajati. No entanto, foi no século XX que suas terras obtiveram maior evidência, quando se descobriu a possibilidade de exploração das jazidas locais. Em 1939, período em que se iniciaram as atividades de lavras de apatita, a Serrana S/A de Mineração construiu uma vila de operários. A exploração de minérios assumiu maior importância no crescimento de Cajati a partir da Segunda Guerra Mundial. Contudo, seu desenvolvimento foi bastante lento, devido à dificuldade de comunicação, comum às cidades daquela região. Assim, somente em 30 de dezembro de 1991, Cajati emancipou-se de Jacupiranga (SEADE – Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados, 2006).

A lagoa facultativa do sistema de lagoas de estabilização estudada encontra-se no município de Cajati – SP, coordenadas 24°43'23" S e 48°05'39" W, com início de operação em setembro de 2002. Encontra-se no Vale do Ribeira do Iguape (Figura 12) e faz parte do sistema de tratamento de águas residuárias operado pela SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo). Esse sistema é composto por gradeamento e caixa de areia como tratamento preliminar, lagoa anaeróbia, lagoa facultativa e tanque do cloração com chicanas, atualmente desativado, com seu efluente final despejado no rio Jacupiranguinha, classificado como classe 2. Cajati possui população de aproximadamente 30.000 habitantes. Desses, 99% possuem suas residências ligadas à rede de abastecimento de água e 67,4% à rede coletora de esgoto, dos quais 90% são tratados. Os dados de projeto das lagoas estão descritos na Tabela 5.

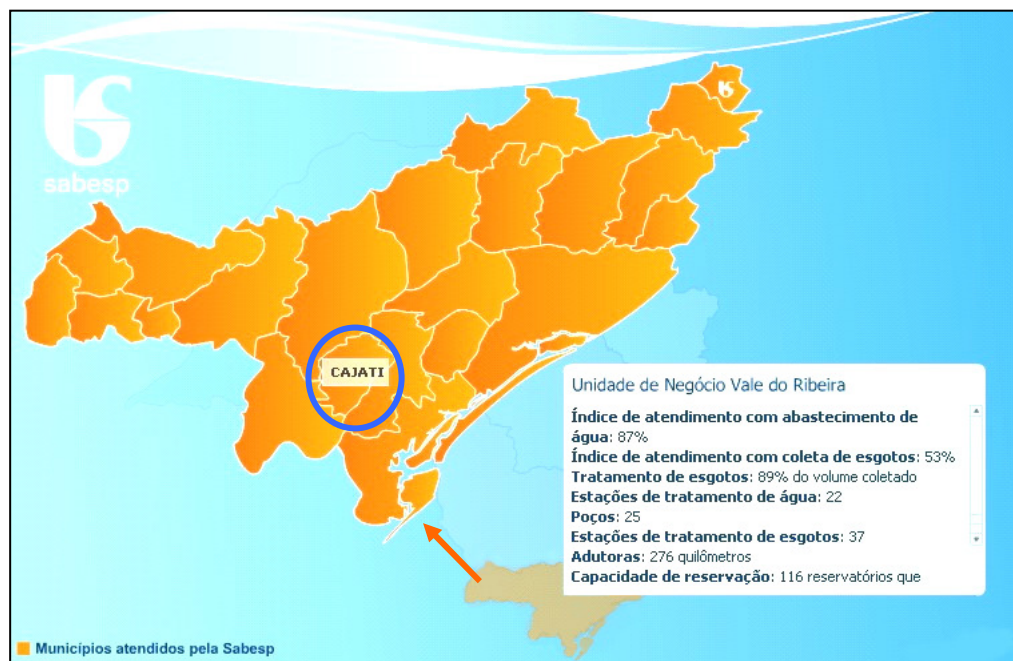


Figura 12 – Localização do município de Cajati – SP. Fonte: Sabesp, 2007.

Tabela 5 – Descrição de projeto das lagoas do Sistema de Lagoas de Estabilização de Cajati – SP.

CARACTERÍSTICAS	LAGOA ANAERÓBIA	LAGOA FACULTATIVA
Comprimento (m)	160,5	214,0
Largura (m)	53,0	163,0
Profundidade (m)	4,0	1,5
Área (m ²)	6.472	33.600
Volume (m ³)	25.886	50.400
Matéria Orgânica (kgBOD.d ⁻¹)	5177,2	*
Fluxo (m ³ .d ⁻¹)	4681,15	4681,15
Tempo de Detenção Hidráulico (dias)	5,5	10,8

* carga orgânica não citada. Fonte: Superintendência de gestão e desenvolvimento operacional de sistemas regionais – Sabesp Registro (setembro/2004)

Em janeiro de 2003 a ETE esteve desativada, com problemas nos painéis da estação elevatória, devido à ocorrência de grande quantidade de chuvas, voltando a operar normalmente em março de 2003. E em junho de 2005, ocorreu o rompimento de tubulação que bombeia esgoto para a ETE, interrompendo o recebimento de esgoto por 30 dias, sendo esse despejado diretamente no rio Jacupiranguinha.

3.3 Coletas das Amostras na Lagoa Facultativa

As coletas foram realizadas superficialmente e colocadas em frascos de fitoplâncton, mantidas no gelo até serem transportadas ao laboratório, nos seguintes pontos (Figura 13):

- Lagoa facultativa: afluente, região central e efluente.
- Efluente na saída do sistema de tratamento, no tanque com chicanas.



Figura 13 – Pontos de coleta (1, 2 e 3) na lagoa facultativa da Estação de Tratamento de Esgoto de Cajati e (4) na área de lançamento para o rio, no tanque de cloração. Foto: Mario D. Domingues.

As coletas foram programadas para ocorrerem com frequência de três em três meses, ou seja, outubro de 2004, janeiro, abril e julho de 2005 visando detectar variação dos gêneros de cianobactérias presentes no sistema, nas quatro estações do ano. Como as lagoas de estabilização são geralmente rasas e com a parte inferior anaeróbia, optou-se pela realização de coletas na superfície da lagoa, isto é, variação horizontal.

Os pontos foram amostrados na lagoa facultativa em seu afluente para análise das cianobactérias provenientes do fluxo da lagoa anaeróbia; no centro da lagoa, para detectar possíveis mudanças na comunidade de cianobactérias; em seu efluente, para acessar quais gêneros se apresentavam na saída do sistema, e na parte final do tanque de cloração, para analisar os gêneros que estariam sendo descartados no rio.

A primeira coleta, realizada em outubro de 2004, apresentou-se com baixa concentração de cianobactérias e a mesma não pôde ser analisada devido a predominância de algas eucarióticas (*Chlorella* sp.). Dessa maneira, optou-se pela realização de isolamento e cultivo das cianobactérias em laboratório. Foi realizada, então, uma coleta não programada dentro das datas iniciais, em 16 de dezembro de 2004.

A coleta de julho não foi realizada, pois o sistema não estava operando nesse período. A tubulação se rompeu antes da elevatória (tubulação responsável pela coleta do esgoto do município e transporte até a lagoa) e todo o esgoto estava sendo despejado *in natura* no rio. A lagoa facultativa (1,5 m) ficou 0,5 m abaixo de seu nível. Esse sistema encontrou-se desativado por cerca de 2 meses no referido período.

3.4 Isolamento e cultivo

Alíquotas de 1 mL das amostras de 16/dez/04 e 13/abr/05 foram inoculadas em tubos de ensaio esterilizados, contendo 9 mL de meio líquido BG-11 (ALLEN, 1968), com e sem nitrogênio, e ciclohexamida (70 mg/L) para inibir o crescimento de células eucarióticas. Depois de homogeneizados, sete diluições seriais com fator 10 foram utilizadas para inocular novos tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultivo, em triplicatas (Figura 14). Para o meio BG-11 sem nitrogênio apenas não foi adicionado o nitrogênio na forma NaNO_3 (ou inorgânico).



Figura 14 – Tubos com meio BG-11, em triplicatas, com sete diluições seriais, para cada ponto da lagoa.

Os tubos foram mantidos em sala de cultivo do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA-USP) por 30 dias, a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob iluminação fluorescente constante ($30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). C\u00e9lulas foram repicadas em meio BG-11 s\u00f3lido (Tabela 5) at\u00e9 a obten\u00e7\u00e3o de culturas puras. Ap\u00f3s isolamento em monoculturas, as linhagens obtidas foram examinadas utilizando-se microsc\u00f3pio de contraste de fase (Zeiss Axioplan, Oberkochen, Germany, Laborat\u00f3rio de Carbono 14, CENA/USP). A identifica\u00e7\u00e3o das cianobact\u00e9rias foi baseada em caracteres morfol\u00f3gicos do material em cultura, o qual foi preservado com formalina, em concentra\u00e7\u00e3o final de 4%. O sistema de classifica\u00e7\u00e3o utilizado foi baseado nos estudos de Kom\u00e1rek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005). Quando poss\u00edvel, o sistema bacteriol\u00f3gico (CASTENHOLZ, 2001) foi citado depois da designa\u00e7\u00e3o bot\u00e2nica.

3.5 N\u00famero Mais Prov\u00e1vel (NMP)

Usando as tabelas de N\u00famero Mais Prov\u00e1vel (NMP) do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, APHA (1995), teste 908 D, as amostras ambientais de 16/dez/04 e 13/abr/05 em triplicatas, com sete dilui\u00e7\u00f5es, as quais obtiveram resultados positivos no crescimento em cultivo, foram quantificadas em c\u00e9lulas por mL.

Os n\u00fameros de tubos positivos encontrados para cianobact\u00e9rias (resultado de dilui\u00e7\u00f5es decimais) s\u00e3o computados como (+) para a interpreta\u00e7\u00e3o dos dados de NMP. O intervalo de confian\u00e7a utilizado foi de 95% para cada tubo analisado. O volume utilizado para a interpreta\u00e7\u00e3o na tabela 908 II foi de 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001 e 0,000001, em triplicatas, de acordo com as setes dilui\u00e7\u00f5es em s\u00e9rie utilizadas. Quando um resultado positivo \u00e9 encontrado em dilui\u00e7\u00f5es maiores do que as tr\u00eas combina\u00e7\u00f5es analisadas de acordo com o m\u00e9todo, os resultados devem ser incorporados no maior n\u00famero de dilui\u00e7\u00e3o encontrado, somando-se os resultados obtidos (APHA, 1995).

Fiore et al. (2005) relatam que \u00e9 poss\u00edvel determinar a distribui\u00e7\u00e3o de cianobact\u00e9rias sem a utiliza\u00e7\u00e3o de m\u00e9todos de contagem tradicional, utilizando-se do m\u00e9todo NMP. O m\u00e9todo de contagem \u00e9 mais preciso, no entanto o NMP fornece diretriz de qual o tamanho da comunidade que est\u00e1 sendo analisado. O

método NMP é a contagem viável de uma população microbiana em concentrações absolutas dos organismos viáveis presentes (POSTGATE, 1969).

3.6 Análises moleculares

3.6.1 Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, tanto das linhagens isoladas como das amostras ambientais, uma suspensão de 3 mL de células na fase de crescimento exponencial foi coletada, concentrada através de centrifugação a 13000 x *g*, durante 15 min, e liofilizada. A extração do DNA genômico seguindo o protocolo descrito por Fiore et al. (2000). Cinco microlitros (5 µL) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,3 µg/mL de gel), após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 X (TBE 1 X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), usando marcador molecular Lambda/HindIII (Promega, Madison, E.U.A.). A documentação do gel foi feita através do programa “Multi Analyst” do “Fluor-S™ Multilmager” (BioRad, Hercules, California, E.U.A.).

3.6.2 Amplificação por PCR

As amplificações por PCR foram feitas em termociclador “Gene Amp. PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.), no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP.

Para a amplificação da região do DNA ribossômico sub-unidade 16S (DNAr 16S) das linhagens isoladas, os oligonucleotídeos iniciadores 27F1 (5'–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3') e 1494Rc (5'–TACGGCTACCTTGTTACGAC–3') (NEILAN et al., 1997) foram utilizados visando a amplificação de fragmentos com aproximadamente 1500 pares de bases. As condições de amplificações foram as seguintes: 95°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.

Para a amplificação de amostras isoladas e ambientais do domínio da *N*-metiltransferase (NMT) do gene *mcvA* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores MSF (5'– ATCCAGCAGTTGAGCAAGC–3') e MSR (5'– TGCAGATAACTCCGCAGTTG– 3') (TILLET et al., 2001) para obter *amplicons* de aproximadamente 1300 pares de bases. As condições de amplificações foram 94°C por 4 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 10 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.

As amplificações das linhagens isoladas dos domínios de NRPS e PKS (KS) foram feitas usando os oligonucleotídeos MTF (5'– GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC–3') e MTR (5'–CCNCGDATYTTNACYTG–3') (NEILAN et al., 1999), e KSF (5'– MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG–3') e KSR (5'– GGRTCICCIARISWIGTICCGTICCRTG–3') (BEYER et al., 1999), respectivamente. Os amplicons resultantes esperados foram de 1000 pares de bases para NRPS e 700 pares de bases para o KS. As condições de ciclagem foram as mesmas para ambos os domínios, sendo 94°C por 2 minutos, seguidos de 5 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 4 minutos, finalizando com extensão final de 72°C por 15 minutos.

Todas as reações de amplificação continham 2,5 µL de tampão PCR1X, 1,5 µL MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,0 µL de cada iniciador (5 pmol/µL), 1,0 µL de DNA (10 ng), 0,3 µL de Platinum Taq DNA Polimerase (1 U) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, E.U.A.) e água ultrapura esterilizada para volume final de 25 µL. O marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) foi utilizado para verificação de tamanho dos *amplicons* obtidos, em gel de agarose 1%, conforme já descrito.

3.6.3 Clonagem e transformação

Os produtos frescos de PCR do DNAr 16S, de *cpcBA* e PKS foram clonados utilizando o kit “P-Gem[®] T-Easy Vector” (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O vetor utilizado foi o pGEM[®] - T de 3015 pb, que é oferecido linearizado com *ECOR* V e com adição de 3' terminal timidina em ambos os lados. Essas terminações 3'-T aumentam a eficiência da ligação.

Esse vetor contém sítios para a resistência à ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento do *LacZ*. Células da bactéria *E. coli* DH5 α foram utilizadas como recipiente, depois de preparadas quimicamente usando o método de cloreto de cálcio, e a introdução do vetor contendo os insertos nessas células competentes foi feita através de choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina e X-Gal, ambos em concentrações finais de 100 $\mu\text{g mL/L}$, e incubadas por 14-16 horas, a temperatura de 37°C.

Uma pequena quantidade de células provenientes de colônias brancas foi utilizada para novas reações de PCR, visando confirmar a presença dos insertos. As condições da reação de amplificação utilizada foram as mesmas descritas no item 3.6.2, e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram M13F/M13R, que flanqueiam regiões do vetor. O tamanho dos *amplicons* foi verificado em gel de agarose 1% TBE 0,5X e os clones que não apresentaram produtos de amplificação ou tamanhos inesperados, não foram analisados.

Em seguida, os plasmídeos foram obtidos pelo método de preparação de pequena escala, usando hidrólise alcalina, de acordo com Bimboim e Doly (1979). As colônias brancas que fizeram parte da seleção foram transferidas para 5 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 14 a 16 horas, a 37°C, sob agitação de 150 rpm. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 1,5 mL da cultura de células produzida e, em seguida, estas foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 20 segundos. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez. O pélete formado foi ressuspenso em 100 μL de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Duzentos μL (200 μL) de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram acrescentados e misturados gentilmente através da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram adicionados aos microtubos 150 μL de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 x *g* durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 6/10 do volume (~270 μL) de isopropanol a temperatura ambiente, misturando-se e centrifugando-se conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pélete foi lavado uma vez com 250 μl de etanol 70% gelado e

centrifugado a 10.000 x *g* por 2 minutos. O pélete foi então seco e ressuspenso em 30 µL de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 M e 10 mg RNase/mL. Os plasmídeos assim extraídos foram armazenados a -20 °C até a próxima etapa.

3.6.4 Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento dos fragmentos de interesse foram feitas usando-se o kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham Biosciences, UK, England) de acordo com as recomendações do fabricante. Os oligonucleotídeos iniciadores T7 (5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′) e SP6 (5′-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3′), que flanqueiam as extremidades do vetor, e os oligonucleotídeos internos 341-357F (5′-CCTACGGGAGGCAGCAG-3′) e 357-341R (5′-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3′); 685-704F (5′-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3′) e 704-685R (5′-TCTACGSATTTACCCSCTAC-3′); 1099-1114F (5′-CAACGAGCGCAACCC-3′) e 1114-1099R (5′-GGGTTGCGCTCGTTGC-3′) (LANE, 1991) foram utilizados para a reação de seqüenciamento do RNAr 16S, enquanto que para o seqüenciamento dos fragmentos de PKS apenas os iniciadores M13F e SP6 foram usados. As condições de ciclagem da reação de seqüenciamento foram 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 60 segundos a 60 °C, as quais foram realizadas no mesmo termociclador já descrito. Em seguida, os produtos foram lavados com etanol 100%, seguida de outra lavagem com etanol 70% para a remoção de resíduos. Esses produtos foram então ressuspenso em formamida HiDi (Applied Biosystems) e as amostras colocadas no ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.7 Construção de Mini-biblioteca de *Amplicons* da região *cpcBA*

Para a construção de uma mini-biblioteca de *amplicons* da região do espaço intergênico da ficocianina (*cpcBA*) foi utilizada amostra ambiental coletada em 16/dez/04. A extração de DNA genômico desse material foi feita conforme já descrito no item 3.6.1. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar aproximadamente 700 pares de bases da região *cpcBA* foram PCβF (5′-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3′) e PCαR (5′-

CCAGTACCACCAGCAACTAA–3') (NEILAN et al., 1995). As reações de amplificação continham 2,5 µL de tampão PCR1X, 1,5 µL MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 1,0 µL de cada iniciador (5 pmol/µL), 1,0 µL de DNA (10 ng), 0,3 µL de Platinum Taq DNA Polimerase (1 U) (Invitrogen) e água ultrapura esterilizada para volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 47°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos (NEILAN et al., 1995) ou 94°C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 12 minutos, modificado de BOLCH (1996), as quais foram realizadas no mesmo termociclador já mencionado. O marcador molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) foi utilizado para verificação dos tamanhos dos *amplicons* obtidos, em gel de agarose 1%, conforme já descrito.

Os produtos frescos de PCR foram clonados e a verificação dos clones transformantes foi feita da mesma forma que no item 3.6.3. Cento e doze clones transformantes foram utilizados para este estudo, sendo 34 clones para cada ponto amostrado (ponto 1 – afluente da lagoa, ponto 2 – centro e ponto 3 – efluente da lagoa). Desse total, 29 clones contendo os fragmentos de interesse foram seqüenciados conforme descrito no item 3.6.4 usando apenas os oligonucleotídeos T7 e SP6.

3.8 Alinhamento e análises filogenéticas

As seqüências resultantes deste estudo foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice que qualidade menor que 20) através do pacote que contém os programas Phred/Phap/Consed (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998), em ambiente operacional Linux, sendo assentadas em *contigs* únicos.

Posteriormente, foram comparadas com outras seqüências previamente depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1999), visando a identificação das espécies de cianobactérias.

O alinhamento seqüencial múltiplo das seqüências obtidas neste estudo, juntamente com outras selecionadas do NCBI, foi realizado usando o programa Clustal W (THOMPSON et al., 1997). Árvores filogenéticas foram construídas por meio do programa MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004) utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITO e NEI, 1987) com o parâmetro Kimura-2 de distância (KIMURA, 1980) e Máxima Parsimônia. Valores de reamostragem (*bootstrap*) baseados em 1.000 replicações (FELSENSTEIN, 1985) foram considerados.

Para análise das seqüências obtidas do domínio PKS utilizou-se o programa ExPASy – Translate Tool (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) para converter as seqüências de nucleotídeos em aminoácidos e analisar qual *frame* codifica a proteína. Essas seqüências de proteínas traduzidas foram comparadas a PKS microbianos conhecidos utilizando-se o software disponível em <http://www.npbio gene.com/> (*Natural Product Biosynthetic Gene Database*).

3.9 Ensaio Imunossorvente Ligado à Enzima (ELISA)

O potencial de toxicidade de dez linhagens de cianobactérias isoladas e três amostras ambientais (16/dez/04, 25/jan/05 e 13/abr/05) foi avaliado usando o *kit* da Beacon (*kit* placa Microcistina, Beacon Analytical Systems, Inc., Portland, ME, E.U.A.), o qual considera as isoformas LR, RR e YR de microcistinas.

Alíquotas de 1 mL de amostras ambientais foram congeladas com nitrogênio líquido por 30 segundos, e em seguida descongeladas em banho-maria a 40°C por 4 minutos, três vezes seguidas, visando a ruptura das células. Desse total, 100 µL foram utilizados para o teste ELISA seguindo as recomendações do fabricante.

Para as linhagens isoladas, optou-se por outra metodologia, por apresentarem espécies filamentosas, necessitando de um tratamento mais agressivo para lise celular. Dessa forma, alíquotas de 2 mL foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O conteúdo foi transferido para tubos de ensaio, no qual foram adicionadas 2 mL de água destilada esterilizada e, em seguida, as amostras foram submetidas ao microondas (potência máxima), por 1 minuto. As soluções foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. Desse total, 100

µL foram utilizados para o teste ELISA seguindo as recomendações do fabricante. Essas análises foram realizadas em tubos de vidro.

3.10 Bioatividades das linhagens isoladas

As dez amostras isoladas (CENA 103 a CENA 112) foram inoculadas separadamente em 320 mL de meio BG-11 e mantidas por 30 dias na sala de cultivo no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, nas mesmas condições descritas no item 3.4.1. Esse volume foi centrifugado a 10.000 x *g* por 10 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi coletado separadamente em relação às células. O sobrenadante foi então submetido à extração de toxinas e compostos bioativos usando clorofórmio ou acetato de etila, sendo utilizados 150 mL para cada uma dessas extrações, e coletada a fase orgânica. Os mesmos volumes foram evaporados até aproximadamente 2 mL de cada extrato e armazenados a – 20°C. As células foram submetidas à extração do extrato intracelular pela adição de 2 mL de metanol, agitadas magneticamente por uma hora e, após esse período, centrifugadas a 5.000 x *g* por 5 minutos. Posteriormente, foram armazenadas a – 20°C.

Os extratos obtidos foram utilizados para avaliação de atividade antimicrobiana. Extratos orgânicos das culturas foram submetidos a testes de bioatividade em placas de Petri contendo linhagens selecionadas de levedura, bactérias e fungo fitopatogênico em duplicata, da coleção de isolados do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA-USP). As bactérias *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Bacillus cereus*, *Paracoccus* sp. e *Staphylococcus aureus*, o fungo *Rhizoctonia solani* e a levedura *Candida cruzeyi* foram selecionados para o estudo. As bactérias foram inoculadas em meio LB (Luria-Bertani) (BERTANI, 1951), o fungo em extrato de malte 3% e a levedura em meio YEPD (*yeast extract peptone dextrose*) (VINCENT, 1970).

Os testes consistiram em colocar discos de filtro de papel Whatman n° 1 (6 mm Ø) esterilizados contendo 20 µL do extrato orgânico em placas inoculadas com os microrganismos testes. As placas contendo os isolados bacterianos e a levedura foram incubados por 24 horas a 28°C, excetuando-se *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus pasteurii* (37°C), enquanto que para o

fungo o tempo de incubação foi de 7 dias a 28°C. Resultados positivos foram visualizados pelo aparecimento de zonas de inibição de crescimento.

3.11 Espectrometria de Massas (Q-TOF)

Alíquotas de 2 mL das dez culturas isoladas provenientes do volume total de 320 mL foram lavadas duas vezes (centrifugação a 5.000 x *g* a 2 minutos) com água destilada esterilizada e agitadas em vórtex com auxílio de esferas de vidro (± 5 mm \varnothing), até a visível quebra das células. Em seguida, foram colocadas em microondas (potência máxima) por aproximadamente um minuto, novamente centrifugadas, e o sobrenadante liofilizado.

Essas análises foram realizadas somente uma vez no Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Laboratório Thomson pelo Prof. Dr. Luis Alberto Beraldo de Moraes (USP-RP). A fase orgânica foi separada e analisada em espectrometria de massas usando um Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) híbrido de alta resolução (7.000) e alta precisão (5 ppm), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As condições para a ESI no modo positivo foram as seguintes: gás de dessolvatação (nitrogênio) aquecido a 150°C; capilar mantido a um potencial de 3.5 kV e a voltagem do cone de 25 kV. A fragmentação do peptídeo (MS/MS *tandem*) foi adquirida selecionando-se o íon com a Massa Molecular (MM) alvo, utilizando-se de analisador de massas quadrupolo seguido de 20eV, dissociação de colisão induzida usando argônio na célula de colisão do quadrupolo e análise de massas pelo TOF. Os extratos anteriormente liofilizados foram dissolvidos em uma mistura de metanol (50%):ácido fórmico (0,1%) (1:1 v/v). As amostra foram introduzidas na fonte a 5 μ L/min com uma seringa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3 Município de Cajati

Segundo SEADE (2006), alguns dos dados mais relevantes do município de Cajati, gerados pelo Governo do Estado de São Paulo, estão na Tabela 6, a qual considera, além do município de Cajati, dados da Região de Registro e do Estado de São Paulo.

Tabela 6 – Dados SEADE sobre o município de Cajati – SP.

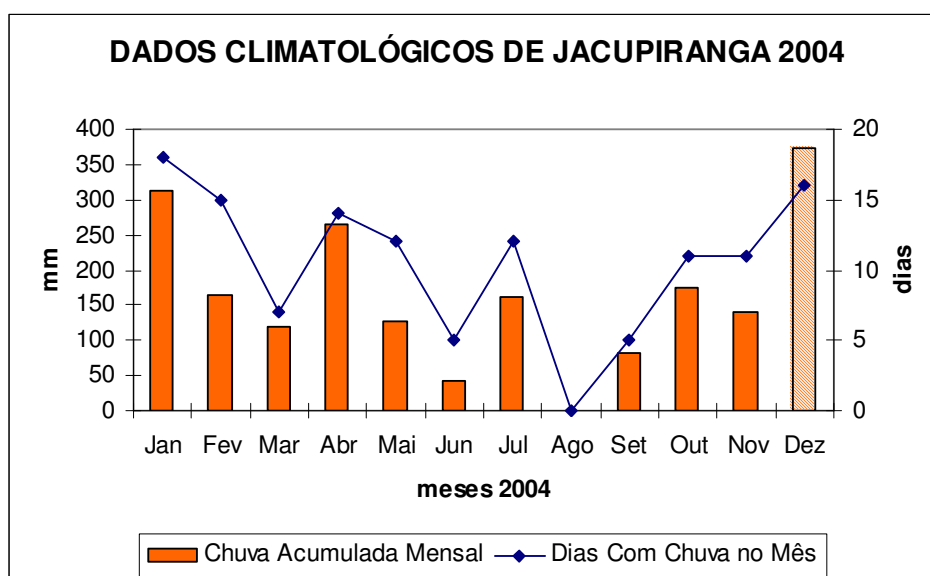
Dados	Ano	Município	Região de Registro	Estado
Área (km ²)	2005	455	12.129	248.600
População (hab)	2005	32.052	286.232	39.949.487
Densidade Demográfica (hab/km ²)	2005	70,44	23,60	160,70
Taxa Geométrica de Crescimento Anual da População - 2000/2005 (% a.a.)	2005	1,90	1,53	1,56
Grau de Urbanização (em %)	2005	74,73	68,73	93,65
Coleta de Lixo (%)	2000	98,09	95,36	98,90
Abastecimento de Água (%)	2000	96,7	93,53	97,38
Esgoto Sanitário (%)	2000	69,19	65,99	85,72
Esgoto Sanitário Tratado (%)	2003	90	NA	NA

NA – Não se aplica.

Dados do município de Jacupiranga (cidade vizinha a Cajati) sobre dados climáticos, como temperaturas máximas e mínimas absolutas, chuvas e dias de chuvas estão apresentados na Tabela 7 e as Figuras 15 e 16 (IAC, Instituto Agrônomo de Campinas, 2006).

Tabela 7 – Dados climatológicos do município de Jacupiranga.

Período	Chuva	Temperatura Máxima Absoluta	Temperatura Mínima Absoluta	Temperatura do período
	(mm)	°C		
16/12/2004 a 19/12/2004	35,9	37,4	18,5	25,3
24/01/2005 a 26/01/2005	43,8	30,7	18,6	24,7
11/04/2005 a 13/04/2005	0,0	35,6	20,7	28,0

**Figura 15** – Gráfico de chuva acumulada mensal por dias de chuva para o período de 2004, destaque para o mês de coleta (dez 04).

Em 2004, a pluviosidade do período foi de 1960,8 mm em 126 dias de chuva. No mês de dezembro, quando da coleta, a chuva acumulada do período foi de 373,3 mm com 16 dias com chuva neste mês.

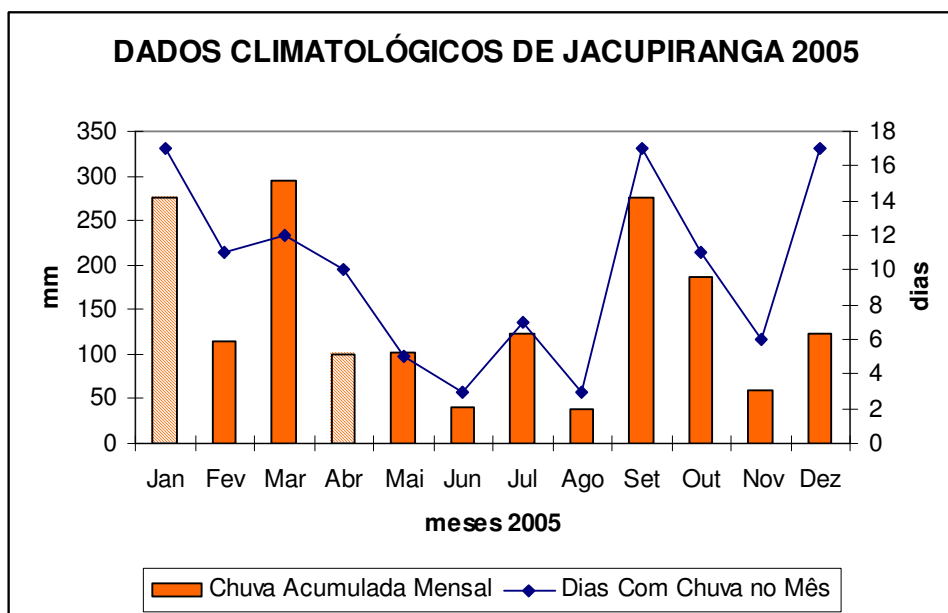


Figura 16 – Gráfico de chuva acumulada mensal por dias de chuva para o período de 2005, destaques para os meses de coleta (jan 05 e abr 05).

Em 2005, a pluviosidade do período foi de 1732,7 mm em 119 dias de chuva. No mês de janeiro e abril, a chuva acumulada mensal foi de 275,1 e 99,9 mm, em 17 e 10 dias com chuva nestes meses, respectivamente.

A temperatura do período registrada, na cidade de Jacupiranga, foi de 25,3 °C, 24,7 °C e de 28 °C, para dezembro de 2004, janeiro e abril de 2005. As precipitações mensais foram de 373,3 mm, 275,1 mm e 99,9 para estes mesmos períodos.

Nas três coletas ambientais as espécies presentes foram distintas, mesmo sendo coletadas nos mesmos pontos, demonstrando que as populações variaram nos períodos de tempo analisados. Em dezembro de 2004 e janeiro de 2005 as chuvas foram intensas, além da presença de uma frente fria vinda do sul, fato este explicativo para as baixas temperaturas apresentadas no período de verão e da entrada do fluxo de água pluvial no sistema da lagoa de estabilização, influenciando todo o tratamento, fator este possível de ter modificado a dinâmica populacional desse local. Já na coleta de abril de 2005 ocorreram chuvas menos intensas e não no período da coleta, além de uma temperatura mais alta se comparada com as outras duas coletas.

Segundo informações coletadas na SABESP (comunicação pessoal), este sistema recebe águas pluviais, gerando resultados negativos para a DBO pela diluição do esgoto.

4.2 Cultivo e isolamento das amostras ambientais

Os gêneros *Synechococcus* sp., *Merismopedia* sp., *Limnothrix* sp., *Leptolyngbya* sp. (meio BG-11) e *Nostoc* sp. (meio BG-11 sem nitrogênio) foram isolados das amostras coletadas nos quatro pontos na lagoa facultativa de estabilização de Cajati – SP (Tabela 8). A descrição dos locais de coleta e do número do depósito na coleção de culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias – CENA – USP estão descritos na Tabela 9.

Tabela 8 – Gêneros isolados da lagoa facultativa e seus respectivos pontos e datas.

	AFLUENTE	CENTRO	EFLUENTE	TANQUE
16 dez 04	<i>Nostoc</i> (SN)	<i>Merismopedia</i> e <i>Leptolyngbya</i>	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Leptolyngbya</i> e <i>Merismopedia</i>
25 jan 05	<i>Nostoc</i> (SN)	<i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus</i>
13 abr 05	<i>Limnothrix</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Limnothrix</i>	<i>Leptolyngbya</i>

SN – meio de cultura sem nitrogênio.

Tabela 9 – Lista de cianobactérias isoladas da lagoa facultativa de Cajati-SP e mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, CENA – USP.

CIANOBACTÉRIA	DATA	LOCAL
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 103	16 Dez 2004	Centro
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 104	16 Dez 2004	Tanque
<i>Nostoc</i> sp. CENA 105	16 Dez 2004	Afluente
<i>Merismopedia</i> sp. CENA 106	16 Dez 2004	Centro
<i>Nostoc</i> sp. CENA 107	25 Jan 2005	Afluente
<i>Synechococcus</i> sp. CENA 108	25 Jan 2005	Efluente
<i>Limnothrix</i> sp. CENA 109	13 Abr 2005	Afluente
<i>Limnothrix</i> sp. CENA 110	13 Abr 2005	Centro
<i>Limnothrix</i> sp. CENA 111	13 Abr 2005	Efluente
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 112	13 Abr 2005	Tanque

Os morfotipos isolados (Figura 17) são caracterizados a seguir, incluindo alguns comentários sobre o gênero descrito, assim como a variabilidade morfológica para cada linhagem de cianobactéria depositada na coleção de culturas é apresentada (Tabela 10).

Ordem Chroococcales (Subseção I)

Synechococcus Nägeli 1849 – células solitárias ou em grupos irregulares ou aglomerações; células cilíndricas em forma de bastão, às vezes arcuadas; conteúdo celular homogêneo, azul-esverdeado; sem aerótopos ou granulação; dimensões 2,7 – 6,5 μm compr. x 0,8 – 1,4 μm diâm., razão compr./diâm. 2,0 – 6,5. Divisão celular por fissão binária perpendicular, às vezes assimétrica. Pseudotricomas presentes sob condições de estresse em cultura. *Comentários:* culturas são utilizadas amplamente como organismos modelos em experimentos. Cerca de vinte espécies são conhecidas depois de novas revisões taxonômicas. Essas espécies ocorrem principalmente no plâncton, no metafíton e sobre pedras. No Brasil, relativamente poucas espécies foram encontradas (KOMÁREK, 2003; SANT'ANNA et al., 2005).

Merismopedia Meyen, 1839 – células formando colônias tabulares, retangulares; conteúdo celular homogêneo, azul-esverdeado; células esféricas ou hemi-esféricas após a divisão; dimensões 0,8 – 2,0 μm compr. x 0,7 – 2,8 μm diâm., razão compr./diâm. 0,6 – 1,1. Divisão celular em dois planos. *Comentários:* são conhecidas mais de trinta espécies, sendo a maioria delas planctônica de águas continentais. São comumente encontradas em reservatórios brasileiros (KOMÁREK, 2003; SANT'ANNA et al., 2005).

Ordem Oscillatoriales (Subseção III)

Limnothrix Meffert 1988 – tricomas solitários, retos ou flexuosos, móveis, pouco constritos; células quadráticas a cilíndricas, retas; com aerótopos nas extremidades, conteúdo esverdeado, verde-azulado; células apicais cilíndricas, retas ou arcuadas, às vezes atenuadas e capitadas; dimensões 2,0 – 9,1 μm compr. x 1,3 – 2,1 μm diâm., razão compr./diâm. 1,1 – 5,2. *Comentários:* é um gênero tipicamente planctônico e há cerca de vinte espécies já revisadas, porém, pouco citadas para o Brasil (KOMÁREK, 2003; SANT'ANNA et al., 2005).

Leptolyngbya Anagnostidis et Komárek 1988 – tricomas isolados ou emaranhados frouxos, retos ou flexuosos, constrictos; bainha fina, inconspícua, hialina; ramificação falsa; células subquadráticas um pouco mais longas que largas; conteúdo celular às vezes levemente granuloso, esverdeado ou acastanhado; dimensões 0,7 – 3,3 μm compr. x 1,6 – 3,1 μm diâm., razão compr./diâm. 0,3 – 1,6. Fragmentação do tricoma com auxílio de necrídios. As linhagens CENA 103 e 112 apresentaram filamentos solitários ou formando emaranhados frouxos, sempre dispersos no meio de cultura. Já na linhagem CENA 104, os filamentos formaram densos agregados (biofilme) nos frascos de cultivo. *Comentários:* o gênero *Leptolyngbya* é um dos mais comuns dentre as cianobactérias, contendo vários morfotipos e ecotipos, compreendendo mais de 100 espécies descritas e ainda mal delimitadas em virtude da falta de características realmente distintivas (KOMÁREK, 2003; SANT'ANNA et al., 2005).

Ordem Nostocales (Subseção IV)

Nostoc Vaucher ex Bornet et Flahault 1888 – tricomas flexuosos envoltos por mucilagem colonial; células esféricas ou em forma de barril, conteúdo levemente granuloso, azul-esverdeado ou acastanhado, dimensões 1,6 – 4,9 μm compr. x 1,7 – 4,4 μm diâm., razão compr./diâm. 0,7 – 1,6; heterocito terminal ou intercalar, em forma de barril a cilíndrico; acineto cilíndrico, reto ou levemente curvado. *Comentários:* é um gênero comum e bem distribuído, com mais de 200 táxons descritos. Em geral, as espécies de *Nostoc* não suportam ambientes poluídos. No Brasil, poucas espécies já foram mencionadas (KOMÁREK, 2003; SANT'ANNA et al., 2005).

Tabela 10 – Descrição dos morfotipos das cianobactérias isoladas neste estudo, incluindo os dados de variabilidade morfométrica das linhagens.

IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO	ORGANIZAÇÃO CELULAR E COLORAÇÃO	MORFOLOGIA CÉLULA/TRICOMA	TAMANHO DA CÉLULA (μm) ^a		
			C	L	C/L
<i>Synechococcus</i> sp. CENA108	Células solitárias, azul-esverdeadas	Células cilíndricas retas ou arcuadas, com pseudotricomas	2,7 – 6,5 (4,2)	0,8 – 1,4 (1,2)	2,0 – 6,5 (3,6)
<i>Merismopedia</i> sp. CENA106	Células arranjadas em colônias retangulares, azul-esverdeadas	Células esféricas ou hemi-esféricas	0,8 – 2,0 (1,4)	0,7 – 2,8 (1,7)	0,6 – 1,1 (0,9)
<i>Limnothrix</i> sp. CENA109	Células formando tricomas móveis, solitários, dispersos no meio (condições de cultura), pouco constrictos, verdes	Células retas, cilíndricas, com aerótopos no ápice; células apicais cilíndricas, retas ou pouco arcuadas	2,0 – 7,8 (4,5)	1,3 – 1,8 (1,5)	1,1 – 5,2 (3,0)
<i>Limnothrix</i> sp. CENA110			3,5 – 7,6 (5,4)	1,5 – 2,0 (1,7)	1,9 – 4,7 (3,1)
<i>Limnothrix</i> sp. CENA111			3,3 – 9,1 (5,7)	1,5 – 2,1 (1,8)	1,8 – 5,0 (3,2)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA103	Células formando tricomas levemente constrictos, com bainha fina, inconspícua, dispersos no meio ou em emaranhados frouxos (condições de cultura), acastanhados (103), verdes (112)	Células quadráticas, às vezes com granulação; células apicais com ápice arredondado	1,3 – 3,3 (2,2)	1,6 – 2,6 (2,1)	0,6 – 1,6 (1,0)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA112			0,7 – 2,4 (1,4)	1,8 – 2,5 (2,1)	0,3 – 1,1 (0,7)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA104	Células formando tricomas levemente constrictos, com bainha fina, inconspícua, arranjados em agregados densos, biofilme (condições de cultura), verdes		1,0 – 2,8 (1,8)	1,7 – 3,1 (2,3)	0,4 – 1,4 (0,8)
<i>Nostoc</i> sp. CENA105	Células formando tricomas em colônias mucilaginosas, azul-esverdeadas (105), acastanhadas (107)	Células esféricas ou em forma de barril, com material granular fino; heterocito terminal ou intercalar, em forma de barril a cilíndrico; acineto cilíndrico, reto ou um pouco curvado	1,6 – 4,9 (2,8) H: 2,6 – 4,2 (3,6) A: 3,2 – 9,3 (5,4)	1,7 – 4,4 (2,9) H: 3,1 – 4,0 (3,6) A: 2,6 – 4,2 (3,4)	0,7 – 1,6 (1,0)
<i>Nostoc</i> sp. CENA107			2,4 – 4,5 (3,1) H ^b : 2,8 – 4,4 (3,5) A ^c : 2,8 – 4,7 (3,9)	2,3 – 4,4 (3,4) H ^b : 2,9 – 4,4 (3,7) A ^c : 2,2 – 4,6 (3,5)	0,7 – 1,2 (0,9)

^a células vegetativas, outras indicadas; C, comprimento; L, largura, Mínimo, máximo e (média, n=30); ^bH: heterocito; ^cA: acineto.

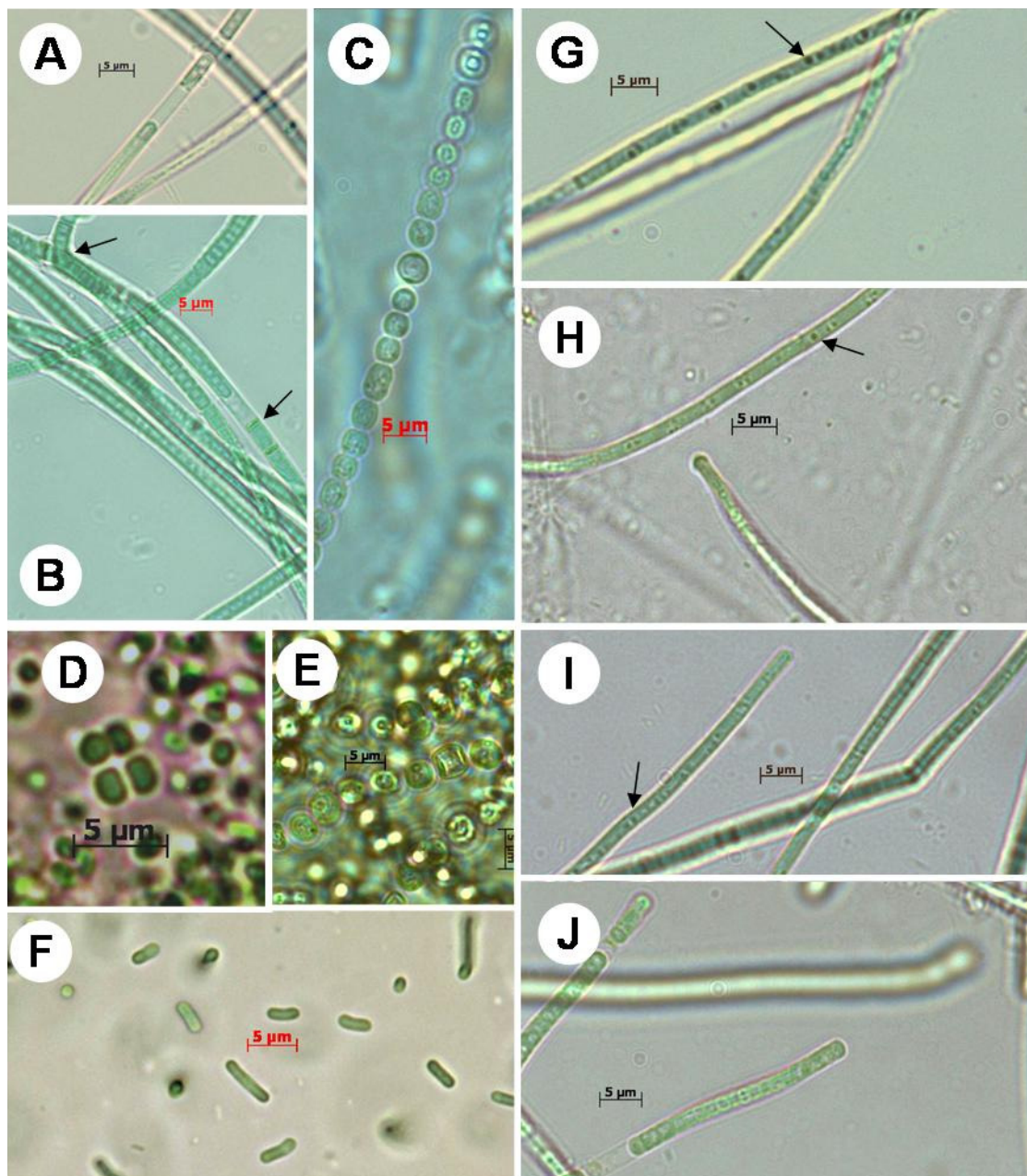


Figura 17 – Morfotipos de cianobactérias isoladas em cultura do sistema de lagoas de estabilização de Cajati – A. *Leptolyngbya* sp. CENA103, B. *Leptolyngbya* sp. CENA104 com ramificação falsa e necrídio (setas), C. *Nostoc* sp. CENA105, D. *Merismopedia* sp. CENA106, E. *Nostoc* sp. CENA107, F. *Synechococcus* sp. CENA108, G. *Limnothrix* sp. CENA109 com aerótopo (seta), H. *Limnothrix* sp. CENA110 com aerótopo (seta), I. *Limnothrix* sp. CENA111 com aerótopo (seta), J. *Leptolyngbya* sp. CENA112. Escala = 5 µm.

Segundo Dokulil e Teubner (2000), as cianobactérias apresentam quatro ecotipos de acordo com seu comportamento na coluna d'água:

- Espécies capazes de fixar N_2 (*Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskki*).

- Espécies em ambientes estratificados (*Planktothrix rubescens*). Apresentam um “ótimo” de profundidade, normalmente metalímnion, pela habilidade de flutuabilidade. Crescem em filamentos solitários.
- Espécies em ambientes turbulentos (*Limnothrix redekei*, *Planktothrix agardhii*). Este grupo está normalmente bem misturado no epilímnion. Não fixam N₂ e não estão em locais estratificados ou migrando.
- Espécies formadoras de colônias ou agregados (*Microcystis* e *Aphanizomenon*). Excursões diárias pelo epilímnion possivelmente pela sua unidade de tamanho grande.

Estes gêneros encontrados, com a técnica de isolamento, podem estar sub-estimados dentro da população de cianobactérias com seus poucos táxons representativos pela problemática da seletividade de linhagens (WARD et al., 1998). A contagem por microscopia óptica invertida das amostras para os períodos de outubro de 2004, janeiro de 2005, abril de 2005 e julho de 2005 foi realizada dentro do projeto temático “Estudos dos sistemas naturais e artificiais redutores de cargas poluidoras para a sustentabilidade dos recursos hídricos do Baixo Ribeira de Iguape, SP” (02/13449-1). Quando os dados de isolamento foram comparados com a contagem direta, obtivemos diferença nos gêneros encontrados. Foram isolados cinco gêneros desse sistema no presente estudo (*Leptolyngbya*, *Synechococcus*, *Limnothrix*, *Nostoc* e *Merismopedia*) e através de contagem direta foram encontrados seis gêneros (*Aphanocapsa* sp., *Lyngbya* sp., *Merismopedia punctata*, *Merismopedia tenuissima*, *Pseudanabaena* sp., *Synechocystis* sp. e *Phormidium* sp.) Através do isolamento, por ser seletivo, foi possível obter gêneros possivelmente não dominantes no período, inclusive fixadores de nitrogênio, os quais não foram encontrados na contagem direta realizada. Independente da limitação dos métodos de cultura, as cianobactérias isoladas da lagoa facultativa de Cajati poderão ser utilizadas em estudos posteriores de fisiologia e ecologia desta população.

4.3 Biomassa – Número Mais Provável (NMP)

Os NMP obtidos utilizando-se de meio BG-11 com e sem nitrogênio estão descritos nas Tabelas 11 e 12, apresentados os valores menores, maiores e média. Os valores variaram de $3,9 \times 10^2$ a $2,3 \times 10^3$ e $7,5 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^4$ células por mL em dezembro de 2004 e abril de 2005, respectivamente e com BG-11 sem nitrogênio $2,3 \times 10^2$ a $2,3 \times 10^3$ em ambos os períodos dentro da lagoa facultativa. Os resultados obtidos com NMP foram semelhantes aos obtidos em lagoa facultativa de Portugal, onde o valor máximo encontrado de cianobactérias foi de $8,8 \times 10^3$ células por mL (VASCONCELOS e PEREIRA, 2001).

Tabela 11 – Número Mais Provável obtido de culturas com meio BG-11.

Data	Local	NMP/100mL	Menor	Maior
Dezembro 04	Afluente	$3,9 \times 10^4$	7×10^3	$1,3 \times 10^5$
	Centro	$2,3 \times 10^5$	4×10^4	$1,2 \times 10^6$
	Efluente	$9,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^5$
	Tanque	$1,5 \times 10^5$	3×10^4	$4,4 \times 10^5$
Abril 05	Afluente	$1,5 \times 10^6$	3×10^5	$4,4 \times 10^6$
	Centro	$7,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$
	Efluente	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^6$
	Tanque	$1,2 \times 10^7$	3×10^6	$3,8 \times 10^7$

Tabela 12 – Número Mais Provável obtido de culturas com meio BG-11 sem nitrogênio.

Data	Local	NMP/100mL	Menor	Maior
Dezembro 04	Afluente	$2,3 \times 10^4$	4×10^3	$1,2 \times 10^5$
	Centro	$2,3 \times 10^5$	4×10^4	$1,2 \times 10^6$
	Efluente	$2,3 \times 10^4$	4×10^3	$1,2 \times 10^5$
	Tanque	$2,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$4,7 \times 10^4$
Abril 05	Afluente	$2,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$4,7 \times 10^5$
	Centro	$2,3 \times 10^5$	4×10^4	$1,2 \times 10^6$
	Efluente	$2,3 \times 10^4$	4×10^3	$1,2 \times 10^5$
	Tanque	*	*	*

* Dados não compatíveis com os da tabela de NMP

As amostras de dezembro de 2004 em meio BG-11 apresentaram número maior de células por mL no centro da lagoa e menor na margem de entrada, já em abril de 2005 o valor maior de células por mL foi encontrado no tanque de cloração e menor na região central.

Os resultados de dezembro de 2004 em meio BG-11 sem nitrogênio apresentaram número maior de células por mL também na região central e menor no tanque de cloração e em abril de 2005 o número maior de células por mL na região central e menor na margem de saída, mas sem o NMP do tanque de cloração.

As amostras de abril de 2005 apresentaram valores maiores em todos os locais e datas analisadas, quando comparadas com as amostras de dezembro de 2004.

Quando comparados os resultados obtidos com a contagem direta descrita no item anterior, referente ao projeto temático realizado nesse sistema, os resultados diferiram pelo menos na ordem de 10^{-2} para os resultados do NMP, isto é, os números obtidos através do método de NMP foi sub-estimado para a coleta realizada em abril de 2005 quando comparado com o método de contagem direta.

4.4 Extração de DNA Genômico

As extrações de DNA genômico das amostras isoladas e ambientais foram realizadas com sucesso utilizando o protocolo descrito por Fiore et al. (2000), que foi desenvolvido visando à obtenção de DNA de todos os gêneros de cianobactérias conhecidos até o momento. As Figuras 19 e 20 mostram a qualidade dos DNAs extraídos, sendo que para as amostras ambientais menor eficiência de extração foi obtida, possivelmente por apresentarem agentes contaminantes, que dificultaram o processo.

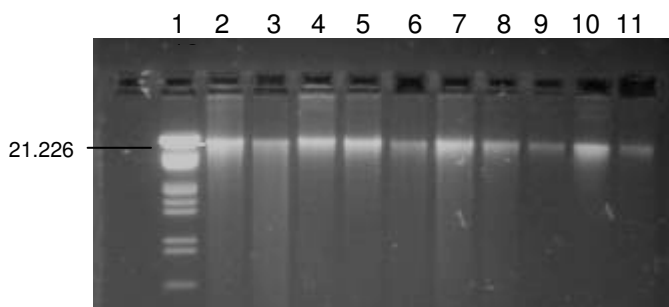


Figura 18 – Extração de DNA genômico das amostras isoladas. 1-marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III, 2- *Merismopedia* CENA106, 3- *Leptolyngbya* CENA104, 4- *Synechococcus* CENA108, 5- *Limnothrix* CENA109, 6- *Limnothrix* CENA111, 7- *Leptolyngbya* CENA112, 8- *Limnothrix* CENA110, 9- *Leptolyngbya* CENA103, 10- *Nostoc* CENA105, 11- *Nostoc* CENA107.

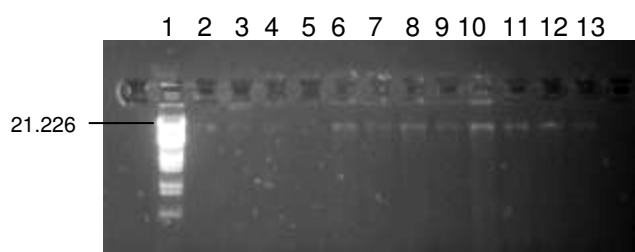


Figura 19 – Extração de DNA genômico das amostras ambientais. 1-marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III, 2- afluenta (16dez), 3- centro (16dez), 4- efluente (16dez), 5- tanque (16dez), 6- afluenta (25jan), 7- centro (25jan), 8- efluente (25jan), 9- tanque (25jan), 10- afluenta (13abr), 11- centro (13abr), 12- efluente (13abr) e 13- tanque (13abr).

4.5 Amplificação do DNAr 16S por PCR das linhagens isoladas

O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F1 e 1494Rc (NEILAN et al., 1997) foi usado com sucesso para amplificar seqüências de aproximadamente 1500 pb das 10 linhagens de cianobactérias isoladas neste estudo (Figura 20).

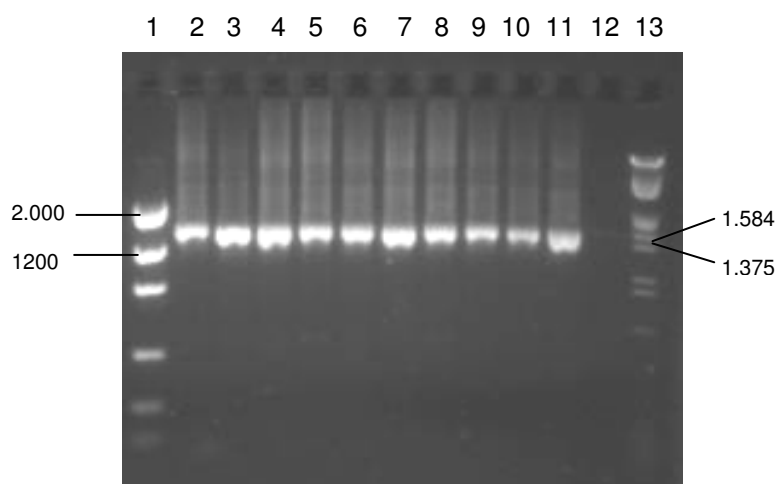


Figura 20 – Produtos de amplificação (oligonucleotídeos iniciadores 27F1/1494R) do gene RNAr 16S das amostras isoladas. 1-Marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2- *Merismopedia* CENA106, 3- *Leptolyngbya* CENA104, 4- *Synechococcus* CENA108, 5- *Limnothrix* CENA109, 6- *Limnothrix* CENA111, 7- *Leptolyngbya* CENA112, 8- *Limnothrix* CENA110, 9- *Leptolyngbya* CENA103, 10- *Nostoc* CENA105, 11- *Nostoc* CENA107, 12- controle negativo (sem DNA), 13- marcador molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III.

Após a confirmação dos tamanhos dos *amplicons* resultantes, os produtos frescos de amplificação foram clonados, a verificação dos insertos de interesse foi feita usando os iniciadores M13F/M13R, e os DNAs plasmidiais foram extraídos para posterior seqüenciamento.

4.6 Seqüenciamento dos *amplicons* de DNAr 16S e Análise Filogenética das linhagens isoladas

A seqüência de nucleotídeos do DNAr 16S foi processada praticamente em sua totalidade (1500 pb), baseando-se nas posições 27-1494 (correspondentes a numeração de *E. coli*) para as dez linhagens de cianobactérias isoladas neste estudo (Apêndice A). As seqüências geradas neste estudo e tamanho dos fragmentos obtidos encontram-se depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso (Tabela 13):

Tabela 13 – Número de acesso no GenBank das linhagens isoladas.

ISOLADOS	DEPÓSITO GENBANK	Tamanho Fragmento
<i>Merismopedia</i> sp. CENA106	EF088332	1483 pb
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA104	EF088333	1486 pb
<i>Synechococcus</i> sp. CENA108	EF088334	1483 pb
<i>Limnothrix</i> sp. CENA109	EF088335	1484 pb
<i>Limnothrix</i> sp. CENA111	EF088336	1484 pb
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA112	EF088337	1488 pb
<i>Limnothrix</i> sp. CENA110	EF088338	1484 pb
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA103	EF088339	1489 pb
<i>Nostoc</i> sp. CENA105	EF088340	1489 pb
<i>Nostoc</i> sp. CENA107	EF088341	1487 pb

Essas seqüências mostraram diferenças de identidade quando comparadas com outras seqüências de cianobactérias existentes em banco de dados públicos (NCBI). A análise BLAST da seqüência de DNAr 16S da *Merismopedia* CENA106, confirmada em análises morfológicas, foi comparada positivamente com a seqüência da *Merismopedia tenuissima* 0BB46S01 (AJ639891) (100% de identidade). As seqüências de *Limnothrix* sp. CENA109, *Limnothrix* sp. CENA110 e *Limnothrix* sp. CENA111 apresentaram 99% de identidade com *Limnothrix* sp. 165c (AJ505943). A análise BLAST da *Leptolyngbya* CENA104 resultou em 99% de identidade com a seqüência da *Plectonema boryanum* (*Leptolyngbya*) UTEX 485 (AF132793). Já a *Synechococcus* sp. CENA108 mostrou 99% de identidade de seqüência com *Synechococcus* sp. 0BB26S03 (AJ639899). Para a *Nostoc* sp. CENA105, *Leptolyngbya* sp. CENA112 e *Leptolyngbya* sp. CENA103, a análise BLAST revelou identidades menores a 95%, provavelmente essas linhagens ainda não foram descritas e necessitam de revisão. No entanto, para *Nostoc* sp. CENA107 96% de identidade com *Nostoc* sp. strain 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207) foi observada, conforme Tabela 14.

Tabela 14 – Análise BLAST realizada para as seqüências de RNAr 16S das amostras isoladas da lagoa facultativa de Cajati-SP.

ISOLADO	BLAST	% COBERTURA	E- VALUE	MÁXIMA IDENTIDADE
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 103 (EF088339)	<i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.LH70.1 16S (AY493574)	100%	0.0	94%
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 104 (EF088333)	<i>Leptolyngbya foveolarum</i> (X84808)	100%	0.0	99%
<i>Nostoc</i> sp. CENA 105 (EF088340)	<i>Nostoc</i> sp. 8941 (AY742448)	99%	0.0	94%
<i>Merismopedia</i> sp. CENA 106 (EF088332)	<i>Merismopedia tenuissima</i> 0BB46S01 (AJ639891)	100%	0.0	100%
<i>Nostoc</i> sp. CENA 107 (EF088341)	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)	100%	0.0	96%
<i>Synechococcus</i> sp. CENA 108 (EF088334)	<i>Synechococcus</i> sp. 0BB26S03 (AJ639899)	100%	0.0	99%
<i>Limnothrix</i> sp. CENA 109 (EF088335)	<i>Limnothrix redekei</i> 165c (AJ505943)	100%	0.0	99%
<i>Limnothrix</i> sp. CENA 110 (EF088338)	<i>Limnothrix redekei</i> 165c (AJ505943)	100%	0.0	99%
<i>Limnothrix</i> sp. CENA 111 (EF088336)	<i>Limnothrix redekei</i> 165c (AJ505943)	100%	0.0	99%
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA 112 (EF088337)	<i>Leptolyngbya frigida</i> ANT.LH70.1 (AY493574)	100%	0.0	94%

A relação filogenética das seqüências geradas neste estudo e outras provenientes do GenBank foi investigada utilizando os métodos de *Neighbor-Joining* e Parsimônia (Figuras 21 e 22). Todas as linhagens isoladas de cianobactérias formam um grupo monofilético nas árvores analisadas. Entretanto, três subgrupos podem ser notados dentro desse grupo maior: 1. Linhagens caracterizadas por células unicelulares pertencentes a ordem Chroococcales, 2. linhagens caracterizadas por tricomas não formadores de heterocitos pertencentes a ordem Oscillatoriales e 3. Linhagens caracterizadas por tricomas formadores de heterocitos em um plano de divisão pertencente a ordem Nostocales.

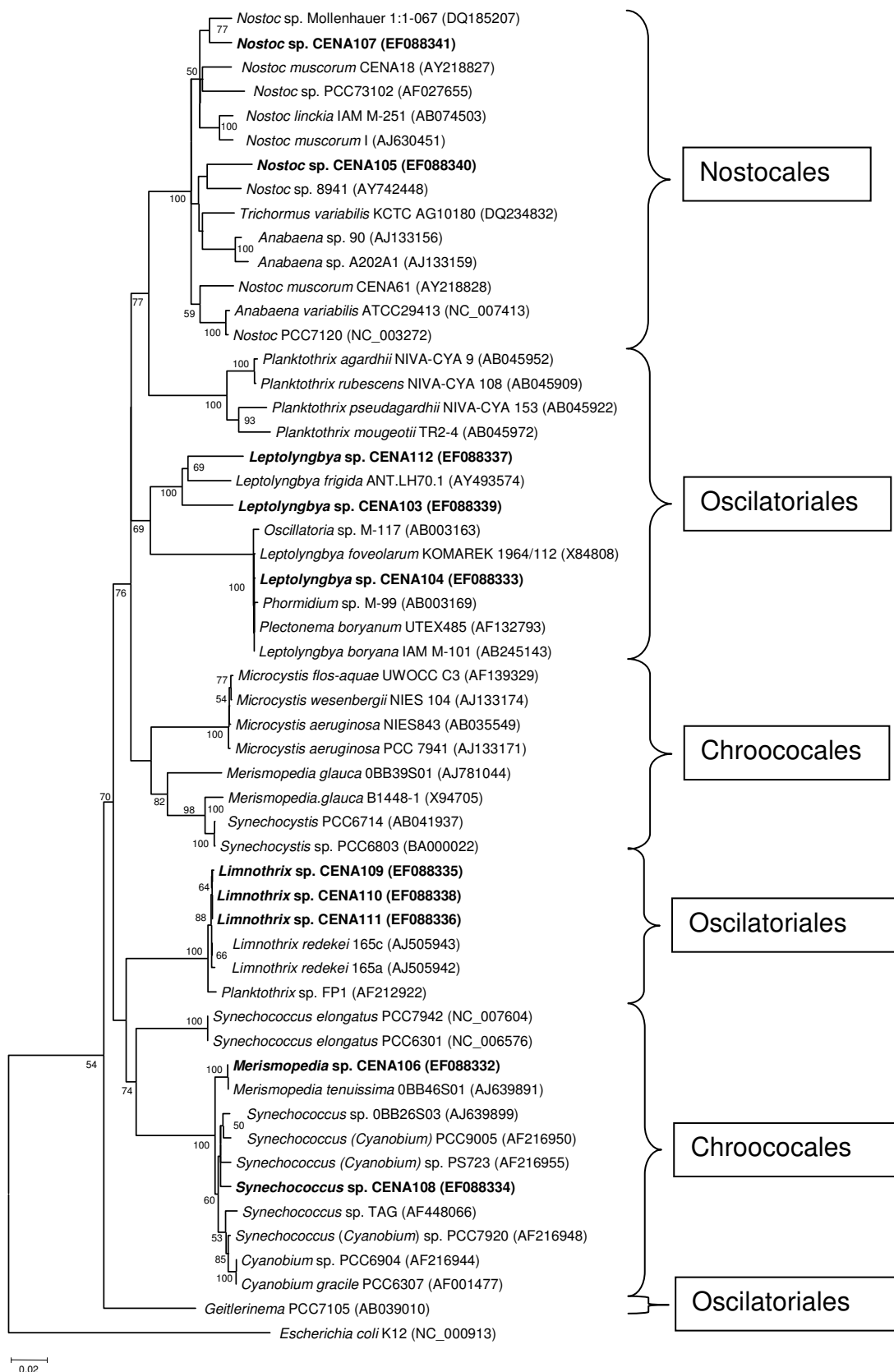


Figura 21 – Árvore filogenética do gene que codifica para o RNAr 16S construída pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 64238, Modelo Kimura 2-*parameter*, número de nucleotídeos 1280. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

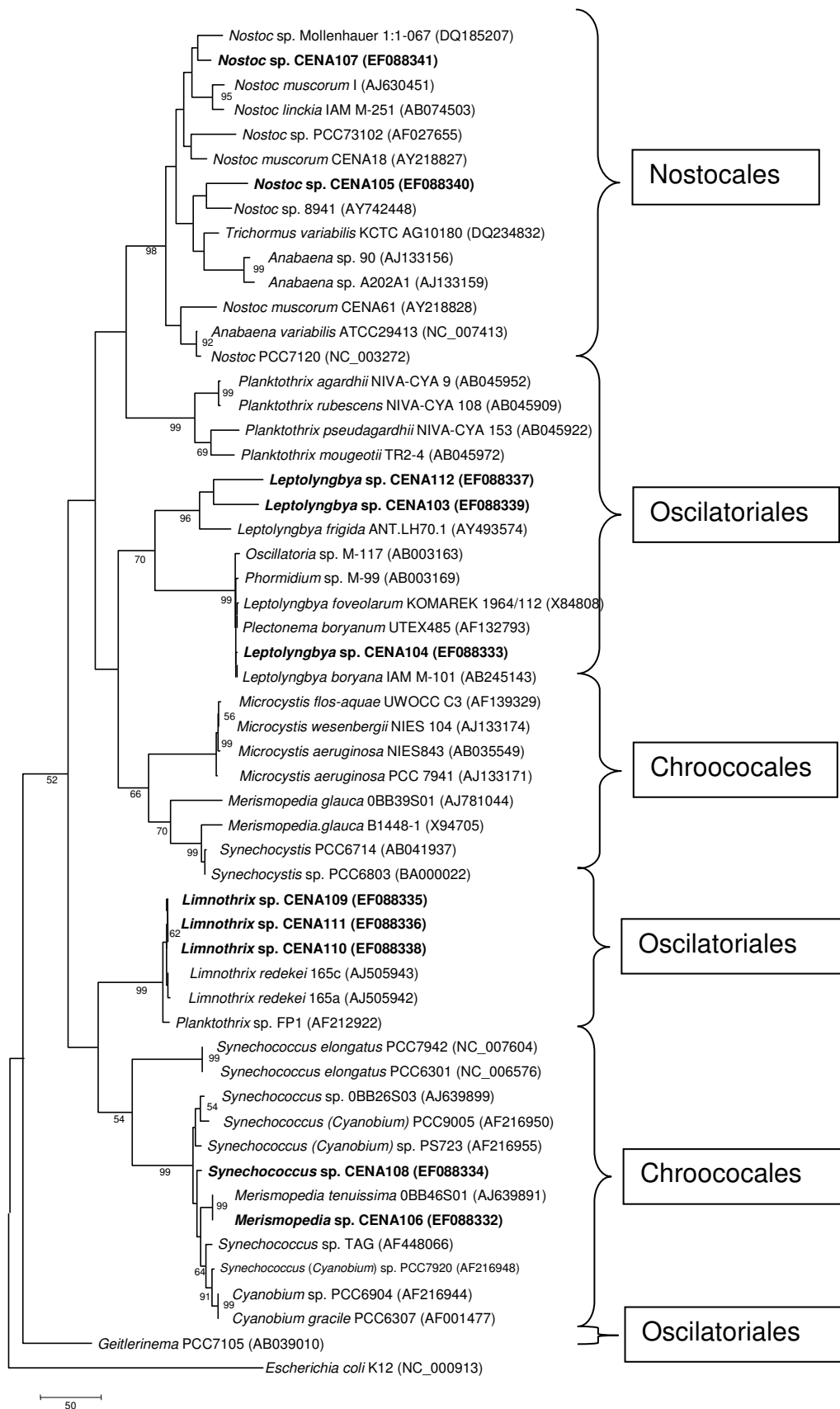


Figura 22 – Árvore filogenética do gene que codifica para o rRNA 16S construída pelo método da Máxima Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*=64238, número de nucleotídeos 1280. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

As árvores filogenéticas construídas, tendo como base as seqüências do gene DNAr 16S, mostraram que *Nostoc* sp. CENA105 e *Nostoc* sp. CENA107 agruparam-se de forma coerente com outros membros da ordem Nostocales.

As *Leptolyngbya* sp. CENA103 e *Leptolyngbya* sp. CENA112 formaram uma ramificação com *Leptolyngbya* CENA104 no clado das Oscillatoriales nos dois métodos analisados. Outro clado independente para membros da ordem Oscillatoriales foi formado com *Limnothrix* sp. CENA109, *Limnothrix* sp. CENA110 e *Limnothrix* sp. CENA111, quando usados ambos os métodos (NJ e MP). *Gleiterinema* PCC7105 (AB039010) não se ramificou no clado das *Limnothrix* nos dois métodos testados.

Dentre as Chroococcales *Merismopedia* sp. CENA106 posicionou-se na mesma ramificação que *Merismopedia tenuissima* 0BB46S01, nos dois métodos avaliados, e *Synechococcus* sp. CENA108 também se agrupou com membros da ordem Chroococcales.

Apesar da origem polifilética envolvendo as formas unicelulares e de filamentos simples, os resultados obtidos mostraram cladogramas claramente distintos. O primeiro deles encontra-se composto pelos membros da ordem Nostocales, enquanto que os demais (Oscillatoriales e Chroococcales) se posicionam de forma alterada.

O grupo das cianobactérias normalmente é considerado monofilético mesmo apresentando diversidade morfológica, porém apresenta cladogramas polifiléticos em suas ordens. Análises do DNAr 16S realizadas por Tomitani et al. (2006) mostraram que as cianobactérias filamentosas sem diferenciação celular (subseção III) se misturam com as espécies unicelulares (subseção I e II), indicando que a morfologia filamentosa tem origem polifilética dentro do grupo das cianobactérias e também que algumas cianobactérias das subseções I-IV formam cladogramas com topologias internas conservadas. Esses resultados foram observados nos dois métodos utilizados, *Neighbor-Joining* e Máxima Parsimônia.

As formas filamentosas com heterocitos são monofiléticas, mas as formas unicelulares e de filamentos simples sem distinção celular são heterogêneas e compreendem várias linhagens distintas (HOFFMANN et al., 2005), em concordância com os resultados obtidos neste estudo.

Apesar das três seqüências de *Limnothrix* sp. estarem no mesmo clado que a *Planktothrix* sp. FP1 (AF212922), análise BLAST feita para esta linhagem, tendo em vista as seqüências disponíveis no GenBank, resultou 98% de identidade com *Limnothrix redekei* (AJ505943, AJ505942, AJ505941).

4.7 Mini-Biblioteca de *amplicons* da Região *cpcBA*

A amplificação por PCR da região *cpcBA* do operon da ficocianina (Figura 24), usando a amostra ambiental da lagoa facultativa de Cajati (afluente, centro e efluente do sistema), coletada em 16 dez 2004, gerou *amplicons* com aproximadamente 600 pb, conforme o esperado.

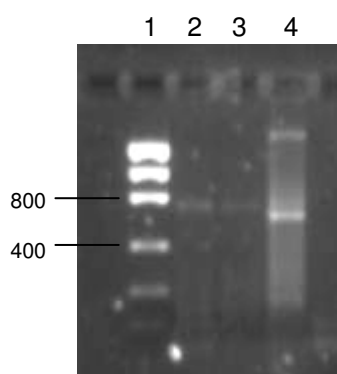


Figura 23 – Produtos de amplificação usando oligonucleotídeos iniciadores para a região *cpcBA* da lagoa facultativa de Cajati. 1-marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2- afluente (16dez), 3- centro (16dez), 4- efluente (16dez).

Os produtos da PCR, mostrados na Figura 24, foram utilizados para a construção da mini-biblioteca da região *cpcBA*. Após a clonagem, novas reações de amplificação foram realizadas usando 34 clones de cada ponto amostrado da lagoa facultativa, totalizando 112 clones, visando à confirmação dos clones transformantes. Os oligonucleotídeos iniciadores M13F/M13R foram utilizados para essa finalidade (Figura 25).

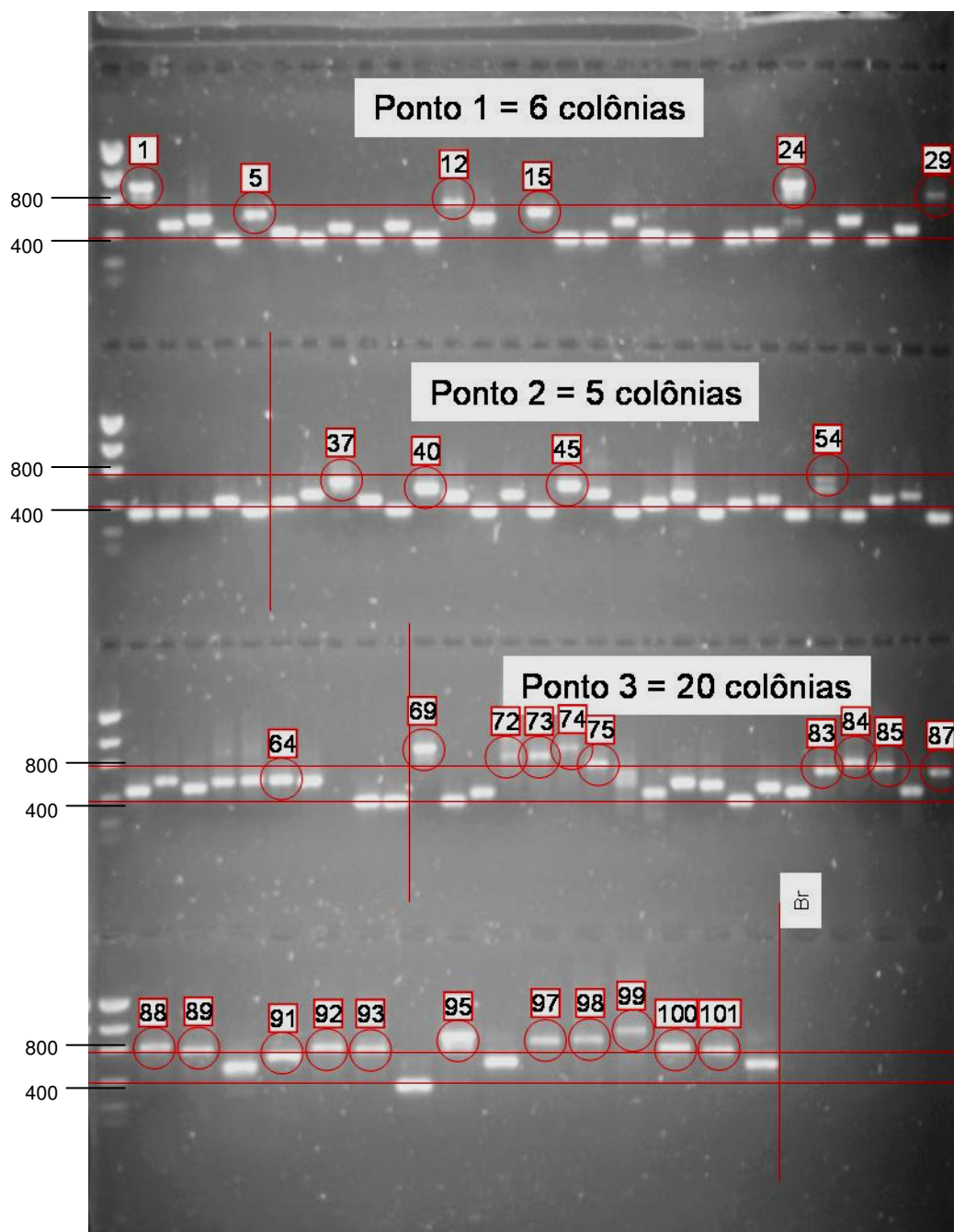


Figura 24 – Produtos de amplificação do gene *cpcBA* (ficocianina) com oligonucleotídeos iniciadores M13R/M13F de 112 clones oriundos da lagoa facultativa de Cajati. Br – controle negativo (sem DNA). As amostras destacadas com a numeração de seus respectivos clones foram seqüenciadas.

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 24 mostraram variação no tamanho dos fragmentos produzidos na PCR. Por esse motivo, optou-se por selecionar apenas os fragmentos que resultaram em 600 pb, aproximadamente, para as demais análises. Assim, foram seqüenciados 6 clones do ponto 1 (afluente), 5 clones do ponto 2 (centro) e 20 clones do ponto

3 (efluente). Os pontos 29 e 97 foram seqüenciados, mas não foi possível a montagem em um *contig*.

Os oligonucleotídeos iniciadores PC β F e PC α R, usados neste estudo, apresentaram resultado considerado satisfatório para linhagens de *Microcystis* sp. e *Anabaena* sp. Esse resultado pode ser confirmado em estudos realizados por Lorenzi (2004), que obteve produtos de amplificação para clones desses mesmos gêneros, confirmados por meio de seqüenciamento.

Somente 3 seqüências formaram um *contig*, quando processadas utilizando o pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed. Para as demais seqüências (29), *contigs* pequenos e/ou com qualidade baixa foram encontrados, não contemplando o espaço intergênico da ficocianina (*cpcBA-IGS*), utilizado na diferenciação dos gêneros de cianobactérias.

Foram analisadas através de BLAST as três seqüências geradas da região *cpcBA*, conforme Tabela 15.

Tabela 15 – Identidade através de BLAST das seqüências geradas com o gene de ficocianina.

CLONE	% COBERTURA	MÁXIMA IDENTIDADE	ORGANISMO
Cajati 01 (639 pb)	98	75	<i>Anabaena lemmermannii</i> AnaDalai (AY 702241)
Cajati 24 (698 pb)	94	73	<i>Microcoleus</i> sp. PCC8701 (AY768472)
Cajati 95 (720 pb)	92	75	<i>Anabaena sphaerica</i> UTEX 'B1616' (DQ439645)

A relação filogenética das seqüências geradas neste estudo e outras provenientes do GenBank foi investigada utilizando os métodos de *Neighbor-Joining* e Parsimônia (Figuras 25 e 26).

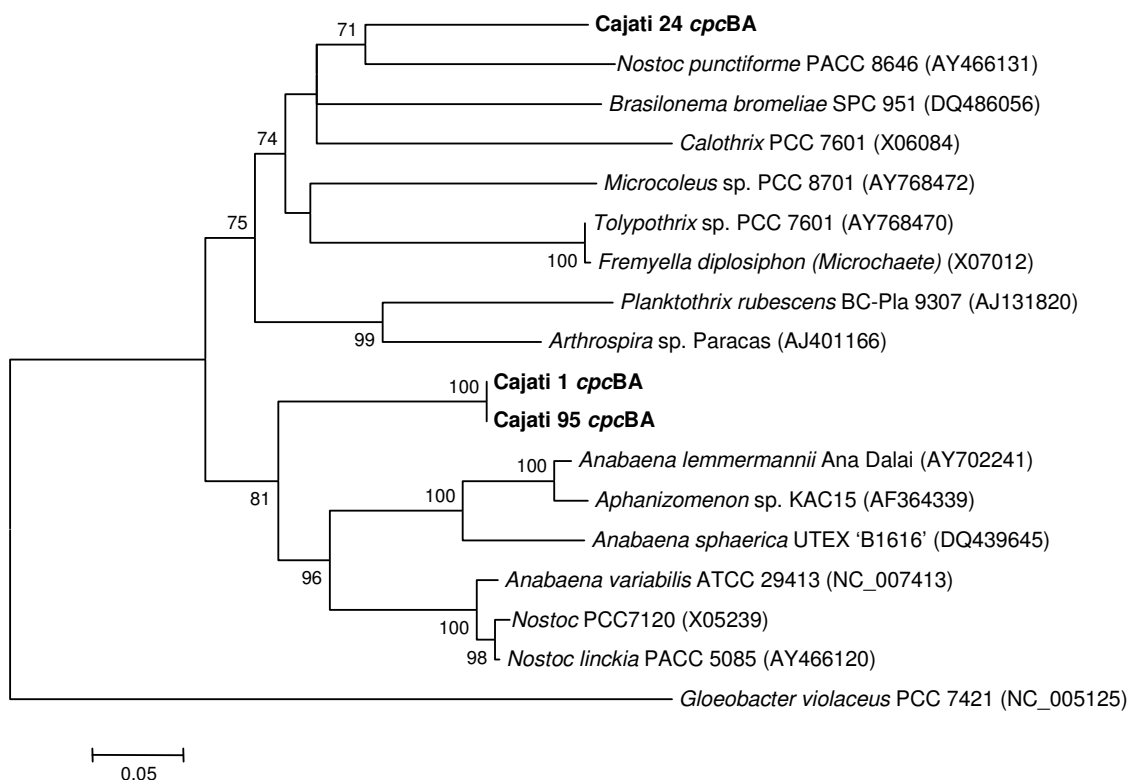


Figura 25 – Árvore filogenética baseada na seqüência de *cpcBA*-IGS de cianobactérias construída pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*=75906, modelo Kimura-2 *parameter*, número de nucleotídeos 492. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

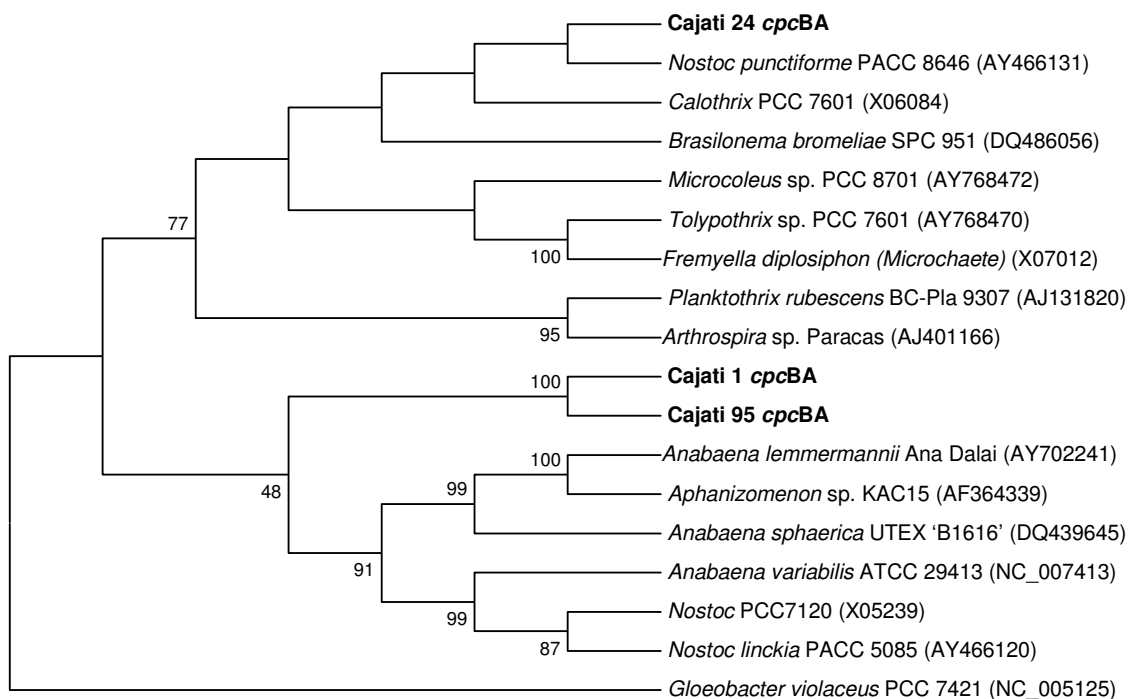


Figura 26 – Árvore filogenética baseada na seqüência de *cpcBA*-IGS de cianobactérias construída pelo método da Máxima Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*=20522, número de nucleotídeos 492. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

As árvores filogenéticas construídas, tendo como base as seqüências de *cpcBA*-IGS de cianobactérias, mostraram que Cajati 1 e Cajati 95 agruparam-se em 100% das reamostragens de forma coerente com outros membros da ordem Nostocales (Família Nostocaceae), nos dois métodos analisados.

Já Cajati 24 agrupou-se com *Nostoc punctiforme* PACC 8646 (AY466131), formando um subgrupo com membros da ordem Nostocales, em ambos os métodos. O agrupamento formado com *Microcoleus* sp. PCC 8701 (AY768472) apresentou seqüências das ordens Nostocales e Oscillatoriales. Apesar de Cajati 24 ter apresentado identidade de 73% através de análise BLAST com esse *Microcoleus*, essas seqüências não estão posicionadas no mesmo subgrupo.

Existe somente uma seqüência de *cpcBA*-IGS de cianobactérias do gênero *Microcoleus* depositada no GenBank e a mesma não foi publicada ainda, dificultando, assim, informações sobre essa linhagem.

4.8 Detecção do domínio NMT do gene *mcyA*

A amplificação por PCR do domínio da *N*-Metiltransferase (NMT) do gene *mcyA*, um dos 10 genes relacionados a biossíntese da microcistina, foi feita nas amostras isoladas e ambientais. Foi utilizado o conjunto de indicadores MSF/MSR, buscando-se a amplificação de fragmentos com 1300 pb (Figura 27).



Figura 27 – Produtos de amplificação do gene *mcyA* das cianobactérias isoladas. 1- Marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 2- ponto 1 (16dez), 3- ponto 2 (16dez), 4- ponto 3 (16dez), 5- ponto 4 (16dez), 6- ponto 1 (25jan), 7- ponto 2 (25jan), 8- ponto 3 (25jan), 9- ponto 4 (25jan), 10- ponto 1 (13abr), 11- ponto 2 (13abr), 12- ponto 3 (13abr) e 13- ponto 4 (13abr), 14- *Merismopedia* CENA106, 15- *Leptolyngbya* CENA104, 16- *Synechococcus* CENA108, 17- *Limnothrix* CENA109, 18- *Limnothrix* CENA111, 19- *Leptolyngbya* CENA 112, 20- *Limnothrix* CENA110, 21- *Leptolyngbya* CENA103, 22- *Nostoc* CENA105, 23- *Nostoc* CENA107, 24- controle negativo (sem DNA), 25-Marcador molecular *Low DNA Mass Ladder*, 26-controle positivo.

No entanto, os resultados foram negativos para todas as amostras analisadas, sugerindo que alguns problemas nas reações de amplificação possam ter ocorrido ou ainda a existência de linhagens tóxicas no local amostrado, uma vez que os resultados do teste ELISA apontaram resultados positivos (conforme item 4.10).

Os três *operons* descritos para microcistina e um para nodularina são diferentes entre si (conforme Figura 9). Devido a essa diversidade dos genes e de seus distintos agrupamentos, relacionados a biossíntese da microcistina, as seqüências podem apresentar diferenças também. Interessante seria testar novos conjuntos de oligonucleotídeos tendo como alvo outros genes do *operon* da microcistina nas amostras isoladas nesse estudo, por exemplo os genes *mcyD* e *mcyE*.

4.9 Distribuição dos genes PKS e NRPS

Para estimar o potencial de biossíntese de metabólitos secundários nas linhagens de cianobactérias isoladas utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados para a detecção de genes NRPS e PKS.

Peptídeos sintetase não-ribossômicos (NRPS) possuem estrutura modular, na qual cada módulo funciona como construtor de blocos

responsáveis por uma incorporação e/ou modificação de uma única unidade de aminoácido, tipicamente composto por domínio de adenilação, domínio de tiolação e domínio de condensação (BARRIOS-LLERENA et al., 2007). O conjunto de iniciadores MTF/MTR foi usado para amplificar fragmento de NRPS e tem como alvo o domínio de adenilação (A) dessas enzimas e produzem fragmentos de aproximadamente 1000 pares de bases. A seqüência desse domínio A possui regiões bem conservadas, o que permite que iniciadores degenerados amplifiquem por PCR produtos em todas as linhagens que abrigam genes correspondentes (Figura 28).

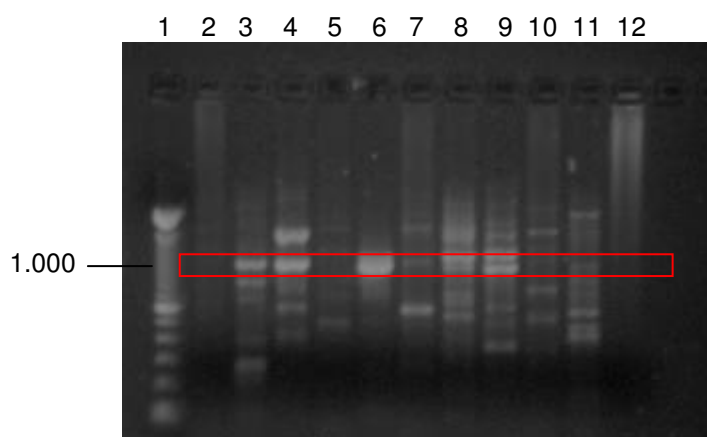


Figura 28 – Produtos de amplificação do gene para NRPS. 1-Marcador molecular 100 pb DNA Ladder, 2- *Leptolyngbya* CENA103, 3-*Leptolyngbya* CENA104, 4- *Nostoc* CENA105, 5-*Synechococcus* CENA106, 6- *Nostoc* CENA107, 7- *Merismopedia* CENA108, 8- *Limnothrix* CENA109, 9- *Limnothrix* CENA110, 10- *Limnothrix* CENA111, 11- *Leptolyngbya* CENA112, 12- controle negativo (sem DNA).

As linhagens *Leptolyngbya* CENA 104, *Nostoc* CENA 105, *Nostoc* CENA 107, *Limnothrix* CENA 109 e *Limnothrix* CENA 110 apresentaram o fragmento esperado de 1000 pares de bases para o gene NRPS. Bandas com menor intensidade de amplificação também foram obtidas para *Synechococcus* CENA 108, *Limnothrix* CENA 111 e *Leptolyngbya* CENA 112. Assim, dentre as dez linhagens isoladas, oito delas apresentaram resultados positivos para o gene de NRPS (80%) (Figura 28).

Policetídeo sintase do tipo I (PKS) são enzimas multifuncionais, organizadas em módulos, responsáveis por um ciclo na cadeia de alongação e são atualmente representativas em todas as cianobactérias isoladas de PKS (BARRIOS-LLERENA et al., 2007). O conjunto de iniciadores degenerados

KSF/KSR, que amplifica regiões do domínio da cetossintase (KS) das PKS tipo I, foram utilizados para a reação de PCR e os produtos resultantes podem ser visualizados na Figura 29.

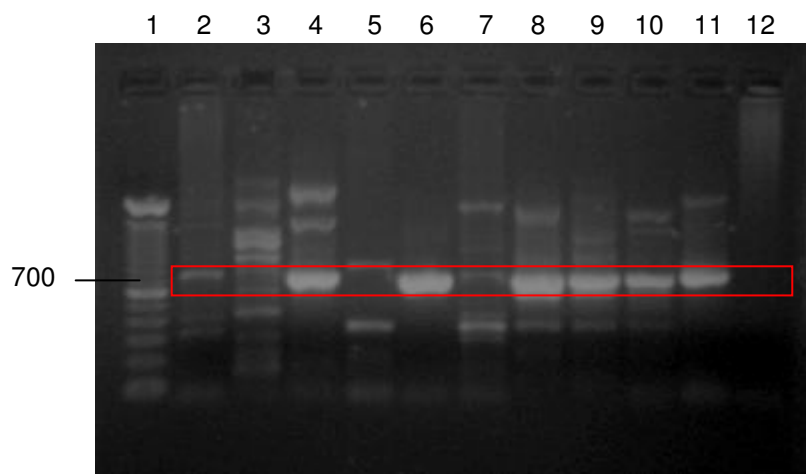


Figura 29 – Produtos de amplificação do gene para PKS. 1-Marcador molecular 100 pb DNA Ladder, 2- *Leptolyngbya* CENA103, 3-*Leptolyngbya* CENA104, 4- *Nostoc* CENA105, 5-*Synechococcus* CENA106, 6- *Nostoc* CENA107, 7- *Merismopedia* CENA108, 8- *Limnothrix* CENA109, 9- *Limnothrix* CENA110, 10- *Limnothrix* CENA111, 11- *Leptolyngbya* CENA 112, 12- controle negativo (sem DNA).

Para o gene PKS, as linhagens *Nostoc* CENA 105, *Nostoc* CENA 107, *Limnothrix* CENA 109, *Limnothrix* CENA 110, *Limnothrix* CENA111 e *Leptolyngbya* CENA 112 apresentaram o fragmento esperado de 700 pares de bases para o gene. Com menor intensidade de amplificação a *Leptolyngbya* CENA 103 e *Synechococcus* CENA 108 também apresentaram resultados positivos. Das dez linhagens analisadas, oito apresentaram o fragmento esperado de bases (80%).

Segundo Ehrenreich et al. (2005), obtêm-se resultados negativos para NRPS e PKS mesmo quando atividades são detectadas, sugerindo que essas atividades podem ter sido produzidas por outros sistemas além dos genes PKS e NRPS.

As linhagens *Nostoc* CENA 105, *Nostoc* CENA 107, *Limnothrix* CENA 109, *Limnothrix* CENA 110, *Limnothrix* CENA111 e *Leptolyngbya* CENA 112 as quais apresentaram resultados positivos para PKS foram seqüenciadas (Apêndice A) e seus produtos analisados através de ferramentas disponíveis na Internet.

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 16. Múltiplos produtos foram obtidos para as linhagens analisadas.

Tabela 16 – Resultado dos Domínios de Peptídeos para as linhagens isoladas quando comparadas com o banco de dados disponível em NPBiogene.

ISOLADO	PKS
<i>Nostoc</i> CENA 105	clone 2 nostopeptolida (nosB)
	clone 3 nostopeptolida (nosB)
	clone 5 nostopeptolida (nosB)
<i>Nostoc</i> CENA 107	clone 8 leinamicina (KS8)
	clone 9 curacina (curG)
	clone 11 nostopeptolina (nosB)
	clone 12 curacina (curG)
<i>Limnothrix</i> CENA 109	clone 13 chivosazol (Chic KS8)
	clone 14 chivosazol (Chic B-KS-3)
	clone 17 chivosazol (Chic KS7)
	clone 18 disorazola (KS1)
<i>Limnothrix</i> CENA 110	clone 19 chivosazol (Chic KS8)
	clone 20 chivosazol (Chic B-KS-3)
	clone 23 pederin (pedI-KS3)
	clone 24 chivosazol (ChicE-KS13)
<i>Limnothrix</i> CENA 111	clone 25 chivosazol (Chic KS8)
	clone 27 chivosazol (Chic KS8)
	clone 29 chivosazol (Chic-KS8)
	clone 30 chivosazol (Chic-KS8)
	clone 31 microcistina (KS1)
<i>Leptolyngbya</i> CENA 112	clone 32 barbamida (barE – KS)
	clone 33 microcistina

Nostopeptolidas são produzidas pela cianobactéria terrestre *Nostoc* sp. GSV224 e são octapeptídeos acilados ramificados com estrutura lactona heptapeptídeo. Um componente não usual é o acetato de leucil, derivado de leucil e intermediado pela adição de acetato, desta maneira, adicionada diretamente no sistema NRPS e PKS. A estrutura de anel consiste em sete amino (imino) ácidos e uma unidade de acetato. O agrupamento do gene *nos* contém três genes NRPS (*nosA*, *C* e *D*) e um gene PKS (*nosB*) para a inserção do acetato e dois genes *nos E* e *F* envolvidos na formação da 4-metil-prolina (WELKER e DÖHREN, 2006). Os peptídeos identificados de *Nostoc* CENA 105

e *Nostoc* CENA 107 apresentaram maior identidade com esse composto. O gene *nosB* é composto por 1244 aminoácidos e apresenta homologia com barbamida BarE e microcistina *mcyG*, os quais são domínios de PKS (HOFFMANN et al., 2003). Barrios-Llerena et al. (2007) observaram o gene *nosB* nas linhagens de *Tolypothrix* sp. PCC7110, *Leptolyngbya* sp. PCC7410 e *Plectonema boryanum* PCC73110.

A estrutura química e o operon de nostopeptolida podem ser observados na Figura 30.

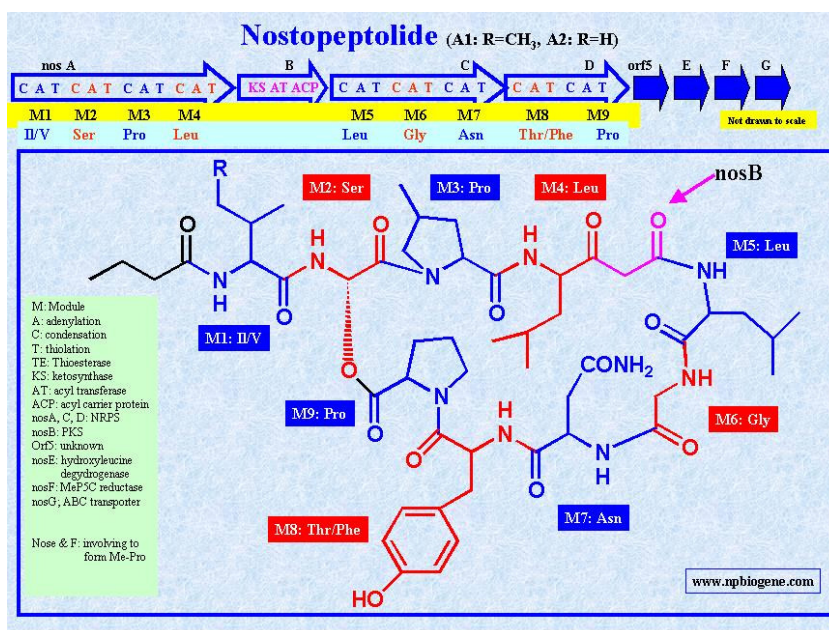


Figura 30 – Estrutura química e operon de Nostopeptolida. Fonte: NPBiogene.

Curacinas são policetídeos com uma única cisteína convertida a tiazolidina e são produzidas pelas linhagens de *Lyngbya majuscula*. Seu agrupamento contém 14 genes, incluindo oito PKSs mono modulares e um híbrido PKS-NRPS (CurF), com domínios hetero de ciclização, ativação Cys e tioração. A formação não usual de CurA é de proteínas carreadores acil, seguidas de módulos adjacentes autônomos (CurB-E). Essa região em particular é similar a outro policetídeo produzido também por *Lyngbya*, a jamaicamida (WELKER e DÖHREN, 2006). Os nucleotídeos seqüenciados de *Nostoc* CENA 107 apresentaram maior identidade com esse composto. No entanto, Barrios-Llerena et al. (2007) observaram o gene *curA* KS1 em *Gloeothecae* sp. ATCC27152.

A estrutura química e o operon de curacina podem ser observados na Figura 31.

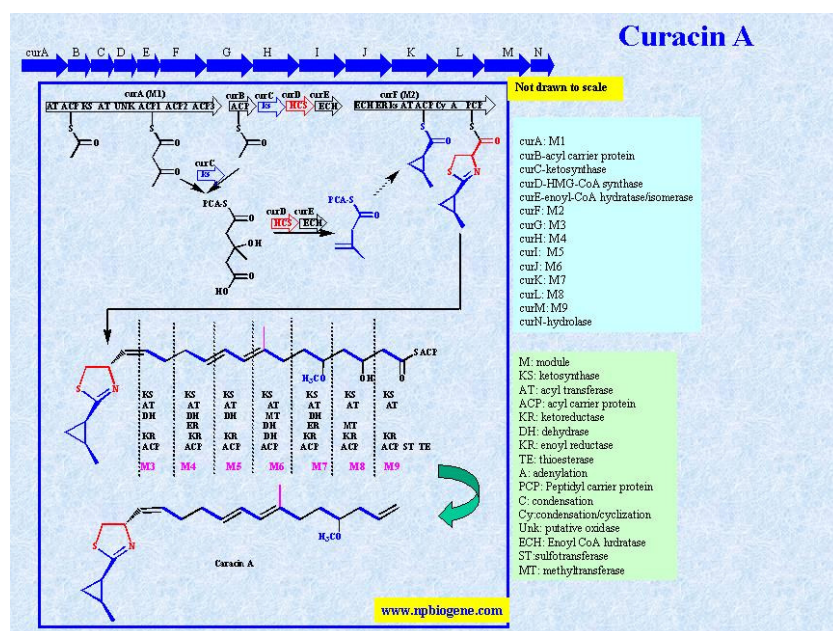


Figura 31 – Estrutura química e operon de Curacina. Fonte: NPBiogene.

Inicialmente, a barbamida foi obtida de extrato lipídico da coleção de *Lyngbya majuscula* de Curaçao, possuindo vários elementos de estruturas únicas, incluindo o grupo atriclorometil. Técnicas de espectrometria foram utilizadas para elucidar sua química e estrutura. Ensaios preliminares indicam que barbamida possui atividades antimolucida. Todavia, esse composto aparenta ser inativo em outros ensaios e suas propriedades biológicas continuam desconhecidas (RAMASWAMY et al., 2006).

É formada por 12 genes em duas ou três unidades de transcrição. Entretanto, barbamida é sintetizada por sistema misto PKS/NRPS com características não usuais, que incluem domínios distintos PCP e A, como também o módulo de PKS que codifica para duas ORFs separadas (hemi-modular) (CHANG et al., 2002).

Barbamida é um dos cerca de 200 metabólitos bioativos produzidos por cianobactérias de origem marinha, sendo a maioria deles isolados de *Lyngbya majuscula*. O domínio de adenilação do gene barE aceita especificamente 3-cloro-Leu, mas não está claro onde 3-cloro-Leu é intermediário livre ou é, de alguma maneira, canalizado entre barA e barE (WELKER e DÖHREN, 2006). Os peptídeos identificados de *Leptolyngbya* CENA 112 apresentaram maior

identidade com esse composto, apesar de Barrios-Llerena et al. (2007) terem observado o gene *barE* KS em *Planktothrix* sp. PCC7811.

A estrutura química e o operon de barbamida podem ser observados na Figura 32.

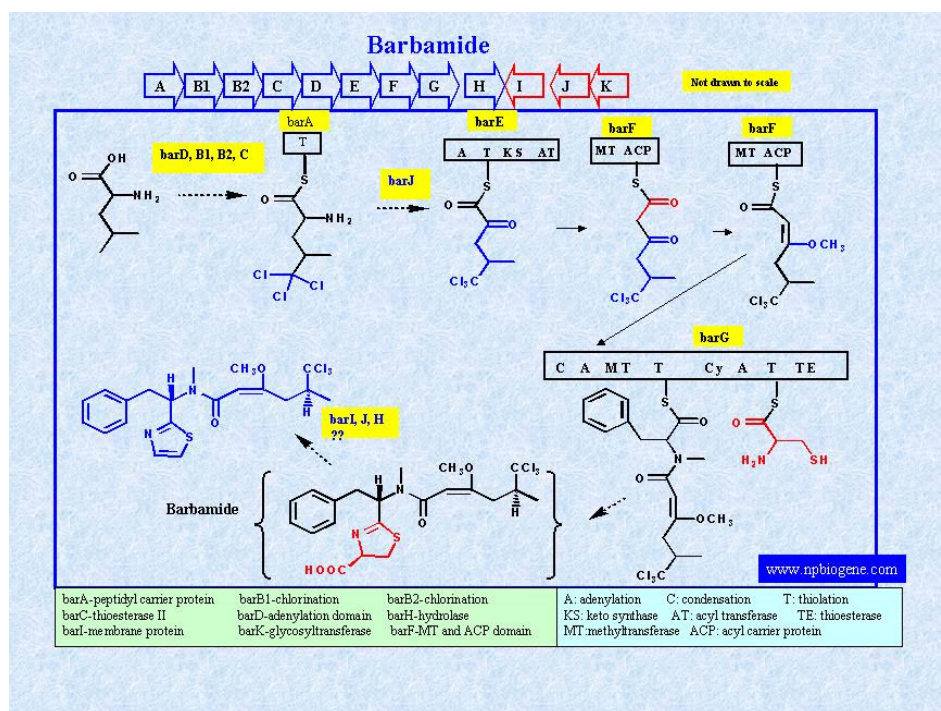


Figura 32 – Estrutura química e operon de Barbamida. Fonte: NPBiogene.

As microcistinas são hepatotoxinas produzidas por cianobactérias e sua complexa via biossintética é um dos muitos sistemas modulares multi-enzimáticos envolvendo domínios de NRPS e PKS (TILLET et al., 2000). Os peptídeos identificados de *Leptolyngbya* CENA 112 apresentaram maior identidade com esse composto, da mesma forma que Barrios-Llerena et al. (2007) obtiveram resultados positivos para microcistina KS2 em linhagem de *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4.

Microcistina e nodularina são caracterizadas pelo aminoácido Adda na posição 5 e derivadas de aspartato nas posições 5, 6 e 3, respectivamente, do anel (WELKER e DÖHREN, 2006). Três agrupamentos de biossintese de microcistina em cianobactérias já foram descritos até o momento, conforme Figura 9.

A estrutura química e o operon da microcistina podem ser observados na Figura 33.

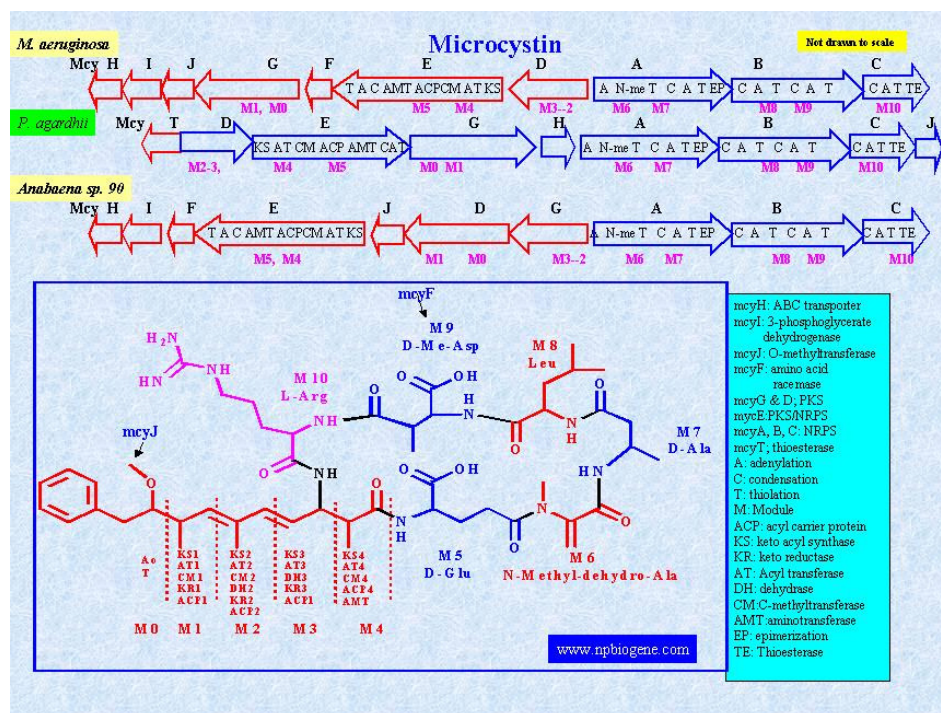


Figura 33 – Estrutura química e *operon* da Microcistina. Fonte: NPBiogene.

Essas seqüências transcritas em peptídeos demonstraram diferenças de identidade quando comparadas com seqüências de cianobactérias de banco de dados públicos. A análise BLAST das proteínas (Tabela 17) e seqüências representantes dos peptídeos que apresentaram identidade com as linhagens isoladas auxiliaram na seleção de outras seqüências para a construção de árvores filogenéticas. Dessa forma, inferências filogenéticas foram feitas a partir da construção de árvores pelos métodos *Neighbor-Joining* e *Máxima Parsimônia*.

Tabela 17 – BLAST realizado com seqüências transcritas em proteínas das linhagens isoladas para o gene PKS.

Isolados	Organismo	E-Value	Identidade	Positivos
<i>Nostoc</i> CENA105 (clone2)	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (ZP_00345638)	3e-78	152/219 (69%)	183/219 (83%)
<i>Nostoc</i> CENA105 (clone3)	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC29413 (YP_325326)	3e-82	148/164 (90%)	158/164 (96%)
<i>Nostoc</i> CENA105 (clone5)	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (ZP_00345638)	1e-87	168/246 (68%)	202/246 (82%)
<i>Nostoc</i> CENA107 (clone8)	<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101 (YP_723336)	6e-94	162/224 (72%)	193/224 (86%)
<i>Nostoc</i> CENA107 (clone9)	CurG [<i>Lyngbya majuscula</i>] (AAT70102)	4e-99	176/232 (75%)	195/232 (84%)
<i>Nostoc</i> CENA107 (clone11)	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_322130)	1e-123	211/237 (89%)	225/237 (94%)
<i>Nostoc</i> CENA107 (clone12)	CurG [<i>Lyngbya majuscula</i>] (AAT70102)	5e-100	179/237 (75%)	198/237 (83%)
<i>Leptolyngbya</i> CENA112 (clone31)	<i>Planktothrix agardhii</i> NIVA-CYA 126/8 (CAD29795)	2e-96	164/234 (70%)	191/234 (81%)
<i>Leptolyngbya</i> CENA112 (clone32)	<i>Anabaena</i> sp. 90 (AAO62585)	4e-102	173/246 (70%)	202/246 (82%)
<i>Leptolyngbya</i> CENA112 (clone33)	<i>Anabaena</i> sp. 90 (AAO62585)	4e-99	169/241 (70%)	197/241 (81%)

As seqüências selecionadas para a construção das árvores filogenéticas foram BarE (AAN32979) [*Lyngbya majuscula*], NosB (AAF15892) [*Nostoc* sp. GSV224], CurG (AAT70102) [*Lyngbya majuscula*], Leinamicina (AAN85523) [*Streptomyces atroolivaceus*], *Polyangium cellulorum* (AAY89053), *Polyangium cellulorum* (AAY89052), Disorazole (DQ013294) [*Polyangium cellulorum* linhagem So ce12], Microcistina (AY212249) [*Anabaena* sp. 90], Pederin (AAR19304) [bactéria simbiótica de *Paederus fuscipes*], *Anabaena* sp. 90 (AAO62585), *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 (CAD29795), *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (YP_723336), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_325326), *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (ZP_00345638), *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_322130), *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (CAG23964), *Candidatus Endobugula sertula* (ABM63527), Microcistina (CAD60099) *Anabaena circinalis* 90 e *Streptomyces venezuelae* PikAI (AAC69329) para enraizar as árvores, conforme Figuras 34 e 35.

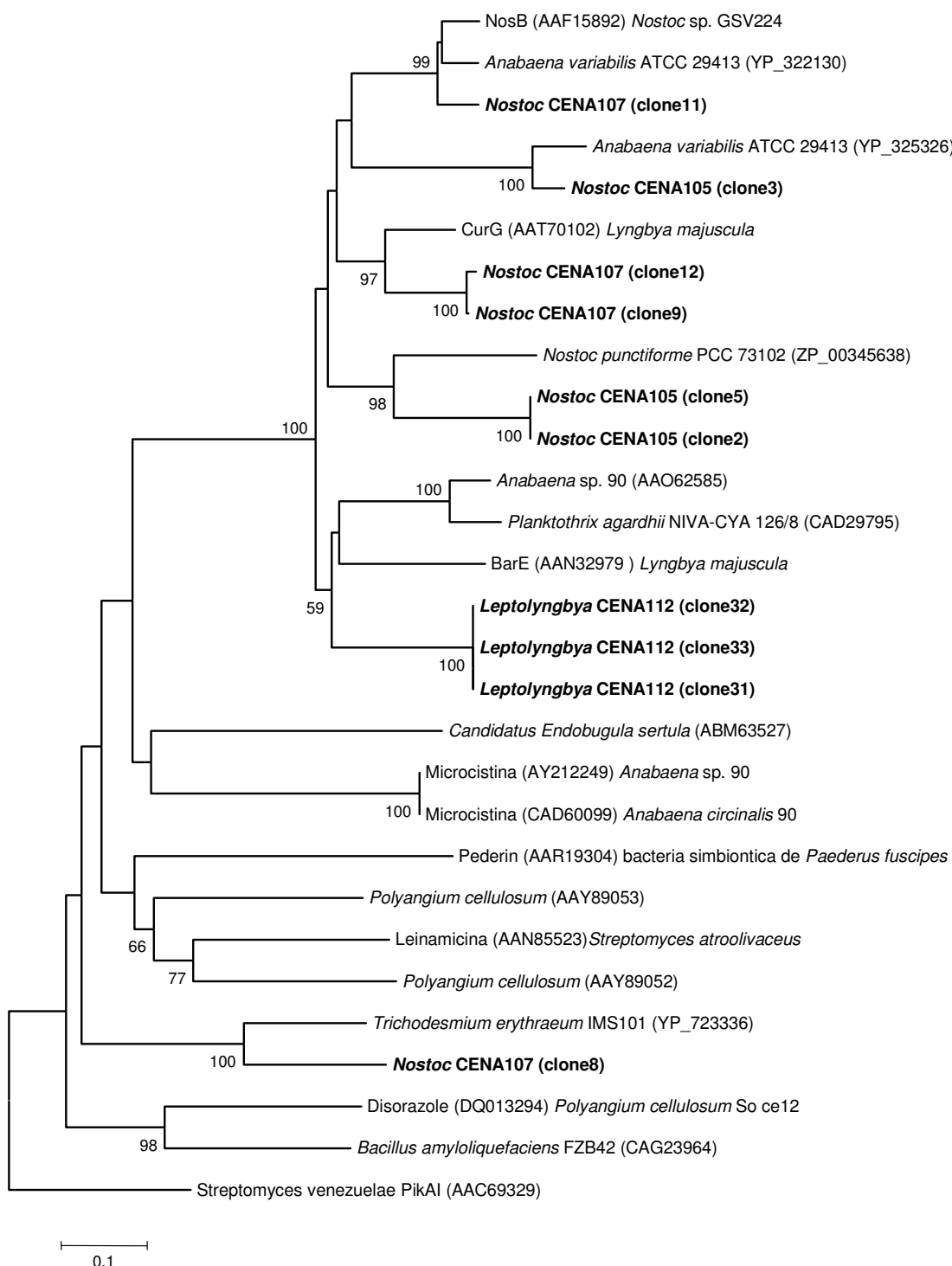


Figura 34 – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construídas pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 64238, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 159. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

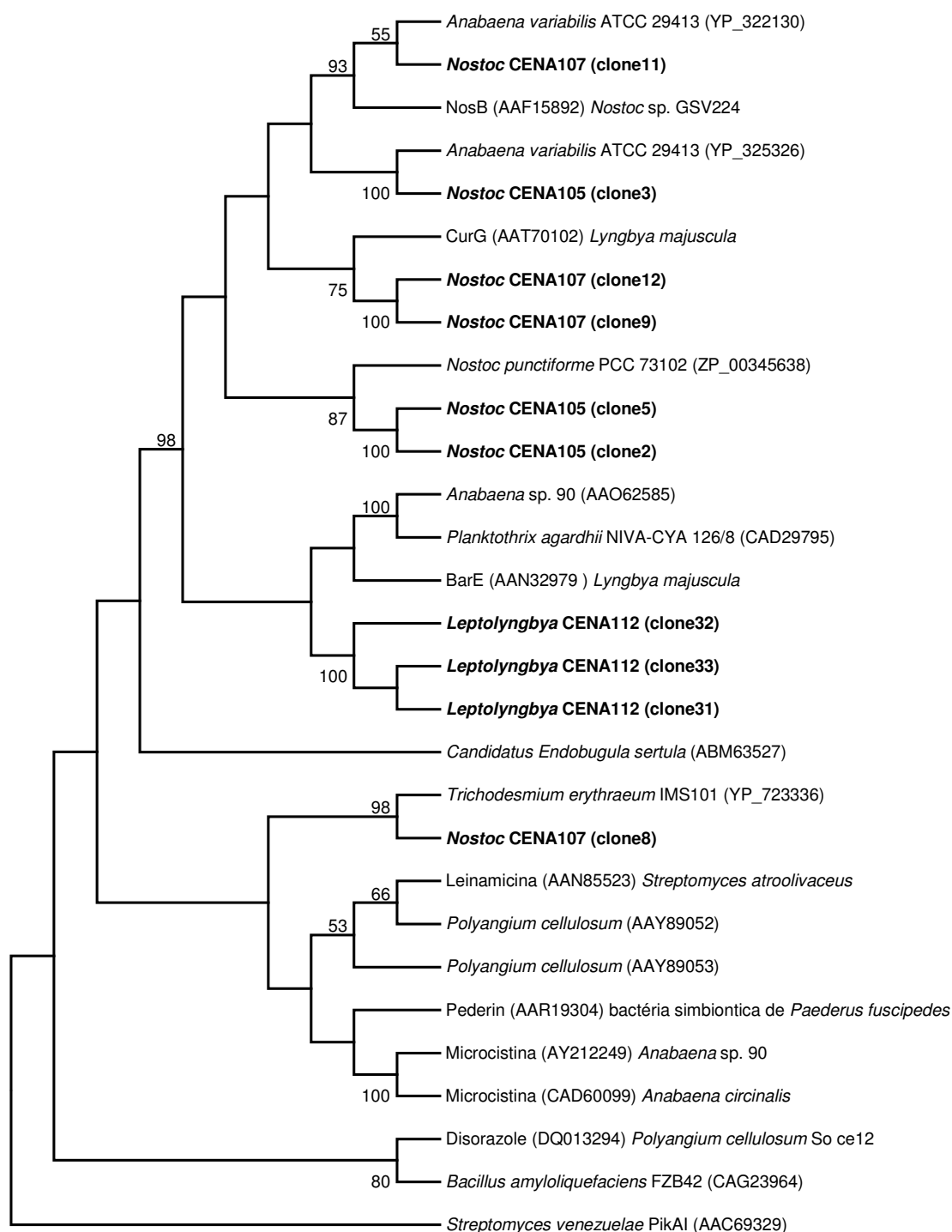


Figura 35 – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construídas pelo método Máxima Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000 replicações; seed= 50257, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 159. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

O clone11 da *Nostoc* CENA107 apresentou 89% de identidade com *Nostoc* sp. GSV224 (AAF15892). No método NJ, ramificou externamente, formando um clado com *Nostoc* sp. GSV224 (AAF15892) e com *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_322130), valor de reamostragem de 99%. No método MP, o clone11 ramificou com *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_322130), formando um clado com *Nostoc* sp. GSV224 (AAF15892). Nostopeptolina é produzida pela *Nostoc* sp. GSV224 (AAF15892) terrestre, considerada referência para esse peptídeo.

O clone3 da *Nostoc* CENA105 apresentou 90% de identidade com *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_325326) e, em ambos os métodos analisados, o valor de reamostragem foi de 100% para o agrupamento formado com esta mesma linhagem.

O clone12 da *Nostoc* CENA107 e clone9 da *Nostoc* CENA107 agruparam-se no mesmo clado em 100% das reamostragens nos dois métodos analisados. No entanto, esse clado, por sua vez, agrupou-se em outro clado juntamente com CurG (AAT70102) [*Lyngbya majuscula*], em reamostragem de 97% para o NJ e 75% para o MP. Ambos os clones obtiveram identidade de 75% com essa seqüência de CurG.

O clone5 *Nostoc* CENA105 e clone2 CENA105 *Nostoc* também se agruparam no mesmo clado em 100% das reamostragens nos dois métodos analisados. Esse clado agrupou-se em um outro clado contendo a *Nostoc punctiforme* PCC73102 (ZP_00345638), em reamostragem de 98% no NJ e 87% no MP. A identidade de *Nostoc punctiforme* PCC73102 (ZP_00345638) foi de 68% com o clone5 e de 69% com o clone2.

O subgrupo formado envolvendo Barbamida E (AAN32979) [*Lyngbya majuscula*] apresentou-se de maneira distinta nos dois métodos estudados. Para NJ, os clones 31, 32 e 33 da *Leptolyngbya* CENA112 posicionaram-se no mesmo clado em 100% das reamostragens, formando um subgrupo maior com Bar E, juntamente com *Anabaena* sp. 90 (AAO62585) e *Plankthothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 (CAD29795), porém com apenas 59% de reamostragem. Para MP, os clones 31 e 33 posicionaram-se no mesmo clado, mas com baixa reamostragem, formando um outro subgrupo com o clone32 (100% de reamostragem). O valor de reamostragem para o subgrupo contendo as amostras isoladas e BarE foi de 50%. Os clones 32 e 33 mostraram identidade

de 70% com a linhagem de *Anabaena* sp. 90 (AAO62585), enquanto que o clone 31 apresentou identidade de 70% com *Plankthothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 (CAD29795).

O clone8 *Nostoc* CENA107 se posicionou no mesmo clado que *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (YP_723336) (reamostragem de 100%) em ambos os métodos, e apresentou 72% de identidade com esta cianobactéria. O resultado para o peptídeo transcrito a partir do clone8 foi a leinamicina, composto este não descrito ainda como produzido por cianobactérias.

Os compostos de PKS produzidos por cianobactérias, identificados e disponíveis em banco de dados são escassos. Por esse motivo, alguns resultados obtidos, quando realizada análise BLAST, para comparação com outros organismos, acaba gerando resultados não congruentes com a literatura de produtos de metabólitos secundários para cianobactérias. Três hipóteses podem estar ocorrendo: os produtos não estão disponíveis no banco de dados de seqüências de nucleotídeos ou proteínas; podem ser novos compostos ainda não descritos para cianobactérias ou; os resultados obtidos apresentaram problemas quando gerados.

Esse fato pode ser observado para os produtos de PKS encontrados a partir das três linhagens de *Limnothrix* sp, os quais não apresentaram correspondência com nenhum produto até então descrito para cianobactérias.

Para as linhagens isoladas de *Limnothrix* sp foram seqüenciados quatro clones de cada linhagem, tendo como resultado principal o composto chivosazol. Com esses resultados, novas árvores filogenéticas foram construídas, mas somente as seqüências obtidas dos clones 13 CENA109, clone20 CENA110, clone23 CENA110, clone 29 CENA111 e clone30 CENA111 se alinharam corretamente e foram utilizadas, conforme a Figura 40, para o teste *Neighbor-Joining*, e Figura 41, para Máxima Parsimônia.

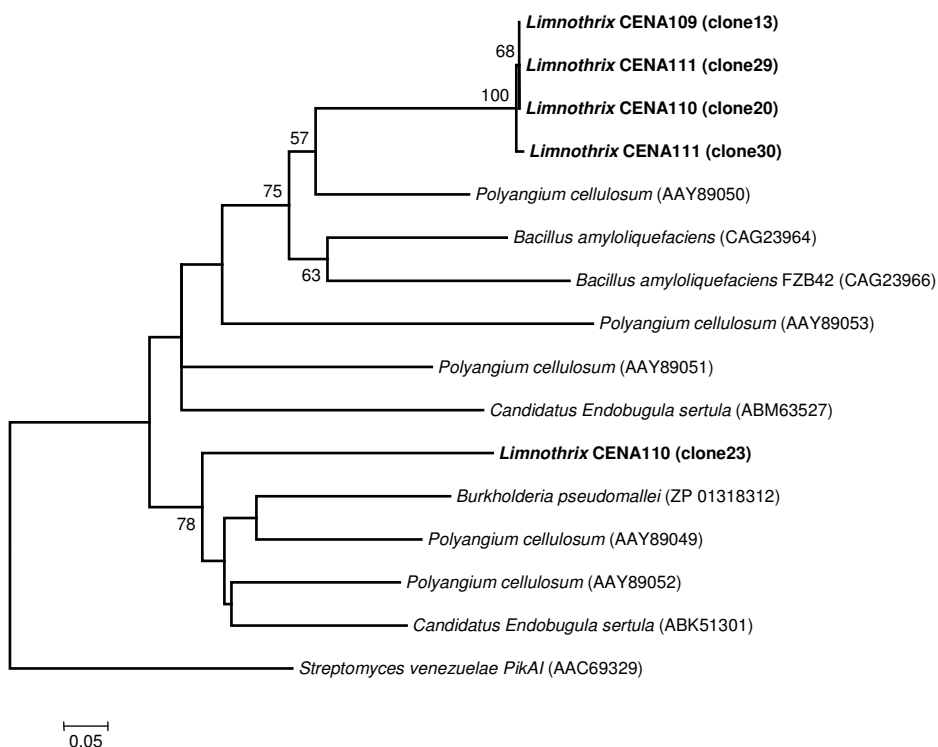


Figura 36 – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construída pelo método *Neighbor-Joining* usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 35531, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 87. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

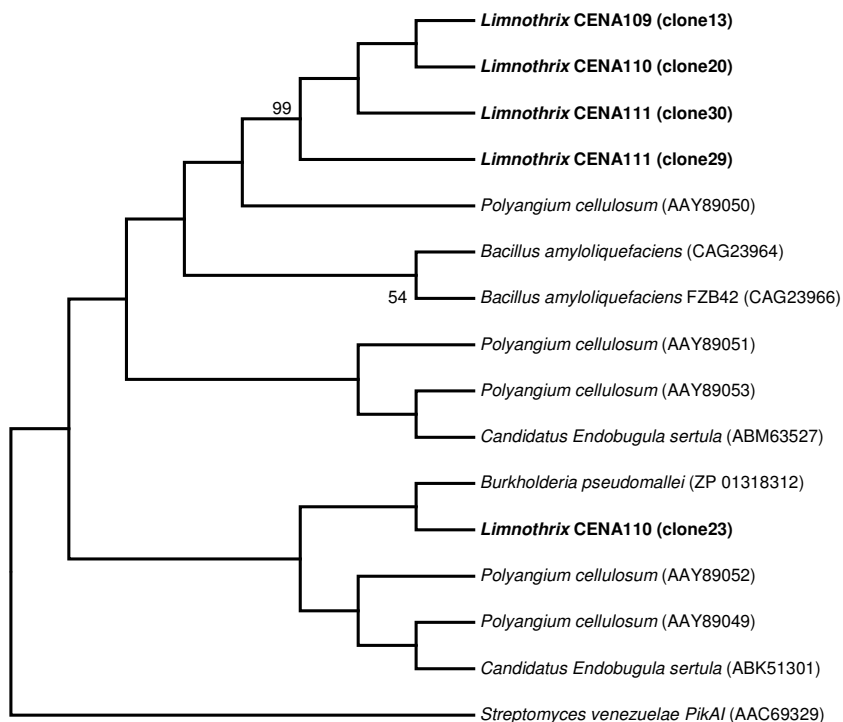


Figura 37 – Árvore filogenética de seqüências de nucleotídeos do domínio de cetossintase de PKS traduzidas para peptídeos construída pelo método Máxima Parsimônia usando o programa MEGA, com 1000 replicações; *seed*= 30326, Modelo Amino:correção de Poisson, número de aminoácidos 87. Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram desconsiderados.

O composto chivosazol é produzido por um tipo não usual de PKS tipo I, conforme descrito por Muller et al. (2006). Sua estrutura química e operon podem ser observados na Figura 38.

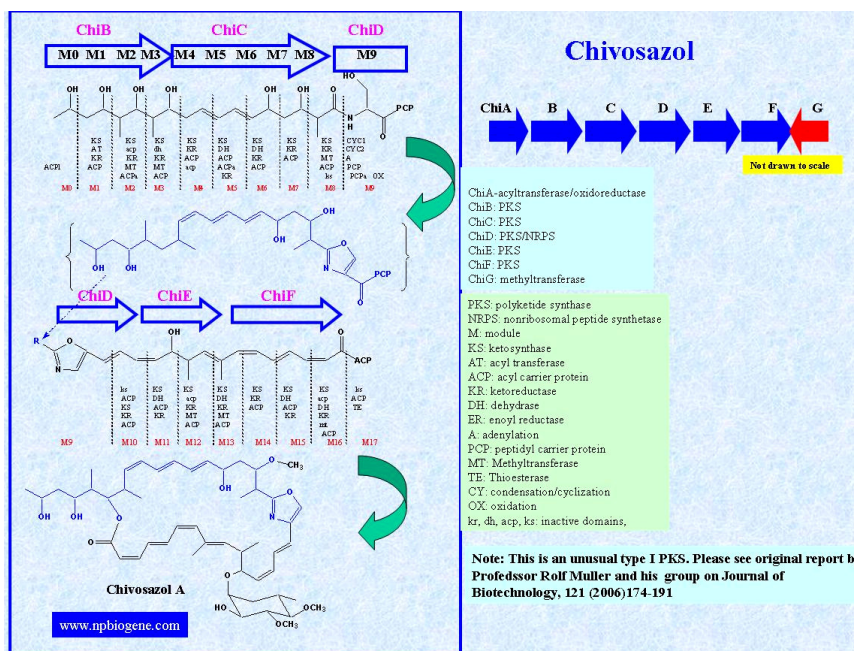


Figura 38 – Estrutura química e operon de Chivosazol. Fonte: NPBiogene.

Ehrenreich et al. (2005) realizaram um *screening* com linhagens de cianobactérias para NRPS e PKS e concluíram que todos os fragmentos obtidos de linhagens axênicas e não axênicas foram similares quando analisados por BLAST, sugerindo apenas a amplificação de produtos provindos de cianobactérias.

Os resultados obtidos neste estudo, com domínio de cetossintase (KS) das amostras isoladas de cianobactérias de lagoa de estabilização, foram positivos quanto ao potencial para a produção de metabólitos secundários. No entanto, esses resultados não indicam necessariamente que essas linhagens estejam produzindo exatamente esses compostos. O potencial das cianobactérias para a produção de compostos naturais ainda é pouco conhecido, mas sabe-se claramente que estes organismos são produtores de grande variedade de metabólitos secundários, incluindo toxinas.

4.10 ELISA

O teste ELISA para microcistina foi realizado com todas as amostras ambientais e linhagens isoladas (Tabela 7 e 8).

As Tabelas 18 e 19 apresentam os resultados obtidos com o teste ELISA para as amostras ambientais e para as cianobactérias isoladas.

Tabela 18 – Resultados obtidos com o teste ELISA para as amostras ambientais.

AMOSTRA	LOCAL	MICROCISTINA (µg/L)
Dez 2004 – Ambiental	Afluente	0,05
	Centro	0,00
	Efluente	0,04
	Tanque	0,00
Jan 2005 – Ambiental	Afluente	3,70
	Centro	0,00
	Efluente	3,74
	Tanque	0,00
Abr 2005 – Ambiental	Afluente	0,04
	Centro	0,04
	Efluente	0,05
	Tanque	0,06

Tabela 19 – Resultados obtidos com o teste ELISA para as cianobactérias isoladas.

ISOLADOS	LOCAL	MICROCISTINA (µg/L)
<i>Leptolyngbya</i> CENA 103	Centro	0,14
<i>Leptolyngbya</i> CENA 104	Tanque	0,00
<i>Nostoc</i> CENA 105	Afluente	0,00
<i>Merismopedia</i> CENA 106	Centro	2,17
<i>Nostoc</i> CENA 107	Afluente	0,00
<i>Synechococcus</i> CENA 108	Efluente	0,22
<i>Limnothrix</i> CENA 109	Afluente	0,19
<i>Limnothrix</i> CENA 110	Centro	0,42
<i>Limnothrix</i> CENA 111	Efluente	0,00
<i>Leptolyngbya</i> CENA 112	Tanque	0,31

O ensaio imunológico realizado com todas as linhagens isoladas e amostras ambientais identificaram a produção de microcistinas do tipo LR, RR

ou YR ou nodularina nas amostras que possuem concentração igual ou maior que 0,1µg/L.

Levando-se em conta esse valor, considera-se positivo para a produção de microcistinas as amostras ambientais do afluente (3,7 µg/L) e efluente (3,74 µg/L) do dia 25 jan 05. Comparando esse resultado com as linhagens isoladas de 25 jan 05 (*Nostoc* CENA107 e *Synechococcus* CENA108), as quais apresentaram resultados positivos para o domínio PKS, o isolado de *Nostoc* não apresentou resultado para microcistina por ELISA na data citada. Provavelmente, o(s) gênero(s) que produziu microcistina nesse período não foi isolado.

Para as amostras isoladas, considera-se como positivas *Leptolyngbya* CENA103, *Merismopedia* CENA106, *Synechococcus* CENA108, *Limnothrix* CENA109, *Limnothrix* CENA110 e *Leptolyngbya* CENA112. Os isolados *Leptolyngbya* CENA112 e *Limnothrix* CENA109 e 110 apresentaram resultados para o domínio PKS e para ELISA.

O valor máximo aceitável de microcistina em água utilizada para consumo humano é de 1,0 µg/L de acordo com a Organização Mundial de Saúde e acatada pela portaria 1469/00 na legislação brasileira. Dos dados apresentados, três resultados estão acima desse valor. São eles: afluente 25 jan 05, efluente 25 jan 05 e *Merismopedia* CENA106.

4.11 Teste de bioatividade usando bactérias, fungo e levedura

Os metabólitos foram extraídos com diferentes solventes, clorofórmio e acetato de etila, para extração de produtos extracelulares, através do sobrenadante, e com metanol, para produtos intracelulares, extraídos das células centrifugadas das culturas analisadas, conforme exemplo na Figura 39.

Os extratos resultantes com esses diferentes solventes foram usados para a determinação qualitativa quanto à habilidade dos metabólitos extraídos inibirem o crescimento dos organismos alvo (Figura 40).

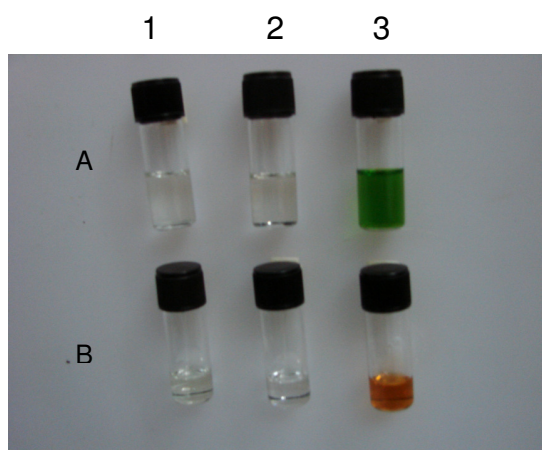


Figura 39 – Extratos de duas linhagens de *Leptolyngbya*, CENA 103 (A) e CENA 112 (B). Extratos obtidos com clorofórmio (1), acetato de etila (2) e metanol (3).

Os resultados positivos obtidos estão descritos na Tabela 20. Tanto para o fungo como para a levedura os resultados foram negativos.

Tabela 20 – Resultados dos extratos contra as bactérias analisadas.

ISOLADO	EXTRATO	BACTÉRIA
<i>Merismopedia</i> CENA 106	intracelular	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Merismopedia</i> CENA 106	intracelular	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Synechococcus</i> CENA 108	intracelular	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Synechococcus</i> CENA 108	intracelular	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<i>Limnothrix</i> CENA 109	intracelular	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Limnothrix</i> CENA 110	extracelular	<i>Bacillus subtilis</i>

Os isolados *Merismopedia* CENA106, *Synechococcus* CENA108, *Limnothrix* CENA109 e 110 apresentaram resultados considerados positivos também para a produção de microcistina através do teste ELISA.

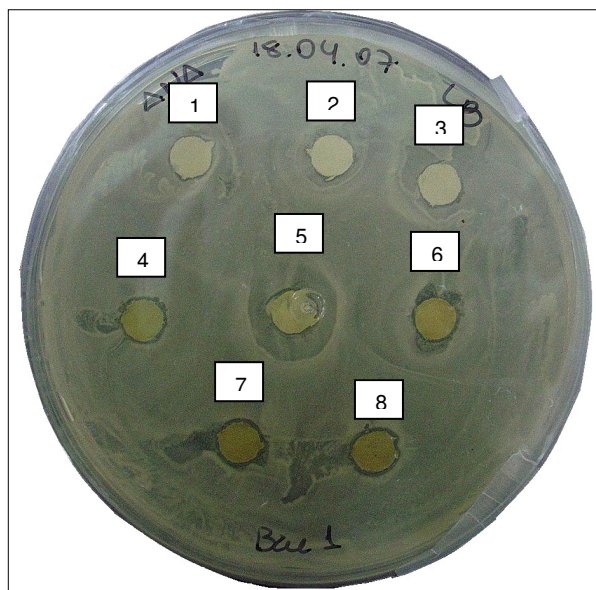


Figura 40 – Teste de bioatividade. Extratos: 1. *Limnothrix* CENA110 clorofórmio, 2. *Limnothrix* CENA111 clorofórmio, 3. Meio BG-11 – teste negativo, 4. *Synechococcus* CENA106 célula, 5. *Merismopedia* CENA108 célula, 6. *Limnothrix* CENA109 célula, 7. *Limnothrix* CENA110 célula e 8. *Limnothrix* CENA 111 célula.

Segundo Piccardi et al. (2000), atividades antibacterianas são menos comuns do que atividades antifúngicas. Nesse estudo, foram testadas somente três bactérias para 50 linhagens de *Nostoc*. Oito delas inibiram ao menos uma destas bactérias, sendo que nenhum extrato foi ativo para *Escherichia coli*; *Agrobacterium vitis* (gram negativa) foi inibida pelos extratos hidrofílicos obtidos de 5 linhagens, mas não por extratos lipofílicos; 1 hipofílico e 3 lipofílicos foram ativos para *Staphylococcus epidermidis*. O fungo *Rhizoctonia solani* foi o mais sensível dos fungos estudados, sendo que quinze linhagens demonstraram atividades antifúngicas.

Outro estudo conduzido com *Nostoc* (ATCC53789) contra as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas aeruginosa* não obtiveram resultados positivos nos ensaios de bioatividade. Esses autores também realizaram ensaios com fungos. Dos doze fungos testados, nove (*Armillaria* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, *Penicillium expansum*, *Phytophthora cambivora*, *P. cinnamomi*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia*, sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium albo-atrum*) tiveram seu crescimento inibido por *Nostoc*, somente três (*Colletotrichum coffeanum*, *C. trifolii* e *Fusarium solani*) não apresentaram atividade observada (BIONDI et al., 2004).

4.12 Espectrometria de Massas

Os resultados obtidos pela técnica de espectrometria de massas estão representados nas Figuras 41 e 42 para as amostras CENA103 a CENA112. As análises por Q-TOF foram feitas usando extrato intracelular por metanol e os espectros foram obtidos na faixa de 100 a 1400 Da.

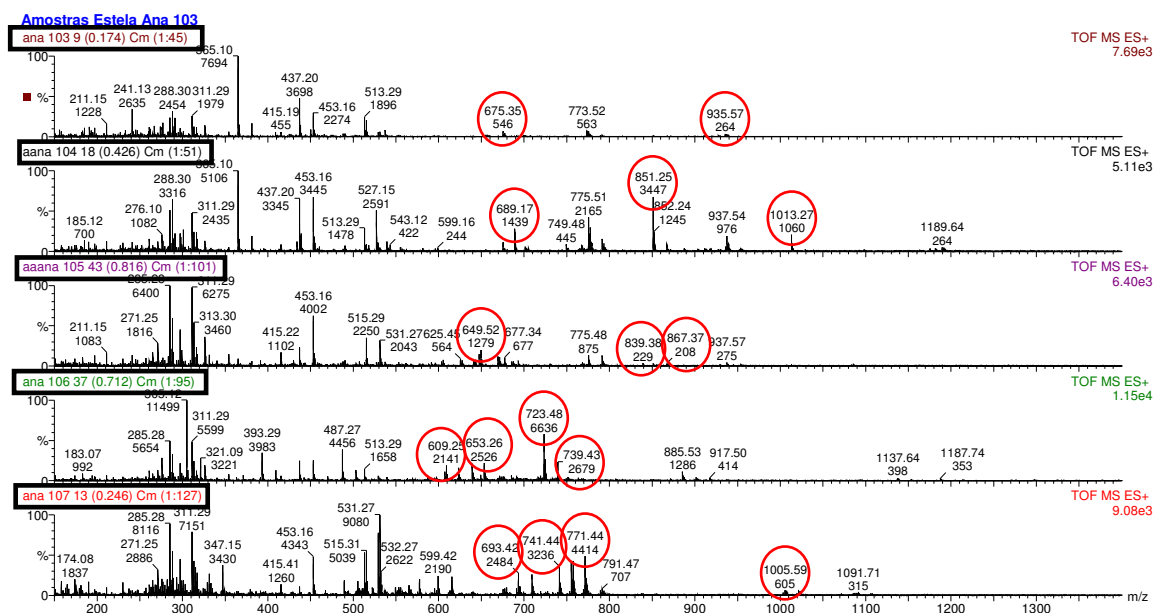


Figura 41 – Espectros obtidos por Q-TOF (MS) em modo positivo para os extratos de *Leptolyngbya* CENA103, *Leptolyngbya* CENA104, *Nostoc* CENA105, *Synechococcus* CENA106 e *Nostoc* CENA107. Círculo: peptídeos putativos.

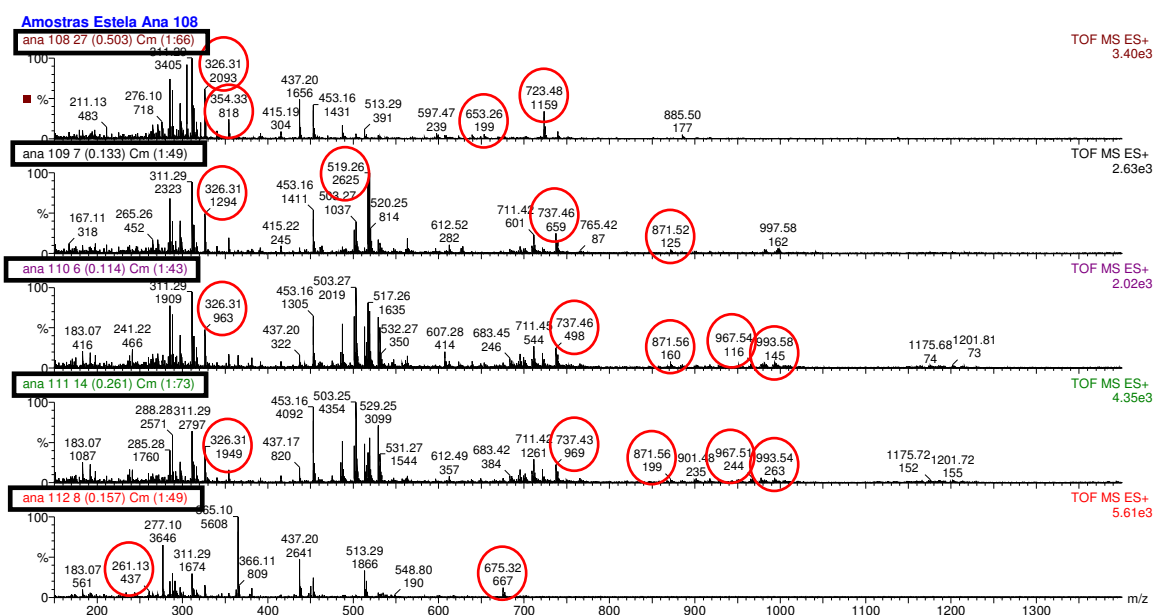


Figura 42 – Espectros obtidos por Q-TOF (MS) em modo positivo para os extratos de CENA108, *Limnothrix* CENA109, *Limnothrix* CENA110, *Limnothrix* CENA111 e *Leptolyngbya* CENA112. Círculo: peptídeos putativos.

A identificação do metabólito presente nos extratos foi feita por ESI MS/MS, através da comparação de suas massas com dados disponíveis na literatura.

As massas obtidas nos espectros fragmentados (m/z) apresentaram correlação positiva com peptídeos putativos descritos na literatura. Mas, quando essas fragmentações foram comparadas com as descritas na literatura, não foi possível identificar a que classe de peptídeos pertencia, por apresentarem diferenças nos valores de massas dos fragmentos encontrados. Na Tabela 21 estão descritos os compostos putativos encontrados na literatura quando comparados com os espectros MS.

Tabela 21 – Descrição dos compostos putativos encontrados dos espectros das linhagens isoladas (MS).

ISOLADOS	Q-TOF <i>m/z</i> ISOLADOS	COMPOSTOS PUTATIVOS
<i>Leptolyngbya</i> CENA103	675	Homodolastatina (675)
	675	Cryptophycina-326 (675)
	935	Anabaenopeptolida 90-A (935)
<i>Leptolyngbya</i> CENA104	689	Guineamida D (689,41)
	851	Anabaenopeptina F (851)
	1013	Microcystina-LR (1013)
	1013	Ci-Cyanopeptolina W (1013,5)
<i>Nostoc</i> CENA105	649	Manualalida A (649)
	839	Nodularina-X (839,4)
	867	Ácido Ferintóico A (867)
<i>Merismopedia</i> CENA106	609	Microginina 91-B (609)
	609	Aeruginosina 98-A (609,32)
	609	Microcina SF608 (609,34)
	653	Aeruginosina 102A (653,33)
	723	Antanapeptina D (723,43)
	739	Antanapeptina B (739,46)
<i>Nostoc</i> CENA107	693	Manualalida B (693)
	741	Antanapeptina C (741,48)
	771	Kasumigamida B (771,38)
	771	Kasumigamida-O (771,38)
	1005	aeruginopeptinas 917S-C (1005,5)
<i>Synechococcus</i> CENA108	326	Semiplenamida C (326,30)
	354	Methyl tumonoato A (354,2)
	653	Aeruginosina 102A (653,33)
	723	Antanapeptina D (723,43)
<i>Limnothrix</i> CENA109	326	Semiplenamida C (326,30)
	737	Antanapeptina A (737,44)
<i>Limnothrix</i> CENA110	326	Semiplenamida C (326,30)
	737	Antanapeptina A (737,44)
	967	Microcystina-LR (967)
	967	[Asp3,Dha7]Mcyst-LR (967,54)
	993	Dihidrodolastatina 12 (993)
<i>Limnothrix</i> CENA111	993	Micropeptina EI992 (993)
	993	Cianopeptolina 992 (993,5)
	326	Semiplenamida C (326,30)
	737	Antanapeptina A (737,44)
	967	[Asp3,Dha7]Mcyst-LR (967,54)
	993	Dihidrodolastatina 12 (993)
<i>Leptolyngbya</i> CENA112	993	Micropeptina EI992 (993)
	993	Cianopeptolina 992 (993,5)
	261	Aulosirazola (261)
	675	Homodolastatina (675)
	675	Cryptophycina-326 (675)

Desta maneira, conclui-se que os extratos obtidos podem não ser de peptídeos e sim de compostos produzidos por cianobactérias, como, por exemplo, em sua parede celular ou a clorofila.

A purificação dos estratos pode ser feita antes da análise de Q-TOF. Uma maneira é por HPLC, para detectar a fração correta. Nem sempre isso ocorre, pois a amostra pode passar pela coluna sem se agregar. Outra dificuldade de se conseguir um bom espectro é a dependência de qual solvente usar para extrair o composto, podendo o resultado final interferir nos resultados. Amostras filamentosas são mais difíceis de romper suas células, podendo ocorrer o não rompimento e por isso a não liberação de toxinas para o extrato. O composto analisado pode também apresentar polaridade diferente da do solvente utilizado e não ser extraído.

5. CONCLUSÕES

As cianobactérias estavam presentes em todas as amostras coletadas na lagoa facultativa de Cajati. Nos quatro pontos coletados ao longo dessa lagoa as comunidades encontradas diferiram entre si provavelmente por alterações ocorridas nas variáveis climatológicas. Novas linhagens de representantes dos gêneros *Leptolyngbya* sp., *Limnothrix* sp., *Nostoc* sp., *Merismopedia* sp. e *Synechococcus* sp. puderam ser identificadas através de microscopia tradicional e confirmadas por técnicas de biologia molecular usando o gene DNAr 16S. As relações filogenéticas entre essas seqüências também foram investigadas. Essas seqüências encontram-se depositadas em banco de dados público (GenBank).

Mundialmente, novas pesquisas estão surgindo buscando um panorama mais amplo da produção de toxinas pelas cianobactérias, sua ativação, além do desenvolvimento de alternativas para detectá-las. Nesta pesquisa, foi confirmado o potencial das cianobactérias para a produção de produtos naturais através do gene PKS, pela detecção de possíveis produtos gerados por via metabólica secundária. Das dez linhagens analisadas, oito apresentaram resultados positivos para esse gene, com resultados distintos dos possíveis produtos que as cianobactérias são capazes de produzir.

Através de testes de bioatividade usando bactérias, fungo e levedura, somente quatro das dez linhagens estudadas apresentaram resultados positivos com bactéria (*Merismopedia* CENA106, *Synechococcus* CENA 108, *Limnothrix* CENA109 e *Limnothrix* CENA110). Dessas quatro, *Merismopedia* CENA106 não apresentou resultado de amplificação para os genes NRPS e PKS enquanto que *Synechococcus* CENA108 apresentou baixa intensidade de amplificação. Apesar disso, sabe-se que resultados negativos para NRPS e PKS podem ser obtidos mesmo quando atividades são detectadas, sugerindo

que tais atividades podem estar relacionadas a outro sistema além dos genes PKS e NRPS.

Durante o desenvolvimento deste estudo, alguns problemas relacionados com a amplificação do fragmento para seqüências da região do espaço intergênico da ficocianina através dos genes *cpcBA* foram constatados com as amostras analisadas da lagoa facultativa. Por esse motivo, a mini-biblioteca da amostra ambiental desse ambiente não gerou os resultados esperados, não sendo possível sua comparação com as linhagens isoladas obtidas.

As amostras coletadas em Cajati apresentaram resultados positivos para cianotoxinas pelo método ELISA e amplificação pelo domínio PKS, além de produção de metabólitos secundários detectados por ensaio de bioatividade, mas negativo para o gene *mcyA*. Esses resultados demonstram o possível comprometimento do processo de tratamento por lagoa de estabilização, por conter cianotoxinas na lagoa analisada. Caso ocorresse a cloração no tanque de cloração, o impacto da produção de cianotoxinas nesse sistema seria ainda maior, pois iriam liberar as toxinas presentes no interior das cianobactérias do efluente da lagoa no rio receptor. Necessário será a avaliação da quantidade de cianotoxinas produzidas nos sistemas de lagoas de estabilização, quanto efetivamente será despejado nos rios, se será para despejo ou reuso desse efluente e quais impactos da presença dessa toxina nos recursos hídricos.

Estudos mais aprofundados serão necessários em sistemas de tratamentos por lagoas de estabilização para detectar precocemente a presença de cianobactérias e suas toxinas nestes ambientes, uma vez que estas podem estar presentes em águas de abastecimento, prejudicando a saúde de animais e humanos. Estudos de biologia e ecologia em lagoas de estabilização são ainda escassos, necessitando de mais conhecimento e/ou aprofundamento, visando auxiliar a tomada de decisões por órgãos competentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.B. (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal Phycology*, v.4, p.1-4.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. 1990. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5-Stigonematales. *Algological Studies*, v.59, p.1-73.

ANSARI, M.Z.; YADAV, G.; GOKHALE, R.S.; MOHANTY, D. (2004). NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic Acids Research*, v.32, p.W405-W413.

APHA (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. Washington, DC: APHA, 1268p.

AZEVEDO, S.M.F.O. (2001). Cianobactérias tóxicas: Causas e Conseqüências para a Saúde Pública. *Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento*, v.3, p.81-94.

BAKER, J.A.; ENTSCH, B.; NEILAN, B.A.; MCKAY, D.B. (2002). Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.6070-6076.

BAKER, J.A.; NEILAN, B.A.; ENTSCH, B.; MCKAY, D.B. (2001). Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. *Environmental Toxicology*, v.16, p.472-482.

BARRIOS-LLERENA, M.E.; BURJA, A.M.; WRIGHT, P.C. (2007). Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria

as a mining tool for secondary metabolites. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.34, p.443-456.

BARTRAM, J.; CARMICHAEL, W.W.; CHORUS, G.J.; SKULBERG, O.M. (1999). Introduction. In: CHORUS, I. e BARTRAM, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, Inglaterra. On behalf of WHO.

BEACON ANALYTICAL SYSTEMS INC. Microcystin plate kit. Disponível em: <http://www.beaconkits.com/product_detail.cfm?ID=63>. Acesso em 02 de agosto de 2004.

BENTO, A.P. (2005). *Tratamento de Esgoto Doméstico em Lagoas de Estabilização com Suportes para o desenvolvimento de Perifíton / Biofilme*. Florianópolis. 197 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v.62, p.293-300.

BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B.; MÜLLER, R. (1999). Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1445, p.185-195.

BEYRUTH, Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; CARVALHO, M.C. & PEREIRA, H.A.S.L. (1992). Toxic algae in freshwaters of São Paulo State. In: CORDEIRO-MARINO, M.; AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C.L.; TOMITA, N.Y. & PLASTINO, E.M. *Algae and Environment: a general approach*. SBFic/CETESB. p.53-64.

BIMBOIM, H.C.; DOLY, J. A (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, v.7, 1513-1518.

BIONDI, N.; PICCARDI, R.; MARGHERI, M.C.; RODOLFI, L.; SMITH, G.D.; TREDICI, M.R. (2004). Evaluation of *Nostoc* strain ATCC53789 as a potential source of natural pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.3313-3320.

BOLCH, C.J.S.; BLACKBURN, S.I.; NEILAN, B.A.; GREWE, P.M. (1996). Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the

cpcBA intergenic spacer and flanking regions. *Journal of Phycoogy*, v.32, p.445-451.

BRIAND, J.F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobactéria in surface water ecosystem. *Veterinary Research*, v.34, p.361-377.

BROCK, T.D. (1973). Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. *Science*. v.179, p.480-483.

BURJA, A.M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J.G.; WRIGHT, P.C. (2001). Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, v.57, p.9347-9377.

CANE, D.E.; WALSH, C.T. (1999). The parallel and convergen universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology*, v.6, p.R319-R325.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. (no prelo). Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático.

CARMICHAEL, W.W.; BENT, P.E. (1981). Hemagglutination method for detection of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, v.41, p.1383-1388.

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

CASTENHOLZ, R.W. (1973). Ecology of blue-green algae in hot springs. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. *The biology of blue-green algae*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.379-414.

CASTENHOLZ, R.W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria. p. 473-600. In: Boone, D.R. e Castenholz, R.W. (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition. The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*, Volume One. Springer-Verlag, New York, 721p.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. (1989). Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. P. 1710-1799.

CHANG, Z.; FLATT, P.; GERWICK, W.H.; NGUYEN, V.; WILLIS, C.L.; SHERM, D.H. (2002). The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. *Gene*, v.296, p.235–247.

CHERNICHARO, C.A.L.; FLORENCIO, L.; BASTOS, R.K.X.; PIVELI, R.P.; VON SPERLING, M.; MONTEGGIA, L.O. (2006). Tratamento de esgotos e produção de efluentes adequados a diversas modalidades de reuso da água. In: Lourdinha Florêncio, Rafael Kopschitz Xavier Bastos, Miguel Mansur Aisse (Coord.). PROSAB - Tratamento e utilização de esgotos sanitários. Rio de Janeiro, ABES.

CHORUS, I. (2002). Cyanobacterial toxin research and its application in Germany: a review of the current status. *Environmental Toxicology*, v.17, p. 358-360.

CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. (2003). Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology*. v.185, p.564-572.

CHRISTIANSEN, G.; KURMAYER, R.; LIU, Q.; BÖRNER, T. (2006). Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. v.72, p.117-123.

CHU, F.S.; HUANG, X.; WEI, R.D.; CARMICHAEL, W.W. (1989). Production and characterization of antibodies against Microcystins. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 55, p.1928-1933.

CODD, G. A.; LINDSAY, J.; YOUNG, F.M.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. (2005). Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P. and Visser, P.M. Ed., Harmful cyanobacteria. Springer, Dordrecht, The Netherlands. p. 1-24.

CODD, G.A. (2000). Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, v.16, p.51-60.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. (2005). Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.264-272.

- COX, P.A.; BANACK, S.A.; MURCH, S.J.; RASMUSSEN, U.; TIEN, G.; BIDIGARE R.R.; METCALF, J.S.; MORRISON, L.F.; CODD, G.A.; BERGMAN, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *PNAS*, v.102, p.5074-5078.
- CRUZ, L.S.; SOUZA, W.G. DE; SILVA, E.C. DA; RUBIM, K.T.; BRAGANÇA, M.C.; ZANDONADE, E.; AZEVEDO, S.M.F.O.; GONÇALVES, R.F. (2003). Cianobactérias e cianotoxinas em lagoas de estabilização facultativas. V *SESMA*, ABES, Vitória, Espírito Santo.
- DEBERT, G.L.B. (2002). *Estudo de cianobactérias em reservatório com elevado grau de trofia (Reservatório de Salto Grande – Americana – SP)*. São Carlos. 207 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – CRHEA – Universidade de São Paulo.
- DITTMANN, E.; BÖRNER, T. (2005). Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.192-200.
- DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; BÖRNER, T. (2001). Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.57, p.467-473.
- DOKULIL, L.T.; TEUBNER, K. (2000). Cyanobacterial domain in lakes. *Hydrobiologia*, v.438, p.1-12.
- DOR, I.; DAMIN, A. (1996). Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. *Archiv fur Hydrobiologie*. v.83, p.197-206, 1996, supplement 117.
- DOW, C.S. e SWOBODA, U.K. (2000). Cyanotoxins. In: WHITTON, B.A. e POTTS, M. (2000). *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, U.S.A. p.613-632.
- ECKART, K. (1994). Mass spectrometry cyclic peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, v.13, p.23-55.
- EHRENREICH, I.M.; WATERBURY, J.B.; WEBB, E.A. (2005). Distribution and Diversity of Natural Product Genes in Marine and Freshwater Cyanobacterial Cultures and Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 7401–7413.
- EWING, B.; GREEN, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities. *Genome Research*. v.8, p.186-194.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v.8, p. 175-185.

Expasy – Translate Tool <<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>>. Acessado em junho e julho de 2007.

FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-791.

FIGUEIREDO, D.R.; AZEITEIRO, U.M.; ESTEVES, S.M.; GONÇALVES, F.J.M.; PEREIRA, M.J. (2004). Microcystin-producing blooms — a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.59, p.151–163.

IORE, M.F.; ETCHEGARAY, A.; LORENZI, A.S.; SILVA, C.S.P. (2005). Monitoramento de cianobactérias produtoras de toxinas através de métodos moleculares. In: Reunião Brasileira de Ficologia, 10., 2004, Salvador. *Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos: anais...* Rio de Janeiro: Museu Nacional. p.33-56. Org. Sociedade Brasileira de Ficologia (Série Livros; 10).

IORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (2000). Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v.39, p.159-169.

FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. (2005). Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 203, p. 257-263.

FUNASA (2003). *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Azevedo, S.M.F.O. e Brandão, C.C.S. (Comitê Editorial). Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 56p.

FUREY, A.; CROWLEY, J.; HAMILTON, B.; LEHANE, M.; JAMES, K.J. (2005). Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *Journal of Chromatography A*, v. 1082, p. 91–97.

FURTADO, A.L.F.F. (2003) (M'PEKO, A.L.). *Avaliação da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) em espécies de*

Microcystis (Cianobactérias) no sistema de lagoas de estabilização do município de São Lourenço da Serra (Vale do Ribeira de Iguape) – SP. 108 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Departamento de Hidráulica e Saneamento – Universidade de São Paulo.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphicak tool for sequence finishing. *Genome Research*. v.8, p. 195-202.

HAIDER, S.; NAITHANI, V.; VISWANATHAN, P.N.; KAKKAR, P. (2003). Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere*, v.52, p.1-21.

HAMILTON, A.J.; ROBINSON, W.; TAYLOR, I.R.; WILSON, B.P. (2005). The ecology of sewage treatment gradients in relation to their use by waterbirds. *Hydrobiologia*, v.534, p.91-108.

HARADA, K.; KONDO, F.; LAWTON, L. (1999). Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I. e BARTRAM, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, Inglaterra. On behalf of WHO.

HEALTH CANADA FEDERAL – PROVINCIAL SUBCOMMITTEE ON DRINKING WATER (1998). *Cyanobacterial Toxins —Microcystins in Drinking Water*. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/water-eau/drink-potab/fpt/com_30_e.html>

HERRERO, M.; VICENTE, M.J.; CIFUENTES, A.; IBANÉZ, E. (2007). Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the lipid fraction of *Spirulina platensis* pressurized ethanol extract. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 21: p. 1729–1738.

HILBORN, E.D.; CARMICHAEL, W.W.; YUAN, M.; AZEVEDO, S.M.F.O. (2005). A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins. *Toxicon*, v.46, p.218–221

HOFFMANN, D.; HEVEL, J.M.; MOORE, R.E.; MOORE, B.S. (2003). Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene* 311 (2003) 171–180

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. (2005) System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Algological Studies*, v.117, p.95-115.

- HU, Z.Q.; LIU, Y.D.; LI, D.H. (2004). Physiological and biochemical analyses of microcystin-RR toxicity to the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environmental Toxicology*. v.19, p.571-577.
- IAC – INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS (2006). Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. < <http://ciiagro.iac.sp.gov.br/>>
- JAMES, K.J.; CROWLEY, J.; HAMILTON, H.; LEHANE, M.; SKULBERG, O.; FUREY, A. (2005). Anatoxins and degradation products, determined using hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion-trap mass spectrometry: forensic investigations of cyanobacterial neurotoxin poisoning. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.19, p.1167–1175.
- JANSE, I.; KARDINAAL, W.E.A.; MEIMA, M.; FASTMER, J.; VISSER, P.M.; ZWART, G. (2004). Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.3979-3987.
- JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.M.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M., ANTUNES, M.B.; FILHO, D.A.M.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. (1998). Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil. *New England Journal of Medicine*, v.338, p.873-878.
- KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS – Microbiology Ecology*, v.35, p.1-9.
- KAEBERNICK, M.; DITTMANN, E.; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. (2002). Multiple alternate transcription direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacteria nonribosomal peptide. *Applied and Environmental Microbiology*. v.68, p.449-455.
- KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A.; BÖRNER T.; DITTMANN, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.3387–3392.
- KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, p.3387-3392.

- KEGG – (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. (2007). Phycocyanin operon. <http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?syw00195+SYNW2022>. Acesso em 10 de abril de 2006.
- KIMURA, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120.
- KOMÁREK, J. (2003). Coccoid and colonial cyanobacteria. In: WEHR, J.D.; SHEATH, R.G. (2003) *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Massachusetts: Academic Press. Vol. 1, Cap. 3, p. 59-116.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (1999) Cyanoprokaryota, 1. Teil Chroococcales. – In, Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, 548 pp., Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (2005) Cyanoprokaryota 2. Teil Oscillatoriales – In, Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. and Schagerl, M. (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/2, 759 pp., Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (1989) Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4 – Nostocales. *Algological Studies*, v.64, p.115-127.
- KOMÁREK, J.; AZEVEDO, S.M.F.O.; DOMINGOS, P.; KOMÁRKOVÁ, J.; TICHÝ, M. (2001). Background of the Caruaru tragedy: a case taxonomic study of toxic cyanobacteria. *Algological Studies*, v.103, p.9-29.
- KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD (1999). Human health aspects. In: CHORUS, I. e BARTRAM, J. (1999). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, Inglaterra. On behalf of WHO.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. (2004) MEGA3, Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, v.5, p.150-163.
- LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.Q.; OSHIMA, YASUKATSU. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, v.37, p.1359-1373.

LANE, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester, Wiley.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; MAHAKHANT, A.; NOPARATNARAPORN, N.; YONGMANITICHAI, W.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. (2001). Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailan strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*, v.39, p.973-980.

LINDNER, P.; MOLZ, R.; YACOUB-GEORGE, E.; DÜRKOP, A.; WOLF, H. (2004). Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. *Analytica Chimica Acta*, v.521, p.37-44.

LORENZI, A.S. (2004). *Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil*. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LORENZI, A.S.; FURTADO, A.L.F.F.; AGUJARO, L.F.; GENUÁRIO, D.B.; MACHADO, J.B.M.; SILVA-STENICO, M.E.; FIGUEIRA, A.V.O.; FIORE, M.F. (2007). A quantitative Real-Time PCR for the specific detection of *Microcystis* and microcystin hepatotoxic gene. In: VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. 2007, Mangaratiba, *Official Program and Abstracts Book*. Livro.

LSMSF (2007). Life Sciences Mass Spectrometry Facility <www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>. Acessado em 16 de março de 2007.

LYRA, C.; HANTULA, J.; VAINIO, E.; RAPALA, J.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. (1997). Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. *Archives of Microbiology*, v.168, p.176-184.

LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; GUGGER, M.; VEZIE, C.; SUNDMAN, P.; PAULIN, L.; SIVONEN, K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.513-526.

MAIZONAVE, C.R.M.; WERNER, V.R.; SCHERER, K.D.; ANDRADE, R.R. (2005). Ocorrência da cianobactéria *Sphaerocavum brasiliense* na estação de

tratamento de esgotos do Lami, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 23. 2005, Santos, *Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Santos: SBM. CD-ROM.

MARQUES, K. N. (2006). *Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio desativada com ênfase em Aphanothece e sua capacidade de bioadsorção do ²²⁶Ra*. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

McELHINEY, J.; LAWTON, L.A. (2005). Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.203, p.219– 230.

MEISSNER, K.; DITTMANN, E. & BÖRNER, T. (1996). Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiology Letters*, v.133, p.295-3003.

METCALF, J.S.; BELL, S.G.; CODD, G.A. (2001). Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.904-909.

MIHALI, T.K.; MÜNCHHOFF, J.; NEILAN, B.A. (2007). Cylindrospermopsin biosynthesis unraveled. In: VII International Conference on Toxic Cyanobacteria. 2007, Mangaratiba, *Official Program and Abstracts Book*. Livro.

MIWA, A.C.P. (2007). *Avaliação do funcionamento do sistema de tratamento de esgoto de Cajati, Vale do Ribeira de Iguape (SP), em diferentes épocas do ano*. 194 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

AGUILA, N.K.S. del (2007). *Avaliação de bactérias fototróficas em lagoas de estabilização: diversidade, purificação e identificação*. 224 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. (2004). Characterization of the Nodularin Synthetase Gene Cluster and Proposed Theory of the Evolution of Cyanobacterial Hepatotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.6353–6362.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM USA (2003). Blue green algae. <[http://ntp-](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_Background/ExecSumm/BlueGreen/)

[server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_Background/ExecSumm/BlueGreen/](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_Background/ExecSumm/BlueGreen/)>.

Acesso em 16 de janeiro de 2006.

NEILAN, B. A.; DITTMANN, E.; ROUHIAINEN, L.; BASS, R. A.; SCHAUB, V.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. (1999). Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxicity of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, v.181, p.4089–4097.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D. e GOODMAN, A.E. (1995). Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology*. v.61, p.3875-3883.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L., HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, p.693-697.

NetPrimer.

<<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>>.

Acessado em julho de 2007.

NICHOLSON, B.C.; BURCH, M.D., 2001. *Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines*. Disponível em: <<http://www7.health.gov.au/nhmrc/publications/synopses/eh19syn.htm>>. Acesso em 26 de agosto de 2004.

NISHIZAWA, T.; UEDA, A.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; OCHI, K.; SHIRAI, K. (2000). Polyketide synthase gene couple to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *Journal of Biochemistry*, v.127, p.779-789.

NPBiogene (Natural Product Biosynthetic Gene Database).

<<http://www.npbioene.com/>>. Acesso em junho e julho de 2007.

OLIVEIRA, M.C.; MENCK, C.F.M. (2001). O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida. In: MATIOLI, S.R. (2001) *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto, Editora Holos. Capítulo 2, p.15-26.

OULDRA, B.; ANDALOUSSI, M.; FRANCA, S.; BARROS, P.; MARTINS, R.; OUFDOU, K.; SBIYYAA, B.; LOUDIKI, M.; MEZRIOUI, N.; VASCONCELOS, V.

- (2000). Harmful cyanobacterial toxic blooms in waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, v.42, p.179-186.
- LOUDRA, B.; LOUDIKI, M.; VASCONCELOS, V.; SABOUR, B.; SBIYYAA, B.; OUFDOU, K.; MEZRIOUI, N. (2002). Detection and quantification of microcystins from cyanobacteria strains isolated from reservoirs and ponds in Morocco. *Environmental Toxicology*, v.17, p.32-39.
- OUFDOU, K.; OUDRA, B.; BARAKATE, M.; LOUDIKI, M.; ALTALLA, A. (2000). Relationships between bacteria and cyanobacteria in the Marrakech waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, v.42, p.171-178.
- PEINADOR, M. (1999). Las cianobacterias como indicadores de contaminación orgánica. *Revista de Biología Tropical*, v.47, p.381-391.
- PICCARDI, R.; FROSINI, A.; TREDICI, M.R.; MARGHERI, M.C. (2000). Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. *Journal of Applied Phycology* v. 12, p. 543–547.
- POMATI, F.; SACCHI, S.; ROSSETTI, C.; GIOVANNARDI, S.; ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; NEILAN, B.A. (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal Phycol.* v. 36, p. 553-562.
- POSTGATE, J.R. (1969). Viable counts and viability. In: NORRIS, J.R. e RIBBONS, D.W. (1969). *Methods in Microbiology*. New York Academic Press, U.S.A. p. 611-628.
- POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.L.; BARRETO, V.; WARD, C.J.; PREISER, W.; POON, G.K.; NEIL, D. & CODD, G.A. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*, v.352, p.21-26.
- RAI, A.N. (1990) CRC handbook of symbiotic cyanobacteria. Boca Raton: CRC Press, 253p.
- RAMASWAMY, A.V.; FLATT, P.M.; EDWARDS, D.J.; SIMMONS, T.L.; HAN, B.; GERWICK, W.H. (2006). The secondary metabolites and biosynthetic gene clusters of marine cyanobacteria. Applications in biotechnology. In: Proksch, P., Muller, W.E.G. (Eds.), *Frontiers in Marine Biotechnology*. Horizon Bioscience, pp. 175–224.
- RAMÍREZ-MORENO, S.; MARTÍNEZ-ALONSO, M.R.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.; ESTEVE, I.; GAJU, N. (2003). Seasonal population changes in the restriction

fragment length polymorphism (RFLP) patterns from PCR-amplified 16S rRNA genes of predominant ribotypes in microbial mat samples from the Ebro Delta (Spain). *Current Microbiology*, v.46, p.190-198.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M. E STANIER, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v.111 p.1-61.

ROSSELLÓ-MORA, R. e AMANN, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, v.25, p.39-67.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. (2004). Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*. v.70, p.686-692.

SABESP (2007). Mapa e informações de todos os municípios atendidos. <<http://www2.sabesp.com.br>> Acesso em 10 de outubro de 2007.

SAITOU N., NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.406-425.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANT'ANNA C.L.; BRANCO, L.H.Z.; AZEVEDO, M.T.P. (2005). Cyanophyceae/Cyanobacteria. In: BICUDO, C.E.M. E MENEZES, M. (2005). *Gêneros de lagas de águas continentais do Brasil (chave para a identificação e descrições)*. RIMA: São Carlos, p. 19-82.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SENNA, P.A.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. (2004). Planktic cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, p.213-227.

SEADE (2006). Perfil municipal de Cajati – SP. <<http://www.seade.gor.be/produtos/perfil.php>>. Acesso em 23 de janeiro de 2006.

SHOPF, J.M.; WALTER, M.R. (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. (Eds.). *The biology of Cyanobacteria*. Oxford: Blackwell Scientific, p. 543-564.

- SIVONEN, K.; JONES, G., 1999. Cyanobacterial toxin. In: CHORUS, I. & BARTRAM, J. (Eds.) *Toxic cyanobacterial in water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management*. London: Spon. p.41-111.
- SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; FIIRDIG, M.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHARTT, K.L. (1992). Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, from *Nostoc* sp. strain 152. *Chemical Research in Toxicology*, v.5, p.464-469.
- SKULBERG, A.M. (1995). Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. (Ed.) *Hydrogen energy system. Production and utilization of hydrogen and future aspects*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.95-110.
- SMITH, A.J. (1983). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Annales de Microbiologie*. v.134, p.93-113
- SMITH, A.J. (1983). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Annales de Microbiologie*. v.134, p.93-113
- STAL, L.J.; MOEZELAR, R. (1997). Fermentation in Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. v.21, p.179-211.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 10.1093/molbev/msm092.
- TARCZYNSKA, M.; NALECZ-JAWECKI, G.; ROMANOWSKA-DUDA, Z.; SAWICKI, J.; BEATTIE, K.; CODD, G.; ZALEWSKI, M. (2001). Test for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples. *Environmental Toxicol.*, v.16, p.383-390.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface, flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v.25, p.4876-4882.
- TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; DÖHREN, H. von; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, v.7, p.753-764.
- TILLET, D.; PARKER, D.L.; NEILAN, B.A. (2001). Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A Gene (*mcyA*) of the cyanobacterial

- genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2810-2818.
- TOMITANI, A.; KNOLL, A.H.; CAVANAUGH, C.M.; OHNO, T. (2006). The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.103, p.5442-5447.
- VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. (2001). Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Research*, v.35, p.1354-1357.
- VINCENT, J.M. (1970). Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford: Blackwell, Oxford. (IBP Handbook, 15).
- WARD, D.M.; FERRIS, M.J.; NOLD, S.C.; BATESON, M.M. (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.1353-1370.
- WELKER, M.; DÖHREN, H. (2006). Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Rev.*, v.30, p.530-563.
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. (2000). Introduction to the cyanobacteria. In: _____ The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.1-11.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (1998). Chapter 7 – *Freshwater algae and cyanobacteria. Guidelines for safe recreational-water environments*. Vol. 1: coastal and fresh-water.
- WIEDNER, C.; VISSER, P.M.; FASTER, J.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MUR, L.R. (2003). Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC7806. *Applied and Environmental Microbiology*. v.69, p.1475-1481.
- WILLAME, R.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; WILMOTTE, A.; KOMÁREK, J.; HOFFMANN, L. (2006). Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal Phycology*, v.42, p.1312-1332.
- WILMOTTE, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (1994). *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p.1-25.

WILSON, K.M.; SCHEMBRI, M.A.; BAKER, P.D.; SAINT, C. (2000). Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and desing of a species-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, p.332-338.

WOESE, C.R.; SOGIN, M.L.; BONEN, L.; STAHL, D. (1975). Sequence studies on 16S ribosomal RNA from blue-green alga. *Journal of Molecular Evolution*, v.4, p.307-315.

ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A.; CARVALHO, M.C. & SOUZA, R.C.R. *Manual de Orientação em Casos de Florações de Algas Tóxicas: um Problema Ambiental e de Saúde Pública*. CETESB, 1997.

ZHAO, Y.; HRUDEY, S.; LI, X. (2006). Determination of Microcystins in Water Using Integrated Solid-Phase Microextraction with Microbore High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Quadruple Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, v. 44, p. 359-365.

**APÊNDICE A – Seqüências geradas dos genes DNAr 16S, PKS e
ficocianina neste estudo**

DNAr 16S

>CENA 106 - *Merismopedia* sp. (EF088332)

GATGAACGCTGGCGGCGTGTCTTAACACATGCAAGTCAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACGGGTGAG
 TAACGCGTGGGAACCTGCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGA
 GAGGTGAAATGAAATTCGCCTGAGGATGGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACC
 AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAT
 GAAGGCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAACTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACG
 GCTAATCCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 CGTCCGCAGGTGGCCTTGTAAGTCTGTCTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTCCGGCGATGGAAACTA
 CAAGGTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCGCGGTGATGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGA
 ACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATCACTGACACTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGG
 GATTAGATACCCCTGTAGTCTGGCCGTAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCCTCGGT
 GTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGA
 CATCTGCGAATCCCTTGAAACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTG
 TCAGTCTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGCGCAACCCACGTCGTTAGTTGCCAGCAT
 TCAGTTGGGCACTCTAGCGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCAT
 GCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGCTCGCGAGAGTAA
 GCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCT
 AGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
 GAAGTTGGCCACGCCGAAGTCTTACTCCAACCCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGAC
 TGGGGTGAA

>CENA 104 - *Leptolyngbya* sp. (EF088333)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTG
 AGTAACGCGTGAGAACATGCCCTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCC
 TTAGGGTGAAAAGATTTATTGTCTAGAGATTGGTCTGCGCTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACA
 CCAAGGCGACGATCTGACTTGGTCTGAGAGGATGACCAGGCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGG
 AGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGATGACGGTACCTGATGAATCAGCAT
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGTCCGTAGGTGGTTTTATCAAGTCTGTCTGTTAAAGCGTGGCGCTTAAACCGCATAAGGGCAGTGGAAAC
 TGATGAACTAGAGTGCATAGGGGTAACAGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAA
 GAACACCAGCGGCGAAAGCGTGTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAA
 GGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAACGATGACAACACTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAGCC
 GTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATCCTCGGAACCCGTATGAAAGTTAGGGGTGCCTTCGGGAGCCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGTCAGTCTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAGCGCAACCCACGTTTTTGTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGC
 ATGCCCCATACGCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCGTTCGACAAAGAGCAGCCAGCCAGCGATGGT
 GAGCCAATCTCATAAACCGACGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCG
 CTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
 TGGGAGTTGGTACGCCCCGAAGTCTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGAT
 GACTGGGGTGAA

>CENA 108 - *Synechococcus* sp. (EF088334)

GATGAACGCTGGCGGCGTGTCTTAACACATGCAAGTCAACGAACCTTCGGGTAGTGGCGGACGGGTGAG
 TAACGCGTGGAAATCTGCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGA
 GAGGTGAAATGAAATTCGCCTGAGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACC
 AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAT
 GAAGGCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACG
 GCTAATCCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 CGTCCGCAGGCGGCCATGTAAGTCTGTCTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCGATGGAAACTA
 CAAGGCTTGTAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCGCGGTGATGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGA
 ACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGG
 GATTAGATACCCCTGTAGTCTGGCCGTAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCCTCGGT
 GTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGAC

GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGA
 CATCCTGCGAATCCCTTGGAAACGAGGGAGTGCCTTCGGGAACGCAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCC
 TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCGTTAGTTGCCAGCAT
 TCAGTTGGGCACCTCTAGCGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCAT
 GCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTA
 GCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCT
 AGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTCACACCATG
 GAAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACTCCAACCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGAC
 TGGGGTGAA

>CENA 109 - *Limnothrix* sp. (EF088335)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTG
 AGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCCGATGTGCC
 GAGAGGTGAAAGGTTAACTGCCCCGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTA
 CCAAGGCAGTGATCGGTAGCTGGTTTGGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGG
 ACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCAT
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGTCCGCAGGCGGTCTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAAC
 TGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAA
 GAACACCAGCAGCGAAGGCGTTTCTACTGGACCAAACCTGACGCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAA
 GGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCGACCCGTGCA
 GTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAAGTCCGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATC
 ATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCCGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGC
 AAGCTAATCTCGTAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCG
 CTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTCACACCA
 TGGGAGTTGGTTTTGCCCCGAAGTCATTACCCTAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTGATGA
 CTGGGGTGAA

>CENA 111 - *Limnothrix* sp. (EF088336)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTG
 AGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTCAGGTCGGGGACAACGACTGGAAACGGTCGCTAATACCCGATGTGCC
 GAGAGGTGAAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTA
 CCAAGGCAGTGATCGGTAGCTGGTTTGGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGG
 ACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCAT
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGTCCGCAGGCGGTCTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAAC
 TGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAA
 GAACACCAGCAGCGAAGGCGTTTCTACTGGACCAAACCTGACGCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAA
 GGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCGACCCGTGCA
 GTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATCCTGCGAATCCTGGCGAAAAGTCCGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATC
 ATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCCGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGC
 AAGCTAATCTCGTAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCG
 CTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCGCCGTCACACCA
 TGGGAGTTGGTTTTGCCCCGAAGTCATTACCCTAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTGATGA
 CTGGGGTGAA

>CENA 112 - *Leptolyngbya* sp. (EF088337)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTCTTTCCGGACATAGTGGCGGACGGG
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTTTGGTTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCAATGTG
 CCTTTGGGTGAAAGCTTTAGTGCCAAGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAAGGGAC
 TACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGG

CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAG
 GGACGACGGCCTACTGGTTGTAAACCTCTTTTGATAGGGAAGAACAATGACGGTACCTATCGAATCAG
 CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGCGTCCGTAGGTGGCCATCTAGTCAGTTGTTAAAGCGTAGAGCTTAACTCTATAAAGGCAATTGA
 AACTGATGAGCTAGAGTGCATAGGGGCAAGGGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGG
 GAAGGACATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG
 AAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGACCGTATCGACCCGG
 TCAGTGTCTGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGG
 TTTACATGTCCGGAATCTTCTTGAAGGGAAGAGTGCCTACGGGAGCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCT
 GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCTAGTTGCCA
 GCATTAAGTTGGGCACCTTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCA
 GCATGCCCTTACATCTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAGCTAGCGATA
 GCAAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAAT
 CGTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
 CATGGGAGTTGGCCAGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCGTAAGGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTG
 ATGACTGGGGTGAA

>CENA 110 - *Limnothrix* sp. (EF088338)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTG
 AGTAACGCGTGAGAATCTGCCTCAGGTCCGGGACAACGACTGGAAACGGTGCCTAATACCCGATGTGCC
 GAGAGGTGAAAGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTA
 CCAAGGCAGTGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGG
 ACGAAGGCCGTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAAGATCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCAT
 CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA
 AGCGTCCGCAGGCGGTCTCGTAAGTCTGTCTTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATAAAGGGGATGGAAC
 TGCGAGACTAGAGGTAGGTAGGGGTAGAAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAA
 GAACACCAGCAGCAAGCGGTTCTACTGGACCAAACGACTGACGCTCATGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAA
 GGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCACGTATCGACCCGTGCA
 GTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATCTGCGAATCTGGCGAAAGTCCGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATC
 ATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAACAATGGTCCGGACAGAGGGCTGCAAGCTCGCGAGAGC
 AAGCTAATCTCGTAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCG
 CTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
 TGGGAGTTGGTTTTGCCCGAAGTCATTACCCTAACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTGATGA
 CTGGGGTGAA

>CENA 103 - *Leptolyngbya* sp. (EF088339)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAAACACATGCAAGCCGAACGGAGGTCTTCGGACCTTAGTGGCGGACGGG
 TGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCTTTGGATGGGGATAACGACTGGAAACGGTGCCTAATACCCAATATG
 CCGAGAGGTAAAACCTTATATGGCCAGGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCA
 CACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCGAGA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAG
 GGAGGAAGGCCTACTGGTTGTAAACCTCTTTTGATAGGGAAGAAGAAAGTACGGTACCTATCGAATCAG
 CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGCGTCCGTAGGTGGTTATTCAAGTCAGCCGTCAAAGGATGGAGCTTAACTCCATAAAGGCAGTTGA
 AACTGGATAGCTAGAGTGCATAGGGGCAAGGGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGG
 GAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCCTTGCTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG
 AAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGTCCGTATCGACCCGG
 GCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAA
 TTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGG
 CTTGACATGTCGCAATCTTGATGAAAGTGCAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGC
 TGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTCTAGTTGCC
 ATCATTAAAGTTGGGCACCTTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
 AGCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGCTAGCGAT
 AGCAAGCTAATCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAA

TCGCTAGTAACCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCGCGAGGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCT
GATGACTGGGGTGAA

>CENA 105 - *Nostoc* sp. (EF088340)

ATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGAATCTTTAGGGATTTAGTGGCGGACGGG
TGAGTAGCGCGTGAGAATCTACATTCAGGTCTGGGACAACCATTGGAAAACGGTGGCTAATACCGGATGTG
CCGGGAGGTGAAAAGATTAATTGCCTGAAAATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCG
CACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAG
GGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGAAAAGTGAAGGTACTTGAGGAATAAG
CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGGC
TAAAGGGTCCCGAGGTGGCATTGTGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAGATAAAAAGCAGTGGGA
AACTACAAAGCTAGAGTGCGTTCCGGGCGAGAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAG
GAAGAACACCGGTGGCGAAAAGCGTTCTGCTAGGCCCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAAGCTAGGGGAGCG
AATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACCGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGA
GCCGTGCCGAGCTAACCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGA
CTTGACATGTGCGTGAATTTCTCTGAAAGGAGAAAAGTGCCTTAGGGAGCACGAACACAGGTGGTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCC
AGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTC
AGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAAAAGGGCAGCTACACAGCGAT
GTGATGCAAATCCAAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCTGCGTGAAGGAGGAA
TCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCATGGAAGCTGGCAACGCCCGAAGTCATTACTCCAACCATTCGTGGGGGAGGATGCCAAGGCAGTGTCT
GGTACTGGGGTGAA

>CENA 107 - *Nostoc* sp. (EF088341)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGACACCTTTCGGGGTGTAGTGGCGGACGGGTG
AGTAACGCGTGAGAATCTGGCTTCAGGTCTGGGACAACCCTGAAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCC
GTTGGGTGAAAAGGTTAACTGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCA
CCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGG
AGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAAGAACACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCA
TCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGGCGTA
AAGCGTCCCGAGGTGGCTGTGTGTCTGCTGTTAAAGAGTGTAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGTGGAAA
CTACACGGCTAGAGTGCGTTCCGGGCGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGA
AGAACACCGGTGGCGAAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAAGCTAGGGGAGCGAA
TGGGATTAGATAACCCAGTAGTCCTAGCCGTAACCGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGC
CGTGCCGTAGCTAACCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGACT
TGACATGTGCGGAATCTTCTTGAAGGGAAAGAGTGCCTTCCGGGAGCGGAAACACAGGTGGTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTAGTTGCCAG
CATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAG
CATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGACAGCGATGT
CAAGCAAATCCCGTAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCTGCGTGAAGGAGGAATC
CTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
ATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCCCAACGATTTCGTGAGGGGAATGCCAAGGCAGGACTGG
TGACTGGGGTGAA

Cetosintase (KS) do gene PKS

>clone2_CENA105PKS

TCTATTTTTAGAAATCTGCTTGGTCTGCTTTAGAAAATGCCGGGTATGATTCAGAGAATTACTCTGGTCAA
GTAGGTGTTTTACGCGGGTACAGGGTGAATAGTTATCTATTATTTAATCTGGCTCAGAACCAGGTTTTT
TAGGCACGGCTATTGATTATCAAACATTAATTGGTAATGAAAAAGATAACATTGCCACACGAGTTGCTTA
TAAATTAATCTCAAAGGGCCGAGTATTGGCGTTTACAGACAAATGCTCTACATCTTTAGTGGCTATTTAT
TTAGCTTGTCAAAGCTTACTTAATTACCACTGTGATATGGCTTTGGCTGGTGGTGTGAGTGTCAATGTCC
TGCAAAAAGCCGGTTATATCTATCAAGAAGGAAGCGTTTTATCTCCTAATGGTCAATGTCTGCTTTGA
TGCCAACTCCCAAGGAACAGTGGGTGGGAGTGGTTAGGTGTGGTAGTCTTGAAGCGATTAGAAGATGCC

ATCGCTGATCGAGATTGCATCCATGCGGTCATCAAAAGTGTGGCTGTCAATAACGATGGTGCAGCGAAAG
TCGGCTACACAGCACCCAGCATCGAAGGACAAGCAAAAGTCATTGCCGAAACCCTAGCGTTGGGTGACAT
TAACCCGAAACTGTTACTTATATCGAAACTCACGGCACCCGGCACCTTCGGCGACCCAATCACTAGT
GAATTC

>clone3_CENA105PKS

GCATCTTTCTAGAACTAGTTTATGAAGCTCTCGAAAATGCTGGTTACGAATCCGAATCATAACAATGGCTT
GATTGGTTTGTATGCTGGCTGTGGTCAAAATACTTATTTTGTAGGCATATTTGTGGGCGCGCGGAAATT
ATTGATAGCGTCGGTGAATTTACAGACGATGCTAGCCAATGAAAAGGACTTTTTAACTTAGTCGTGCTGCC
TATAAGTTGAATTTAAAAGGGCCGGCTGTCAGCGTCAATACTGCTTGTCTACTTCCCTAGTCGCAGTAA
TTCAAGCTTGTCAAGCCTTGAGTAACTACCAGTGCACATGGCTTTAGCTGGTGGTGTGTCCATGACAAC
ACCCAAAACAGTGGTTACATAGCCCAAGAAGGGACAATGCTTTCTCCCGATGGTCATTGTCTCCCTTT
GATGCCAAAAGCTAATGGCACAATGTTTAAACAACGGTGCAGGCTTGGTAGTTTTGAAACGGGTGGAAGACG
CATTGCAAGATGGCGATCGCATTATGCCGTGATTCTGTGGTACAGGGATCAATAATGATGGGGCTGACAA
GGTAAGTTTACAGCACCCAGCGTCAACGGACAAGCCGAAGCCATTGCCCAAGCCCAAGCCTATGCTGAC
TTTCATCCCGAAAGCATCTCTTATATTGAAGCCCATGGCACCCGGCACCCAGCTTCGGCGACCC

>clone5_CENA105PKS

GAATTCCTAGTATTGGGTCGCCGAAGGTGGTGCCGGTGCCGTGAGTTTTCGATATAAGTAACAGTTTTCG
GGGTTAATGTCACCCAACGCTAGGGTTTCGGCAATGACTTTTGCTTGTCTTCGATGCTGGGTGCTGTGT
AGCCGACTTTCGCTGCACCATCGTTATTGACAGCCACACTTTTGATGACCGCATGGATGCAATCTCGATC
AGCGATCGCATCTTCTAATCGCTTCAAGACTACCACACCTAAACCACTCCACCCACTGTTTCTTGGGAG
TTGGCATCAAAGGCAGCATTGACCATTAGGAGATAAAACGCTTCTTCTTGATAGATATAACCGGCTT
TTTGACAGGACATTGACACTCACACCACCAGCCAAAGCCATATCACAGTGGTAATTAAGTAAGCTTTGACA
AGCTAAATAAATAGCCACTAAAGATGTAGAGCAATTTGTCTGAACGCCAATACTCGGCCCTTTGAGATTT
AATTTATAAGCAACTCGTGTGGCAATGTTATCTTTTTTCAATTACCAATTAATGTTTGATAATCAATAGCCG
TGCCATAAAAACCTCGGTTCTGAGCCAGATTAATAATAGATAACTATTCCACCCTGTACCCGCGTAAAC
ACCTACTTGACCAGAGTAATCTCTGAATCATAACCCGGCATTTTCTAAAGCAGACCAAGCAGATTCTAAA
AATAGACGCTGTTGCGGATCCATCTCCAACGCTTCCCGAATCGAATTCCCGCGGCC

>clone8_CENA107PKS

GATTAATGCTGGAGTTGAGCTGGTTGTGTTTAGAAGATGCTGGATATTCACCACTGGAATTATCAGGTAG
TCCATAGGTGTTTTTATTGGGGCTTGTAGTTATGACTCAATTCTGACTTTGAATGAGGAAGAGATTGAT
GTGCATAGTGGAACAGGCAGTTGGACTACTATGATTCCAAATCGAATTTCTGCTTATTTTTATTTTTCTG
GTCCAAGTCTTCTGTTGATACAGCTTGCTCAAGTCTTTAGTTGCTATTTCATCAGGCTATTAATGCTTT
GAAAGAACAGGAATGTGAGCAAGCATTAGTGGGTGGAATTAGTGTGTTATTGTCACCAATAACATACATC
CAAATGAGTCAGCAGAATATGTTGTCTCCAAAGGGACAATGTA AAACTTTTCGACAGTGGAGCGGATGGTT
ATGTGCGTGGAGAAGGAGCTGGGGTAATTTTATAAAAACCCCTAGATAAAGCCATTCAAGACCAAGATCA
TATCCATGGTGTGATCAAAGGAAGCGCTGTTAATCATGGTGGAAAAGCAAGA ACTTTAACCTCTCCAAAT
ATTTATGCTCAAGCCAAAGTAATTCGTGCTGCCATAAAAAAGCTGGCATTGCTCCTAATACTATTTCTT
ACATCGAAACTCACGGCACCCGGCACCTCCCTCGGCGACCCAATCACTAGTGA

>clone9_CENA107PKS

GCCGCGGAATTCGATTAGGGAGGCGTAGCAGATGGACCCGACGATCGGTTGTTTTTAGAATGTGCTTG
GGAAGTAATAGAAAGGGTGGTTACAATCCAAACGTATATGAAGGTTCAATTGGGGTTTACGCTGGTTGC
AGTATTAATAGTTATTTAATCAACAATCTTGATTCTGAATCTGACCTCGGTTTACGGGTATATCTTAAGG
GAGGTGACAAAGATTATTTAGCAACGCGTGTGCTTACCATCTAAATTTAACTGGGCCTGCTGTTAGCAT
TCAAACCTGCTTGTTC AACCTCATTTGGTAGCAGTTACATTGCTTGCCAAAGTCTGCTTAATGGAGAGTGT
GACATGGCGCTAGCAGGTGGGCTCTATTTTTGTTTCTCAGGAACCTGGGTATTTGTATCAAGATGGGT
TGGTTGCTTACC GGATGGGC ACTGTAGAGCTTTTGATGCCAAAGCTAACGGAACAGTTCCAAGTAATGG
GATTGGGGTTGTACTCCTTAAGGGACTCAGGGATGCAATTACTGATGGTGATTATATCTATGCAGTGATT
AAGGGTTCAGCTATTAACAACGATGGTTCTTTAAAAGTGGGCTATACTGCGCCTAGTGTAGAAGGTCAAG
CAGCAGTAATTCAGAAGCTCATGCTGTCGCGGGAGTAGACCCAGAGACAATTACATATGTAGAAACTCA
TGGCACCGGCACCTCC

>clone11_CENA107PKS

TTCCTAGTATTGGGTCGCCGAGGCAGGTGCCGGTGCCGTGAGCTTCAATATAGGAGATTGTCTCAGCA
TCTACACCAGCTATAGCTTGAGCTTACCAATGACTGCTGCTTGACCGCTCACACTAGGAGCAGTGTAGC
CGACTTTCATTGCACCATCGTTATTAATCGCCGAGCCTTTAATAATTGCATGAATATAGTCGCGATCGCT
AATTGCATCCTGTAATCTTTTTAATACCACAATACCAGCGCCGTACCTGCGATCGTTCCTTGTGCTTGA
GCATCAAAGCGCGGACAGTGTCCATCAGGAGAAAGAATCATTCCCTCTTGATGCAAATAGCCGATTTTCT

CAGGAATGTTGAGAGTAACTCCACCAGCTAAAGCTATATCACATTCACCATTTAAAAGACCTTGACAAGC
 TATATGAACAGCAACTAAAGAAGTAGAACAAGCTGTTTGCACATTTACTGCGGGGCCAGTTAAGTTGAGT
 TTATATGCAACTCGTGTGCGGTAAAAAATCTTTATCGTTAGAAAATTCCTAATTGTACGGGGTCAATCGTTT
 CTAATAATTGATAATGAGGATAAAGGTTGCTAAAAAGATACTATTTCATCCCTACACCACCATAAACCCC
 AATTAACCATTGTAGGTTTGCGGGTCATAACCAGCTTTTTCTGTTGCTTCCCAAGCCAATTCTAAAAAT
 AGGCGCTGCTGCGGATCCATCGGC

>clone12_CENA107PKS

GAATTCAGTAGTGATTGGGTGCGCGAGGCAGGTGCCGGTGCCATGAGTTTCTACATATGTAATTGTCTCT
 GGGTCTACTCCCGCGACAGCATGAGCTTCTGCAATTACTGCTGCTTGACCTTCTACACTAGGCGCAGTAT
 AGCCCACTTTTAAAGAACCATCGTTGTTAATAGCTGAACCCCTAATCACTGCATAGATATAATCACCATC
 AGTAATTGCATCCTTGAGTCCCTTAAGGAGTGCAACCCCAATCCCACTACTTGGAAGTGTCCGTTAGCT
 TTGGCATCAAAAAGCTCTACAGTGCCCATCCGGTGAAGCAACCAACCCATCTTGATACAAAATACCCAGGTT
 CCTGAGAAAACAAAAATAGAGACCCACCTGCTAGCGCCATGTCACACTCTCCATTAAGCAGACTTTGGCA
 AGCAATGTGAACTGCTACCAATGAGGTTGAACAAGCAGTTTTGAATGCTAACAGCAGGCCAGTTAAATTT
 AGATGGTAAGCAACACGCGTTGCTAAATAATCTTTGTACCTCCCTTAAGATATACCCGTAAACCGAGGT
 CAGATTCAGAATCAAGATTGTTGATTAAATAACTATTAATACTGCAACCAGCGTAAACCCCAATTGAACC
 TTCATATACGTTTGGATTGTAACCACCCCTTTCTATTACTTCCCAAGCACATTTCTAAAAACAACCTCTGT
 T

>clone13_CENA109PKS

CGGCCGCGGAATTCGATTCGGGATGCGATGCCGATGGATCCGCAGCATCGGCTGTTTTTGCAGCAGGCC
 TGGCACGCCTTGGAAGATGCGGGCATTGCGCCCTCTTCCCTGGCCGGCAGCCGCACCGCCGTGTTTGTGG
 GAGTGCAGATGAATGAATATGTGGAGCGGTTTGGCCCCGACGCGGGCCCCCAAGTGGCCACAGGTAACGC
 CCACGCCATGATTGCCAACCGGCTGTCTACCTGCTGGATCTGCGCGGCCCCAGCGAAAATTATTGACACC
 GCTTGCTCTAGCTCCCTGGTGGCTGTGCATCGGGCGGTGACAGGCCATCCGCTCCGGCGAGGCCCCCTTGG
 CGATCGCGGGGGGTGTGCATTTGCTCCTGTCCCCACCGCCGTGATGATGGCGGCGCGGATGGGGGTTTT
 GTCGCCGGAGGGACGCTGCTACGCCTTTGATGCGCGGGCCAATGGCTATGTGAAGGGCGAAGGCGTGGGC
 GTGGTCTGACCTCAAATCGTTAGCCCAAGCTCGGGCCGATCGCGATCATATCTACGGCGTAATTCGGGCTT
 TCGGGGTGAACCATGGTGGCCATGGCATGTCCCTGACGGCTCCGAACCCCTCAGGCCCAGGCTGACTTGAT
 CGCCAGGTATATCAGCAAGCGCGGTGGATCCGGCTTCCATTACCTTGATTGAAACCCACGGCACCGGC
 ACCAGCTTCGGCGACCCAATCACTAGT

>clone14_CENA109PKS

ATGCTCCCGAATCCCTGCAGACACGCGCTGTGGCGTTTACGTGGGAGCCGCCACAACCTTCTATGGCCTC
 GATAGCCAGGACGGCCAGAACGGATCGGCCAACCGTGAACCCAACGCCATGGCTTCCCTGGGATCCTCCA
 TGGCCATCTTGCCCTGCGCGGATTGCCTATCACCTCAACCTCAAGGGCCCGCGATCCCCGTGGATACCGC
 CTGTTCTTCCCTCCCTGGTGGCCTTGCAATTTGGCCTGTCAGGGATTGCTGCAAGGGGATTGTGATTTGGCC
 CTGGCGGGCGGGGTGGCCCTGCTGTTGCTCTCGCCAGGGTGCATCAATTTTTGGACTACAGCGGAATGC
 TGTCCGCCACGAATCAATGCCGTCCCTTTGACCAGTCTGCCAATGGGTTTGTGCCGGCCGAAGGTTGCCG
 GGTGGTGTGTTGAAGCGCCTCAGCGAGGCCCAACGGGACGGCGACCCAATCTATGGGGTGATTTCGGGCT
 TCGGGCATGAACCAGGATGGGCGCTCCAATGGGATTACGGCTCCCAATGTCCAAGCCCAAACGGAACCTGG
 AACAGGCCCTTACACCAAGGGGCAAATTTGACCCACAGCACCTGAGCTATGTGGAAGCCCATGGCACCGG
 CACCACCTCGGGCAGCCAATCAC

>clone17_CENA109PKS

GAATTCAGTAGTGATTGGGTGCGCGAGGCAGGTGCCGGTGCCATGGGCTTCCACATAGCTCAGGGTGCTG
 GGGTCAATTTGCCCTTGGTGTAGAGGGCCTGTTCCAGTTCCGTTTGGGCTTGGACATTGGGAGCCGTAA
 TCCCATTTGGAGCGCCATCCTGGTTTATGCCCCGAAGCCCGAATCACCACATAGATTGGGTCGCCGTCCCG
 TTGGGCTCGCTGAGGCGCTTCAACATCACACCCCGCAACCTTCGGCCGGCACAAAACCCATTGGCAGAC
 TGGTCAAAGGGACGGCATTGATTGTTGTTGCGGACAGCATTCCGCTGTAGTCCAAAAATTTGATGCACCTGG
 GCGAGAGCAACAGCAGGGCCACCCCGCCCGCAGGGCCAAATCACAATCCCTTGCAGCAATCCCTGACA
 GGCCAAATGCAAGGC

>clone18_CENA109PKS

GAATTCAGTAGTGATTGGGTGCGCGAGGGAGGTGCCGGTGCCGTTGGGCTTCCACATAGCTCAGGGTGCTG
 GGGTCAATCTGCCCTTGGTGTAGAGGGCCTGTTCCAGTTCCGTTTGGGCTTGGACATTGGGAGCCGTAA
 TCCCATTTGGAGCGCCATCCTGGTTTATGCCCCGAAGCCCGAATCACCACATAGATTGGGTCGCCGTCCCG
 TTGGGCTCGCTGAGGCGCTTCAACATCACACCCCGCAACCTTCGGCCGGCACAAAACCCATTGGCAGAC
 TGGTCAAAGGGACGGCATTGATTGTTGTTGCGGACAGCATTCCGCTGTAGTCCAAAAATTTGATGCACCTGG
 GCGAGAGCAACAGCAGGGCCACCCCGCCCGCAGGGCCAAATCACAATCCCTTGCAGCAATCCCTGACA
 GGCCAAATGCAAGGC

GCGAGAGCAACAGCAGGGCCACCCCGCCCGCCAGGGCCAAATCACAATCCCCTTGCAGCAATCCCTGACA
GGCCAAATGCAAGGCCACCAGTGAGGAAGAACAGGCGGTATCCACGGGGATCGCCGGGCCCTTGAGGTTG

>clone19_CENA110PKS

TTTTGCAGCAGGCTGGCAGCCTTGGGAAGATGCGGGCATTTCGGCCCTCTTCCCTGGCCGGCAGCCGCAC
CGCCGTGTTTGTGGGAGTGCAGATGAATGAATATGTGGAGCGGTTTGGCCCCGACGCGGGCCCCAAGTG
GCCACAGGTAACGCCACGCCATGATTGCCAACCGGCTGTCTACCTGCTGGATCTGCGCGGCCCCAGCG
AAATTATTGACACCGCTTGCTCTAGCTCCCTGGTGGCTGTGCATCGGGCGGTGCAGGCCATCCGCTCCGG
CGAGGCCCCCTTGGCGATCGCGGGGGGTGTGCATTTGCTCCTGTCCCCACCGCCGTGATGATGGCGGGC
CGGATGGGGGTTTTGTCGCCGGAGGGACGCTGTACACCTTTGATGCGCGGGCCAATGGCTATGTGAAGG
GCGAAGGCGTGGGCGTGGTCTGCCTCAAATAGTTAGCCCAAGCTCGGGCCGATCGCGATCATATCTACGG
CGTAATTCGGGCTTCTGGGGTGAACCATGGTGGCCATGGCATGTCCCTGACGGCTCCGAACCCCTCAGGCC
CAGGCTGACTTGATCGCCAGGTATATCAGCAAGCGGGCGGTGGATCCGGCTTCCATTACCTTGATTGAAA
CCCATGGCACCGGCACCTCCTTCGGCG

>clone20_CENA110PKS

TGTGGAGCGGTTTGGCCCCGACGCGGGCCCCCAAGTGGCCACAGGTAACGCCACGCCATGATTGCCAAC
CGGCTGTCTACCTGCTGGATCTGCGCGGCCCCAGCGAAATTATTGACACCGCTTGCTCTAGCTCCCTGG
TGGCTGTGCATCGGGCGGTGCAGGCCATCCGCTCCGGCGAGGCCCCCTTGGCGATCGCGGGGGGTGTGCA
TTTGTCTCTGTCCCCACCGCCGTGATGATGGCGGCGCGGATGGGGGTTTTGTCGCCGGAGGGACGCTGC
TACACCTTTGATGCGCGGGCCAATGGCTATGTGAAGGGCGAAGGCGTGGGCGTGGTCTGCCTCAAATCGT
TAGCCCAAGCTCGGGCCGATCGCGATCATATCTACGGCGTAATTCGGGCTTCTGGGGTGAACCATGGTGG
CCATGGCATGTCCCTGACGGCTCCGAACCCCTCAGGCCAGGCTGACTTGATCGCCAGGTATATCAGCAA
GCGGCGGTGGATCCGGCTTCCATTACCTTGATTGAAACCCATGGCACCGGCACCAGC

>clone23_CENA110PKS

GAATTCAGTAGTGATTGGGTCGCCGAGGCAGGTGCCGGTGCCATGGGCTTCCACATAGCTCAGGGTGCTG
GGGTCAAATTTGCCCTTGGTGTAGAGGGCTGTTCCAGTTCGGTTTGGGCTTGGACATTGGGAGCCGTAA
TCCCATTGGAGCGCCATCCTGGTTCGTGCCCGAAGCCGAATCACCACATAGATTGGGTGCGCCGTCCCG
TTGGGCTCGCTGAGGCGCTTCAACATCACCACCCCGCAACCTTCGGCCGGCCACAAACCCATTGGCAGA
CTGGTCAAAGGGACGGCATTGATTTCGTGGCCGACAGCATTCCGCTGTAGTCCAAAAATTGATGCACCCTG
GGCGAGAGCAACAGCAGGGCCACCCCGCCCGCCAGGGCCAAATCACAATCCC

>clone24_CENA110PKS

GAATTCAGTAGTGATTGGATCGCCGAGGGTGGTGGCGGTGCCGTGGGCTTCCACATAGCTCAGGGTGCTG
GGGTCAAATTTGCCCTTGGTGTAGAGGGCTGTTCCAGTTCGGTTTGGGCTTGGACATTGGGAGCCGTAA
TCCCATTGGAGCGCCATCCTGGTTCATGCCCGAAGCCGAATCACCACATAGATTGGGTGCGCCGTCCCG
TTGGGCTCGCTGAGGCGCTTCAACATCACCACCCCGCAACCTTCGGCCGGCCACAAACCCATTGGCAGAC
TGGTCAAAGGGACGGCATTGATTTCGTGGCCGACAGCATTCCGCTGTAGTCCAAAAATTGATGCACCCTGG
GCGAGAGCAACAGCAGGGCCACCCCGCCCGCCAGGGCCAAATCACAATCCCCTTGCAGCAATCCCTGACA
GGCCAAATGCAAGGCCACCAGGGAGGAAGAACAGGCGGTATCCACGGGGATCGCCGGGCCCTTGAGGTTG
AGGTGATAGGCAATCCG

>clone25_CENA111PKS

GGCCGCGGAATTTCGATTAGGGAGGCGATGCCGATGGATCCGCGAGCAGCGGGTTTTCTAGAAGAGGCTT
GGAAGGCGATCGAGGATGCCGGTATGCTCCCGAATCCCTTGCAGACACGCGCTGTGGCGTTTACGTGGG
AGCCGCCACAACTTCTATGGCCTCGATAGCCAGGACGGCCAGAACGGATCGGCCAACCGTGAACCCAAC
GCCATGGCTTCTTGGGATCCTCCATGGCCATCTTGCTGCGCGGATTGCCTATCACCTCAACCTCAAGG
GCCCGGCGATCCCTGTGGATACCGCTGTTCTTCCCTCCCTGGTGGCCTTGCATTTGGCCTGTGAGGATT
GCTGCAAGGGGATTGTGATTTGGCCCTGGCGGGCGGGGTGGCCCTGCTGTTGCTCTCGCCAGGGTGCAT
CAATTTTTGGACTACAGCGGAATGCTGTGCGCCACGAATCAATGCCGTCCCTTTGACCAGTCTGCCAATG
GGTTTGTGCCGGCCGAAGGTTGCGGGGTGGTGTGTTGAAGCGCCTCAGCGAGGCCCAACGGGACGGCGA
CCCAATCTATGGGGTATTTCGGGCTTCGGGCATGAACCAGGATGGGCGCTCCAATGGGATTACGGATCCC
AATGTCCAAGCCAAACGGAACCTGGAACAGGCCCTTACACCAAGGGGCAAATTGACCCAGCACCCTGA
GCTATGTGGAAGCCATGGCACCGGCACCTCCTTCGGCGATCCA

>clone27_CENA111PKS

GCCGCGGAATTTCGATTAGGGAGGCGTAGGAGATGGATCCGCAACAGCGGCTGTTTTTGCAGCAGGCTG
GCACGCCCTTGGGAAGATGCGGGCATTTCGGCCCTCTTCCCTGGCCGGCAGCCGCACCAGCCGTGTTTGTGGGA
GTGCAGATGAATGAATATGTGGAGCGGTTTGGCCCCGACGCGGGCCCCAAGTGGCCACAGGTAACGCC
ACGCCATGATTGCCAACCGGCTGTCTACCTGCTGGATCTGCGCGGCCCCAGCGAAATTATTGACACCGC

TTGCTCTAGCTCCCTGGTGGCTGTGCATCGGGCGGTGCAGGCCATCCGCTCCGGCGAGGCCCCCTTGGCG
 ATCGCGGGGGTGTGCATTTGCTCCTGTCCCCACCGCGTGATGATGGCGGCGGGATGGGGGTTTTGT
 CGCCGGAGGGACGCTGTACACCTTTGATGCGCGGGCCAATGGCTATGTGAAGGGCGAAGGCGTGGGCGT
 GGTCTGCCTCAATCGTTAGCCCAAGCTCGGGCCGATCGCGATCATATCTACGGCGTAATTCGGGCTTCTG
 GGGTGAACCATGGTGGCCATGGCATGTCCCTGACGGCTCCGAACCCCTCAGGCCAGGCTGACTTGATCGC
 CCAGGTATATCAGCAAGCGGCGGTGGATCCGGCTTCCATTACCTTGATTGAAACCCATGGCACCGGCACC
 ACCCTCGGGCACCCAATCACTA

>clone29_CENA111PKS

GAATTCAGTGTGATTGGGTCGCCGAAGCTGGTGCCGGTGCCGTGGGTTTCAATCAAGGTAATGGAAGCC
 GGATCCACCGCCGCTTGCTGATATACCTGGGCGATCAAGTCAGCCTGGGCTGAGGGTTCGGAGCCGTCA
 GGGACATGCCATGGCCACCATGGTTCACCCAGAACCCGAATTACGCCGTAGATATGATCGCGATCGGC
 CCGAGCTTGGGCTAACGATTTGAGGCAGACCACGCCACGCCCTTCGCCCTTCACATAGCCATTGGCCCGC
 GCATCAAAGGTGTAGCAGCGTCCCTCCGGCGACAAAACCCCATCCGCGCCGCCATCATCACGGCGGTGG
 GGGACAGGAGCAAATGCACACCCCCCGCGATCGCCAAGGGGGCCCTCGCCGGAGCGGATGGCCTGCACCGC
 CCGATGCACAGCCACCAGGGAGCTAGAGCAAAGCGGTGTCAATAATTTGCTGGGGGCCGCGCAGATC

>clone30_CENA111PKS

GAATTCAGTGTGATTGGGTCGCCGAGGGTGGTGCCGGTGCCATGGGTTTCAATCAAGGTAATGGAAGCC
 GGATCCACCGCCGCTTGCTGATATACCTGGGCGATCAAGTCAGCCTGGGCTGAGGGTTCGGAGCCGTCA
 GGGACATGCCATGGCCACCATGGTTCACCCAGAACCCGAATTACGCCGTAGATATGATCGCGATCGGC
 CCGAGCTTGGGCTAACGATTTGAGGCAGACCACGCCACGCCCTTCGCCCTTCACATAGCCATTGGCCCGC
 GCATCAAAGGTGTAGCAGCGTCCCTCCGGCGACAAAACCCCATCCGCGCCGCCATCATCACGGCGGTGG
 GGGACAGGAGCAAATGCACACCCCCCGCGATCGCCAAGGGGGCCCTCGCCGGAGCGGATGGCCTGCACCGC
 CCGATGCACAGCCACCAGGGAGCTAGAGCAAAGCGGTGTCAATAATTTGCTGGGGGCCGCGCAGATCCAGC
 AGGTAGGACAGACGGTTGGCAATCATGGCGTGGGCGTTACCTGTGGCCACTTGGGGGCCGCGTCGGGGC
 CAAACCGCTCCACATATTCATTCATCTGCACTCCACAAAACACGGCGGTGCGGCTGCCGGCCAGGGAAGA
 GGGCCGAATGCCCGCATCTTCCAAGGCGTGCCAGGCCTGCTGCAAAAACAGCC

>clone31_CENA112PKS

CGCAGCAGCGATTATTGCTGGAATGTGCTGGGAAGGCCCTGGAGGATGCGGGCTACAATCCATTTCATCTA
 TGGAGGCGCGATTGGCCTTTATGCTGGTGCCTGCGATGAATACTTACCTGCTGAATCAGGTTTTATCCCAAT
 CGTACCAGTTGGATGAACAGGACTCTTTCAGGTGCTGACGCTCAGTTCAATGGGTGGCTTTCAACTCA
 CCACAGCCAACGACAAAGACTATCTACCACCCGCTCTCTTATAAGCTGAATCTCAAAGGCCCCAGTAT
 TAATGTGCAAACCGCCTGTTTCGACCTCGCTGGTAGCGGTGCATCTGGCCTGCCAGAGTTTGTGCAAGGC
 GACTGTGATATGGCGCTGGCGGGCGGTGTGTGGTGCATGTGCCGCAAACAGTGGGCCATCTGTATCAGG
 ATGGGATGATTTTAACTTCCGATGGGCATTGTGCGCGTTCGATGCCAGGCCAGCGGCACTATCTTTGG
 CAGCGGTGCCGGAGTGGTTCGTTTTGAAGCGGTTGGATCAGGCTGTGGCAGAGGTTGATCGGATCTATGCC
 GTGATCAAAGGATCGGCGATTGGCAACGACGGCAGCAACAAAGTCGGCTATTTTGCACCCAGCGCTGCGG
 GTCAGGCGCTTGTAAACCGCAGAGGCGATTGCCGCCGAGGTGTTGATCTGAAACAATTGGCTATGTAGA
 AGCCACGGCACCGGCACCACCTCGGCGACC

>clone32_CENA112PKS

CGGCCGCGGGAATTTCGATTAGGGAGGCGTAGGAGATGGACCCGAGCAGCGATTATTGCTGGAATGTGCC
 TGGGAAGGCCTGGAGGATGCGGGCTACAATCCATTTCATCTATGGAGGCGGATTGGCCTTTATGCTGGTG
 CGTCGATGAATACTTACCTGCTGAATCAGGTTTATCCCAATCGTCACCAGTTGGATGAACAGGACTCTTT
 GCAGGTGCTGACGCTCAGTTCAATGGGTGGCTTTCAACTCACACAGCCAACGACAAAGACTATCTCACC
 ACCCGCTCTCTTATAAGCTGAATCTCAAAGGCCCCAGTATTAATGTGCAAACCGCCTGTTTCGACCTCGC
 TGGTAGCGGTGCATCTGGCCTGCCAGAGTTTGTGCAAGGCGACTGTGATATGGCGCTGGCGGGCGGTGT
 GTCGGTGCATGTGCCGCAAACAGTGGGCCATCTGTATCAGGATGGGATGATTTTAACTTCCGATGGGCAT
 TGTGCGCGTTCGATGCCAGGCCAGCGGCACTATCTTTGGCAGCGGTGCCGGAGTGGTTCGTTTTGAAGC
 GGTTGGATCAGGCTGTGGCAGAGGGTGCATCGGATCTATGCCGTGATCAAAGGATCGGCGATTGGCAACGA
 CGGCAGCAACAAAGTCGGCTATTTTGCACCCAGCGCTGCGGGTCAGGCGCTTGTAAACCGCAGAGGCGATT
 GCCGCCGAGGTGTTGATCCTGAAACAATTGGCTATGTAGAAGCCACGGCACCGGCACCACCTCGGGC
 ACC

>clone33_CENA112PKS

GAATTCAGTGTGATTGGATCGCCGAGGCAGGTGCCGGTGCCGTGGGCTTCTACATAGCCAATTGTTTTCA
 GGATCAACACCTGCGGCGGCAATCGCCTTTCGCGTTACAAGCGCTGACCCGAGCGCTGGGTGCAAAAT
 AGCCGACTTTGTTGCTGCCGTCGTTGCCAATCGCCGATCCTTTGATCACGGCATAGATCCGATCACCCTC
 TGCCACAGCCTGATCCAACCGCTTCAAACGACCACTCCGGCACCGCTGCCAAAGATAGTGCCGCTGGCC

TGGGCATCGAACGCGCGACAATGCCCATCGGAAGTTAAAATCATCCCATCCTGATACAGATGGCCCACTG
 TTTGCGGCACATGCACCGACACACCGCCCGCCAGCGCCATATCACAGTCGCCTTGCAGCAAACCTCTGGCA
 GGCCAGATGCACCGCTACCAGCGAGGTGCAACAGGCGGTTTGACATTAATACTGGGGCCTTTGAGATTC
 AGCTTATAAGAGACGCGGGTGGTGAGATAGTCTTTGTGCTGGCTGTGGTGAGTTGAAAGCCACCCATTG
 AACTGAGCGTCAGCACCTGCAAAGAGTCCTGTTTCATCCAACCTGGTGACGATTGGGATAAACCTGATTTCAG
 CAGGTAAGTATTCATCGACGCACCCAGCATAAAGGCCAATCGCGCCTCCATAGATGAATGGATTGTAGCCC
 GCATCCTCCAGGCCTTCCCAGGCACATTCCAGCAAT

Mini-Biblioteca do gene *cpcBA* (ficocianina)

>Cajati clone 01

GAAATCATCCTGCGCTACGTAACCTACGCTGTAATGGCAGGTGATGCAAGCGTACTCGACGATCGCTGCT
 TGAACGGACTGCGCGAAACCTACCAAGCTTTGGGAACTCCTGGTTCTTCCGTAGCTGTAGGCGTTCAAAA
 GATGAAGGAAGCTGCTGTCAAGATTGCTAACGATCCCAACGGTATCACCCAAGGCGATTGCAGCCAGTTG
 ATGCTGTAAGTTGCTAGCTACTTCGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCTTAGAAAAGTTGTTAGCGATTAG
 CTCTAGCTAAAAGCTGACTGCTCGTACCTGACCTAAATTAACCAACTGCAATAATAGAGATTGTCAAACA
 ATGAAAACACCGATTACTGAAGCAATTGGCGCTGCCGATACCCAAGGTCGTTTCTTAAGCAACACCGAGC
 TACAAGCAATCAACGGTTCGTTTCGATCGCGCTTCTGCTAGCATGGAAGCTGCTCGCGCTCTGACCAGCAA
 AGCTCAACAACCTCGTTGACGGTGTGCTCAAGCTGTGTACAGCAAGTTTCCTTACACCACCCAAATGCAA
 GGACCTCAGTACGCTGCTGACTCACGCGGTAATCCAAGTGCCTCGCGATATCGGTCACTACCTGCGGA
 TGGTTACCT

>Cajati clone 24

TCCAGTACCACCAGCAACTAAGCAGTAGGTAACCATTGCAAGTAGTAACCGATGTCACGTACACACTTT
 TCTCTACCTGTTTGGGTAGAAGCGTAGTTTGGCCCTTGCAATTTGAGTGGTGTAAAGGAACTTTTGGTATA
 CAGCATTGCTGCACCTTCTGCCAAACGTTGTGCGTTGCTGGTCAATCCTTTAGCAGCTTCTAAGCTTGC
 TGTGCTTGACGATAACGACCAAAAGCGGTTTGCATTTCCGGTGTGCTTAGGAAACGTCTTGTGAGTCA
 GCAGATGCTACTGCTTCGGTAAGAGGAGTTTTCATCGGTCCAGTATCTCCCTTTTACAAAATTTTGTFTA
 AAGTAGTTTATGTGCAACTGACTATATATAGTCAGCGATTGCGGTGCGGTAGTTAAACTACAGCTTATGA
 TACAGCAGATGCTGCACGGTCAAGTAGCTAGATACTTCAGACATCAATGCGCTGCAATCACCTTTGGTG
 ATATTATTGGGATCGCCAGCAATTGCTAATGCTGCTTCTTTTCATCTTTTGAACGCCAACTGCTACTGAAG
 CTCCGGGGGTTTCTAAAGCTAAGTAGGTTTCGCGTAAACCGTTCAAACAACGGTTCATCGAGAACACTAGC
 GTCGCCAGAGAAAATTGCGTAGGTTACATAGCGCAAAATGATTTCCATGTGCGGTAAACAAGCAGCCA

>Cajati clone 95

TGGAAATCATCCTGCGCTACGCAACCTACGCTGTAATGGCAGGTGATGCAAGCGTACTCGACGATCGCTG
 CTTGAACGGACTGCGCGAAACCTACCAAGCTTTGGGAACTCCTGGTTCTTCCGTAGCTGTAGGCGTTCAA
 AAGATGAAGGAAGCTGCTGTCAAGATTGCTAACGATCCCAACGGTATCACCCAAGGCGATTGCAGCCAGT
 TGATGTCTGAAGTTGCTAGCTACTTCGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCTTAGAAAAGTTGTTAGCGATT
 AGCTCTAGCTAAAAGCTGACTGCTCGTACCTGACCTAAATTAACCAACTGCAATAATAGAGATTGTCAA
 CAATGAAAACACCGATTACTGAAGCAATTGGCGCTGCCGATACCCAAGGTCGTTTCTTAAGCAACACCGA
 GCTACAAGCAATCAACGGTTCGTTTCGATCGCGCTTCTGCTAGCATGGAAGCTGCTCGCGCTCTGACCAGC
 AAAGCTCAACAACCTCGTTGACGGTGTGCTCAAGCTGTGTACAGCAAGTTTCCTTACACCACCCAAATGC
 AAGGACCTCAGTACGCTGCTGACTCACGCGGTAATCCAAGTGCCTCGCGATATCGGTCACTACCTGCG
 GATGGTTACCTACTGC

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)