

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA – CENA/USP

KARLA NISHIYAMA MARQUES

**Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de
efluentes de uma mina de urânio desativada com ênfase em
Aphanothece e sua capacidade de bioissorção do ^{226}Ra**

Piracicaba

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA – CENA/USP

KARLA NISHIYAMA MARQUES

**Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de
efluentes de uma mina de urânio desativada com ênfase em
Aphanothece e sua capacidade de biossorção do ^{226}Ra**

Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente.
Orientadora: Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba

2006

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.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Marques, Karla Nishiyama

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 ^{226}Ra / Karla Nishiyama Marques; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2006.

118 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Adsorção 2. Cultura de microrganismos 3. Filogenia 4. Genes RNAr 16S 5. Radionuclídeo I. Título

CDU 579.26:504.4

“Aos meus pais e à minha irmã,
dedico.”

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Marli de Fátima Fiore, pela paciência, apoio, conhecimentos compartilhados, confiança e incentivos; por todas as faces e fases de uma orientação,

Ao Dr Wilson Cervi da Costa da Comissão Nacional de Energia Nuclear/Coordenação do Laboratório de Poços de Caldas-MG, pela coordenação e desenvolvimento dos trabalhos na CNEN, por todos os ensinamentos e pela harmonia que inspira.

À Dr^a Heliana de Azevedo Gomes da Comissão Nacional de Energia Nuclear/Coordenação do Laboratório de Poços de Caldas-MG, pela oportunidade oferecida e confiança depositada.

À Dr^a Siu Mui Tsai, por todo o suporte oferecido,

À Dr^a Célia Leite Sant'Anna do Instituto de Botânica da Secretaria do Estado de São Paulo, pelas identificações das cianobactérias isoladas, pelas orientações e ensinamentos.

À Profa Dra. Elaine Carrer do Laboratório de Biologia Molecular do LB/CEBTEC da ESALQ, por disponibilizar o laboratório para os seqüenciamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda, do Laboratório de Carbono 14 deste Centro, por disponibilizar o microscópio óptico para as fotos das cianobactérias.

Aos técnicos Armando Luiz Bruschi, Cláudio Vitor Roque e Osvaldo Teles da Costa do Laboratório de Radioecologia da CNEN/Poços de Caldas pelo suporte nas coletas e desenvolvimento dos ensaios com radionuclídeo, pelo carisma e simpatia sempre presentes.

À técnica Valentina de Fátima de Martin, do Laboratório de Biologia Molecular do LB /CEBTEC, por todo auxílio, sugestões e bom humor durante o seqüenciamento.

Aos técnicos José Elias Gomes, Fábio Duarte, Francisco Montrazi e Wagner Piccinini do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, pelas sugestões e auxílios no decorrer do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Radioecologia da CNEN/Poços de Caldas, Leilane Ronqui, Leonardo Ogeta Tarifa e Michelle Borato pelo desenvolvimento dos ensaios de radionuclídeos, pelos dados compartilhados e pelas “duas”.

Aos integrantes do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, Ana Luiza Fonseca Fortes Furtado, Adriana Sturion Lorenzi, Caroline Souza Pamplona da Silva, Daniele Takahashi, Daniele Toledo Del Rio, Diego Bonaldo Genuário, Felipe Pacheco, Maria Estela Stenico, Ricardo Yukio Honda, Tânia Keiko Shishido, Victor da Silva Santos, por toda contribuição e suporte intelectual, braçal e emocional que apoiaram o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os alunos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, pelo apoio acadêmico e pela vivência, com as físicas, sugestões, ilustrações, músicas e corredores a fio.

Aos amigos das comissões organizadoras dos Encontros Científicos dos Pós-Graduandos no CENA-USP, pelas discussões, decepções, paciência e conquistas divididas.

Aos amigos que me cativaram e que cativei na trajetória por Piracicaba, por mostrarem o valor de conversas noite a fora, trabalhos noite adentro, discussões dias a fio, dedicação madrigal, amparo intransitivo; e também por serem lares e ensinarem o leve peso da lágrima, a maestria de um sorriso, a cura em um abraço.

À Comissão de Pós-Graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários da Pós-Graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela paciência, auxílio e carisma durante todo o decorrer do curso de mestrado.

À Industrias Nucleares do Brasil S/A – Caldas/MG, por permitir as coletas necessárias para o desenvolvimento do trabalho.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear, pela oportunidade de realização deste trabalho em suas instalações.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelos recursos financeiros concedidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado.

“Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
o que importa é que sempre é possível e necessário "Recomeçar" ...”

Paulo Roberto Gaefke

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

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

As cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes oxigênicos com ampla plasticidade metabólica e estrutural, que apresentam potencial biotecnológico para exploração na bio sorção de metais pesados e biodegradação de poluentes orgânicos. Devido as suas fortes interações com cátions e ao contínuo suprimento de biomassa barata, as cianobactérias podem ser candidatas promissoras à bio sorventes para remoção de metais e radionuclídeos. Dessa maneira, numa tentativa de encontrar uma cianobactéria com esse perfil para remover ^{226}Ra de uma mina de urânio desativada da Unidade de Tratamento de Minérios (UTM) pertencente às Indústrias Nucleares do Brasil (INB), Caldas, MG, doze linhagens de cianobactérias foram isoladas desse ambiente. Essas linhagens foram morfológicamente caracterizadas como *Aphanothece* sp. CENA75, *Rhabdoderma* sp. CENA114, *Synechococcus* cf. *lividus* CENA79, *Aphanocapsa* cf. *holsatica* CENA80, *Geitlerinema acutissimum* CENA85, *Pseudanabaena galeata* CENA84, *Pseudanabaena* sp. CENA81, *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76, *Leptolyngbya* sp. CENA83, *Phormidium formosum* CENA86, *Phormidium violaceum* CENA82 e *Nostoc* sp. CENA87. A análise molecular dos isolados, baseada em seqüências quase completas do gene RNAr 16S (1325 pb), estava de acordo com a análise morfológica, com exceção das linhagens *Rhabdoderma* sp. CENA114 e *Phormidium violaceum* CENA82. As seqüências de RNAr 16S dessas duas linhagens mostraram valores baixos de identidades (<92%) com seqüências do GenBank, o que pode representar novas espécies de cianobactérias. Altas percentagens de identidades (>96%) das seqüências do gene de RNAr 16S foram encontradas entre as linhagens restantes e as do GenBank. A árvore filogenética construída usando o método "Neighbour-

Joining” mostrou que as linhagens unicelulares das ordens Chroococcales e as filamentosas da Oscillatoriales eram polifiléticas, conforme já relatado.

A distribuição e abundância da população de cianobactérias nos efluentes da UTM-INB foram investigadas pelo método da contagem de células viáveis (número mais provável, NMP). O NMP mostrou uma população de cianobactérias variando de 4.0×10^0 to $\geq 2.4 \times 10^8$ cells·mL⁻¹. Os locais Cava da Mina, com pH médio de 3,88, e o sistema de tratamento da usina, com pH 8,0, mostraram os mais baixos e mais altos valores de NMP, respectivamente.

Para identificar os isolados de cianobactérias prejudiciais, um teste imunológico (ELISA) foi realizado para detectar microcistinas, uma hepatotoxina que causa envenenamento em humanos. A produção de microcistinas foi detectada em três isolados, *Pseudanabaena galeata* CENA84, *Pseudanabaena* sp. CENA81 e *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76. Esse resultado é inédito, pois não há relatos dos gêneros *Pseudanabaena* e *Leptolyngbya* como produtores de microcistinas.

Baseado nos resultados obtidos, a linhagem *Aphanothece* CENA75 encontrada em todos os efluentes da UTM-INB amostrados, inclusive no local Cava da Mina, o qual possui pH ácido (média de 3,88) e elevado teor de urânio ($5,68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e rádio, foi selecionada para os testes de bioadsorção com ²²⁶Ra. Os experimentos conduzidos em pH 3,5 e 5,0 mostraram que a biomassa seca de *Aphanothece* CENA75 comporta-se como uma resina de troca iônica fracamente ácida. A razão (concentração final/concentração inicial) da adsorção do ²²⁶Ra após 135 minutos em pH 3,5 e 5,0 foi de 0,86 e 0,82, respectivamente. Esses resultados mostraram que a biomassa seca de *Aphanothece* CENA75 adsorveu uma baixa quantidade de ²²⁶Ra nos dois valores de pHs estudados. Entretanto, o aumento da retenção do radionuclídeo em pH 5,0 sugere que mais adsorção pode ocorrer em pH acima desse valor.

Palavras-chave: Adsorção, Cultura de microrganismos, Filogenia, Genes RNAr 16S, Radionuclídeo.

ABSTRACT

MARQUES, K.N. 2006. **Morphological and molecular analysis of cyanobacteria isolated from a deactivated uranium mine effluents with emphasis in *Aphanothece* and its ^{226}Ra biosorption capacity**. 2006. 118 f. Dissertation (Master of Science). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2006.

Cyanobacteria are oxygenic photosynthetic microorganisms with wide metabolic and structural plasticity, which have biotechnological potential for exploration in metals biosorption and organic pollutants biodegradation. Due to its strong interactions with cations and a reliable supply of cheap biomass, cyanobacteria may be a promising biosorbent candidate for removing metals and radionuclides. In this way, in an attempt to find a cyanobacteria with this profile to remove ^{226}Ra from a deactivated uranium mine effluents of the Ores Treatment Unit (UTM) belonging to the Nuclear Industries of Brazil (INB), Caldas, MG, twelve cyanobacterial strains were isolated from this environment. These strains were characterized morphologically as *Aphanothece* sp. CENA75, *Rhabdoderma* sp. CENA114, *Synechococcus* cf. *lividus* CENA79, *Aphanocapsa* cf. *holsatica* CENA80, *Geitlerinema acutissimum* CENA85, *Pseudanabaena galeata* CENA84, *Pseudanabaena* sp. CENA81, *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76, *Leptolyngbya* sp. CENA83, *Phormidium formosum* CENA86, *Phormidium violaceum* CENA82 and *Nostoc* sp. CENA87. The molecular analysis of the isolates, based on the sequences of nearly complete 16S rRNA gene (1325 bp), was in agreement with the morphological analysis, with exception of *Rhabdoderma* sp. CENA114 and *Phormidium violaceum* CENA82 strains. The 16S rRNA sequences of these two strains showed low identities scores (<92%) with sequences from GenBank, which may represent novel cyanobacterial species. High percentages of identities (>96%) of 16S rRNA gene sequences were found between the remaining strains and of the GenBank. The phylogenetic tree of 16S rRNA sequences constructed using Neighbour-Joining method showed that

unicellular strains of the orders Chroococcales and filamentous Oscillatoriales were polyphyletic, as reported earlier.

The distribution and abundance of cyanobacterial population in the effluents of UTM-INB were investigated by viable cells counting (most probable number, MPN) method. The MPN showed a cyanobacterial population range from 4.0×10^0 to $\geq 2.4 \times 10^8$ cells·mL⁻¹. The locations of the Pit Mine with pH 3.88 and the Plant System Treatment with pH 8.0 showed the lowest and highest MPN values, respectively.

To identify harmful cyanobacterial isolates, an immunological test (ELISA) was carried out to detect microcystins, a hepatotoxin which cause human poisoning. Microcystins production was found in three isolates, *Pseudanabaena galeata* CENA84, *Pseudanabaena* sp. CENA81 and *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76. This is a novel result since there is no report for both genera, *Pseudanabaena* and *Leptolyngbya*, as microcystin producers.

Based on the obtained results, the *Aphanothece* CENA75 strain found in all UTM-INB effluents sampled, including in the Pit Mine location, which has an acidic pH (average of 3.88) and high level of uranium ($5.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and radium, was selected for the ²²⁶Ra biosorption assays. The experiments performed in pH 3.5 and 5.0 showed that dried biomass of *Aphanothece* CENA75 behaves as a weakly acid resin. The ratio (final concentration/initial concentration) of ²²⁶Ra adsorption after 135 min in pH 3.5 and 5.0 was 0.86 and 0.82, respectively. These results showed that the dried biomass of *Aphanothece* CENA75 adsorbed low amount of ²²⁶Ra in both studied pH values. However, the increase of the radionuclide retention in pH 5.0 suggests that more adsorption may occur in pH above of this value.

Keywords: Adsorption, Microorganisms culture, Phylogeny, 16S rRNA genes, Radionuclide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Objetivos.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Características gerais de cianobactérias.....	17
2.2	História da sistemática de cianobactérias.....	19
2.3	Sistemática molecular de cianobactérias.....	24
2.4	Cianobactérias e acúmulo de metais e radionuclídeos.....	29
2.5	A Unidade de Tratamento de Minérios-Indústrias Nucleares do Brasil S/A, Caldas – MG.....	35
2.5.1	O radionuclídeo ^{226}Ra	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Área de Estudo.....	39
3.2	Coletas de amostras de água.....	41
3.3	Parâmetros Abióticos.....	43
3.4	Isolamento de cianobactérias.....	43
3.5	Número mais provável (NMP).....	46
3.6	Caracterização morfológica das cianobactérias isoladas.....	47
3.7	Caracterização molecular das cianobactérias isoladas.....	47
3.7.1	Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias....	47
3.7.2	Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S nos isolados..	48
3.7.3	Clonagem.....	48
3.7.4	Transformação.....	49
3.7.5	PCR usando colônias.....	49
3.7.6	Extração de DNA plasmidial.....	50
3.7.7	Seqüenciamento.....	51
3.7.8	Processamento e análise filogenética das seqüências.....	51
3.8	Análise de microcistinas.....	52
3.9	Experimentos de Biossorção do ^{226}Ra	52
3.9.1	Produção e preparo do bioissorvente (biomassa seca).....	53
3.9.2	Solução sintética do radionuclídeo ^{226}Ra	54
3.9.3	Cinética de biossorção do ^{226}Ra	54

3.9.4	Determinações químicas e radiométricas.....	55
3.9.5	Análise estatística.....	56
3.9.6	Limpeza e descontaminação.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Dados abióticos dos efluentes da UTM-INB.....	59
4.2	Cianobactérias isoladas de efluentes da UTM-INB.....	61
4.2.1	Caracterização morfológica das cianobactérias isoladas.....	63
4.3	Caracterização molecular usando a seqüência de RNAr 16S.....	71
4.4	Biomassa – Número Mais Provável (NMP).....	77
4.5	Análise de microcistinas.....	79
4.6	Cinética de bio sorção do 226Ra.....	80
5	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
	ANEXOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos fotoautotróficos produtores de oxigênio, de ampla diversidade estrutural e metabólica (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). Os representantes desse grupo têm distribuição abrangente nos ecossistemas naturais, desenvolvem-se em ambientes dulcícolas, marinhos e terrestres. Algumas espécies colonizam locais de condições extremas como regiões árticas, fontes termais e de pouca ou nenhuma iluminação (CASTENHOLZ, 1976; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1996; WHITTON; POTTS, 2000).

Esses microrganismos desempenham importantes papéis em seu hábitat. Por realizarem fotossíntese com liberação de oxigênio têm atividade direta na ciclagem do carbono e do oxigênio na atmosfera e atuam como produtores primários e, portanto, como base de cadeia alimentar nos ecossistemas (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973). Além disso, há espécies capazes de fixar nitrogênio atmosférico, dessa forma atuam também na ciclagem deste elemento (WOLK; ERNST; ELHAI, 1994).

A diversidade metabólica e estrutural das cianobactérias reflete-se não apenas na habilidade de sobrevivência em tamanha variedade de ambientes, como também de sintetizar diferentes substâncias bioquimicamente ativas que podem funcionar como inibidores enzimáticos, herbicidas, antimicóticos, inibidores de apetite, antimaláricos e imunossupressores (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et al., 2004; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996). Aliado a isso, há a preocupação com a produção de substâncias tóxicas, tais como hepatotoxinas e neurotoxinas que várias espécies produzem (SIVONEN; JONES, 1999). Esforços vêm sendo feitos para caracterizar e entender o funcionamento desses produtos do metabolismo das cianobactérias.

Outro enfoque dado às investigações da versatilidade metabólica e estrutural das cianobactérias é sua utilização como alternativa para mitigar os efeitos negativos sobre o ambiente resultantes de atividades antropogênicas. Dentre as diferentes atividades humanas que podem gerar contaminantes estão a mineração e o processamento de metais

e radionuclídeos, as quais geram rejeitos que por vezes são ultra-diluídos. Apesar do baixo teor, esses rejeitos são persistentes e podem ser tóxicos mesmo em baixas quantidades, além do problema gerado pela radioatividade no caso dos radionuclídeos (COSTA, 2003; VOLESKY, 1990). A baixa concentração desses elementos nos efluentes torna difícil sua remoção por técnicas de purificação tradicionais como sedimentação, troca iônica etc. Por isso, incentiva-se o desenvolvimento de técnicas alternativas ou adicionais para a remoção de metais e radionuclídeos em solução (HUTCHINS et al., 1986).

Uma alternativa para essa limpeza é utilizar a capacidade dos microrganismos de reterem metais/radionuclídeos, elaborando biotratamentos. Os biotratamentos exploram os mecanismos de interação metal-células que podem ser divididos em duas fases. Uma é geralmente rápida, pode acontecer em células vivas ou mortas e envolve processos físico-químicos (processo passivo). A outra fase é mais lenta e envolve transporte ativo, pela interiorização do metal ou pela transformação de íons (precipitação ou solubilização) por metabólitos produzidos pelas células microbianas (COSTA, 2003; GARDEA-TORRESDEY et al., 1998; VOLESKY 1990; 2004). Essas duas fases são alvos de investigações em diversos microrganismos. Para as cianobactérias, os processos mais estudados são a bioadsorção e a bioacumulação. O primeiro refere-se à propriedade apresentada por biomassas de adsorver e concentrar íons inorgânicos, mesmo de soluções muito diluídas, sem a utilização de energia metabólica e ocorre tanto em células vivas como mortas. Por outro lado, na bioacumulação há gasto de energia e os íons são complexados no interior das células e/ou transformados próximo ao envoltório celular (COSTA, 2003; VOLESKY, 1994, 1990).

No Brasil, na região do Planalto de Poços de Caldas –MG, há efluentes contendo radionuclídeos derivados das atividades da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares Brasileira, Caldas/MG (UTM-INB), a qual foi o primeiro empreendimento de lavra e tratamento de minério de urânio a operar no país (CIPRIANI, 2002). O complexo é constituído de uma mina a céu-aberto e suas áreas de bota-foras, instalações de tratamento físico de minério e usina de tratamento químico para extração de

urânio por processo hidrometalúrgico e bacia de rejeitos, além das instalações de utilidades e administrativas, destacando-se uma fábrica de ácido sulfúrico. Após funcionamento descontínuo desde 1977, em 1995 houve a paralisação definitiva das atividades de lavra e de tratamento químico de minério de urânio. Atualmente a UTM-INB está em fase de descomissionamento, sendo que neste processo estabelecem-se formas de se manter o local seguro para novos empreendimentos e/ou alternativas para recuperá-lo e finalizar as atividades extrativistas. Nesse sentido, o desenvolvimento de estudos envolvendo a caracterização dos microrganismos presentes nesse ambiente e sua relação com os compostos contaminantes, pode contribuir para um descomissionamento mais seguro e com alternativas de mitigação de impactos.

O presente estudo caracteriza-se como uma primeira referência de cianobactérias para águas de área contaminada com radionuclídeos no Brasil. Essa investigação envolveu a caracterização morfológica e molecular de cianobactérias isoladas dos efluentes da UTM-INB. A análise molecular foi feita usando as seqüências gênicas de RNAr 16S. Este trabalho também contribui para a investigação de alternativas de remediação, pois avalia o potencial de bio sorção de uma das espécies isoladas da própria UTM-INB para o radionuclídeo ^{226}Ra .

1.1 Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi caracterizar as cianobactérias presentes nos efluentes da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil S/A, Caldas-MG, e avaliar a capacidade de bio sorção da linhagem predominante. Para tanto, foram utilizadas as seguintes abordagens:

- ✓ Isolamento e purificação de cianobactérias presentes nos efluentes da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil S/A, Caldas-MG;
- ✓ Classificação taxonômica das linhagens isoladas por meio de análises morfológicas e seqüências do gene de RNAr 16S;

- ✓ Construção de árvores filogenéticas usando as seqüências de RNAr 16S;
- ✓ Análise da capacidade de bioabsorção do radionuclídeo ^{226}Ra pela biomassa seca da linhagem mais distribuída nesse ambiente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais de cianobactérias

As cianobactérias compreendem um grupo único dentro do domínio *Bactéria*, capazes de realizar fotossíntese oxigênica (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). A grande maioria dos gêneros conhecidos possuem clorofila *a* e ficobiliproteínas como pigmentos coletores de luz, com exceção dos gêneros *Prochloron*, *Prochlorococcus* e *Prochlorothrix*, os quais possuem somente clorofila *a* e *b* (URBACH; ROBERTSON; CHISHOLM, 1992). O aparato fotossintético desses microrganismos é estrutural, molecular e funcionalmente similar àqueles contidos nos cloroplastos de plantas e algas, onde a H_2O é o fotoredutor com conseqüente liberação de O_2 . No entanto, apesar de sua natureza tipicamente fotossintética aeróbica, alguns exemplares do grupo podem crescer no escuro na presença de certos substratos orgânicos (heterotróficos facultativos) (SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997) e outros sob condições anaeróbicas, utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986).

Uma importante característica de muitas cianobactérias é sua habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico. Em muitos ambientes bem oxigenados, a fixação de N_2 ocorre em células modificadas denominadas heterocitos que possuem um envoltório espesso capaz de evitar a entrada de O_2 , o qual inibe a atividade da enzima nitrogenase (WOLK; ERNST; ELHAI, 1994). Algumas poucas espécies apresentam estratégias fisiológicas particulares que permitem a fixação de N_2 em condições bem oxigenadas mesmo sem heterocito, entretanto essa habilidade está mais presente em condições micro-oxigenadas (BERGMAN et al., 1997).

A habilidade das cianobactérias de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio, acumular carbono e fixar nitrogênio, faz com que elas desempenhem importante papel no ciclo desses elementos (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973). Esses organismos também têm significância evolutiva em relação às plantas, pois é cada vez mais aceita a

teoria de que um antepassado deles deu origem, por endossimbiose, aos cloroplastos das plantas (RAVEN; ALLEN, 2003). Outra importante contribuição é o seu papel ecológico, fundamental como produtores primários e, portanto, como base de cadeia alimentar nos ecossistemas (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973).

As cianobactérias possuem grande variedade de formas e arranjos, há espécies unicelulares cocóides ou em forma de bacilo, e filamentosas ou filamentosas ramificadas multicelulares (WHITTON; POTTS, 2000). Algumas espécies apresentam movimento e seu tamanho varia entre 1 a 100 μm (HOICZYK; BAUMEISTER, 1995). Podem estar presentes no meio em vida livre, na forma de florações planctônicas ou densas turfás, ou ainda em conjunto com outros tipos de organismos como fungos, algas e outras bactérias formando os líquens e mantos microbianos (OLIVER; GANF, 2000; STAL, 1995; STENROOS et al., 2006).

Organismos antigos semelhantes às cianobactérias atuais, datados do início da evolução dos sistemas primitivos fotossintéticos da era proterozóica, têm sido descritos (SHOPF; WALTER, 1994). Alguns desses registros fósseis, com 3,5 bilhões de anos, apresentam as estruturas dos filamentos fossilizados muito próximas da conformação atual da cianobactérias (WHITTON; POTTS, 2000). Essa origem antiga, de adaptação a um ambiente extremo e dinâmico como era a Terra no passado, talvez tenha favorecido a grande plasticidade metabólica das cianobactérias atuais (SCHOPF, 1994). Elas habitam todos os tipos de ecossistemas bem iluminados, normalmente em pH neutro-alcalino, mas algumas espécies são capazes de sobreviver em condições ambientais estressantes como areia e rochas de desertos, águas termais ("hot springs"), lagos do Ártico e Antártida e ambientes eutrofizados resultante da ação antrópica (CASTENHOLZ, 1976; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1996; WHITTON; POTTS, 2000).

Atualmente, tem-se destacado a característica tóxica que algumas espécies de cianobactérias possuem, principalmente em decorrência de acidentes com intoxicação de humanos (AZEVEDO, 1996). Todavia, os benefícios desses organismos vão desde o próprio papel ecológico que o grupo desempenha, até possibilidades de aplicação biotecnológica

devido ao potencial para uso em biorremediação, biodegradação, construção de biosensores e para desenvolvimento de produtos farmacológicos (CHAY; SURIF; HENG, 2005; KREITLOW; MUNDT; LINDEQUIST, 1999; SHASHIREKHA; PANDI; SWAMY, 2005; SKULBERG, 1995).

2.2 História da sistemática de cianobactérias

A sistemática de *Cyanobacteria* passou por muitas mudanças desde o primeiro registro desse grupo de organismo, ocorrido em 1838, pelo biólogo e zoólogo alemão Christian Gottfried Ehrenberg (EHRENBURG, 1838). Nos trabalhos de Thuret (1875), Bornet e Flahault (1886a,b, 1887, 1888) e Gomont (1892) estão as primeiras descrições taxonômicas de cianobactérias, as quais foram consideradas como um grupo especial de algas, as algas verde-azuladas, e a partir disso sua taxonomia seguiu os moldes botânicos, baseada em descrições morfológicas de amostras naturais e nomenclatura conforme o Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

Durante o século 20, inúmeras “floras” foram publicadas descrevendo as espécies conhecidas de “algas verde-azuladas” em diversas regiões em particular e outras com informações sobre as espécies de ocorrência mundial. A publicação mais conhecida contendo o primeiro sistema para classificação desse táxon propriamente dito, foi a de Geitler (1932). Ele compilou todas as informações geradas até então, reconhecendo aproximadamente 1300 espécies, 145 gêneros, 20 famílias e 3 ordens. Sistemas semelhantes foram propostos subsequente (BOURRELLY, 1970; DESIKACHARY, 1959, 1973; FRITSCH, 1945; HOLLERBACH; KOSINSKAJ; POLJANSKIJ, 1953; KONDRATEVA, 1968; STARMACH, 1966). Esses sistemas ficaram conhecidos como sistema Geitleriano e consideram os critérios botânicos tradicionais para as classificações, onde diferentes caracteres morfológicos são utilizados para separar grupos relacionados. Contudo, em muitos casos, apenas um caractere foi usado, resultando em descrições cuja consistência é questionável.

Uma nova tentativa de reformular o sistema de classificação das cianobactérias foi realizada no período de 1951-1981 (DROUET 1968, 1973, 1978, 1981; DROUET; DAILY, 1956). Nesse sistema, denominado Drouetano, as mais de 2000 espécies dentro de mais de 140 gêneros de cianobactérias foram reduzidas para 62 espécies dentro de 24 gêneros. Ele foi baseado na hipótese de que a maioria das espécies de cianobactérias era na realidade ecofenos (mesmo genótipo mostrando diferenças fenotípicas, devido aos estímulos ambientais) morfologicamente variáveis ou um número pequeno de táxons geneticamente homólogos. Embora nenhuma grande crítica ao sistema Drouetano tenha sido publicada, estudos de hibridação de DNA/DNA e composição de bases de DNA (STAM; HOLLEMAN, 1979) mostraram a natureza insatisfatória desse sistema, o qual conseqüentemente caiu em desuso.

O sistema taxonômico introduzido por R. Y. Stanier, a partir de 1971, objetivou tratar as cianobactérias da mesma maneira como as bactérias, de acordo com os estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares (BONEN; DOOLITTLE, 1978; STANIER et al., 1971; STANIER, 1977; WOESE et al., 1975). Nesses estudos, ficaram evidentes a semelhança do envoltório celular das cianobactérias com as das bactérias Gram-negativas e também a natureza bacteriana do ribossomo. Essa colocação das cianobactérias dentro do domínio *Bacteria* corroborou com as primeiras observações realizadas por Cohn (1853). O passo inicial para essa mudança foi convencer todos da necessidade da mudança do nome de algas verde-azuladas para cianobactérias. Na prática, o termo alga verde-azulada ainda tem sido usado principalmente na área de manejo de água e outras proposições práticas e, cianobactéria, na área de pesquisa. Esse sistema enfatiza técnicas microbiológicas e considera parâmetros bacteriológicos em detrimento dos botânicos (HERDMAN et al., 1979; HERDMAN; RIPPKA; STANIER, 1979; RIPPKA et al., 1979; RIPPKA; COHEN-BAZIRE, 1983; RIPPKA, 1988; RIPPKA; HERDMAN, 1992). O sistema Stanieriano, que ainda é bastante fundamentado na morfologia, foi incluído com algumas modificações no Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica em 1989 (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001; STALEY et al., 1989). Embora esse manual não seja um documento oficial de classificação

bacteriana, ele é amplamente aceito pela comunidade de microbiologistas. Na sistemática atual, *Cyanobacteria* é considerado como um Filo dentro do domínio *Bacteria* (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). A classificação das cianobactérias segundo o Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica está apresentada na Tabela 1.

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

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

Atualmente estão em vigência a abordagem botânica e a bacteriológica para classificação das cianobactérias. A fim de minimizar equívocos como ter o mesmo organismo descrito sob dois nomes diferentes dentro do Código Bacteriano e Botânico, concessões e adaptações mútuas dos dois códigos têm sido feitas e têm assegurado que as espécies descritas sob um sistema sejam reconhecidas pelo outro.

Frente a essas alterações e confluências, uma série de revisões vem sendo feitas por J. Komárek e seus colaboradores (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1986, 1989, 1999, 2005). Esse sistema é baseado principalmente em critérios taxonômicos botânicos por razões históricas, mas utiliza também informações obtidas de considerações bacteriológicas, levando em conta sempre que possível

observações de culturas isoladas. Os autores fizeram uma extensa revisão de literatura e tentam integrar todos os caracteres bioquímicos, ultraestruturais e moleculares disponíveis com suas consideráveis experiências taxonômicas. Uma característica desse sistema é o arranjo lógico dos organismos de acordo com várias combinações possíveis de padrão de divisão celular, forma celular e organização das células dentro da bainha e/ou mucilagem; o status genérico é distribuído na maioria das combinações, portanto, o número de espécies dentro dos gêneros tende a ser baixo (WHITTON; POTTS, 2000). As descrições são muito detalhadas e a quantidade de informação necessária para reconhecimento das espécies botânicas no todo é muito grande. Para facilitar o acesso a essas informações J. Komárek juntamente com seus colaboradores criaram um banco de dados (<http://www.cyanodb.cz>) disponível na internet.

A classificação das cianobactérias segundo o sistema proposto por J. Komárek e seus colaboradores está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação das cianobactérias segundo sistema de J. Komárek. (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005).

Ordem	Família	Subfamília	Gêneros
Chroococcales	Gloeobacteraceae		<i>Gloeobacter</i>
	Synechococcaceae	Aphanothecoideae	<i>Cyanothece</i> , <i>Cyanobium</i> , <i>Cyanobacterium</i> , <i>Cyanogranis</i> , <i>Cyanocatena</i> , <i>Lithomyxa</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Cyanodictyon</i> , <i>Lithococcus</i> , <i>Epigloeosphaera</i> , <i>Lemmermanniella</i> , <i>Cyanonephron</i> , <i>Hormothece</i> , <i>Aphanotece</i> , <i>Gloeothece</i>
		Synechococcoideae	<i>Myxobaktron</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Dzensia</i> , <i>Rhabdogloea</i> , <i>Rhabdoderma</i> , <i>Johannesbaptistia</i> , <i>Cyanothamnos</i> , <i>Wolskyella</i> , <i>Bacularia</i> , <i>Tubiella</i> , <i>Rhodostichus</i> , <i>Pseudoncobyrza</i> .
	Merismopediaceae	Merismopedioideae	<i>Synechocystis</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Mantellum</i> , <i>Microcrocis</i> , <i>Coccopedia</i> , <i>Pannus</i> , <i>Merismopedia</i> , <i>Cyanotetras</i>
		Gomphosphaerioideae	<i>Coelomoron</i> , <i>Coelosphaerium</i> , <i>Coelosphaeriopsis</i> , <i>Snowella</i> , <i>Siphonosphaera</i> , <i>Woronichinia</i> , <i>Gomphosphaeria</i>

Continua

Conclusão

	Microcystaceae		<i>Microcystis, Eucapsis,</i>
	Chroococcaceae		<i>Gloeocapsa, Chondrocystis</i> <i>Chroococcus, Asterocapsa,</i> <i>Gloeocapsopsis, Cyanostylon,</i> <i>Cyanokybus, Cyanosarcina,</i> <i>Pseudocapsa, Nephrococcus</i>
	Entophjissalidaceae	Entophissalidoideae	<i>Paracapsa, Lithocapsa,</i> <i>Chlrogloeae, Entophysalis,</i> <i>Cyanoarbor</i>
	Hydrococcaceae	Siphononematoideae	<i>Siphononema ,</i> <i>Tryponema, Hormathonema,</i> <i>Cyanodermatium, Onkonema,</i> <i>Placoma, Hydrococcus,</i> <i>Myxohyella</i>
	Chamaesiphonaceae		<i>Geitleribactron, Cyanophanon,</i> <i>Clastidium, Stichosiphon,</i> <i>Chamaesiphon, Chamaecalyx</i>
	Dermocarpellaceae		<i>Stanieria, Cyanocystis,</i> <i>Dermocarpella</i>
	Xenococcaceae		<i>Chroococcidium,</i> <i>Chroococcidiopsis, Myxosarcina,</i> <i>Xenococcus, Chroococcopsis,</i> <i>Xenotholos</i>
	Hyellaceae	Podocapsoideae	<i>Ercegovicia, Podocapsa,</i> <i>Cyanosaccus</i>
		Hyelloideae	<i>Radaisia, Pascherinema,</i> <i>Cyanoderma, Solentia,</i> <i>Dalmatella, Pleurocapsa, Hyella</i>
Oscillatoriales	Pseudanabenaceae	Pseudanabaenoideae	<i>Romeria, Pseudanabaena,</i> <i>Arthronema, Limnothrix,</i> <i>Jaaginema, Geitlerinema</i>
		Spirulinoideae	<i>Glaucospira, Spirulina,</i>
		Leptolyngbyoideae	<i>Planctolyngbya, Leibleinia,</i> <i>Leptolyngbya</i>
		Heteroleibleinioideae	<i>Heteroleibleinia, Tapinothrix,</i> <i>Sokovia</i>
	Schizotrichaceae		<i>Schizotrix, Trichocoleus</i>
	Borziaceae		<i>Borzia, Komvophoron,</i> <i>Yonedaella, Sinaiella</i>
	Phormidiaceae	Phormidioideae	<i>Arthrospira, Plantothrix,</i> <i>Planktothricoides, Trichodesmium,</i> <i>Tychonema, Proterendothrix,</i> <i>Pseudophormidium, Phormidium,</i> <i>Symploca, Porphyrosiphon</i>
		Microcoleoideae	<i>Lyngbyopsis, Symplocastrum,</i> <i>Dasygloea, Sirocoleum,</i> <i>Microcoleus, Hydrocoleum</i>
		Ammatoideoideae	<i>Pseudoscystonema, Ammatoide,</i> <i>Phormidiochaete</i>
	Gomontiellaceae	Hormoscilloideae	<i>Hormoscilla, Katagnymene</i>
Oscillatoriales		Crinalioideae	<i>Crinalium, Gomontiella</i>
		Starrioideae	<i>Starria</i>
	Oscillatoriaceae	Oscillatorioideae	<i>Oscillatoria, Polychlamydom,</i> <i>Lyngbya, Plectonema, Blennothrix</i>
Nostocales		Homoeotrichoideae	<i>Homoeothrix</i>
	Scytonemataceae		<i>Scytnema, Scytonematopsis,</i> <i>Kyrtuthrix</i>
	Microchaetaceae	Microchaetoideae	<i>Fortiea, Camptylonemopsis,</i> <i>Microchaete</i>
		Tolypotrichoideae	<i>Petalonema, Hassallia,</i>

			<i>Coleodesmium</i> , <i>Coleodesmiumopsis</i> , <i>Tolypothrix</i> <i>Calothrix</i> , <i>Dichothrix</i> , <i>Sacconema</i> , <i>Gloeotrichia</i> , <i>Isactis</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Gardnerula</i>
	Rivulariaceae		
	Nostocaceae		<i>Richelia</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Isocystis</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Hydrocoryne</i> , <i>Wolleea</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Aulosira</i> , <i>Hormothamnion</i> , <i>Trichormus</i> , <i>Nostoc</i>
Stigonematales	Chlorogloeopsaceae		<i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Heterocyanococcus</i>
	Capsosiraceae		<i>Capsosira</i> , <i>Desmosiphon</i> , <i>Hyphomorpha</i> , <i>Letestuinema</i> , <i>Nematoplaca</i> , <i>Stauromatonema</i>
	Stigonemataceae		<i>Homoeoptycha</i> , <i>Pulvinularia</i> , <i>Stigonema</i>
	Fischerellaceae		<i>Doliocatella</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Fischerellopsis</i> , <i>Leptopogon</i> , <i>Parthasarathiella</i> , <i>Westiellopsis</i>
	Borzinemataceae		<i>Borzinema</i> , <i>Handeliella</i> , <i>Schmidleinema</i> , <i>Seguenzaea</i> , <i>Spelaeopogon</i>
	Loriellaceae		<i>Albrightia</i> , <i>Brachytrichiopsis</i> , <i>Colteronema</i> , <i>Geitleria</i> , <i>Loefgrenia</i> , <i>Mastigocoleopsis</i> , <i>Matteia</i>
	Nostochopsaceae		<i>Baradlaia</i> , <i>Mastigocladopsis</i> , <i>Mastigocoleus</i> , <i>Nostochopsis</i>
	Matigocladaceae	Mastigocladaceae	<i>Adrianema</i> , <i>Chondrogloea</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Mastigocladus</i> , <i>Symphyonema</i> , <i>Thalpophila</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Voukiella</i> , <i>Westiella</i> , <i>Brachytrichia</i> , <i>Herpyzonema</i> , <i>Iyengariella</i> , <i>Parenchymorpha</i> , <i>Symphyonemopsis</i>
		Brachytrichioideae	

2.3 Sistemática molecular de cianobactérias

Ao longo das alterações ocorridas na sistemática dos organismos houve o direcionamento para uma classificação que os organizasse e relacionasse de acordo com sua história evolutiva, sua filogenia. Para os organismos procarióticos isso só foi possível usando seqüências de DNA. A filogenia baseada em comparações de seqüências de fragmentos correspondentes de DNA, considera que as diferenças entre as posições dos nucleotídeos refletem a história evolutiva do organismo. Em estudos filogenéticos, é útil

examinar seqüências que evoluíram em diferentes níveis para solucionar diferentes partes da filogenia. Algumas seqüências permanecem virtualmente inalteradas comparando-se os mais diversos organismos e podem ser utilizadas para unir grupos distintos, outras variam tanto que podem ser utilizadas para separar não só espécies como também linhagens (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

A descoberta da molécula de DNA como carregadora de informações genéticas em todos os organismos permitiu reconhecer que diferentes espécies possuem composições únicas de genes. Os estudos utilizando seqüências gênicas para inferir relações evolutivas entre todos os organismos tiveram início com os trabalhos de Carl Woese (WOESE, 1987; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990), o qual utilizou os genes de RNA ribossômico (rRNA). Woese escolheu esses genes (os quais codificam para componentes do RNA ribossômico, o sítio da síntese protéica em todas as células) porque suas seqüências são conservadas (mudanças lentas no tempo) e universais (encontradas em todos os organismos).

Em organismos procarióticos, os genes *rrs*, *rrl* e *rrf* codificam para os RNAs ribossômicos 16S, 23S e 5S, respectivamente (Figura 1). Para inferir relações filogenéticas foi escolhido o gene *rrs* que codifica a subunidade menor do ácido ribonucléico de aproximadamente 1500 pares de bases, devido ao seu tamanho, elevado grau de conservação, mas com variabilidades em maior ou menor grau em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985).

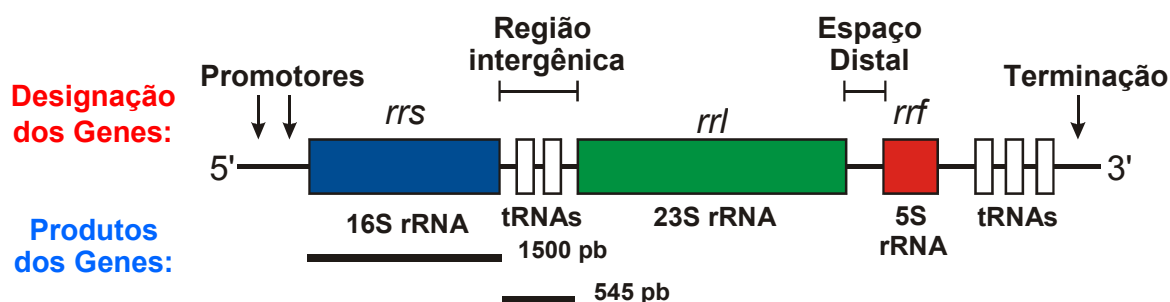


Figura 1. Esquema mostrando o operon do RNAr nos organismos procarióticos.

Em cianobactérias, os estudos de RNAr 16S foram iniciados em 1975 e confirmaram a estrutura bacteriana desse organismo (BONEN; DOOLITTLE, 1975; WOESE et al., 1975). Vários outros estudos têm sido publicados desde então (BONEN; DOOLITTLE, 1976, 1978, BONEN; DOOLITTLE; FOX, 1979; GIOVANNONI et al., 1988; NEILAN et al., 1994, 1997; NELISSEN et al., 1992, 1995a, 1995b, 1996; PALINSKA et al., 1996; TURNER, 1997; WELLER et al., 1991; WILMOTTE et al., 1992, 1993, 1994;) e uma revisão sobre este assunto pode ser encontrada em Wilmotte (1994).

A sistemática molecular utiliza marcadores genéticos para fazer inferência sobre processos de população e filogenia e ao fazer isto cria uma base de dados comparativa significativa para genes ou proteínas específicas. O desenvolvimento da sistemática molecular tem auxiliado nas situações onde a variação morfológica é limitada ou onde a homologia das características morfológicas não é clara. As abordagens morfológicas e as moleculares apresentam vantagens e desvantagens distintas (WILMOTTE, 1994). Em geral, estudos que incorporam os dados moleculares e morfológicos fornecem descrições e interpretações de diversidade biológica, melhores que àqueles que enfocam somente uma abordagem. Dessa forma, a taxonomia polifásica (uso integrado das características genéticas, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, ecológicas) tem sido recomendada para a classificação das cianobactérias e muitos trabalhos estão sendo publicados usando essa abordagem (FIORE et al., 2005; GAYLARDE et al., 2004; HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005; LEHTIMÄKI et al., 2000; RAJANIEMI-WACKLIN, 2005).

Uma das dificuldades encontradas na sistemática molecular de cianobactérias é a conciliação de sua grande diversidade morfológica com sua baixa diversidade genética. De modo geral, alguns dos resultados da análise molecular são contraditórios (*Anabaena* e *Aphanizomenon* – RAJANIEMI et al., 2005), enquanto outros são coerentes (*Microcystis*, *Planktothrix*, *Arthrospira*, *Tychonema*, *Trichodesmium*, *Spirulina*, *Cylindrospermum* – LUNDGREN et al., 2001; NELISSEN et al., 1994; ORCUTT et al., 2002; RUDI et al., 1997; SUDA et al., 2002). Dessa forma, pode-se dizer que os resultados moleculares e

ultraestruturais acumulados nas duas últimas décadas indicam que o sistema de classificação das cianobactérias que vem sendo utilizado não reflete o conhecimento atual sobre sua filogenia (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005). Assim, é de consenso geral que a integração dos dados disponíveis deve continuar e a classificação das cianobactérias deve ser continuamente mudada, corrigida e reavaliada.

Apesar do aprimoramento das técnicas de seqüenciamento e das análises de informações obtidas, além de maior disponibilidade de dados comparáveis, algumas dificuldades ainda existem, como é o caso de muitos organismos terem mais de uma cópia de RNAr 16S. Isso pode gerar equívoco, pois seqüências de um mesmo organismo podem ser interpretadas como de organismos diferentes, comprometendo, assim, as interpretações de resultados. Para cianobactérias especificamente, há registros de 3 cópias de RNAr para *Prochlorococcus marinus* SS120 e *Thermosynechococcus elongatus* BP-1; 4 cópias para *Anabaena* sp. (*Nostoc*) PCC7120, ou 12 considerando-se as cópias contidas em seus plasmídeos e 6 cópias para *Synechocystis* sp. PCC6803 (DUFRESNE, 2003; KANEKO et al., 2001).

Embora hoje em dia seja primordial ter as seqüências de RNAr 16S das cianobactérias determinadas para realizar as análises filogenéticas, principalmente para culturas isoladas, outras seqüências gênicas, tais como do *rpoC1*, *nifH*, *cpcBA*-IGS, ITS também têm sido utilizadas para filogenia de cianobactérias e estrutura de comunidades, visando refinar informações sobre a relação evolutiva desses organismos (BERGSLAND; HASELKORN, 1991; NEILAN et al., 1995; PALENIK, 1994; ZEHR et al., 1997). Na Tabela 3 são apresentados os métodos moleculares que têm sido utilizados com mais freqüência para classificar cianobactérias.

Tabela 3 - Métodos moleculares usados para classificar cianobactérias (SILVA, 2006).

Método ^a	Princípio do método	Diferenciação	Referência
Hibridização DNA-DNA	DNA genômico purificado é hibridizado com DNA marcado da linhagem tipo e a eficiência da hibridização é comparada com os resultados da hibridização de DNA idêntico. Ou a taxa de renaturação é opticamente determinada sem marcação.	De gênero ao nível de subespécie	KONDO et al., 2000; LACHANCE, 1981; STAM; STULP, 1988; WILMOTTE; STAM, 1984.
RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição)	DNA genômico digerido com enzimas de restrição é usado para produzir fragmentos de comprimentos diferentes, os quais são separados em gel de agarose. Enzimas raras ou hibridização com sondas marcadas são usadas para diminuir o grande número de fragmentos. Os padrões dos fragmentos obtidos podem ser comparados numericamente.	De espécie ao nível de linhagem	ASAYAMA et al., 1996; LEHTIMÄKI et al., 2000; MAZEL, 1990.
Amplificação de DNA (AFLP, ARDRA, REP-PCR, RAPD)	Amplificação de DNA por PCR produz fragmentos que formam um padrão diretamente ou combinado com digestão com enzimas de restrição.	De espécie ao nível de linhagem	LYRA et al., 1997, 2001; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995; SATISH et al., 2001.
Seqüenciamento do gene RNAr 16S	PCR e seqüenciamento	De família ao nível de subespécie	IORE et al., 2005; GIOVANNONI et al., 1988; GUGGER et al., 2002; LEHTIMÄKI et al., 2000.
Seqüenciamento de outros genes: <i>rbcLX</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoB</i>	PCR e seqüenciamento	De família ao nível de linhagem	GUGGER et al., 2002; TOLEDO; PALENIK, 1997.
Seqüenciamento da região ITS (espaço interno transcrito entre o DNAr 16S e o DNAr 23S)	PCR, separação ou clonagem dos produtos e seqüenciamento	De família ao nível de linhagem	GUGGER et al., 2002; LAAMANEN et al., 2001; ORCUTT et al., 2002.
Seqüenciamento da região <i>cpcBA</i> -IGS espaço intergênico do operon da ficocianina	PCR e seqüenciamento	De família ao nível de linhagem	BARKER et al., 1999; LAAMANEN et al., 2001; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001.

^a AFLP = polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados; ARDRA = análise de restrição de DNA ribossômico amplificado; REP-PCR = seqüências repetitivas extragênicas palindrômicas; RAPD = DNA polimórfico amplificado ao acaso

O gene de RNAr 16S tem sido utilizado intensivamente para classificação de novos organismos procarióticos e foi recomendado como sendo um parâmetro chave para a taxonomia (STACKEBRANDT et al., 2002). Ele é considerado uma boa ferramenta de comparação, pois a filogenia de suas seqüências tem mostrado consistência com a filogenia dos genomas, além disso, tem um robusto volume de dados passíveis de comparação e sua abrangência possibilita diferenciação de família até subespécie (Tabela 3). Assim, as análises filogenéticas geradas a partir de suas seqüências são utilizadas como “esqueleto” para a sistemática de procariotos. Essas filogenias são base, por exemplo, para o sistema de classificação contida no Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática, um sistema amplamente aceito e utilizado dentre os microbiologistas para a taxonomia de procariotos (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005).

2.4 Cianobactérias e acúmulo de metais e radionuclídeos

A observação e utilização dos efeitos e propriedades das vias metabólicas da microbiota pela população humana são históricas. Como exemplo, pode-se citar o uso da fermentação na produção de pães e bebidas desde o antigo Egito, até o uso de microrganismos para atividade de mineração (biolixiviação), na Roma antiga (ACEVEDO, 2002).

Cianobactérias são microrganismos de grande plasticidade metabólica, exercendo atividades sobre os ciclos de diferentes elementos na biosfera, acumulando-os, transformando-os, degradando-os, como no ciclo do carbono e do oxigênio pela fotossíntese e do nitrogênio, pela capacidade de fixação de N_2 (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973). Além desse importante papel ecológico, existem linhagens que produzem diferentes substâncias bioquimicamente ativas. Nas últimas duas décadas, foram isolados e caracterizados inúmeros compostos bioativos pertencentes às diversas classes de substâncias, entre eles, inibidores enzimáticos, herbicidas, antimicóticos, inibidores de apetite, antimaláricos e imunossupressores (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et.al.,

2004; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996). Substâncias tóxicas, tais como hepatotoxinas (microcistinas, nodularina, cilindrospermopsinas) e neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a, anatoxina-a (S)) também são produzidas por cianobactérias (SIVONEN; JONES, 1999). Assim, devido a essa versatilidade metabólica tem ocorrido um crescente interesse por esses microrganismos, principalmente para a exploração do potencial de utilização de seus metabólitos pela indústria farmacêutica (BURJA et al., 2001), na produção de nanopartículas (LENGKE; FLEET; SOUTHAM, 2006a, 2006b), bem como bioindicadores (REGEL et al., 2002). Outra forma de exploração está na utilização desses microrganismos para degradação de substâncias antropogênicas, tais como os xenobióticos organoclorados e para imobilização e/ou recuperação de íons metálicos estáveis e instáveis (radionuclídeos), como alternativas para mitigar áreas poluídas e/ou degradadas em biotratamentos (COSTA, 2003; VOLESKY, 1994, 1990).

Dentre as diferentes atividades humanas que podem gerar contaminantes estão a mineração e o processamento de metais e radionuclídeos, as quais geram rejeitos que por vezes são ultra-diluídos. A recuperação de íons com alto valor agregado como, por exemplo, o ouro ou a remoção de íons que mesmo em pequenas concentrações são quimicamente tóxicos, como os metais pesados cádmio, cromo, zinco e os radionuclídeos urânio, tório, rádio, são difíceis e caras quando realizadas por técnicas de purificação tradicionais como sedimentação, troca iônica etc, visto que não possuem sensibilidade suficiente para concentrar os íons (COSTA, 2003; HUTCHINS et al., 1986; VOLESKY 1990, 2004).

Os biotratamentos exploram os mecanismos de interação metal-células que podem ser divididos em duas fases. Uma é geralmente rápida, pode acontecer em células vivas ou mortas e envolve processos físico-químicos (processo passivo) como a “adsorção” (acúmulo ou concentração de substâncias em uma superfície ou interface), complexação na parede das células e em outras superfícies externas, entre outras. A outra fase é mais lenta e envolve transporte ativo, pelo fluxo de íons através da membrana celular para o interior da célula (bioacumulação) ou pela transformação de íons (precipitação ou solubilização)

resultantes de metabólitos produzidos pelas células microbianas (por exemplo, metalotioneínas) (COSTA, 2003; GARDEA-TORRESDEY et al., 1998; VOLESKY 1990; 2004). Essas duas fases são alvos de estudos em diversos microrganismos. No caso específico de cianobactérias, tem se considerado o processo de bioissorção, ou seja, a propriedade apresentada por biomassas de reter e concentrar íons metálicos, mesmo de soluções muito diluídas, sem a utilização de energia metabólica, ocorrendo em células vivas e/ou mortas, e a bioacumulação, ou seja, o processo de armazenamento e/ou transformação de íons metálicos na célula com gasto de energia (COSTA, 2003; VOLESKY, 1994, 1990). Alguns dos estudos encontrados na literatura que investigaram esses processos são apresentados a seguir.

A investigação da capacidade da cianobactéria *Oscillatoria angustissima* como bioissorvente de Cu^{2+} , testando diferentes pHs e tratamentos de células, mostrou que a biomassa dessa linhagem é uma boa candidata para este fim, com máxima adsorção em pH 5 (AHUJA, GUPTA; SAXENA, 1997). A adsorção aumentou com o aumento na concentração do íon. A biomassa adsorveu em torno de $268,45 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomassa quanto exposta a uma solução com $23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu^{2+} e aumentou para $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu^{2+} adsorvido em solução contendo $89,33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Cu^{2+} . O melhor tratamento para liberar o metal da biomassa foi com lavagens de HCl. Eles também testaram efluente contaminado em pH 3,5 e obtiveram sucesso. Esses autores obtiveram sucesso inclusive com efluente contaminado com pH 3,5. Em outro estudo onde células mortas de 16 linhagens de algas e 14 de cianobactérias foram comparadas quanto à eficiência de bioissorção de cádmio, chumbo, níquel e zinco, a cianobactéria *Lyngbya taylorii* atingiu as mais altas taxas de recuperação dos metais, em pH ótimo variando entre 3 a 7 para cádmio, chumbo e zinco e de 4 a 7 para níquel (KLIMMEK et al., 2001). A cianobactéria *Spirulina (Arthrospira) platensis* foi estudada quanto à bioissorção de baixas concentrações de cádmio (menores que $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e nível de toxicidade para diferentes concentrações desse metal (RANGSAYATORN et al., 2002). Os resultados obtidos mostraram que as alterações induzidas pelo cádmio foram desintegração e desorganização das membranas dos

tilacóides, presença de grandes espaços intratilacoidais, aumento de corpos polifosfatos e lise celular. Para os testes de bioissorção foi utilizada biomassa morta e a remoção de cádmio foi pH dependente (ótimo em pH 7) e indiferente para temperatura. O processo foi rápido, com 78% de recuperação em 5 minutos. Em um trabalho sobre cinética, equilíbrio e mecanismos de bioissorção de Cr^{3+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} por *Spirulina* sp., observou-se que o equilíbrio foi atingido entre 5 a 10 minutos, e os resultados mostraram que a biomassa de *Spirulina* sp. comporta-se como um trocador iônico fracamente ácido (CHOJNACKA; CHOJNACKI; GÓRECKA, 2005). Esses autores mostraram que a capacidade máxima de bioissorção foi atingida em pH 7 e foi dependente da fase de crescimento e condições de manutenção da cultura. Ademais, três grupos funcionais capazes de trocas catiônicas foram identificados: grupos carboxil, fosfato e hidroxil (ou amina). Esse mesmo gênero de cianobactéria, ou seja *Spirulina platensis*, foi também testado com relação a acumulação de outros metais (Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) para células livres e imobilizadas, vivas e liofilizadas (VANNELA; VERMA, 2006). Nesse estudo, foram identificadas as duas fases do processo de bioissorção, a primeira rápida (1 a 2 minutos) contribuindo para 63-77% da bioissorção total e a segunda com duração de 2 horas. Esses autores concluíram que a biomassa dessa cianobactéria apresentou potencial para aplicação devido à capacidade de acumulação e facilidade de recuperação dos metais por meio da simples lavagem dela com sais contendo cálcio.

Com relação a pesquisas com radionuclídeos, há estudos como os de Sakagushi et al. (1978) que avaliaram a capacidade de diversas microalgas e cianobactéria em acumular urânio diluído em águas marinhas. Nesse estudo, as cianobactérias avaliadas foram *Synechococcus elongatus* e *Calothrix crustácea*. A *C. crustácea* capturou relativamente pouco urânio (40 μg de U por g de células secas de água contendo 1 ppm de U), enquanto que *S. elongatus* acumulou grandes quantidades (1.764 μg de U por g de células secas de água contendo 1 ppm de U) e foi a que teve maior captação de urânio dentre os microrganismos marinhos avaliados. Nessa mesma linhagem de *S. elongatus* foi observado que a captação de U variou com o estado fisiológico das células e as condições do meio,

especialmente o pH, sendo o pH ótimo em torno de 5 (HORIKOSHI et al., 1979). Esse estudo também mostrou que íons podem interferir na biodisponibilidade do U para a célula, como o íon carbonato. Numa outra cianobactéria também unicelular, a *Anacystis nidulans*, onde a capacidade de sua biomassa acumular Amerício e Urânio foi avaliada, verificou-se que suas células exibiram coeficientes de distribuição na magnitude de $(5,33 \pm 3,57) \times 10^5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ para U (LIU; WU, 1993). A habilidade de bioissorção de sua biomassa foi influenciada pelas condições ambientais e fisiológicas das células, sendo que o pH ótimo variou de 3 a 6. A maior retenção foi em pH 3,5, onde mais de 95% de U e Am foi retido por biomassa de $70 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Em outro estudo sobre a habilidade de isolados de cianobactérias para mobilizar U a partir de minérios com baixo grau deste metal, constatou-se que as culturas iniciavam a mobilização em diferentes estágios de crescimento e que a quantidade de células é fator importante na eficiência da atividade (LORENZ; KRUMBEIN, 1985). A máxima mobilização (51% do total de U contido no minério) foi observada após 80 dias. Nesta mesma linha de biolixiviação, em outra pesquisa investigou-se a capacidade de *Spirulina platensis* e *Nostoc linkia* para mobilização de íons UO_2^{2+} de minérios pobres em urânio (CECAL et al., 2000). Nesse estudo verificou-se que o pH alcalino favorecia a lixiviação do urânio e que sua mobilização foi mais evidente na presença das cianobactérias (40-90%) comparativamente com a lixiviação quando não havia cianobactérias (20-30%).

Alguns dos estudos relatados na literatura sobre bioissorção e/ou acumulação de urânio envolvem o uso de material da natureza. Num deles, a avaliação da bioissorção de urânio por biomassa seca obtida de uma floração de cianobactérias, com predominância de *Microcystis aeruginosa*, indicou que o pH ótimo foi entre 4 e 5, com uma hora para a reação atingir o equilíbrio (LI et al., 2004). A recuperação do U foi possível por meio da lavagem da biomassa com HCl 0,1 N. Em líquens, associações de fungos e cianobactérias, verificou-se que a eficiência no acúmulo do metal de urânio estava estreitamente correlacionada com as condições ambientais (HAAS et al., 1998). Os experimentos foram realizados com amostras retiradas diretamente do ambiente e mantidas a aproximadamente 25°C em pHs variando de 2 a 10. Após incubação dessas amostras por 24 h em solução contendo 100 ppm de U,

observou-se 4,2% de U na massa seca do líquen. O pH ótimo para o líquen testado variou entre 4 e 5. Há também estudos envolvendo consórcios microbianos (células vivas) contendo cianobactérias (BENDER; LEE; PHILLIPS, 2000). Esses autores produziram um consórcio artificial sobre partículas de sílica-gel e avaliaram sua capacidade de bioremediação e bioedução de U (VI). Concluíram que o consórcio teve uma conformação ideal para este fim, o conjunto era sustentado pela produção fotossintética das cianobactérias e houve boa remoção de U(VI) .

A escolha de uma biomassa com potencial para biossorção está relacionada à sua sensibilidade ao metal, capacidade de acumulação, estabilidade sob condições ambientais adversas, necessidades nutricionais, mas também deve-se levar em consideração quais os tipos de compostos nocivos os microrganismos produzem. De forma geral, quando se trata da aplicabilidade efetiva dos processos biossorção, a utilização de biomassa de células mortas traz vantagens sobre os processos que exigem metabolismo celular ativo. Isso porque para as células vivas há menor espectro de utilização em concentrações diversas em consequência da toxicidade do poluente para a própria célula utilizada como biossorvente. Além do mais, demanda recursos financeiros maiores por necessitar de manutenção dos organismos vivos, problemas com a recuperação do líquido tratado e vida útil da biomassa (vezes que uma mesma biomassa pode ser utilizada para descontaminar efluentes, sem aumentar gastos), sendo que em biossorventes de células mortas esse processo exigiria menores cuidados e portanto menores investimentos (KLIMMEK et al., 2001; PARK et al., 2004; VANNELA; VERMA, 2006; VOLESKY, 1990).

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados registros de pesquisas de cianobactérias em efluentes contaminados nem de sua relação com radionuclídeos para o Brasil.

2.5 A Unidade de Tratamento de Minérios-Indústrias Nucleares do Brasil S/A, Caldas – MG

A Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil S/A Caldas-MG (UTM-INB) foi o primeiro complexo minero industrial de lavra e beneficiamento de urânio do Brasil. O País possui a sexta maior reserva geológica de urânio do mundo. A Figura 2A mostra os depósitos e instalações de exploração existentes no País, ressaltando que estão sob a gerência da INB, a qual é uma empresa de economia mista vinculada à Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e subordinada ao Ministério da Ciência e da Tecnologia.

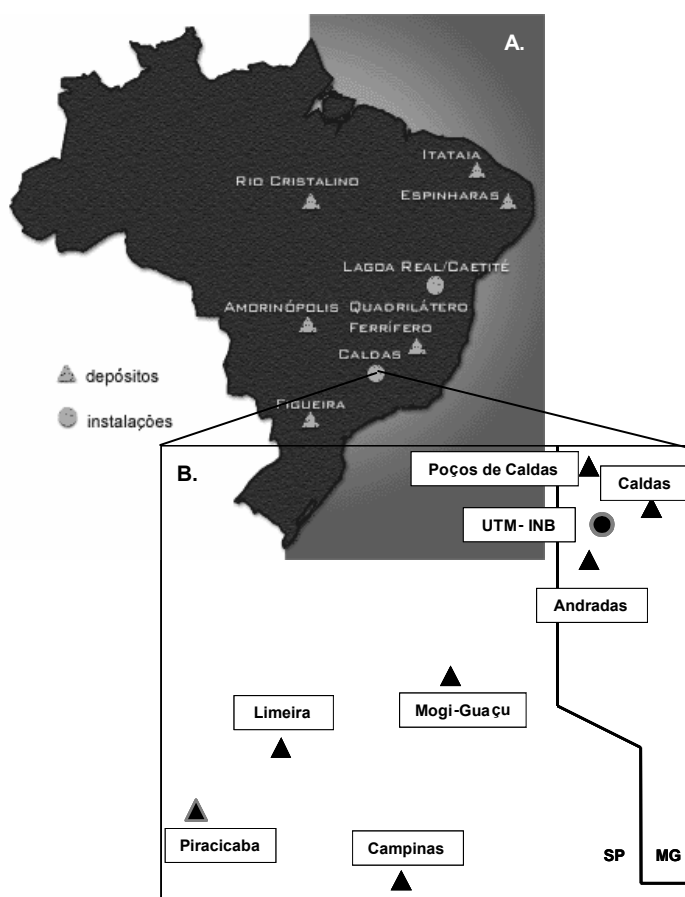


Figura 2. A. Mapa do Brasil mostrando locais de depósitos naturais de urânio (triângulos) e instalações de processamento do minério (circunferências) (modificado de <http://www.inb.gov.br/IMAGENS/uranionoBrasil.GIF>, agosto de 2006). B. Esquema mostrando a localização geográfica da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil S/A de Caldas-MG (UTM-INB, círculo preto e cinza) (modificado de Guia de Quatro Rodas, 2006).

A UTM-INB Caldas (Figura 2B) está implantada no Planalto de Poços de Caldas na região sudoeste do Estado de Minas Gerais, município de Poços de Caldas, ocupando área em torno de 15 km². A unidade fica sobre o divisor de águas das bacias hidrográficas do Rio das Antas e do Rio Verde. A bacia do Rio das Antas drena cerca de 70% do platô e a bacia do Rio Verde cerca de 20%. A água do Rio das Antas é usada para irrigação e para o gado, este rio fornece água para a Represa Bortolan, próxima à cidade de Poços de Caldas. O solo, bastante argiloso, é classificado como latossolo vermelho-amarelo sendo muito heterogêneo nas áreas mineralizadas (CIPRIANI, 2002; FERNANDES et al., 1995 *apud* GOMES; GARCIA JUNIOR, 2001; SOUZA, 1995; <http://www.inb.com.br>, setembro de 2006).

A instalação consiste de uma mina a céu aberto e suas áreas de bota-foras, instalações de tratamento físico de minério, usina de tratamento químico para extração de urânio por processo hidrometalúrgico, bacia de rejeitos e bacias de decantação para o tratamento dos rejeitos, além das instalações de utilidades e administrativas, destacando-se uma fábrica de ácido sulfúrico (CIPRIANI, 2002).

Estima-se que 94,5.10⁶ ton de rocha foram removidas, devido à mineração, sendo que somente 2% desta quantidade foram destinadas ao processamento físico e químico. O restante permanece estocado principalmente no bota-fora 4 (BF4) e bota-fora 8 (BF8). As pilhas de minério estéril que constituem o BF4 e o BF8 foram estabelecidas em cima da vertente de dois córregos, respectivamente, o Córrego da Consulta e o Córrego Soberbo, os quais tiveram seus cursos desviados por canais. Nesses bota-foras existe drenagem de água; essa água é neutralizada e passa por bacia de precipitação de sólidos (Cava da Mina) e em seguida volta para o ambiente (GOMES; GARCIA JUNIOR, 2001)

As atividades de extração e processamento de urânio foram de 1977 a 1995, quando a unidade paralisou os processos. Apesar de encerradas as atividades, o passivo ambiental da região é grande. Passivo ambiental representa os danos causados ao meio ambiente, representando, assim, a obrigação, a responsabilidade social da empresa com aspectos ambientais, definição da Associação Nacional de Biossegurança (ANBio) 2001.

As mineradoras possuem responsabilidades sobre o impacto ambiental causado por seu empreendimento. Entende-se por impacto ambiental toda alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas, que, direta ou indiretamente, afetem: a saúde, a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; a qualidade dos recursos ambientais (Conselho Nacional do Meio Ambiente, 1986).

Cipriani (2002) fez um levantamento minucioso sobre as consequências da lavra da mina de urânio, incluindo reflexos sociais e ecológicos causados na região. Como exposto em seu trabalho, a associação da atividade de mineração com diminuição de impactos e recuperação do em torno somente começou a ganhar forças nas décadas de 80 e 90 com regulamentação de legislações específicas.

Durante as etapas de lavra e tratamento do minério, a indústria de urânio produz efluentes líquidos e gasosos, aerossóis e resíduos, que devem ser adequadamente gerenciados para evitar a dispersão de espécies químicas que possam causar danos ao meio ambiente. As espécies químicas incluem metais pesados, ânions tóxicos e radionuclídeos naturais, que podem estar na forma de óxidos e sais, em suspensão, em solução ou na forma gasosa como o radônio, além da acidez e da alcalinidade. Quando a concentração de radionuclídeos estiver acima de limites estabelecidos em lei, os efluentes e resíduos podem ser considerados rejeitos radioativos (CIPRIANI, 2002).

De acordo com a CNEN, com relação à emissão de radionuclídeos ao ambiente externo à UTM a situação é controlável, no entanto, como o empreendimento está sobre um divisor de águas e os rejeitos sólidos foram construídos com os desvios de rios da região, há necessidade de bombeamento constante das águas que percolam pelos rejeitos, para que sejam contidas e tratadas. Além disso, há todo o impacto na paisagem causado pela atividade de escavação propriamente dita.

Atualmente a UTM-INB está em fase de avaliação para o descomissionamento da instalação, ou seja, a INB está estudando formas que lhe possibilite continuar outros

empreendimentos na área, ou mesmo finalizar sua atuação, conforme as exigências do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), para assegurar condições de menor impacto possível para o entorno e recuperação da área modificada. Um processo de descomissionamento leva cerca de 10 anos desde o início das avaliações até sua implantação efetiva.

2.5.1 O radionuclídeo ^{226}Ra

Dos quatro isótopos de rádio derivados das cadeias de decaimento do urânio, actínio e tório, o ^{226}Ra , produto do decaimento do ^{238}U , é o mais importante de ocorrência natural devido a sua meia-vida longa (1.622 anos), da abundância natural de seu pai e da sua elevada radiotoxicidade. A maioria dos rejeitos contendo rádio é produzida pelo processamento de minérios de urânio e a formação do rádio-226 acontece quando o tório-230 (^{230}Th , filho do ^{238}U) emite uma partícula alfa (núcleo de hélio, $^4\text{He}_2$) sendo que o ^{226}Ra formado decai para formar o gás radônio-222, ^{222}Rn (KAPLAN, 1978).

Tanto o ^{226}Ra como o ^{222}Rn apresentam riscos radiológicos. O ^{226}Ra por sua habilidade de substituir o cálcio na estrutura óssea e o ^{222}Rn pela sua retenção nos pulmões na forma de ^{210}Pb (chumbo-210) e ^{210}Po (polônio-210) (COSTA, 2003). Além do ^{238}U (radionuclídeo pai), todos os radionuclídeos filhos ora citados são de controle obrigatório nas mineradoras de urânio, como por exemplo as controladas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN, a saber, a Unidade de Tratamento de Minérios em Caldas-MG, UTM, e a Unidade de Concentrado de Urânio em Lagoa Real-BA, ambas pertencentes as Indústrias Nucleares do Brasil S/A, INB.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

Amostras de água foram coletadas em dois sistemas de tratamento de efluentes radioativos da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil/SA (UTM-INB), Poços de Caldas/MG. Os dois sistemas são constituídos de um conjunto de bacias de escoamento e decantação, no entanto, as amostragens foram feitas somente em algumas delas.

No primeiro sistema, denominado de Sistema de Tratamento da Cava da Mina (CM) (Figuras 3A e 3B), foram realizadas coletas de água dos efluentes radioativos na área que recebe as águas drenadas do bota-fora 4 (BF4) e são bombeadas da Bacia Nestor Figueiredo e também no Ponto 41 (P41), local de reentrada da água tratada na Bacia de Decantação do sistema da CM. Esse local reúne as águas da CM e as águas drenadas do bota-fora 8 (BF8), e liga o sistema à Represa de Águas Claras. Desta represa a água flui para o Ribeirão das Antas, fora da propriedade da UTM-INB. No segundo sistema, denominado Sistema de Tratamento da Usina de Processamento de Urânio (Figuras 3C, 3D e 3E), as coletas de água abrangeram: a Bacia de Rejeitos (R), a qual foi construída para tratar os rejeitos do processamento de urânio realizado na Usina a fim de precipitar os radionuclídeos; a Bacia de Decantação 1 (D1), a qual recebe a água que passou pela R e de onde ela flui para a Bacia de Decantação 2 (D2), o último ponto de coleta e última bacia de tratamento antes da água do sistema voltar para o Ribeirão Soberbo, ambiente externo à UTM-INB.

Os pontos de coleta foram determinados de acordo com as condições espaciais de acesso ao local, como segurança da trilha, firmeza do solo, altura da água, entre outras dificuldades práticas de campo. Uma vez escolhidos, os pontos foram mantidos em todas as coletas. O mapa da área com os respectivos pontos de amostragens pode ser visualizado na Figura 4.

Sistema de Tratamento da Cava da Mina

A.



Sistema de Tratamento da Usina de Processamento de Urânio

B.



C.



D.



E.



Figura 3. Fotos dos locais de coleta das amostras de água. **A.** Cava da Mina; a seta vermelha indica a mina a céu aberto (morro escavado). **B.** Ponto 41; ducto de saída da água, passando por ele a água vai para a Represa de Águas Claras. **C.** Bacia de Rejeitos; formada por ampla lâmina d'água. **D.** Bacia de Decantação 1; a seta branca indica o ponto de saída da água. **E.** Bacia de Decantação 2, a seta azul mostra o sentido de saída da água, quando a vazão é suficiente, em direção ao Ribeirão Soberbo.

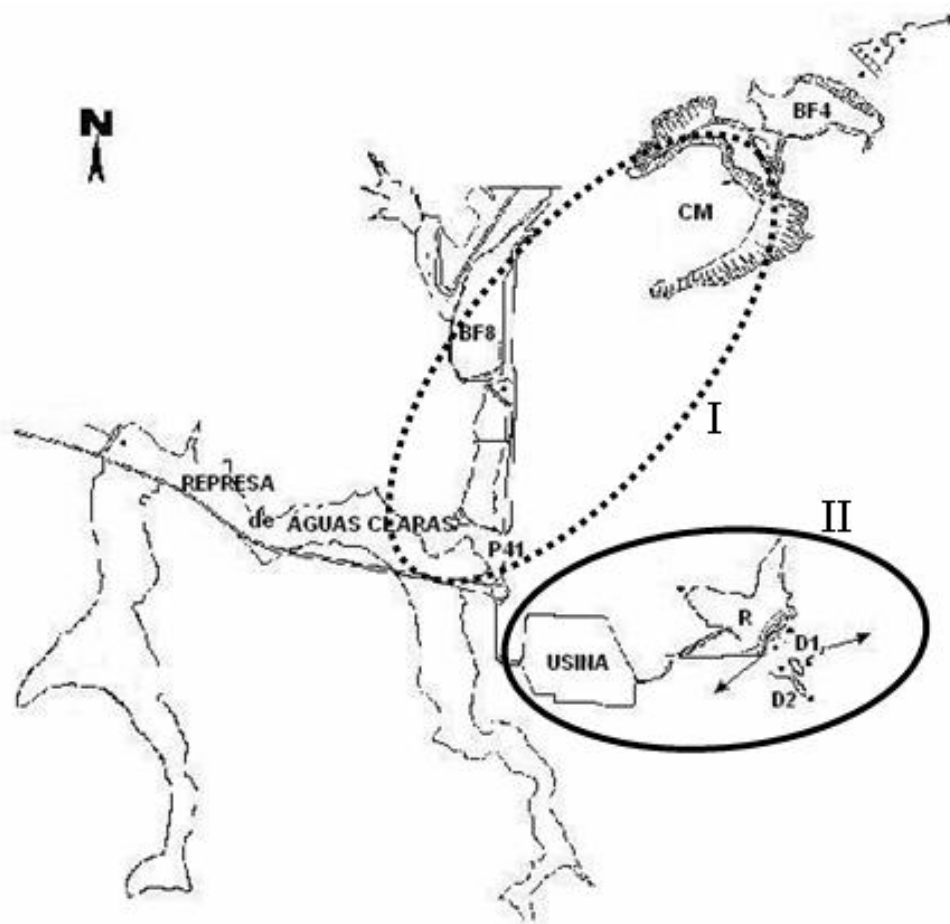


Figura 4. Esquema geral da Unidade de Tratamento de Minérios – Indústrias Nucleares do Brasil S/A mostrando: I (círculo tracejado)– Sistema de Tratamento da Cava da Mina, contendo a Cava da Mina (CM) e o Ponto 41 (41); e II (círculo contínuo)– Sistema de Tratamento da Usina de Processamento de Urânio, contendo Bacia de Rejeitos (R), Bacia de Decantação (D1) e Bacia de Decantação (D2). (Modificado de Gomes e Garcia Junior, 2001)

3.2 Coletas de amostras de água

Todas as coletas, autorizadas pela administração da UTM-INB, contaram com supervisão e auxílio da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)/Coordenação do Laboratório de Poços de Caldas-MG. Participaram diretamente deste trabalho a Dr^a. Heliana Azevedo Gomes – Chefe da Seção Técnica da Coordenação do Laboratório de Poços de Caldas (COOLAB) e responsável pelo Laboratório de Radioecologia; e os técnicos do Laboratório de Radioecologia: Armando Luiz Bruschi, Cláudio Vitor Roque e Osvaldo Teles da Costa.

As amostragens de água para isolamento de cianobactérias foram realizadas em 4 períodos: Setembro de 2003, final do período de estiagem de inverno; Novembro de 2004, período de final de primavera; Abril de 2005, período intermediário de outono; e Dezembro de 2005, início de verão, período de intensificação de chuvas.

Os materiais utilizados foram: balde de 10 L, rede de plâncton com malha de 22 μ m, frascos de plástico ou de vidro com capacidade para 200 mL, solução de Lugol (10 g de Iodeto de Potássio em 100 mL de água destilada e adição de 5 g de Iodo Cristalino e 10 mL de Ácido Acético Glacial), caixas de isopor e bolsas de gelo. Em cada ponto, o balde foi lançado quatro vezes à profundidade de 0-20 cm, a água suspendida foi dispensada na rede coletora e o acumulado no copo dessa rede foi colocado em um frasco e destinado para o isolamento de cianobactérias (material vivo). O balde foi lançado mais uma vez e uma quantidade variando de 100 a 200 mL de água foi retirada e destinada à fixação com Lugol (American Public Health Association, 1995). Esse processo foi repetido três vezes, resultando em triplicatas de amostras de material vivo e outras três réplicas de material fixado, para cada ponto de coleta. Apenas na Bacia de Rejeitos foi utilizada Garrafa de Van Dorn na coleta de Novembro de 2005, pois o volume de água permitiu.

A utilização da solução de Lugol seguiu as recomendações da CETESB (informação pessoal da M.Sc. Livia Fernanda Agujaro). Esse método de fixação foi escolhido porque, apesar de modificar a coloração das células, a solução de iodo preserva melhor as estruturas celulares e é menos tóxica em relação a outros métodos como a formalina, por exemplo. Para a fixação do material utilizou-se a proporção de aproximadamente 10% em relação ao volume da amostra, ou seja, a solução de Lugol foi adicionada em gotas até a amostra atingir tonalidade de “conhaque”.

Terminada a coleta, todos os frascos foram acondicionados e transportados em isopores contendo bolsas de gelo e protegidos da luz até o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP), em Piracicaba/SP, no mesmo dia da coleta.

3.3 Parâmetros Abióticos

Os dados abióticos de temperatura e precipitação para a região de Poços de Caldas/MG foram obtidos de Somar Meteorologia S/A. Para os efluentes da UTM-INB os dados de temperatura, pH, urânio e índices de nível trófico foram cedidos pela CNEN-Poços de Caldas/MG e caracterizam o ambiente da Cava da Mina, do Ponto 41 e da Bacia de Rejeitos.

3.4 Isolamento de cianobactérias

Logo que chegaram ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA – USP, Piracicaba/SP, as amostras de água contendo células vivas foram utilizadas para o isolamento das cianobactérias. Cada réplica dessas amostras passou por um procedimento de diluição seriada conforme metodologia descrita no “Standard methods for the examination of water and wastewater” (American Public Health Association, 1995). Em condições assépticas, usando fluxo laminar, 1 mL da amostra ambiental foi inoculada em tubo de ensaio contendo 9 mL de meio de cultura líquido BG-11 (ALLEN, 1968) (Tabela 4) previamente esterilizado em autoclave a 121°C, 1 atm por 20 minutos (1ª diluição, 10^{-1}). Da 1ª diluição, 1 mL foi retirado e inoculado em novo tubo com 9 mL do mesmo tipo de meio (2ª diluição, 10^{-2}) e assim sucessivamente até a 7ª diluição (10^{-7}) (Figura 5).

Em cada tubo de cultura foi acrescentado o antibiótico ciclohexamida (SIGMA-ALDRICH, Sant Louis, MO, EUA), numa concentração de $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, a fim de evitar o desenvolvimento de células eucarióticas, tais como algas e fungos. Os tubos de ensaio inoculados foram mantidos em sala de crescimento climatizada a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com iluminação fluorescente constante de $40 \text{ } \mu\text{moles} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ por 30 dias.

Tabela 4 – Meio de cultura BG-11 utilizado no cultivo das cianobactérias (ALLEN, 1968)

Componentes	estoque ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Usar por litro	Concentração final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
NaNO_3	150	10 mL	1,5
K_2HPO_4	40	1 mL	0,04
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75	1 mL	0,075
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36	1 mL	0,036
Ácido cítrico	6	1 mL	0,006
Citrato de amônio férrico	6	1 mL	0,006
Na_2EDTA	1	1 mL	0,001
Micronutrientes	-	1 mL	-
Carbonato de sódio	20	1 mL	0,02

Completar o volume com H_2O deionizada para 1000 mL

Autoclavar.

pH após autoclavagem e esfriamento: 7,4

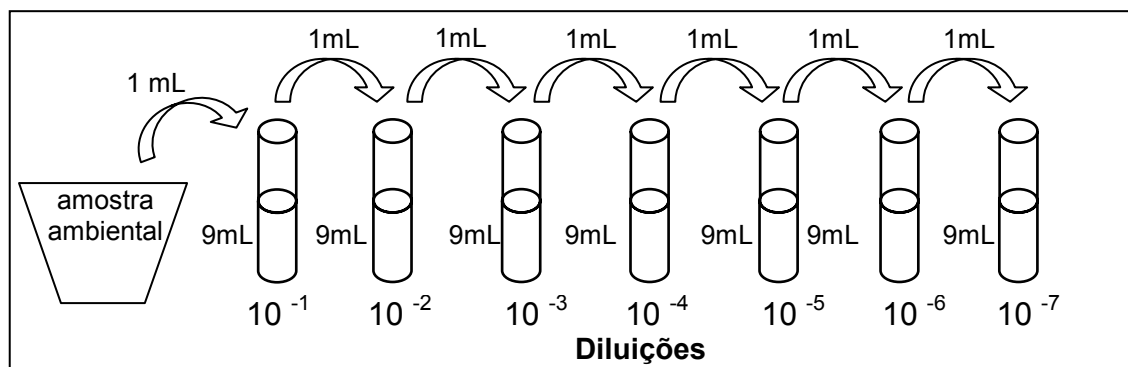
Notas:

Se fizer aeração com CO_2 , deve-se adicionar 1 M HEPES, pH 8,0 numa concentração final de 10 a 20 mM (ou seja, 10 a 20 mL por litro).

Para meio sólido, adicionar noble agar (Difco, Detroit, MI, EUA) numa concentração final de 1%.

Solução de micronutrientes:

H_3BO_3	2,86	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,222	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{Mo}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,39	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,079	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,049	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

**Figura 5.** Esquema mostrando a diluição em série das amostras de água.

Passados cerca de 20 a 30 dias, ou até o crescimento celular ser visivelmente constatado, as culturas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BH-2, Hauppauge, NY, EUA e ZEISS Axioplan 2 MC80DX) e alíquotas do material celular foram transferidas para novos tubos de ensaio contendo meio BG-11 líquido, sendo que os isolados que apresentaram células heterocitadas foram inoculados em meio de cultura líquido AA/4 (ALLEN; ARNON, 1955) (Tabela 5). Esses isolados também foram inoculados em placas de Petri contendo meio BG-11 ou AA/4 sólidos (com 1% de Agar Noble). Esse processo foi repetido, com alternância entre meio sólido e líquido, conforme a necessidade, até se obter culturas isoladas de cada cianobactéria dos efluentes da UTM-INB (Figura 6).

Tabela 5 – Meio de cultura AA/4 utilizado no cultivo das cianobactérias (ALLEN; ARNON, 1955).

MEIO DE CULTURA - AA/4		
AA/4	-Pi	+Pi
mL de solução estoque·litro ⁻¹	6,25	3,10
Soluções Estoques		
I) -Pi		
Faça as soluções abaixo e armazene a 4°C.		
Misture as 4 soluções estoques -Pi, na proporção 1:1:1:1 (armazene a 4°C).		
1. MgSO ₄ ·7H ₂ O	20 g/500 mL	
2. CaCl ₂ ·2H ₂ O	6 g/500 mL	
3. NaCl	20 g/500 mL	
4. Micronutrientes: Adicionar na ordem listada - espere cada reagente ser dissolvido. Sempre agite antes de usar.		
a) Água pura		1090 mL
b) Solução AA de Fe-EDTA (ver abaixo)		160 mL
c) MnCl ₂ ·4H ₂ O		360 mg
e) Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O (99% pureza)		61,1 mg
f) ZnSO ₄ ·7H ₂ O		44 mg
g) CuSO ₄ ·5H ₂ O		15,8 mg
h) H ₃ BO ₃ (ácido bórico)		572 mg
i) NH ₄ VO ₃ (NH ₄ ⁺ metavanadate)		4,6 mg
j) CoCl ₂ ·6H ₂ O		8 mg
Solução AA de Fe-EDTA		
(1) Dissolver 5,2 g KOH peletes em 186 mL de água pura. Adicionar 20,4 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O. (2) Em seguida, dissolver 13,7 g FeSO ₄ ·7H ₂ O em 364 mL de água pura (ou use Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·nH ₂ O; Ferric sulfate, n-hydrate). Misturar as soluções 1 e 2. Borbulhar ar filtrado com filtro Millipore (0,45 mm) até a solução mudar de cor (entre 4 min a 4 horas).		

II) +Pi

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	28 g/500 mL	ou
K_2HPO_4 anidro	21.4 g/500 mL	

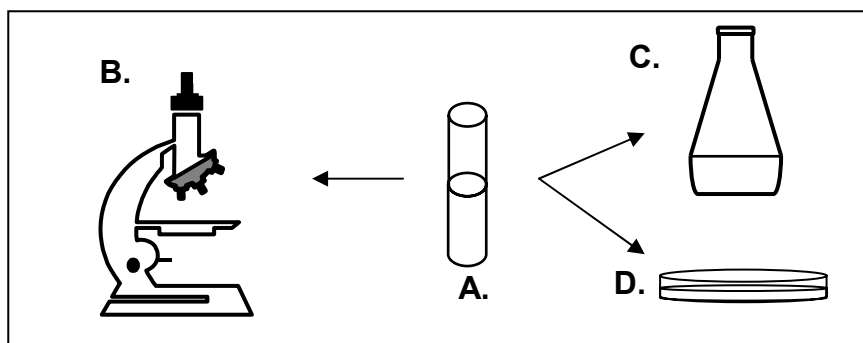


Figura 6. Fases do processo de isolamento. **A.** Tubo incubado por 20-30 dias. **B.** Avaliação em microscópio óptico das culturas obtidas. A partir dessa avaliação alíquotas das diferentes culturas eram passadas para meio líquido (**C.**) e/ou sólido (**D.**). O processo foi repetido até o isolamento das linhagens obtidas.

3.5 Número mais provável (NMP)

O teste do NMP apresenta uma estimativa de uma população microbiana em concentrações absolutas dos organismos viáveis presentes no meio. Neste estudo foram feitas diluições até 10^{-7} (Figura 5) com triplicatas e os cálculos dos NMPs foram feitos observando-se os tubos de ensaio após 30 dias da inoculação, seguindo critério de presença (+)/ausência (-) de crescimento celular. Os dados foram analisados e tabulados seguindo os critérios presentes no “Standard methods for the examination of water and wastewater” (American Public Health Association, 1995). A quantificação pelo método de NMP foi realizada para as coletas de novembro de 2004, abril e dezembro de 2005.

3.6 Caracterização morfológica das cianobactérias isoladas

A identificação taxonômica das cianobactérias de acordo com suas características morfológicas foi realizada com a colaboração da Dr^a. C.L. Sant'Anna, especialista em taxonomia de cianobactérias da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente – São Paulo/SP e do MSc R. Y. Honda. O sistema de classificação utilizado foi baseado nos estudos de Komárek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005). Quando possível, o sistema do código bacteriológico (CASTENHOLZ, 2001) foi citado depois da designação botânica. A identificação das espécies isoladas foi realizada por meio de observações microscópicas (Olympus BH-2), considerando a forma, coloração, tamanho e arranjo celular, seguindo as chaves de classificação mencionadas.

3.7 Caracterização molecular das cianobactérias isoladas

3.7.1 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias

Uma suspensão de 3 mL de células na fase de crescimento exponencial de cada cultura de cianobactéria foi concentrada por centrifugação a $13000 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram submetidas ao método de extração de DNA genômico descrito por Fiore et al. (2000). Para confirmar a efetividade da extração, 5 μ L de cada produto da extração foi acrescido de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) e a integridade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gel), após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 X (1 X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), e comparado ao padrão de tamanho de DNA do marcador molecular Lambda DNA/EcoR I + Hind III (Promega, Madison, WI, EUA). O gel foi documentado pelo programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM MultiImager" (BioRad, Hercules, CA, EUA) e o DNA extraído foi armazenado à temperatura de -20°C .

3.7.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S nos isolados

A amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S das cianobactérias isoladas foi obtida com o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e 1494Rc (5'- TACGGCTACCTTGTTACGAC – 3') (NEILAN et al., 1997). Para a reação de amplificação foi utilizada uma solução contendo: tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM de MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 5 pmol·μL⁻¹ de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) esterilizada, para um volume final de 25 μL. No termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), as reações foram submetidas às condições de: 95°C/3 min; 30 ciclos 94°C/10 seg, 50°C/20 seg, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min.

A verificação do tamanho e quantificação dos amplicons resultantes foi feita usando o padrão de tamanho e massa molecular de DNA “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen), após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE; Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) em gel de agarose 1% e documentação no programa “Multi Analyst” do “Fluor-S[™] Multilmager” (BioRad).

3.7.3 Clonagem

As seqüências RNAr 16S produzidas na PCR foram ligadas ao vetor do kit de clonagem “pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems” (Promega). O vetor utilizado foi o pGEM[®] - T de 3015 pb, o qual vem linearizado com *EcoR* V e com adição de timidina na posição 3' terminal em ambos os lados, característica que promove maior eficiência de ligação. Esse vetor contém sítios para resistência à ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento do *LacZ*. A clonagem foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, contidas no Manual de Instrução do “pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems”.

3.7.4 Transformação

A introdução do vetor contendo inserto nas células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foi efetuada através de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Alíquotas de 10 μ L do produto de ligação foram adicionadas a 50 μ L de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 α em microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi então transferido imediatamente para banho-maria a 42°C, onde foi mantido por 30 segundos, sem agitação, e de onde foi retirado e incubado em gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se ao conteúdo do microtubo, 250 μ L de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) a temperatura ambiente e a nova mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. A suspensão de células competentes transformadas foi plaqueada em meio LB sólido com ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 μ g·mL⁻¹ de meio de cultura, e as placas foram incubadas por 15 horas, a temperatura de 37°C.

3.7.5 PCR usando colônias

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, 4 a 5 colônias brancas foram selecionadas e utilizadas para nova reação de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade (0,5 μ L) de células transformadas foi adicionada a 25 μ L de reação de PCR (conforme solução descrita no item 3.7.2), utilizando-se os iniciadores: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'); M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'). As condições de amplificação foram: 94°C/5 min; 25 ciclos de 95°C/20 seg, 50°C/15 seg, 60°C/1 min. A verificação do tamanho dos amplicons foi feita em gel de agarose 1% - 0,5 X TBE conforme descrito no item 3.7.1.

3.7.6 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5 α que continham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina, de acordo com Birnboim e Doly (1979). As colônias brancas, com resultado positivo para o inserto na PCR, foram transferidas para 6 mL de meio líquido LB contendo 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. A seguir, 1,5 mL da cultura de células produzidas foram transferidos para microtubos e passaram por centrifugação a 10.000 x *g* por 20 segundos. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez. O material precipitado foi ressuspenso em 100 μL de solução gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; glucose 50 mM). A essa mistura foram acrescentados 200 μL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%), o conteúdo foi misturado gentilmente por inversão dos microtubos. Após incubação em gelo por 5 minutos, foram adicionados 150 μL de solução III gelada (acetato de potássio 3 M; ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se nova inversão para misturar o conteúdo e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, os microtubos passaram por centrifugação a 10.000 x *g* durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos, aos quais se adicionou 270 μL de isopropanol a temperatura ambiente. A mistura foi agitada e centrifugada conforme descrito anteriormente.

Após a eliminação do sobrenadante, o precipitado foi lavado uma vez com 250 μL de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 x *g* por 2 minutos. Esse precipitado foi seco e ressuspenso em 30 μL de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,5 M; 10 mg RNase $\cdot\text{mL}^{-1}$. Os microtubos foram incubados a 37°C por 30 minutos, em seguida centrifugados por 3 minutos para a remoção de materiais insolúveis e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Por fim, após corrida em gel de agarose conforme descrito no item 3.7.2, para confirmação, os plasmídeos extraídos foram armazenados a -20°C até sua utilização na próxima etapa.

3.7.7 Seqüenciamento

Para o seqüenciamento dos fragmentos de gene de RNAr 16S inseridos nos plasmídeos, os insertos foram amplificados por PCR utilizando-se o Kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para isso, foram utilizados 4 conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores: um conjunto de iniciadores externos ao fragmento (correspondentes a regiões do plasmídeo) o M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e o SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'); e três conjuntos internos ao fragmento, ou seja, 341-357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') e 341-357R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'); 685-704F (5'-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3') e 685-704R (5'-TCTACGSATTTACCCSCTAC-3'); 1099-1114F (5'-CAACGAGCGCAACCC-3') e 1099-1114R (5'-GGGTTGCGCTCGTTGC-3') (LANE, 1991). Na reação de PCR utilizou-se 200 ng de plasmídeo, 5 pmol·μL⁻¹ de um dos iniciadores, 1 μL de “DYEnamic”, tampão 1X “Save Money” (Tris HCl 1M pH9,0, MgCl₂ 1M, H₂O ultrapura autoclavada) e água ultrapura para volume final de 10 μL. Essa reação foi submetida às seguintes condições: 25 ciclos 95°C/20 seg, 55°C/15 seg, 60°C/60 seg. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing”. Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no seqüenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), por aproximadamente 2,5 horas. Com o programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems) os dados gerados pelo seqüenciador foram coletados e processados.

3.7.8 Processamento e análise filogenética das seqüências

Os fragmentos do gene de RNAr 16S obtidos no seqüenciamento foram montados em “contigs” usando o pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) e somente bases com qualidade >20 foram consideradas. Em seguida, as seqüências obtidas foram comparadas com

seqüências depositadas no “Ribosomal Database Project II” (RDP) (MAIDAK et al., 1999) e/ou no “GenBank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando-se a ferramenta “Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

Para a construção da árvore filogenética, as seqüências de RNAr 16S obtidas neste estudo e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas, editadas e os métodos de distância evolutiva (“Neighbour-Joining”) e máxima parcimônia (“Maximum-Parsimony”) foram aplicados usando o pacote de programa MEGA 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). O suporte para os nós internos da árvore de distância evolutiva e máxima parcimônia foi estimado usando reamostragem (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 replicações.

3.8 Análise de microcistinas

Todas as linhagens de cianobactérias isoladas da UTM-INB foram analisadas para verificar se produziam microcistinas utilizando-se o ensaio imunológico ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) para detecção de microcistinas em água (Kit placa Microcistina, Beacon Analytical Systems, Inc., Portland, ME, EUA). Para isso, triplicatas de 100 µL de cultura de cada linhagem no final da fase exponencial de crescimento, foram colocadas em microtubos e a lise celular foi feita por choque térmico (incubação em nitrogênio líquido por 30 segundos seguido de banho-maria por 4 minutos a 40°C, repetido por três vezes). Em seguida procedeu-se a análise de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9 Experimentos de Bioissorção do ²²⁶Ra

Os ensaios e análises de bioissorção seguiram a metodologia de Volesky (2004) e foram desenvolvidos na CNEN/Coordenação do Laboratório de Poços de Caldas-MG, envolvendo o Laboratório de Radioecologia sob responsabilidade da Dr^a. Heliana de

Azevedo Gomes e o Laboratório Radioquímica sob responsabilidade de Maria Helena Tirollo Taddei. Os experimentos de bioissorção foram realizados sob a supervisão do Dr. Wilson Cervi da Costa, com a colaboração dos técnicos Armando Luiz Bruschi e Cláudio Vitor Roque e estagiário Leonardo Ogeta Tarifa.

3.9.1 Produção e preparo do bioissorvente (biomassa seca)

O bioissorvente utilizado na investigação da sorção do ^{226}Ra foi a biomassa de células mortas de *Aphanotece* sp. CENA75. Calculou-se um total de 20 g de biomassa seca necessária para realizar todos os testes de bioissorção. Baseando-se na estimativa de produção de 1 g de massa seca para cada 10 L de cultura em meio líquido, foram cultivados cerca de 200 L do isolado *Aphanotece* sp. CENA75 em meio BG-11 líquido. Os frascos de cultivo tinham capacidade para 10 L e em cada frasco eram acrescentados 0,5 L de inóculo. Durante 12 a 15 dias os frascos inoculados foram mantidos com bombeamento constante de ar filtrado, sob iluminação fluorescente constante de 40 $\mu\text{moles. m}^2.\text{s}^{-1}$, a temperatura de $24\pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, a biomassa obtida foi concentrada por centrifugações a 16000 x g por 30 minutos a 4°C e em seguida as células concentradas foram protonadas. Para isso, as células foram ressuspensas em solução de HCl 0,1M em um Becker com quantidade suficiente para deixá-las submersas e colocadas sob agitação constante por 1 hora. Após esse período as células foram lavadas com água ultrapura até o valor de pH estipulado para os ensaios de bioissorção, sendo escolhidos dois, pH 3,5 e 5. Nova centrifugação foi efetuada e o precipitado foi retirado com a menor quantidade possível de água ultrapura.

A biomassa seca foi obtida dispondo a biomassa protonada em placas de Petri mantidas em estufa a $50-60^\circ\text{C}$ até estabilização do peso (SORVALL, Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, EUA). Ao término do processo a biomassa foi pesada, datada e acondicionada em frascos, os quais foram mantidos em dessecadores até sua utilização.

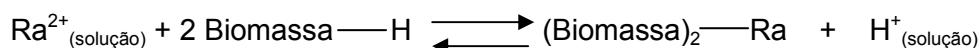
3.9.2 Solução sintética do radionuclídeo ^{226}Ra

A solução sintética estoque do radionuclídeo ^{226}Ra foi preparada a partir do cloreto de rádio (RaCl_2) nos Laboratórios de Análises Radiométricas dos Serviços de Proteção Radiológica do Laboratório de Poços de Caldas CNEN/DILAB, e originadas de fontes certificadas pelo Laboratório Nacional de Metrologia das Radiações Ionizantes – LNMRI, do Instituto de Radioproteção e Dosimetria – IRD, da CNEN.

As soluções de trabalho utilizadas nos experimentos foram obtidas por diluições de alíquotas com massas conhecidas (método gravimétrico, precisão de pesagem de 0,01 mg) e conforme as “Recomendações para diluição de soluções radioativas” do LNMRI, para concentrações de atividades numa faixa de cerca de $2341 \pm 255 \text{ Bq}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir dessa solução estoque foram produzidas as diluições utilizadas nos ensaios de Cinética de Biossorção e Isotermas de Biossorção.

3.9.3 Cinética de biossorção do ^{226}Ra

Os experimentos de cinética de biossorção, parâmetro para determinar em qual tempo a interação da biomassa com Ra^{2+} atinge seu equilíbrio químico (Sistema de Reação de Biossorção), demonstrado pela equação:



O delineamento experimental foi em esquema fatorial 2 (pH 3,5; pH 5,0) x 9 (tempos em minutos: 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 135) x 2 (número de repetições), totalizando 36 parcelas.

Em cada tratamento, duplicatas de Erlenmeyer contendo 50 mg de biomassa seca (biossorvente) em 50 mL de solução de trabalho de concentração de atividade equivalente a $478,15 \pm 47,8 \text{ Bq}\cdot\text{L}^{-1}$ ficaram em constante agitação (250 rpm) por 15 minutos. Outros dois frascos com a mesma proporção de biossorvente e solução ficaram sob agitação constante por 30 minutos e assim por diante até o tempo de 135 minutos de contato entre biomassa e

solução, variando sempre de 15 em 15 minutos. A cada tempo percorrido a solução correspondente era filtrada e 25 mL eram armazenados em frascos plásticos para serem enviados para a análise radioquímica.

Os controles (branco) dos tratamentos seguiram o mesmo procedimento. Duplicatas de Erlenmeyer contendo 50 mg de biomassa seca (biossorvente) em 50 mL de solução de água ultrapura condicionada ao pH específico permaneceram em constante agitação (250 rpm) por 15 minutos. Outros dois frascos nas mesmas condições ficaram 30 minutos e assim por diante até o tempo de 135 minutos de contato entre biomassa e solução sem ^{226}Ra .

Para calcular o valor de adsorção do radionuclídeo pelo próprio Erlenmeyer, um controle com dois frascos foram colocados em contato com 50 mL de solução de trabalho de mesma atividade durante 135 minutos nas mesmas condições de cada tratamento.

Os experimentos foram conduzidos sem o ajuste do pH no decorrer do tempo de contato.

3.9.4 Determinações químicas e radiométricas

As determinações das concentrações de atividades iniciais e finais (ou de equilíbrio) do radionuclídeo ^{226}Ra , expressas em $\text{Bq}\cdot\text{L}^{-1}$ foram determinadas por contador alfa “ESM Eberline FHT 770T Multi -Low-Level- Conter” (Eberline Instrument Corp. Santa Fé, NM, EUA).

Para as quantificações dessas concentrações de atividade há a necessidade de realizar co-precipitação e separação do sulfato de rádio (RaSO_4) ocluso na rede cristalina do sulfato de bário (BaSO_4), seu carreador, e posterior contagem alfa do radionuclídeo filho ^{222}Rn (radônio).

O bário (Ba^{2+}), considerado como representante químico do Ra^{2+} , é utilizado para a determinação do rendimento do processo de co-precipitação da espécie $\text{BaSO}_4\cdot\text{RaSO}_4$, calculado pela razão entre a massa adicionada do carreador e a massa recuperada no co-

precipitado. Essa última é estabelecida determinando-se a quantidade de Ba^{2+} remanescente em solução (filtrado) por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).

3.9.5 Análise estatística

A análise estatística comparando as médias das duplicatas em cada intervalo de tempo, considerando os dois pH (3,5 e 5,0) foi feita utilizando-se o teste t-Student, com $p < 0,05$.

3.9.6 Limpeza e descontaminação

Todo o material que entrou em contato com soluções radioativas teve de ser isolado ou limpo e descontaminado. Os materiais descartáveis, como papel de filtro, restos de soluções e biomassa foram descartados em bombonas destinadas para rejeito radioativo e processados de acordo com as normas de Radioproteção pela própria CNEN. Os materiais não descartáveis (vidrarias, filtros plásticos MILLIPORE entre outros) contatados com soluções radioativas foram lavados e descontaminados de acordo com o seguinte protocolo: enxaguar com água de torneira; mergulhar em solução de EXTRAN 1% (detergente neutro, agente tensoativo desengordurante) por 2 horas; lavar com água de torneira; mergulhar em solução de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1% (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético, agente complexante de metais) por 12 horas; lavar com água de torneira; mergulhar em solução de HNO_3 (ácido nítrico, grau técnico) 10% por 2 horas (materiais plásticos por 15 minutos) e lavar com água destilada ou deionizada.

Observar que as soluções de limpeza são reutilizadas e armazenadas em caixas plásticas e a água de torneira contaminada no processo escoar pela tubulação até uma bacia de decantação da própria CNEN, na qual a água acumulada passa por tratamento e depois é liberada ao ambiente. Assim como todo material utilizado na descontaminação; como

detergentes, buchas, caixas entre outros; são de uso restrito e ficam separados em pia determinada. Além disso, são utilizados avental, luvas cirúrgicas descartáveis e dosímetro como equipamentos de proteção individual; e a área de limpeza fica identificada como de "manuseio de soluções radioativas".

A Figura 7 mostra algumas etapas dos experimentos de bioabsorção com o ^{226}Ra pela biomassa de *Aphanotece* sp. CENA 75.

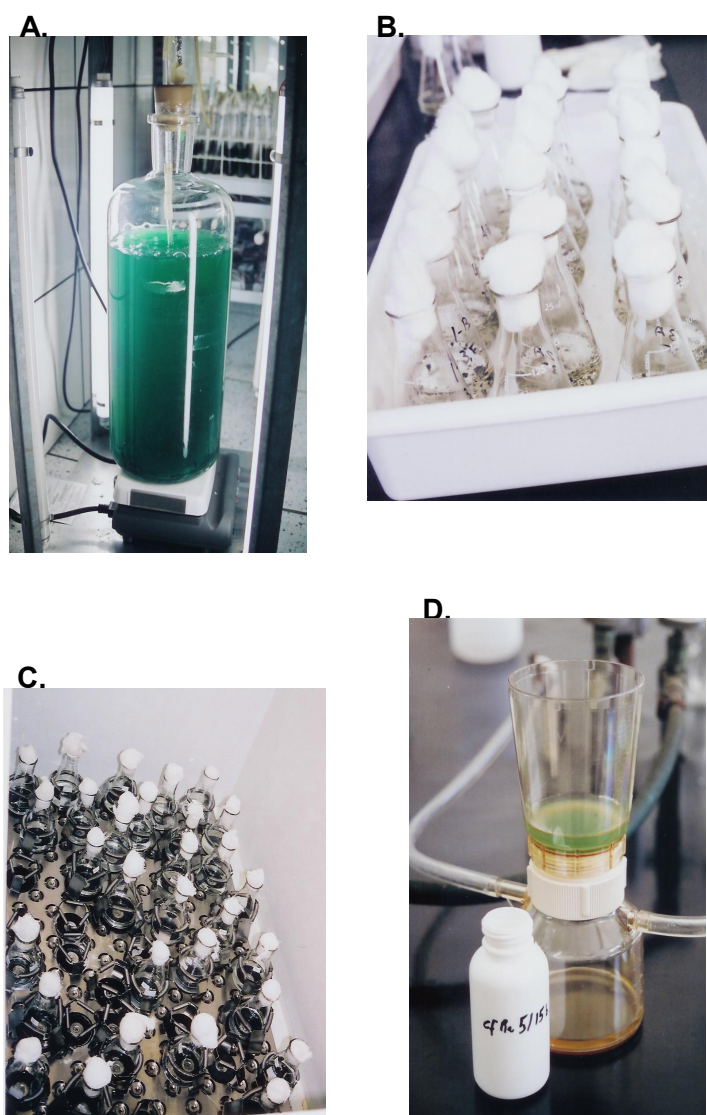


Figura 7. Algumas etapas do experimento de bioabsorção. A. Produção biomassa em larga escala. B. Frascos contendo 50 mg de biomassa seca em 50 mL de solução de trabalho contendo ^{226}Ra . C. Frascos em agitação. D. Solução em processo de filtração após tempo de contato, o verde na parte de cima do filtro é a biomassa, o líquido depositado no fundo do filtro foi armazenado no frasco plástico branco e enviado para análise.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados abióticos dos efluentes da UTM-INB

A região do Planalto de Poços de Caldas apresenta clima tropical, com duas estações distintas, a seca durante o inverno e a úmida durante o verão. Num histórico de 30 anos para essa região, pode-se dizer que a precipitação concentra-se entre outubro e março, com média mais alta em janeiro (309,8 mm) e a mais baixa em agosto (24,3 mm). Acompanhando essas mudanças a temperatura fica em torno de 22°C durante o verão, com médias mais altas em janeiro e baixa para cerca de 16°C no inverno, com menores registros em julho.

Os efluentes da UTM-INB melhor caracterizados são a Cava da Mina e o Ponto 41, onde são registradas médias para o ano de 2004. A Cava da Mina é um ambiente com alto teor de radionuclídeos. Utilizando-se o urânio como parâmetro, este teve média de 5,68 mg·L⁻¹. De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, o limite é de 0,02 mg·L⁻¹. Outro parâmetro importante é o pH, cuja média nesse efluente foi de 3,88. A temperatura média foi de 21,95°C, mas chegou a 19,80°C em agosto e 24°C em novembro de 2004.

No ponto 41, efluente que já passou pelos tratamentos do sistema da Cava da Mina e que é despejado na Represa de Águas Claras, a concentração de urânio diminui para <0,02 mg·L⁻¹. O pH varia pouco ao longo dos meses, próximo de 6,0 (a média de 2004 foi 6,2). A temperatura teve alta de 23°C no verão e baixou para 17°C no inverno.

Quanto ao estado trófico, calculado pelo índice de Toledo (TOLEDO et al., 1983), considerando concentrações de fósforo e clorofila *a*, ambos os efluentes da Cava da Mina e Ponto 41, são oligotróficos.

Para o sistema de tratamento da usina, as avaliações periódicas das características físicas, químicas e biológicas tiveram início em 2006. O pH é mantido próximo de 8,0, devido ao tratamento que essas bacias recebem para precipitar os radionuclídeos. Até o

momento, a média de temperatura foi ao redor de 21°C, com registro de 24-25 °C, nos meses de verão. Quanto aos radionuclídeos, para a primeira bacia, a de rejeitos (R), a concentração é de $<0,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Existem mais duas bacias de decantação (D1 e D2) antes do efluente ir para águas externas à UTM-INB, contudo não há medidas para esses efluentes. As leituras de fósforo e clorofila *a* feitas até o momento caracterizam os efluentes desse sistema como oligotróficos.

4.2 Cianobactérias isoladas de efluentes da UTM-INB

Ao todo, foram isoladas 12 linhagens de cianobactérias abrangendo 8 gêneros, sendo 4 pertencentes à ordem Chroococcales (formas unicelulares), 7 à Oscillatoriales (filamentosas) e 1 à Nostocales (filamentosa heterocitada). A Tabela 6 mostra as linhagens isoladas dos efluentes da UTM-INB.

Embora já tenha sido relatado que a técnica de isolamento tradicional consegue acessar menos de 1% da comunidade microbiana do ambiente (TORSVIK; OVREAS, 2002), quando o objetivo é trabalhar diretamente com organismo vivos, e não somente conhecer a diversidade da comunidade ou utilizar estritamente propriedades de seu genoma, este tipo de abordagem faz-se necessária. Para um levantamento da diversidade e dinâmica de populações de cianobactérias nesse peculiar ambiente seria necessária maior periodicidade nas amostragens e a utilização de técnicas de contagem direta das células e/ou DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) e/ou construção de mini-bibliotecas de seqüências gênicas, seguida de sequenciamento. O isolamento de um número baixo de representantes desse grupo de organismos indica que a técnica de isolamento usada foi limitante para certos grupos taxonômicos, uma vez que a diversidade de cianobactérias nos ambientes é normalmente maior do que a encontrada neste estudo.

Tabela 6 – Linhagens de cianobactérias isoladas de efluentes da UTM-INB.

Ordem	Cianobactéria	Meio de Cultura*	Microcistina** ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Local de ocorrência***	Coleta****
Chroococcales					
	<i>Aphanothece</i> sp. CENA75	BG-11	0,00	todos	todas
	<i>Rhabdoderma</i> sp. CENA114	BG-11	0,00	R, D1, D2	II, III
	<i>Synechococcus</i> cf. <i>lividus</i> CENA79	BG-11	0,00	R, D1, D2	II, III, IV
	<i>Aphanocapsa</i> cf. <i>holsatica</i> CENA80	BG-11	0,00	P41, R, D1, D2	todas
Oscillatoriales					
	<i>Geitlerinema acutissimum</i> CENA85	BG-11	0,00	P41, R, D1, D2	todas
	<i>Pseudanabaena galeata</i> CENA84	BG-11	0,32	R, D1	todas
	<i>Pseudanabaena</i> sp. CENA81	BG-11	0,29	R, D1, D2	todas
	<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>tenerrima</i> CENA76	BG-11	0,33	R, D1, D2	todas
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA83	BG-11	0,00	R, D1, D2	todas
	<i>Phormidium formosum</i> CENA86	BG-11	0,00	D1	IV
	<i>Phormidium violaceum</i> CENA82	BG-11	0,00	R, D1, D2	II, III
Nostocales					
	<i>Nostoc</i> sp. CENA87	AA/4	0,00	P41	II, III

* Tipo de meio enriquecido em que a cultura é mantida. BG-11 (ALLEN, 1968) e AA/4 (ALLEN; ARNON, 1955) .

**Microcistinas nas formas LR, RR, YR ou Nodularina

*** CM=Cava da Mina; P41= ponto 41; R= Bacia de Rejeitos; D1=Bacia de Decantação 1e D2=Bacia de Decantação 2.

****I= setembro de 2003; II=novembro de 2004; III=abril de 2005; IV=dezembro de 2005

A picocianobactéria (diâmetro < 2 µm), *Aphanothece* sp. CENA 75, foi isolada em todas as coletas e de todos os efluentes amostrados, inclusive da CM que possui pH 3,88. Esse fato é relativamente incomum, uma vez que a maioria das cianobactérias é encontrada em ambientes com pH neutro ou levemente alcalino (pH 7,0 – 10,00) (RIPPKA et al., 1981). Na literatura há registros de ocorrência desse gênero (HONDA; AZEVEDO, 2004; OREN, 2000; SANT'ANNA et al., 2005) para ambientes variados, desde eutróficos a oligotróficos, de temperaturas altas e também em ambientes marinhos, isso evidencia sua plasticidade metabólica. Já o gênero *Rhabdoderma* não é comumente encontrado, mas há registros em águas represadas. Honda e Azevedo (2004) encontraram *Rhabdoderma* cf. *lineare* em um reservatório oligotrófico de São Paulo. Várias espécies comumente ocorrem no plâncton de lagoas oligotróficas e mesotróficas (KOMAREK, 2003; SANT'ANNA et al., 2005).

A identificação da espécie *Synechococcus* cf. *lividus* CENA79, provavelmente, é registro único para o Brasil. A forma próxima, *Synechococcus lividus*, é reportada de ambientes de características distintas como águas de alta temperatura e concentração de enxofre em diferentes regiões, como por exemplo “Yellowstone National Park” nos EUA (KOMÁREK, ANAGNOSTIDIS, 1999; FERRIS et al., 1996). De acordo com Copeland (1936), a espécie pode ser encontrada em águas de temperatura variando entre 23,5 a 68°C. De forma geral, as águas dos efluentes da UTM-INB possuem temperaturas em torno de 21°C, mas chegam a registrar 24-25°C, dependendo da época do ano.

O gênero *Aphanocapsa* é recorrente em mananciais (CETESB apud YUNES et al., 2005). Esse gênero está relacionado a ambientes eutróficos e oligotróficos. Sant'Anna et al. (2004) analisaram as cianobactérias do estado de São Paulo em reservatórios da região do Alto Tietê, e identificaram 5 tipos diferentes de *Aphanocapsa*, inclusive uma *Aphanocapsa holsatica*. Há relatos de linhagens potencialmente tóxicas para esse gênero (DOMINGOS et al., 1999; SANT'ANNA et al., 2004). A linhagem isolada da UTM-INB foi observada em todas as coletas e só não foi registrada no local CM.

A cianobactéria filamentosa não heterocitada, *Geitlerinema acutissimum*, está relacionada à ambiente de águas represadas, o gênero é recorrente em águas de

reservatórios (informação pessoal M.Sc. Livia Fernanda Agujaro). A linhagem *Geitlerinema acutissimum* CENA85 foi encontrada em todas as coletas, em quatro dos cinco locais amostrados, apenas na CM não foi observada. Essa linhagem, em cultura, apresentou crescimento rápido, mas constatou-se que ela estava comumente associada à *Rhabdoderma* sp. CENA114, a qual permanecia em sua mucilagem, dificultando o seu isolamento.

Duas linhagens de *Pseudanabaena* (CENA81 e CENA84) foram isoladas, sendo este gênero também encontrado tanto em ambientes eutróficos quanto oligotróficos. Linhagens de *Pseudanabena galea* são bem distribuídas e estão geralmente relacionadas à substratos, região bêntica, apoiada em plantas submersas ou mesmo dentro da mucilagem de algas (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005; KOMÁREK; KLING; KOMÁRKOVÁ, 2003). Outras duas Oscillatoriales, *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76 e *Leptolyngya* sp. CENA83, foram isoladas do sistema de tratamento da usina. Esse é um dos gêneros mais comum dessa ordem, presentes no solo, perifiton, metafiton, diferentes ambientes de águas doces e marinhos. Também há registros de sua presença em águas termais e de fontes minerais (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005; KOMÁREK; KLING; KOMÁRKOVÁ, 2003).

Duas espécies de *Phormidium* foram isoladas do local estudado. *Phormidium formosum* CENA86 foi registrada em apenas uma das coletas (dezembro de 2005) e somente na D1. Essa espécie tem distribuição ampla, associada ao substrato em águas estagnadas e represadas, também pode ter ocorrência em águas poluídas com esgoto e, portanto, são relatadas como de ocorrência em locais poluídos (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). *Phormidium violaceum* CENA 82 foi observada em duas coletas (novembro de 2004 e abril de 2005) para todos os ambientes com exceção da CM. Os registros para essa espécie são associados a substratos úmidos de estufas e também em pequenos corpos d'água de substrato rochoso (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).

A única cianobactéria filamentosa heterocitada isolada foi a *Nostoc* sp. CENA87. Esse gênero está normalmente associado à ambientes terrestres, entretanto, também existem registros de *Nostoc* em ambientes aquáticos (POTTS, 2000).

Analisando os registros totais de cianobactérias entre os locais em que foram detectadas, pode ser observada a correlação entre os efluentes interligados do Sistema de Tratamento da Usina e os tipos isolados. Para esse sistema, em que as bacias mantêm características físicas mais próximas devido exatamente ao tipo de tratamento que recebem, os tipos celulares de cianobactérias também foram correspondentes. Além disso, esses foram os locais de maior representatividade, das 12 formas observadas, 11 foram detectadas em R e em D2 e as 12 foram observadas em D1, essa relação pode ser reflexo da constância de um pH próximo de 8. Por outro lado, nos efluentes do Sistema de Tratamento da CM com pH ácido (3,0 – 5,0) foi possível isolar somente uma cianobactéria. Já para o local P41, onde o pH é mais alcalino (variando de 6,0 a 7,0), quatro linhagens de cianobactérias foram isoladas.

Não houve muita disparidade entre as coletas no que se refere à diversidade de isolados. A maior diferença pode ser notada entre a primeira coleta e as demais, porém isso pode ser reflexo da forma como as amostras foram tratadas, pois nas coletas II, III e IV seguiu-se o procedimento para cálculo do número mais provável, com mais diluições do que na coleta I.

4.2.1 Caracterização morfológica das cianobactérias isoladas

As descrições morfológicas detalhadas das cianobactérias isoladas dos sistemas de efluentes da UTM-INB foram feitas usando o sistema de classificação de Anagnostidis e Komárek (1990) e Komárek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005). Quando possível, o sistema bacteriológico (CASTENHOLZ, 2001) foi citado depois da designação botânica. Em cada descrição há o local de ocorrência da espécie dentre os efluentes coletados da UTM-INB.

A seguir são apresentadas as descrições:

Ordem Chroococcales

Família Synechococcaceae

Subfamília Aphanothecoideae

Aphanothece Nägeli 1849

Aphanothece sp.

CENA75 (Figura 8)

Colônias densas, irregulares; envelope mucilaginoso inconspícuo, rente às células; células oblongas a cilíndrico; 0,8 – 1,5 μm compr. x 0,8 – 1,0 μm diâm.; conteúdo verde, homogêneo.

Ocorrência: todos os ambientes amostrados.

Subfamília Synechococcoideae

Rhabdoderma Schmidle et Lauterborn 1900

Rhabdoderma sp

CENA114 (Figura 9)

Colônias oblongas a irregulares; envelope mucilaginoso hialino, inconspícuo; células oblongas a cilíndricas, retas; 1,8 – 3,1 μm compr. x 0,9 – 1,3 μm diâm.; conteúdo verde, homogêneo.

Ocorrência: Bacia de Rejeitos, D1, D2.

Synechococcus Nägeli 1849 (*Gênero-forma XIII*)

Synechococcus cf. *lividus* Copeland 1936

CENA79 (Figuras 10 – 11)

Células solitárias ou formando pseudotricomas, em forma de bastão, retas ou arqueadas; 2,5 – 4 μm compr. x 0,8 – 1,2 (1,6) μm diâm.; com grânulos evidentes nas extremidades, conteúdo verde-claro. De acordo com Copeland (1936), a espécie pode habitar locais com temperaturas de 23,5 °C a 68°C e pH 6,1-8,8. O material analisado difere do material tipo por apresentar comprimento celular menor. Segundo Komárek e Anagnostidis (1998), o

material tipo de *S. lividus* possui as seguintes dimensões: 5,0-15,0 (32,0) μm comprimento x 1,2-2,2 μm diâmetro.

Ocorrência: Bacia de Rejeitos, D1, D2.

Família Merismopediaceae

Subfamília Merismopedioideae

Aphanocapsa Nägeli 1849

Aphanocapsa cf. *holsatica* (Lemmermann) Cronberg et Komárek 1994

CENA80 (Figuras 12 – 13)

Colônias lobadas a irregulares; envelope mucilaginoso inconspícuo, difluente, incolor; células densamente agrupadas, esféricas, 2,0 - 2,4 μm diâm.; conteúdo homogêneo, coloração verde-escuro brilhante. O material analisado possui diâmetro celular maior (2,0 – 2,4 μm) quando comparado com material tipo (ca. 1 μm), segundo Komárek e Anagnostidis (1999).

Ocorrência: Ponto 41, Bacia de Rejeitos, D1, D2.

Ordem Oscillatoriales (*Subseção III*)

Família Pseudanabaenaceae

Subfamília Pseudanabaenoideae

Geitlerinema (Anagnostidis et Komárek) Anagnostidis 1989 (*Gênero-forma IV*)

Geitlerinema acutissimum (Kufferath) Anagnostidis 1989

CENA85 (Figuras 14 – 16)

Tricomas retos ou flexuosos, podendo formar agrupamentos em rede, móveis; células cilíndricas, 4,0 – 6,0 μm compr. x 1,6 – 2,0 μm diâm., com grânulos nas extremidades; célula apical atenuada, curva; conteúdo verde-azulado pálido.

Ocorrência: Ponto 41, Bacia de Rejeitos, D1 e D2

Pseudanabaena Lauterborn 1915 (*Gênero-forma XII*)

Pseudanabaena galeata Böcher 1949

CENA84 (Figura 17)

Tricomas retos, geralmente com 10-30 células, móveis, constritos; células cilíndricas, 1,6 µm diâm. x (2) 3,0 – 4,0 (5) µm compr., com aerótopos nas extremidades (septos translúcidos); célula apical com 1 a 2 aerótopos; conteúdo acastanhado.

Ocorrência: Bacia de Rejeitos, D1.

Pseudanabaena sp.

CENA81 (Figuras 18 – 19)

Tricomas retos, geralmente com 2 - 3 (7) células, móveis, constritos; 1,6 µm diâm. x 4,0 – 4,8 µm compr., com aerótopos nas extremidades (septos translúcidos); conteúdo verde-brilhante, levemente granuloso.

Ocorrência: Bacia de Rejeitos, D1, D2.

Subfamília Leptolyngbyoideae

Leptolyngbya Anagnostidis et Komárek 1988 (*Gênero-forma V*)

Leptolyngbya cf. *tenerrima* (Kützinger ex Hansgirg) Komárek in Anagnostidis 2001

CENA76 (Figuras 20 – 22)

Tricomas retos ou flexuosos, com ramificação falsa, levemente constritos; bainha fina, hialina, inconspícua; células quadráticas a mais curtas que longas, 1,0 – 1,6 µm compr. x 2 – 2,5 µm diâm.; célula apical cilíndrica a levemente truncada, às vezes acuminada; conteúdo verde-azulado, homogêneo. Reprodução por fragmentação do tricoma com auxílio de necrídios. O material analisado difere do material tipo pois esse possui célula apical levemente atenuada. Porém, *Leptolyngbya tenerrima* foi descrita para ambientes planctônicos, no metafíton ou regiões litorâneas (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005).

Ocorrência: Bacia de Rejeitos, D1 e D2

Leptolyngbya sp.

CENA83 (Figuras 23 – 25)

Tricomas retos ou flexuosos, com ramificação falsa, constritos; bainha fina, hialina, inconspícua; constritos; células quadráticas a mais curtas que longas, 1,6 – 2,0 μm diâm.; célula apical cilíndrica a levemente truncada, acuminada, às vezes capitada; conteúdo verde-azulado, homogêneo. Reprodução por fragmentação do tricoma com auxílio de necrídios.

Ocorrência: Bacia de Rejeitos, D1 e D2

Família Phormidiaceae

Subfamília Phormidioideae

Phormidium Kützing ex Gomont 1892

Phormidium formosum (Bory ex Gomont) Anagnostidis et Komárek 1988

CENA86 (Figura 26)

Tricomas retos ou flexuosos, extremidades atenuadas; móveis; células isodiamétricas, 4,0 – 5,0 μm compr. x 5,0 – 6,0 μm diâm.; células apicais cônico-arredondadas; às vezes levemente curvas; conteúdo verde-azulado, levemente granuloso. Reprodução por fragmentação do tricoma com auxílio de necrídios.

Ocorrência: D1.

Phormidium violaceum (Wallroth ex Gomont) Anagnostidis 2001

CENA82 (Figuras 27 – 28)

Tricomas retos ou flexuosos, com extremidades atenuadas; móveis; células isodiamétricas a mais largas que longas, 4,0 – 6,0 μm compr. x 5,0 – 6,0 μm diâm.; células apicais alongadas (afiladas), às vezes arqueadas, com pequena caliptra arredondada (esférica); conteúdo

violeta pálido, com grânulos nos septos. Reprodução por fragmentação do tricoma com auxílio de necrídios.

Ocorrência: Bacias de Rejeitos, D1 e D2.

Ordem Nostocales (*Subseção IV*)

Família Nostocaceae

Subfamília Nostocoideae

Nostoc Vaucher ex Bornet et Flahault 1888

Nostoc sp.

CENA87 (Figuras 29 – 30)

Tricomas (levemente atenuados) reticulados envoltos por mucilagem colonial; envelope mucilaginoso hialino, conspícuo, às vezes difluente; células vegetativas em forma de barril, 3,6 – 4,0 µm compr. x 2,4 – 4,0 µm diâm., conteúdo verde pálido, granuloso; heterocitos esféricos a cilíndricos, 4,0 – 6,0 µm compr. x 3,6 – 4,8 µm diâm.; acinetos esféricos a cilíndricos, 4,0 – 7,2 µm compr. x 3,6 – 4,0 µm diâm..

Ocorrência: Ponto 41.

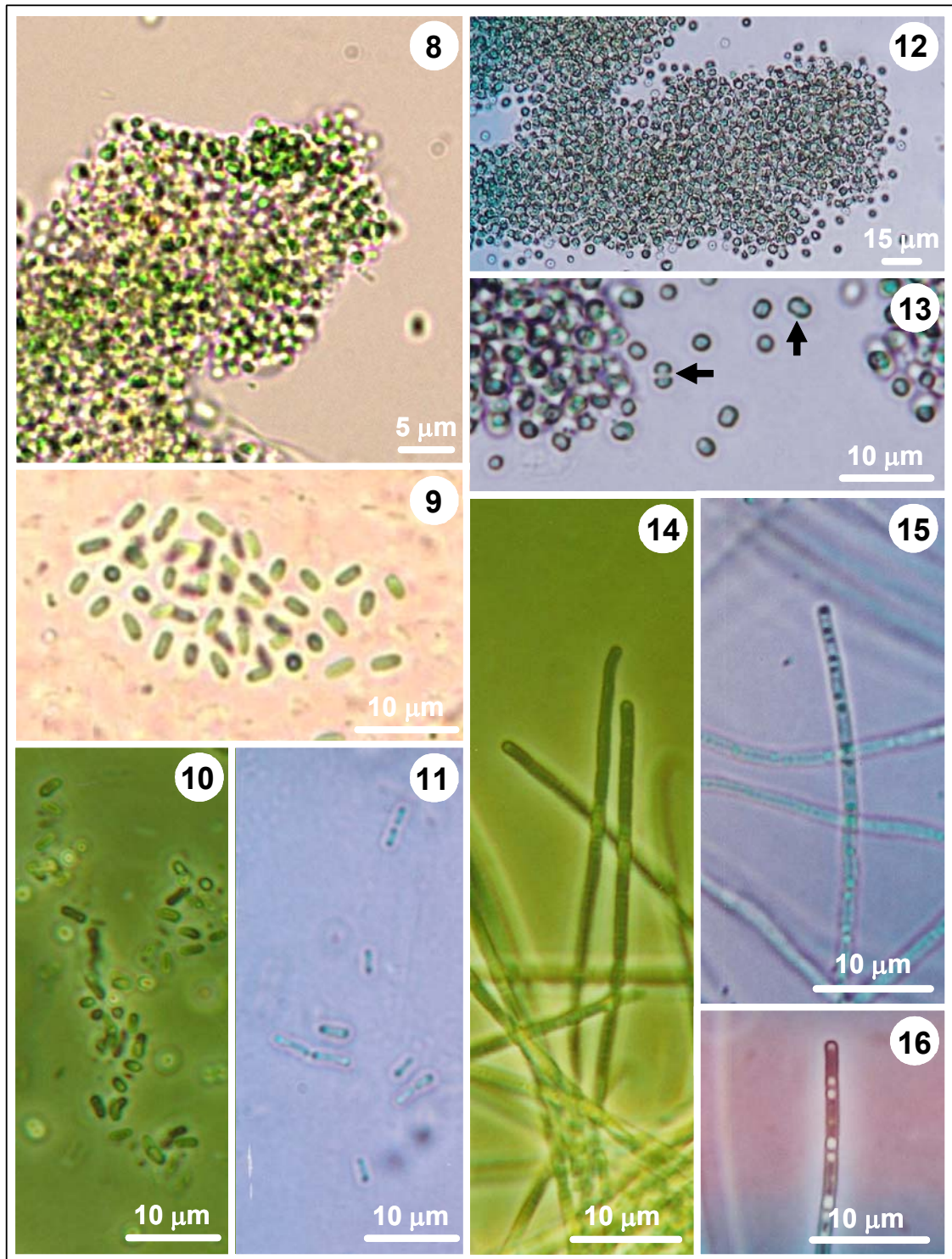


Figura 8. *Aphanothece* sp. CENA75, aspecto geral da colônia; **Figura 9.** *Rhabdoderma* sp. CENA114, aspecto geral da colônia com células dispersas; **Figuras 10 - 11.** *Synechococcus* cf. *lividus* CENA79: 10. células em forma de bastão, 11. células com grânulos nas extremidades; **Figuras 12 - 13.** *Aphanocapsa* cf. *holsatica* CENA80: 12. aspecto geral da colônia, 13. margem da colônia com células esféricas e em divisão (setas); **Figuras 14 - 16.** *Geitlerinema acutissimum* CENA85: 14. tricoma com extremidade curva (contraste-de-fase), 15. tricoma com grânulos, 16. detalhe dos grânulos nas extremidades celulares (contraste-de-fase).

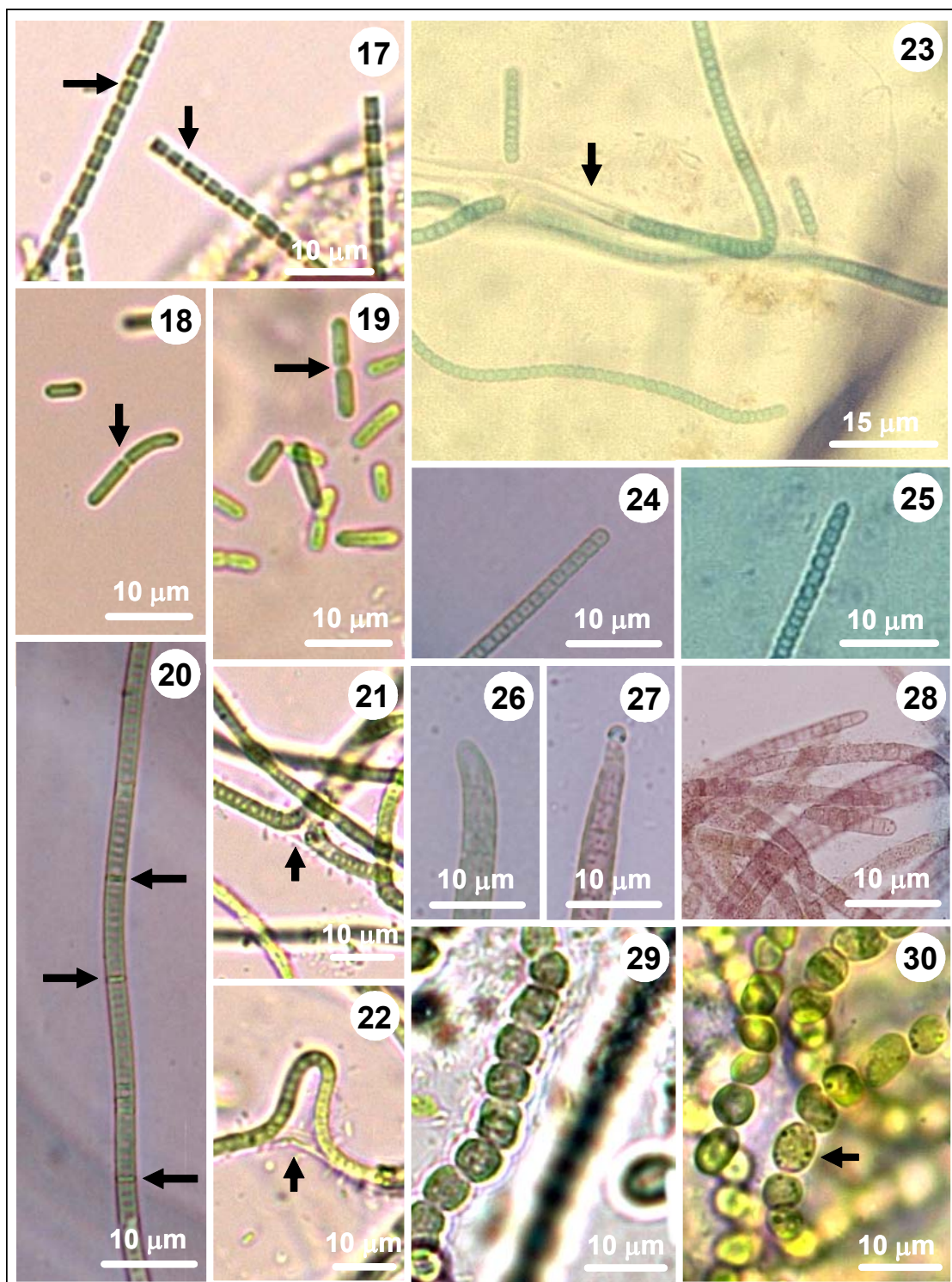


Figura 17. *Pseudanabaena galeata* CENA84, com aerótopos (setas); **Figuras 18 - 19.** *Pseudanabaena* sp. CENA81, notar aerótopos (setas). **Figuras 20 - 22.** *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76: 20. detalhe do filamento, notar necrídios (setas), 21 - 22. ramificação falsa em formação, notar também a bainha (setas); **Figuras 23 - 25.** *Leptolyngbya* sp. CENA83: 23. aspecto geral do filamento, notar bainha (seta), 24 - 25. detalhe do filamento com células quadráticas, notar ápice truncado; **Figura 26.** *Phormidium formosum* CENA86: tricoma com ápice curvo; **Figuras 27 - 28.** *Phormidium violaceum* CENA82: 27. tricoma com ápice atenuado e capitado, 28. aspecto geral dos tricomas castanhos; **Figuras 29 - 30.** *Nostoc* sp. CENA87: 29. células vegetativas, 30. acinet (seta).

4.3. Caracterização molecular usando a seqüência de RNAr 16S

As extrações de DNA genômico das culturas puras de cianobactérias foram realizadas com sucesso usando o protocolo descrito por Fiore et al. (2000), que foi desenvolvido visando à obtenção de DNA de todos os gêneros deste grupo de organismos conhecidos até o momento. A boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR de seqüências de RNAr 16S (Figura 31).

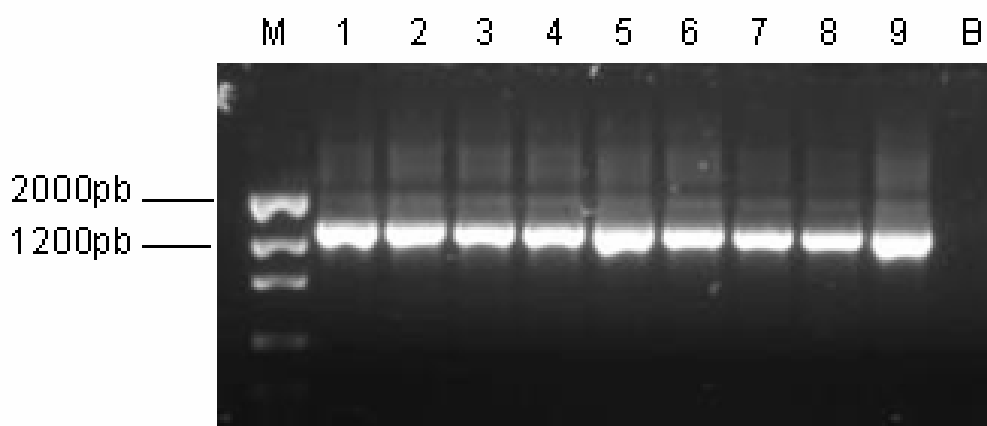


Figura 31. Gel de agarose representativo dos produtos de amplificação por PCR de fragmentos de RNAr 16S. M-marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen); 1- *Aphanothece* sp. CENA75; 2- *Rhabdoderma* sp. CENA114; 3- *Aphanocapsa* cf. *holsatica* CENA80; 4- *Pseudanabaena galeata* CENA84; 5- *Pseudanabaena* sp. CENA81; 6- *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76; 7- *Leptolyngbya* sp. CENA83; 8- *Phormidium formosum* CENA86; 9- *Phormidium violaceum* CENA82.

Neste estudo são apresentados os resultados de nove seqüências praticamente inteiras (variando de 1460 a 1512 pb) do gene que codifica para RNAr 16S de cianobactérias isoladas da UTM-INB. As seqüências, cujas bases apresentaram qualidade (>20) obtidas podem ser observadas no ANEXO A.

Uma das vantagens de se utilizar seqüências do gene de RNAr 16S é porque estudos demonstram que dentro do domínio *Bacteria*, dois organismos podem ser considerados da mesma espécie se eles apresentarem reassociação de DNA-DNA de aproximadamente 70% ou maior (WAYNE et al., 1987) e que linhagens com seqüências do gene de RNAr 16S que apresentam valores de identidades inferiores a 97,5% são improváveis de possuírem reassociação de DNA-DNA maior que 60-70% e, portanto, improváveis de pertencerem à mesma espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Disso resulta que, em análise BLAST utilizando o gene de RNAr 16S, dois organismos são considerados do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (LUDWIG et al., 1998) e de mesma espécies se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Na análise BLAST, a seqüência de RNAr 16S de *Aphanothece* sp CENA75 teve maior identidade (99%) com seqüência de *Synechococcus* PCC6307 (AF001477), isolada de um lago de água doce de Wisconsin, EUA (URBACH et al., 1998). A seqüência da *Rhabdoderma* sp. CENA114 apresentou baixa identidade (90%), com *Gloeothece* sp. KO11DG (AB067577), uma cianobactéria unicelular marinha isolada da região de Cingapura. Há apenas uma seqüência de 618pb de RNAr 16S de *Rhabdoderma* depositada no GenBank, *Rhabdoderma* cf. *rubrum*, e esse fragmento não mostrou identidade com a linhagem isolada da UTM-INB. A seqüência da linhagem *Aphanocapsa* cf. *holsatica* CENA80 mostrou 99% de identidade com a *Synechocystis* sp. PCC6803 (BA000022), isolada de água doce da Califórnia, EUA.

Dentro da ordem Oscillatoriales, *Pseudanabaena galeata* CENA84 mostrou identidade de 98% com uma cianobactéria bentônica não cultivada (DQ181672), presente em um lago da Antártica Oriental. A outra *Pseudanabaena*, CENA81, apresentou identidade de 96% com outra cianobactéria bentônica não cultivada (DQ181677), presente também no mesmo lago da Antártica Oriental. O alinhamento entre as duas seqüências de RNAr 16S das linhagens de *Pseudanabaena* resultou em identidade de 91%. As seqüências de *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76 e *Leptolyngbya* sp. CENA83 tiveram entre si 99% de

identidade e, na análise BLAST, ambas apresentaram identidade de 99% com *Leptolyngya foveolarum* Komárek 1964/112 (X84808). A sequência de RNAr 16S de *Phormidium formosum* CENA86 apresentou 96% de identidade com *Phormidium autumnale* Arct-Ph5, isolada da região do Ártico (DQ493873), e *Phormidium violaceum* CENA82 mostrou 91% de identidade com *Planktothrix pseudagardhii* T1-8-4 (AB045968), isolada da Tailândia. A identidade entre ambas as *Phormidium* isoladas da UTM-INB foi de 90%.

As seqüências de RNAr 16S correspondem aos genes que codificam para a subunidade menor do ácido ribonucléico ribossômico, e por essa característica estrutural são conservados e permitem inferir relações filogenéticas entre os organismos, além de possibilitarem a identificação de espécies. Todavia, deve-se ter em mente o questionamento da congruência entre a identificação das cianobactérias ao interpretar essas inferências e identidades. Wilmotte e Herdman (2001) e Komárek e Anagnostidis (1989) chamam atenção para o fato de que muitas linhagens de cianobactérias são identificadas erroneamente, por isso os pesquisadores devem utilizar linhagens bem caracterizadas para análises comparativas ou usar de uma abordagem polifásica, envolvendo descrições morfológicas, ecológicas, bioquímicas, ultraestruturais e moleculares. Entretanto, isso nem sempre é possível devido ao número limitado de dados existentes atualmente para alguns táxons.

A árvore filogenética do gene de RNAr 16S construída usando o método da distância ("Neighbor-joining") (Figura 32), mostra as relações evolutivas entre as seqüências das cianobactérias isoladas e outras seqüências escolhidas do GenBank, ou seja, *Aphanothece* sp. 0BB21S01 - AJ639901, *Aphanothece elabens* - AB001724 (depositada como *Microcystis elabens*, a mudança está conforme Komárek e Anagnostidis (1999)), *Aphanothece sacrum* - AB116658, *Cyanothece* sp. - AY620239, *Gloeothece membranacea* PCC6501 - X78680, *Synechococcus* sp. - AF317079, *Synechococcus* sp. - AF317071, *Synechococcus* PCC6307 - AF001477, *Synechocystis* PCC 6803 - 47118304, *Synechocystis* PCC6702 - AB041936, *Merismopédia glauca* - X94705, *Snowella litoralis* 1LT47S05 - AJ781041, *Woronichinia naegeliana* - AJ781043, *Microcystis aeruginosa* PCC7005 - U40338, *Pleurocapsa* PCC7327 - AB039007, *Pseudanabaena* PCC6903 - AB039017, *Pseudanabaena* PCC7408 -

AB039020, *Limnothrix* sp. - AJ580008, *Limnothrix redekei* - AJ580007, *Geitlerinema* PCC7105 - AB039010, *Leptolyngbya boryana* - AB245143, *Leptolyngbya foveolarum* - X84808, *Leptolyngbya tenerrima* UTCC 77 - AF218368, *Planktothrix pseudagardhii* - AB045968, *Phormidium* sp. - AB003169, *Phormidium autumnale* – DQ493874, *Microcoleus* sp. - X70770, *Oscillatoria* sp. - AJ133169, *Oscillatoria* sp. - AB003163, *Lyngbya* sp. - AY049751, *Plectonema boryanum* - AF132793. A árvore filogenética foi enraizada usando como grupo externo uma seqüência de nucleotídeos retirada do GenBank, referente a uma cianobactéria da ordem Nostocales, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (NC_007413).

A análise filogenética revelou agrupamentos parafiléticos das linhagens da ordem Oscillatoriales. Esses resultados estão de acordo com os relatados anteriormente para as espécies dessa família de cianobactérias (ISHIDA et al., 2001). Como pode ser observado na Figura 32, as linhagens dessa família ficaram separadas por pelo menos cinco agrupamentos. O maior deles, com valor de reamostragem de 100%, consiste de oito linhagens da ordem Oscillatoriales, onde estão inseridas duas linhagens provenientes deste estudo (*L. tenerrima* CENA76 e *Leptolyngbya* CENA83). Num agrupamento (reamostragem de 99%), formado por seis linhagens, estão os isolados *Pseudanabaena* CENA81 e *P. galeata* CENA84. A linhagem *Phormidium formosum* CENA86 agrupou numa reamostragem de 100% com a mesma *P. autumnale* Arct-Ph5, isolada da região do Ártico, com a qual teve alta identidade. Dentro desses grupamentos, observou-se que *Phormidium violaceum* CENA82 foi a única que formou um clado com uma reamostragem mais baixa (74%) com as linhagens *Planktothrix pseudagardhii* T1-8-4 e *Oscillatoria* CYA 128/R.

As seqüências de cianobactérias da ordem Chroococcales formaram dois clados, sendo que no clado menor, com reamostragem de 90%, ficaram inseridos os isolados *Rhabdoderma* CENA114 e *Aphanothece* CENA75. Dentro desse clado, a *Rhabdoderma* CENA114 ficou sozinha em um ramo separado, enquanto que a *Aphanothece* agrupou-se com linhagens do gênero *Synechococcus*. Nos bancos de dados públicos de seqüências de RNAr 16S existe, até o momento, somente um pequeno fragmento (618 pb) de RNAr 16S da *Rhabdoderma* cf.

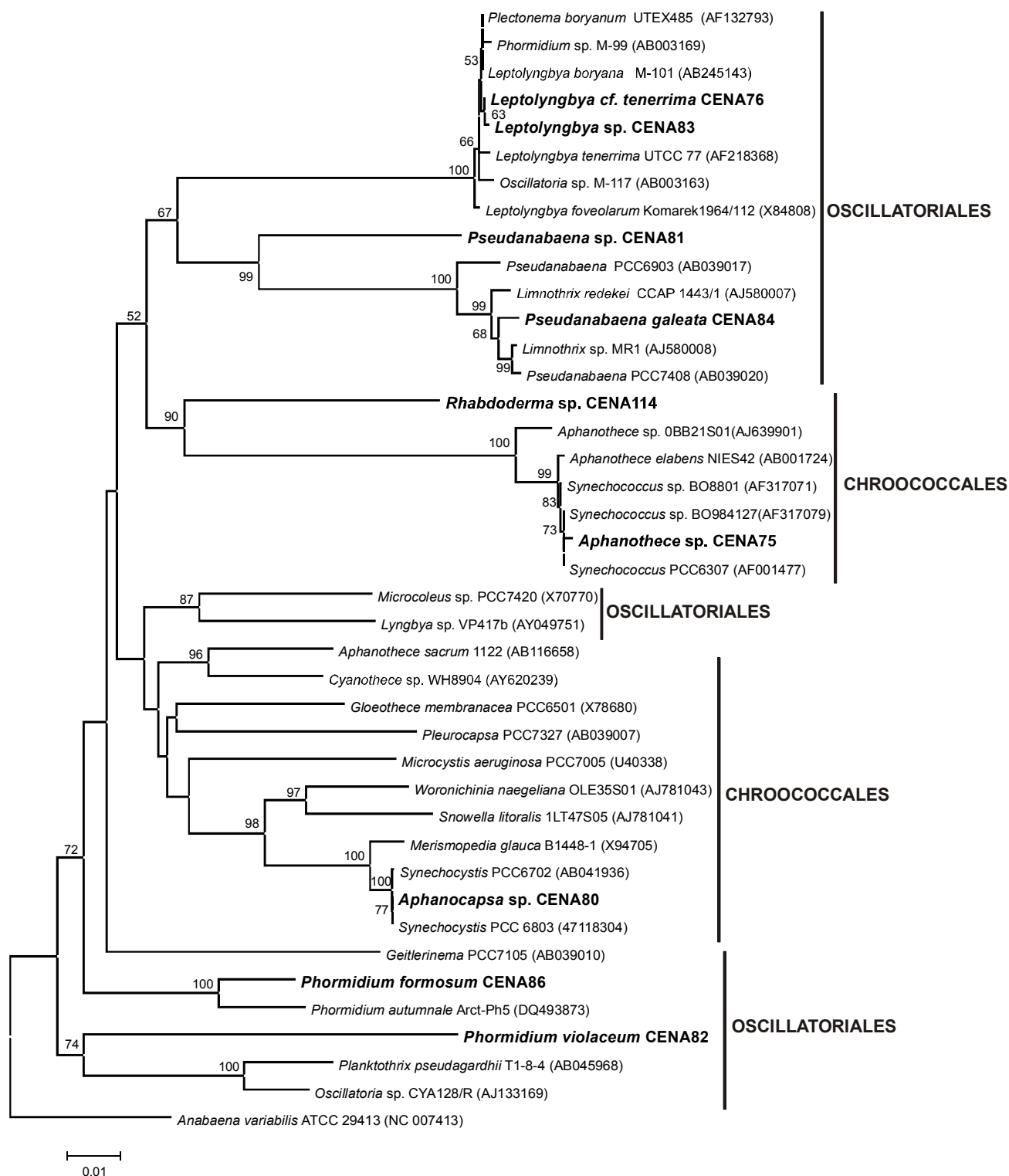


Figura 32. Árvore filogenética construída por “Neighbour-joining” baseada em seqüências de RNAr 16S (1325 pb) mostrando as cianobactérias isoladas da UTM-INB (em negrito). Valores superiores a 50% na reamostragem de 1000 árvores são indicados nos nós.

rubrum Kopara-CH (AJ621833), isolada de um manto microbiano de um atol tropical da Polinésia francesa, o qual apresentou identidade muito baixa (88%) com a sequência da *Rhabdoderma* CENA114 e, portanto, não foi utilizada na construção da árvore filogenética. Um agrupamento monofilético interno, sustentado por reamostragem de 98%, foi formado dentro do clado maior das linhagens da ordem Chroococcales, contendo as cianobactérias com dois planos de divisão. Nesse agrupamento, o isolado *Aphanocapsa* sp. CENA80 ficou proximalmente relacionado (100% de reamostragem) com cianobactérias do gênero *Synechocystis*. A semelhança entre esses dois gêneros é grande e, inclusive, várias linhagens de *Synechocystis* foram inicialmente descritas como *Aphanocapsa* (listagem de cepas, Instituto Pasteur, <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/alphabet.htm>. Acessado em: setembro de 2006). Uma das diferenças mais facilmente notadas entre esses dois gêneros é a formação de colônias em *Aphanocapsa*. Contudo é comum que linhagens desse gênero quando em cultura, percam a estrutura de colônias o que pode levar a uma identificação errônea. Caso semelhante foi relatado para *Woronichinia* e *Snowella* (RAJANIEMI-WACKLIN et al., 2005).

Na parte superior da árvore pode-se observar que linhagens das ordens Oscillatoriales e Chroococcales formam um agrupamento, embora com baixo valor de reamostragem (52%). As árvores filogenéticas das cianobactérias construídas com sequências de RNAr 16S parecem indicar que esses organismos divergiram ao mesmo tempo numa época passada (HONDA; YOKOTA, SUGIYAMA, 1999; ISHIDA; YOKOTA; SUGIYAMA, 1997; ISHIDA et al., 2001; NELISSEN et al., 1994; TURNER et al., 1999), e assim fica difícil elucidar o seu processo de evolução. Como resultado, linhagens das ordens Oscillatoriales e Chroococcales podem ser encontradas no mesmo clado em algumas posições nas árvores filogenéticas atuais..

4.4. Biomassa – Número Mais Provável (NMP)

Conforme discutido no item 4.2., a técnica de isolamento de microrganismos consegue acessar somente em torno de 1% da população existente no ambiente. Assim, para obter uma aproximação da população de cianobactérias existentes nos locais amostrados, foi utilizado o método do NMP. Esse método possibilita estimar a biomassa de populações bacterianas, em números de células viáveis. Reconhecem-se as limitações da precisão do método, pois seus resultados estatísticos geralmente também subestimam a comunidade e, por se basear em crescimento em meios de cultura, podem selecionar a representatividade microbiana por favorecer certos organismos. Por isso, deve-se entender a técnica como um método semi-quantitativo para distinguir abundância relativa, ao invés de absoluta (BRUNS; HOFFELNER; OVERMANN, 2003; HARRIS; JONES; LEWIS, 1998; VESTER; INGVORSEN, 1998). A precisão do método pode ser melhorada aumentando-se o fator de diluição e a quantidade de diluições paralelas. Além disso, a técnica é convencionalmente utilizada para aumentar o sucesso do isolamento ao favorecer o desenvolvimento de tipos de organismos dominantes e/ou de crescimento rápido, e mesmo isolamento de microorganismos fastidiosos nas maiores diluições, como para bactérias sulfato redutoras (SINGH, KASHYAP, 2006; VESTER, INGVORSEN; 1998), bactérias oxidantes de amônio (JONHSON et al., 2005), diatomáceas (HARRIS; JONES; LEWIS, 1998) e cianobactérias (EGUCHI et al., 1996). Os resultados do NMP obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 7.

Em geral, os valores de NMP mostram que ocorreu variação no número de cianobactérias de acordo com a época de amostragem e também com o pH do local. Os menores valores de NMP, variando de $4,0 \times 10^0$ a $2,3 \times 10^1$ cels·mL⁻¹, foram observados na Cava da Mina, local onde o pH está em torno de 3,88. Conforme já mencionado, desse local só foi possível isolar uma cianobactéria, a *Aphanothece* CENA75. No sistema de tratamento da usina (R, D1 e D2), onde o pH fica em torno de 8,0, foram encontrados os maiores valores de células por mL, variando de $7,5 \times 10^2$ a $\geq 2,4 \times 10^8$ cels·mL⁻¹. O local

P41, com pH em torno de 6,0, apresentou o menor valor de NMP ($2,3 \times 10^2$ cels·mL⁻¹) em dezembro de 2005 e o maior em abril de 2005 ($9,3 \times 10^3$ cels·mL⁻¹). O local D1 foi o que apresentou as maiores variações entre as épocas de amostragens, ou seja em novembro de 2004 ($7,5 \times 10^3$ cels·mL⁻¹) e dezembro de 2005 ($\geq 2,4 \times 10^8$ cels·mL⁻¹). Ambos são meses com grande aporte de chuvas, variando de 135,2 mm a 174,9 mm, e com temperatura média do ar de 22°C. A abundância de cianobactéria, encontrada nesse ambiente peculiar, principalmente nos locais onde o pH é mais alcalino, está de acordo com a observada em outros ambientes aquáticos. Em uma lagoa com água salobra de criação de lagosta na Austrália os valores médios de cianobactérias observados por contagem em microscópio variaram de $1,82 \times 10^3$ a $3,80 \times 10^5$ cels·mL⁻¹ (KANKAANPÄÄ et al., 2005). No Brasil, em uma lagoa facultativa pertencente ao sistema de tratamento por lagoas de estabilização do município de Cajati, Estado de São Paulo, o número de células de cianobactérias variaram de $3,9 \times 10^2$ a $1,5 \times 10^4$ cels·mL⁻¹, dependendo da época do ano (FURTADO et al., 2006¹). Já em Portugal, também em um sistema de lagoa de estabilização, o número máximo de cianobactéria encontrado foi de $8,8 \times 10^3$ cels·mL⁻¹ (VASCONCELOS; PEREIRA, 2001).

Tabela 7 – Números mais prováveis (NMP) para as coletas de novembro de 2004, abril de 2005 e dezembro de 2005. Os valores representam número de células por mL (cels·mL⁻¹).

Local*	Época da amostragem		
	Novembro 04	Abril 05	Dezembro 05
CM	$2,3 \times 10^1$	$7,0 \times 10^0$	$4,0 \times 10^0$
P41	$4,3 \times 10^2$	$9,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
R	$2,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$7,5 \times 10^5$
D1	$7,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^8$	$\geq 2,4 \times 10^8$
D2	$1,5 \times 10^4$	$\geq 2,4 \times 10^8$	$\geq 2,4 \times 10^8$

* CM=Cava da Mina; P41= Ponto 41; R= Bacia de Rejeitos; D1=Bacia de Decantação 1 e D2=Bacia de Decantação 2.

¹FURTADO, A.L.F.F.; CALIJURI, M.C.; LORENZI, A. S.; HONDA, R.Y.; FIORE, M.F. Cyanobacteria in Brazilian waste stabilization ponds. A ser editado pela Water Research.

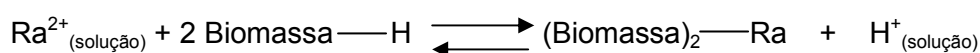
4.5. Análise de microcistinas

Os resultados da análise de microcistinas mostraram que das 12 linhagens isoladas da UTM-INB, três produzem essa hepatotoxina em baixas concentrações (Tabela 6). A toxina foi detectada em três linhagens da ordem Oscillatoriales, ou seja, *Pseudanabaena galea* CENA84, *Pseudanabaena* sp. CENA81 e *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76. Na literatura não há relatos desses dois gêneros de cianobactéria como produtores de microcistinas. Assim esses resultados são inéditos. Os gêneros pertencentes a ordem Oscillatoriales, conhecidos por sintetizarem microcistinas, são *Planktothrix*, *Oscillatoria* e *Phormidium* (JUNGBLUT; NEILAN, 2006).

As microcistinas são sintetizadas por uma via não ribossômica por meio de um complexo multienzimático constituído de peptídeos sintetases (PSs), policetídeos sintases (PKSs) e várias outras enzimas auxiliares (TILLET et al., 2000). Mais de 60 diferentes isoformas de microcistinas foram identificados, sendo que os tipos mais comuns são as microcistinas LR, RR e YR (SIVONEN; JONES, 1999). Essas hepatotoxinas são inibidoras das proteínas fosfatases 1 e 2ª de organismos eucarióticos e a exposição à altas doses delas pode produzir lesão no fígado e levar a morte (KUIPER-GOODMAN; FALCONER; FITZGERALD, 1999). Assim, realizou-se a análise dessa toxina nas linhagens isoladas com o objetivo de selecionar para o teste de bioassorção uma cianobactéria que além de estar presente nos locais estudado não fosse produtora de toxina. Numa pesquisa anterior, observou-se que a linhagem *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76, produtora de microcistinas, apresentou genes de PS, PKS e híbridos PS/PKS (SILVA, 2006), os quais são necessários para a síntese da toxina. Entretanto, a *Aphanothece* sp. CENA75, não produtora de microcistinas, apresentou somente o gene de PS, um indicativo de que ela produz algum tipo de metabólito, mas não a hepatotoxina.

4.6. Cinética de bioissorção do ^{226}Ra

Os ensaios de cinética de bioissorção do ^{226}Ra foram realizados com biomassas secas da linhagem *Aphanothece* sp. CENA75, a qual foi escolhida em virtude de sua ampla ocorrência nos efluentes da UTM-INB e por não produzir a hepatotoxina microcistina. Esse é o primeiro passo para a avaliação de bioissorventes candidatos a uma possível utilização em processos de descontaminação de efluentes contendo radionuclídeos. Nele se investiga o comportamento da biomassa quando em contato com o radionuclídeo em solução, visando a sua capacidade de adsorção. Para isso tem-se que obter o equilíbrio do Sistema de Reação de Bioissorção (SRB) ou seja, detectar o tempo de contato entre as fases sólida (bioissorvente) e líquida (solução do sorvato – no caso, o ^{226}Ra), no qual a reação abaixo atinge seu equilíbrio.



A primeira etapa é fixar o pH do bioissorvente e da solução, variando o tempo de contato entre as duas fases. No presente estudo foram utilizados dois níveis de pH para os ensaios, ou seja, 3,5 e 5,0. Esses valores foram escolhidos baseados na literatura, onde vários estudos mostraram adsorção de metais/radionuclídeos na biomassa seca de diferentes gêneros de cianobactérias em pH variando entre 3,0 a 8,0. Por exemplo, para a *Synechococcus elongatus* a captura de urânio ocorreu em pH ótimo em torno de 5,0 (HORIYOSHI et al., 1979). *Anacystis nidulans* apresentou a maior retenção de urânio e amerício em pH 3,5 (LIU; WU, 1993). A utilização de biomassa de *Oscillatoria angustissima* como bioissorvente de Cu^{2+} atingiu máxima adsorção em pH 5 (AHUJA; GUPTA; SAXENA, 1997). Para *Lyngbya taylorii* as mais altas taxas de recuperação dos metais testados foram em pH variando entre 3,0 a 7,0 para cádmio, chumbo e zinco e de 4,0 a 7,0 para níquel. A escolha dos valores de pH também deve considerar as condições de precipitação do metal, levando em conta a baixa concentração dos íons na solução. O Ra^{2+} não se precipita em pHs elevados, mesmo para $\text{pH} > 10,00$ (GODOY, 1983). Entretanto, os dois valores baixos de pH usados neste estudo, também podem ser justificados pelo fato de que as maiores

concentrações do Ra^{2+} dentre os efluentes da UTM-INB investigados neste trabalho, estão na Cava da Mina (CM), que tem pH médio de 3,88 e apresenta população da linhagem *Aphanothece* CENA75.

A eficiência de adsorção do ^{226}Ra na biomassa seca de *Aphanothece* CENA75 em pH 3,5 foi baixa, o que pode ser verificado pela pouca variação entre a concentração final (C_f) do radionuclídeo em solução e a inicial (C_i) (Figura 33). Após o máximo tempo (135 minutos) de contato do biossorvente com a solução de sorvato, a razão (C_f/C_i) foi de apenas 0,86. Um valor de C_f/C_i próximo de um (1,00) significa que ocorreu pouca ou nenhuma retirada do radionuclídeo da solução. Os valores de C_f/C_i foram próximos (consideradas as incertezas dos resultados) nos tempos 45, 105 e 120 min. A possível explicação para esses resultados é que, nesse pH, os sítios da biomassa seca apresentam maior afinidade pelos íons de H^+ e, portanto o ^{226}Ra compete fracamente por eles. Assim, pela curva da Figura 33, pode-se dizer que o equilíbrio do sistema foi alcançado próximo de 45 min. de contato entre as fases dispersa e dispersora.

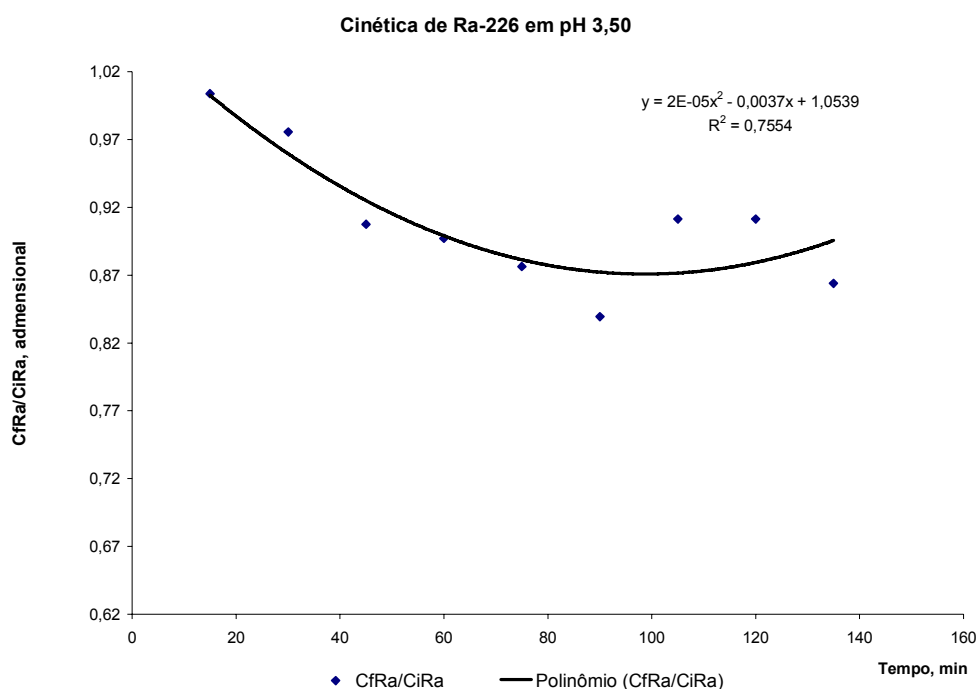


Figura 33. Cinética de biossorção do ^{226}Ra em pH 3,5 pela biomassa seca de *Aphanothece* CENA75, plotando-se C_f/C_i (concentração final do metal/ concentração inicial) por tempo de contato entre biossorvente em solução de sorvato.

A ocupação dos sítios da biomassa seca por íons H^+ pode ser avaliada medindo o pH da solução. A biomassa que serve como bioissorvente foi protonada ao pH teste assim como a solução de trabalho contendo o radionuclídeo alvo. Em condições de acidez, a concentração de íons H^+ é bem maior que de íons Ra^{2+} . Para que os sítios ligantes da biomassa retirem da solução o Ra^{2+} é necessário que íons H^+ saiam do sítio, e isso ocorre quando há mudança na atração do sítio ligante com os íons em questão. Quando íons H^+ são liberados na solução seu pH diminui. A medida dessa variação, juntamente com a análise das concentrações (C_f/C_i) indicam o comportamento de adsorção da biomassa. Nesse experimento, comparando-se os valores das médias de pH entre a solução com Ra^{2+} em contato com a biomassa seca e o controle, biomassa em solução sem íon alvo, para cada tempo (Tabela 8), houve diferença estatística a partir de 30 minutos. Isso significa que houve imobilização de Ra^{2+} , contudo a quantidade de íons alvo retirada da solução foi pequena, visto que o pH variou de 3,30 a 3,54, ao longo do tempo. Isso significa que nesse pH pouco H^+ é liberado dos sítios ligantes, ou seja, existem poucos sítios disponíveis para o Ra^{2+} , e assim ele permanece na solução. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de que o(s) grupo(s) ligante(s) do bioissorvente em estudo torna-se ionizável e, portanto, disponível para ligar metais/radionuclídeos em valores de pH mais elevados do que o do meio de reação, possivelmente acima de pH 4,00 (DITTRICH; SIBLER, 2006).

Tabela 8 – Valores médios finais de pH nos ensaios de bioissorção realizados com pH inicial de 3,5 e 5,0.

TEMPO (min)	Ensaio pH 3,5		Ensaio pH 5,0	
	Solução com Ra^{2+} *	Controle*	Solução com Ra^{2+} *	Controle*
15	3,54±0 a	3,53±0,005 a	4,12±0,01 a	4,97±0,01 b
30	3,44±0,01a	3,51±0,005 b	4,14±0,01 a	4,96±0,005 b
45	3,47±0,03 a	3,50±0,005 a	4,14±0,01 a	4,97±0,02 b
60	3,30±0,005 a	3,48±0,015 b	4,15±0,015 a	4,95±0,025 b
75	3,30±0 a	3,46±0,01 b	4,12±0,015 a	4,98±0,01 b
90	3,33±0,005 a	3,48±0,005 b	4,10±0,005 a	4,99±0,005 b
105	3,37±0,01 a	3,48±0,015 b	4,06±0,01 a	5,00±0,01 b
120	3,37±0,005 a	3,49±0,005 b	4,09±0,01 a	4,95±0,025 b
135	3,39±0,01 a	3,50±0,01 b	4,06±0,005 a	4,97±0,005 b

* Média seguida por letras distintas diferem entre si ao nível de significância $p < 0.05$, de acordo com o teste t-Student. Valores médios ± desvio padrão das médias das duplicatas.

Deve-se observar que no tempo de 45 minutos de contato biossorvente e solução de sorvato não houve diferença estatística, isso pode ser reflexo de diferença no condicionamento da biomassa. O processo de agitação da biomassa promoveu sua homogeneização na solução de contato, disponibilizando sítios de ligação que não haviam sido protonados, dessa forma, mesmo que nesses sítios tenha ocorrido adsorção de Ra^{2+} não haveria alteração no pH pois não haveria H^+ a ser deslocado para a solução.

No ensaio de biossorção de ^{226}Ra em pH 5,0 (Figura 34) houve variação entre as razões C_f/C_i em função do tempo, concentrando-se entre 0,85 – 0,82 no intervalo de 15 a 135 minutos. Considerando-se as incertezas dos resultados das análises radiométricas, a razão C_f/C_i ficou próxima nos intervalos de tempos de 30, 45, 90, 135 minutos. Esse fato sugere que o equilíbrio do SRB foi atingido já a partir de 30 min de contato entre as fases dispersa e dispersora, nas condições deste SRB.

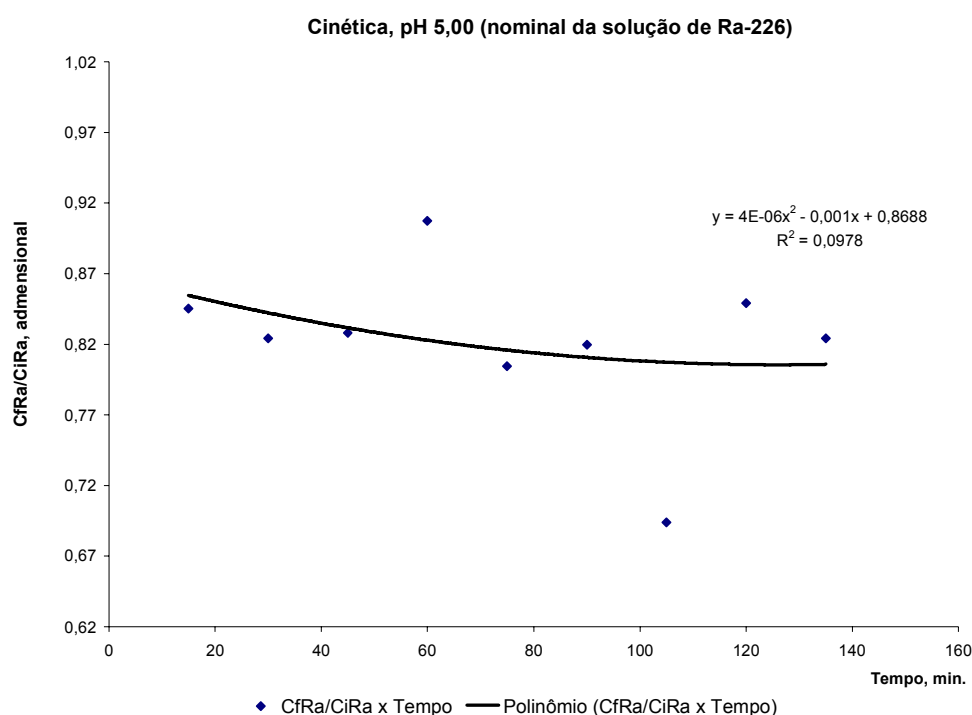


Figura 34. Cinética de biossorção do ^{226}Ra em pH 5,0 pela biomassa de *Aphanothece* sp. CENA75, plotando-se C_f/C_i (concentração final do metal/ concentração inicial) por tempo de contato entre biossorvente em solução de sorvato.

Com relação ao pH, comparando-se os valores das médias de pH entre a solução com Ra^{2+} em contato com a biomassa seca e o controle, para cada tempo (Tabela 8), houve diferença estatística a partir de 15 minutos de contato. Conforme constatado para o ensaio anterior (pH 3,5) houve remoção de Ra^{2+} , contudo a quantidade de íons alvo retirada da solução foi pequena, visto que o pH variou de 4,06 a 4,15, ao longo do tempo.

Os resultados obtidos sugerem que a adsorção de Ra^{2+} seja pH dependente, pois com o aumento do pH o tempo a partir do qual o sítios ligantes tornaram-se disponíveis aos íons alvo diminuiu. Em pH 3,5 foi detectada a partir de 30 minutos e em pH 5,0 a adsorção foi observada a partir de 15 minutos.

Os sítios de adsorção de metais/radionuclídeos por biomassa de cianobactérias são grupos fosfato, carboxílicos, grupos amina e hidroxila (só ionizáveis em pH 10) presentes no envoltório celular e relacionados às camadas de peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (CHOJNACKA, CHOJNACKI; GÓRECKA, 2005; DITTRICH; SIBLER, 2006; FIORE; TREVORS, 1994; GARDEA-TORRESDEY et al., 1998). Em sua revisão sobre a composição do envelope celular e tolerância a metais, Fiore e Trevors (1994), chamam atenção para o fato de que alguns estudos mostram que a camada de lipopolissacarídeo, que contém grupos responsáveis pela complexação dos metais, tem carga neutra ou negatividade fraca. A literatura mostra que as cianobactérias são capazes de remover metais, mas também relata que a eficiência desse processo é influenciada pela linhagem de cianobactéria usada, composição da camada de lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, além da espécie iônica presente no meio de reação.

Comparando-se o comportamento entre as fases dispersa e dispersora com SRB3,5 e SRB5,0 os resultados demonstram que a biomassa seca de *Aphanothece* CENA75 funciona como uma resina de troca iônica fracamente ácida (resina catiônica fraca), fortemente influenciada pelo pH do meio de reação (do SRB), uma vez que seus grupos ligantes começam a ficar ionizados, e portanto disponíveis para ligar metais.

Em estudo anterior realizado utilizando biomassas de *Synechococcus* PCC7942, foi demonstrado que o principal ao grupo envolvido na adsorção de Ca^{2+} é o carboxila

(R-COO-) e que este sítio torna-se ionizável a partir de pH entre 4,0 (DITTRICH; SIBLER, 2006). Considerando que o Ca^{2+} apresenta uma conformação próxima a do Ra e observamos uma adsorção nessa faixa de pH, podemos relacionar a adsorção de Ra^{2+} ao grupo carboxila.

Considerando-se a distribuição da cianobactéria em estudo nos pontos amostrados da UTM-INB, sua biomassa pode estar contribuindo para a imobilização do ^{226}Ra ainda solúvel (colóides inorgânicos e orgânicos), transformando-o em particulado. Apesar da necessidade de comprovação desse fato, pode-se sugerir que esse processo seja mais evidente nas bacias de decantação D1 e D2, cujos pHs próximos do neutro ou levemente alcalinos contribuem para a biossorção deste radionuclídeo.

5. CONCLUSÃO

Doze linhagens de cianobactérias foram isoladas dos efluentes de uma lavra de mina de urânio, o que representa o primeiro registro desse grupo de microrganismos em águas de área brasileira contaminada com radionuclídeos. A caracterização morfológica identificou representantes das ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales. A técnica de isolamento usada, embora tenha sido limitada para acessar a diversidade de cianobactérias no ambiente estudado, permitiu obter culturas isoladas desses organismos em laboratório para o desenvolvimento dos experimentos propostos e também de mais estudos futuros. O isolamento da linhagem *Aphanothece* CENA75 de um local com pH 3,8 e alto teor de urânio, comprova a grande plasticidade metabólica desses organismos que garante a sua sobrevivência em ambiente tão inóspito. A maioria das seqüências de RNAr 16S geradas mostrou identidade com seqüências depositadas em bancos de dados públicas, entretanto duas (*Rhabdoderma* CENA 114, *Phormidium violaceum* CENA82) provavelmente são inéditas, uma vez que não apresentaram identidade significativa com seqüências descritas anteriormente. Todas essas seqüências serão depositadas em bancos de dados públicos, contribuindo para aumentar as informações sobre cianobactérias brasileiras e também para a elucidação das relações evolutivas desse grupo de organismo. Na análise filogenética algumas cianobactérias da ordem Chroococcales formaram um agrupamento monofilético com algumas da ordem Oscillatoriales, confirmando estudos anteriores que evidenciaram a dificuldade de elucidar o seu processo de evolução.

A utilização do crescimento de células viáveis em meios de cultura específicos (NMP) como um método indireto de avaliar a quantidade de cianobactérias nos locais estudados, o qual tem sido utilizado com certa freqüência em ambientes marinhos, mostrou ser aplicável para ambientes de água doce. O número de cianobactérias encontrado foi o esperado e não foi muito diferente dos números relatados na literatura, obtidos usando outras técnicas (contagem de células, colônias formadoras de unidades). Esse método, embora seja considerado semi-quantitativo, evita a necessidade de especialistas em taxonomia de

cianobactérias para realizar a identificação e então a contagem de células desse grupo de organismo em amostras ambientais.

Neste estudo, constatou-se que a linhagem *Aphanothece* CENA75, selecionada para os ensaios de bioissorção, não produz a hepatotoxina microcistina, o que era desejável para sua utilização. Entretanto, foram identificados três isolados de cianobactérias (*Pseudanabaena galeata* CENA 84, *Pseudanabaena* CENA81 e *Leptolyngbya* cf. *tenerrima* CENA76) capazes de sintetizar a hepatotoxina microcistina. Esses dados são também inéditos, pois não há relatos na literatura desses gêneros como produtores de microcistinas. Esses resultados fornecem a base para várias novas investigações, tais como a identificação das isoformas de microcistinas produzidas e os genes envolvidos na sua biossíntese.

Os ensaios de bioissorção de ^{226}Ra por biomassa seca de *Aphanothece* CENA75 mostraram que esse bioissorvente comporta-se como uma resina fracamente ácida e a adsorção foi dependente do pH. Sua atuação no ambiente pode ser relacionada à contribuição na precipitação do ^{226}Ra nos efluentes de maior pH nas bacias de decantação do Sistema de Tratamento da Usina de Processamento de Urânio. Sabe-se que as cianobactérias possuem habilidade de adsorver diferentes metais e por isso novas abordagens podem ser empregadas para a investigação usando biomassas das cianobactérias isoladas deste ambiente peculiar.

A UTM-INB está em fase de descomissionamento, o encerramento de empreendimentos de extração de minério são caros para a região onde estão inseridos, tanto em relação à economia, por causa dos empregos diretos e associados, quanto pelas consequências ambientais, sejam elas paisagísticas ou até de segurança de águas de abastecimento. A caracterização e o entendimento da dinâmica dos efluentes dessa unidade auxiliam nas tomadas de decisão quanto à segurança ambiental da área. Neste sentido conhecer a microbiota atuante nos efluentes da unidade contribui para o aprimoramento desse entendimento. O presente estudo caracteriza-se como uma primeira referência de

cianobactérias para a região de Poços de Caldas-MG e primeiro registro de cianobactérias para águas de área contaminada com radionuclídeos no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, F. Present and future of bioleaching in developing countries. *Electronic Journal of Biotechnology*, Valparaíso, v.15, n.2, p.18-19, 2002.

AHUJA, P.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. *Oscillatoria angustissima*: a promising Cu²⁺ biosorbent. *Current Microbiology*, New York, v.35, p. 151-154, 1997.

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

ALLEN, M.M.; ARNON, D.I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology*, Rockville, v.30, p.366-372, 1955.

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

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, Washington, v.59, n.1, p.149-169, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. Washington, DC: APHA, 1995. 1268p.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes 5 – Stigonematales. *Archiv fur Hydrobiologie*, Stuttgart, v.59, p.1-73, 1990. Supplement, 86.

ASAYAMA, M.; KABASAWA, M.; TAKAHASHI, I.; AIDA, T.; SHIRAI, M. Highly repetitive sequences and characteristics of genomic DNA in unicellular cyanobacterial strains. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.137, p.175-181, 1996.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA – ANBio. Disponível em: <http://www.anbio.org.br> (Acesso em: set. 2006).

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 4., 1996, Recife. Resumos... Recife: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 1996. p.83.

BARKER, G.L.A.; HAYES, P.K.; O'MAHONY, S.L.; VACHARAPIYASOPHON, P.; WALSBY, A.E. A molecular and phenotypic analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) from the Baltic Sea. *Journal of Phycology*, Baltimore, v.35, p.931-937, 1999.

BENDER, J.; DUFF, M.C.; PHILLIPS, P.; HILL, SANDM. Bioremediation and bioreduction of dissolved U(VI) by microbial mat consortium supported on silica gel particles. *Environmental Science and Technology*, Easton, v.34, p.3235-3241, 2000.

BERGMAN, B.; GALLON, J.R.; RAI, A.N.; STAL, L.J. N-fixation by non-heterocystous cianobactéria. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.19, p.139-185, 1997.

BERGSLAND, K.J.; HASELKORN, R. Evolutionary relationship among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.173, p.3446-3455, 1991.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, London, v.7, p.1513-1523, 1979.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. On the Prokaryotic Nature of Red Algal Chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Washington, v.72, p.2310–2314, 1975.

_____. Partial sequences of 16S rRNA and the phylogeny of blue-green algae and chloroplasts. *Nature*, London, v.261, p.669-673, 1976.

_____. Ribosomal RNA homologies and the evolution of the filamentous blue-green bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, New York, v.10, p.283-291, 1978.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W.F.; FOX, G.E. Cyanobacterial evolution: results of 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v.57, p.879-888, 1979.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. (edit.). Bergey's manual of systematic bacteriology: The *Archaea* and deeply branching and phototrophic *Bacteria*: 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, 721p.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-3, p.323-381, 1886a.

_____. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-4, p.343-373, 1886b.

_____. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-5, p.51-129, 1887.

_____. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-7, p.177-262, 1888.

BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce. Initiation a la systematique. III. Les algues bleues et rouges. Paris: N. Bouhée, 1970. 512p.

BRUNS, A.; HOFFERLNER, H.; OVERMANN, J. A novel approach for high throughput cultivation assays and the isolation of planktonic bacteria. FEMS Microbiology Ecology. Amsterdam, 2003, v. 45, p. 161-171.

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

CARR, N.G.; WHITTON, B.A. The biology of blue-green algae. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1973. 676p.

CASTENHOLZ, R.W. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. *Journal of Phycology*, Baltimore, v.12, p.54-68, 1976.

_____. Phylum BX Cyanobacteria. Oxygenic photosynthetic bacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p.473-599.

CECAL, A.; HUMELNICU, D.; POPA, K.; RUDIC, V.; GULEA, A.; PALAMARU, I.; NEMTOI, G. Bioleaching of UO_2^{2+} ions from poor uranium ores by means of cyanobacteria. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v.245, p.427-429, 2000.

CHAY, T.C.; SURIF, S.; HENG, L.Y. A copper toxicity biosensor using immobilized cyanobacteria *Anabaena torulosa*. *Sensor Letters*, Stevenson Ranch, v.3, p.49-54, 2005.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H. Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*, Oxford, v.59, p.75-84, 2005.

CIPRIANI, M. Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de Minas de Urânio. 2002. 363 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

COHEN, Y.; JORGENSEN, B.B.; REVSBECH, N.P.; POPLAWSKI, R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and photosynthesis among cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.51, p.398-407, 1986.

COHN, F. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte mikroskopischer Algen und Pilze. *Nova Acta Academiae Leopoldino-Carolinae*, Halle, v.24, p.103-256, 1853.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 001 de 23 de janeiro de 1986. Disponível em: < <http://www.lei.adv.br/001-86.htm> > Acesso em: set 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em: set 2006.

COPELAND, J.J. Yellowstone thermal Myxophyceae. Annals of the New York Academy of Sciences. New York: New York Academy of Sciences, 1936, v. 36, p 1-232.

COSTA, W.C. Seleção de biomassas para o estudo de bioabsorção dos radionuclídeos ^{226}Ra e ^{137}Cs . 2003. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2003.

DESIKACHARY, T.V. Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research Monographs on Algae, 1959. 686p.

DESIKACHARY, T.V. Status of classical taxonomy. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. The biology of blue-green algae. Oxford: Blackwell, 1973. p.473-486.

DITTRICH, M.; SIBLER, S. Influence of H⁺ and Calcium Ions on Surface Functional Groups of Synechococcus PCC 7942 Cells. Langmuir. Columbus, v.22, p. 5435-5442, 2006.

DOMINGOS, P.; RUBIM, T.K.; MOLICA, R.J.R.; AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W. First report of microcystin production by Picoplanktonic Cyanobacteria isolated from a northeast brazilian drinking water supply. Environmental Toxicology, New York, v.14, n.1, p.31-35, 1999.

DOR, I.; DAMIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. Archiv fur Hydrobiologie, Stuttgart, v.83, p.197-206, 1996. Supplement 117.

DROUET, F. Revision of the classification of the Oscillatoriaceae. Philadelphia: Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1968. 370p. (Monograph, 15).

_____. Revision of the *Nostocaceae* with cylindrical trichomes. New York: Hafner Press, 1973. 292p.

_____. Revision of the *Nostocaceae* with constricted trichomes. Beihefte zur Nova Hedwigia, Weinheim v.57, p.1-258, 1978.

_____. Revision of the *Stigonemataceae* with a summary of the classification of the blue-green algae. Beihefte zur Nova Hedwigia, Weinheim, v.66, p.1-221, 1981.

DROUET, F.; DAILY, W.A. Revision of the coccoid Myxophyceae. Indianapolis: Department of Botany, Butler University, 1956. 218p. (Botanical Studies, 12).

DUFRESNE, A.; SALANOUBAT, M.; PARTENSKY, F.; ARTIGUENAVE, F.; AXMANN, I.M.; BARBE, V.; DUPRAT, S.; GALPERIN, M.Y.; KOONIN, E.V.; GALL, F.L.; MAKAROVA, K.S.; OSTROWSKI, M.; OZTAS, S.; ROBERT, C.; ROGOZIN, I.B.; SCANLAN, D.J.; MARSAC, N.T.; WEISSENBAACH, J.; WINCKER, P.; WOLF, Y.I.; HESS, W.R. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.100, n.17, p. 10020–10025, 2003.

EGUCHI, M.; OKETAU, T. MIYAMOTO, N.; HIROTO, M.; KAWAI, A. Occurrence of viable photoautotrophic picoplankton in the aphotic zone of Lake Biwa, Japan. *Journal of Plankton Research*, Oxford, v.18, n.4, p.539-550, 1996.

EHRENBERG, C.G. (Ed.). Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. v.2. Leipzig: Engelmann, 1838.

ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D.H.; FIORE, M.F.; VON DÖHREN, H.; TSAI, S.M.; NEILAN, B.A. Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. *Journal of Applied Phycology*, Dordrecht, v.16, p.237-243, 2004.

EWING, B; GREEN, P. Base- calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. *Genome Research*, Woodbury, v.8, p.186-194, 1998.

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

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, Lancaster, v.39, p.783–791, 1985.

FERRIS, M.J.; RUFF-ROBERTS, A. L.; KOPCZYNSKI, E. D.; BATESON, M.M.; WARD, D.M. Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.62 (3), p. 1045–1050, 1996.

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

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

FIORE, M.F.; TREVORS, J.T. Cell composition and metal tolerance in cyanobacteria. *BioMetals*, Netherlands, v.7, p. 83-103, 1994.

FOGG, G.E.; STEWART, W.D.P.; FAY, P.; WALSBY, A.E. The blue-green algae. London: Academic Press, 1973. 459p.

FRITSCH, F.E. The structure and reproduction of algae. Cambridge: Cambridge University Press, 1945. v.2, 939p.

GARDEA-TORRESDEY, J.L.; ARENASB, J.L.; FRANCISCOB, N.M.C.; TIEMANNA, K.J.; WEBBER, R. Ability of immobilized cyanobacteria to remove metal ions from solution and demonstration of the presence of metallothionein genes in various strains. *Journal of Hazardous Substance Research*, Kansas, v.1, p.1-18, 1998.

GAYLARDE, C.; GAYLARDE, P.; COPP, J.; NEILAN B. Polyphasic detection of cyanobacteria in terrestrial biofilms. *Biofouling*, Chur, v.20, p.71-79, 2004.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: KOLWITZ, R. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora: Dien Algae. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1932. v.14, 1196p.

GIOVANNONI, S.J.; TURNER, S.; OLSEN, G.J.; BARNS, S.; LANE, D.J.; PACE, N.R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.170, p.3584-3592, 1988.

GODDOY, J.M. Entwicklung einer Analysenmethode für die Bestimmung von U-238, U234, Th-232, Th- 230, Th-228, Ra-228, Ra-226, Pb-210 und Po-210 und ihre Anwendung auf Umweltproben. 1983. Tese (Doutorado) – Universidade de Munique, 1983.

GOMES, H.A.; GARCIA JUNIOR, O. Flutuações nas populações de Thiobacillus ferrooxidans e de Thiobacillus thiooxidans em corpos de água sob influência de mina de extração de urânio - Complexo Mineral Industrial de Poços de Caldas - M.G. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 8., 2001, João Pessoa. Livro de resumos. João Pessoa: SBL, 2001.

GOMONT, M. Monographie des oscillariées. *Annales des Sciences Naturelles - Botanique*, Paris, v.9, p.49-53, 1892.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, Woodbury, v.8, p.195-202, 1998.

GUGGER, M.; LYRA, C.; HENRIKSEN, P.; COUTE, A.; HUMBERT, J.F.; SIVONEN, K. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.52, p.1867-1880, 2002.

GUIA 4 RODAS. Estradas: O mapa do Brasil em formato prático. São Paulo: Editora Abril, 2006. 1 Mapa, colorido. Escala 1:1.200.000. p.12.

HAAS, J.R.; BAILEY, E.H.; WILLIAM PURVIS, O. Bioaccumulation of metals by lichens: uptake of aqueous uranium by *Peltigera membranacea* as a function of time and pH. *American Mineralogist*, v.83, p.1494-1502, 1998.

HARRIS, A.S.D.; JONES, K.J.; LEWIS, J. An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Amsterdam, 1998, v.231, p. 21-30.

HERDMAN, M.; JANVIER, M.; WATERBURY, J.B.; RIPPKA, R.; STANIER R.Y.; MANDEL, M. Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, Reading, v.111, p.63-71, 1979.

HERDMAN, M.; RIPPKA, R.; STANIER, R.Y. Genome size of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, Reading, v.111, p.73-85, 1979.

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

HOICZYK, E.; BAUMEISTER, W. Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.177, p.2387-2395, 1995.

HOLLERBACH, M.M.; KOSINSKAJA, E.K.; POLJANSKIJ, V.I. Sinezelenye vodorosli. [Blue-green algae]. Izd. "Sovetskaja nauka". *Opredelitel' presnovodnykh vodoroslej SSSR*, Moskva, v.2, p.1-652, 1953.

HONDA, R.Y.; AZEVEDO, M.T.P. Estudos taxonômicos em culturas de Cyanobacteria provenientes de um reservatório oligotrófico no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo, SP, Brasil. *HOEHNEA*. São Paulo, v. 31(2), 2004.

HONDA, D.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *Journal of Molecular Evolution*, New York, v.48, p.723-739, 1999.

HORIKOSHI, T.; NAKAJIMA, A.; SAKAGUSHI, T. Uptake of uranium from sea water by *Synechococcus elongatus*. Journal of Fermentation Technology, Osaka, v.57, n.3, p.191-194, 1979.

HUTCHINS, S.R.; DAVIDSON, M.S.; BRIERLEY, J.A.; BRIELERY, C.L. Microorganism in reclamation of metals. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.40, p.311-336, 1986.

ISHIDA, T.; WATANABE, M.M.; SUGIYAMA, J.; YOKOTA, A. Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v.201, p.79-82, 2001.

ISHIDA, T.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo, v.43, p.237-241, 1997.

JOHNSON, S.; BUDINOFF, C.R.; BELNAP, J.; GARCIA-PICHEL, F. Relevance of ammonium oxidation within biological soil crust communities. Environmental Microbiology. Oxford, 2005, v. 7(1), p. 1-12.

JUNGBLUT, A.-D.; NEILAN, B.A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. Archives of Microbiology, Heidelberg, v.185, p.107-114, 2006.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. DNA Research, Tokyo, v.8, p.205-213, 2001.

KANKAANPÄÄ, H.T.; HOLLIDAY, J.; SCHRÖDER, H.; GODDARD, T. J.; VON FISTER, R.; CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria and prawn farming in northern New South Wales, Australia – a case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. Toxicology and Applied Pharmacology, Raleigh, v.203, n.3, p.243-256, 2005.

KAPLAN, I. Física nuclear. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. 633 p.

KLIMMEK, S; STAN, H.J. Comparative Analysis of the Biosorption of Cadmium, Lead, Nickel, and Zinc by Algae. Environmental Science and Technology, Easton, v.35, n.21, p.4283 -4288, 2001.

KOMÁREK, J.; Coccoid and colonial cyanobacteria. In: WEHR, J.D. e SHEATH, R.G. (Eds) Freshwater algae of North America. California: Academic Press, 2003, v. 1. p. 59-116.

KOMÁREK, J.; KLING, H.; KOMÁRKOVÁ, J. Filamentous cyanobacteria. In: WEHR, J.D. e SHEATH, R.G. Freshwater algae of North America. California: Academic Press, 2003, v.1. p. 117-196.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 2- Chroococcales. Analogical Studies, Stuttgart, v.43, p.157-226, 1986.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4- Noctocales. Archiv fur Hydrobiologie, Stuttgart, v.56, p.247-345, 1989. Supplement, 823.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota I. Teil: Chroococcales. Stuttgart: Gustav Fischer, 1999. 545p. (Susswasserflora von Mitteleuropa, 19/1).

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota II. Teil: Oscillatoriales. Munich: Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759p. (Susswasserflora von Mitteleuropa, 19/2).

KONDO, R.; YOSHIDA, T.; YUKI, Y.; HIROISHI, S. DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 50, p.767-770, 2000.

KONDRATEVA, N.V. Cyanophyta. Vid. "Naukova dumka". Vyznacnik Prsnovodnich Vodorostej Ukrajinskov RSR, Kiev, v.1, p.1-524, 1968.

KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology*, Amsterdam, v.187, n.18, p.6258-6264, 2005.

KREITLOW, S.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. Cyanobacteria – a potential source of new biologically active substances. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.70, p.61-63, 1999.

KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J. Human health aspects. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1. ed. London: E&FN Spon, 1999. p.113-153.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, Oxford, v.5, p.150-163, 2004.

LAAMANEN, M.J.; GUGGER, M.F.; LEHTIMÄKI, J.M.; HAUKKA, K.; SIVONEN, K. Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (Cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.67, p.4638-4647, 2001.

LACHANCE, M.A. Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid reassociation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.31, p.139-147, 1981.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: Wiley, 1991. p.115–175.

LANE, D.J.; STAHL, D.A.; OLSEN, T.G.J.; HELLER, D.J.; PACE, N.R. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.163, n.1, p.75-81, 1985.

LEHTIMÄKI, J.; LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; SUNDMAN, P.; ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SALKINOJA-SALONEN, M.; SIVONEN, K. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.50, p.1043-1053, 2000.

LENGKE, M.F.; FLEET, M.; SOUTHAM, G. Morphology of Gold Nanoparticles Synthesized by Filamentous Cyanobacteria from Gold(I)-Thiosulfate and Gold(III)-Chloride Complexes. *Langmuir*, Washington, v.22, p.2780-2787, 2006a.

_____. Synthesis of platinum nanoparticles by reaction of filamentous cyanobacteria with platinum(IV)-chloride complex. *Langmuir*, Washington, v.22, p.7318-7323, 2006b.

LI, P.-F.; MAO, Z.-Y.; RAO, X.-J.; WANG, X.-M.; MIN, M.-Z.; QIU, L.-W.; LIU, Z.-L. Biosorption of uranium by lake-harvested biomass from a cyanobacterium bloom. *Bioresource Technology*, Essex, v.94, n.2, p.193-195, 2004.

LIU, H.H.; WU, J.T. Uptake and recovery of americium and uranium by *Anacystis* biomass. *Journal of Environmental Science and Health*, New York, v.28A, n.2, p.491-504, 1993.

LORENZ, M.G.; KRUMBEIN, W.E. Uranium mobilization from low-grade ore by cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.21, p.374-377, 1985.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, N.; WEZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, v.19, p.554-568, 1998.

LUNDGREN, P.; SODEREBACK, E.; SINGER, A.; CARPENTER, E.J.; BERGAMNN, B. *Katagnymene*: characterization of a novel marine diazotroph. *Journal of Phycology*, Baltimore, v.37, p.1052-1062, 2001.

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

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; PARKER JUNIOR, C.T.; GARRITY, G.M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T.G.; MCCAUGHEY, M.J.; OLSEN, G.J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M.; WOESE, C.R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, London, v.27, n.1, p.171-173, 1999.

MAZEL, D.; HOUMARD, J.; CASTETS, A.M.; TANDEAU DE MARSAC, N. Highly repetitive DNA-sequences in cyanobacterial genomes. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.172, p.2755-2761, 1990.

MOORE, R.E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.16, p.134-143, 1996.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v.17, p.373-384, 1996.

NEILAN, B.A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.61, p.2286-2291, 1995.

NEILAN, B.A.; COX, P.T.; HAWKINS, P.R.; GOODMAN, A.E. 16S Ribosomal RNA sequence and phylogeny of toxic *Microcystis* sp. (cyanobacteria). *DNA Sequence*, London, v.4, p.333-337, 1994.

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

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

NELISSEN, B.; DE BAERE, R.; WILMOTTE, A.; DE WACHTER, R. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. *Journal of Molecular Evolution*, New York, v.42, p.194-200, 1996.

NELISSEN, B.; MORDANT, P.; JONNIAUX, J.L.; DE WACHTER, R.; GOFFEAU, A. Phylogenetic classification of the major super family of membrane transport facilitators, as

deduced from yeast genome sequencing. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.377, p.232-236, 1995a.

NELISSEN, B.; VAN DE PEER, Y.; WILMOTTE, A.; DE WACHTER, R. An early origin of plastids within the cyanobacterial divergence is suggested by evolutionary trees based on complete 16S rRNA sequences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.12, p.1166-1173, 1995b.

NELISSEN, B.; WILMOTTE, A.; DE BAERE, R.; VAN DE PEER, Y. ; HAES, F.; NEEFS, J. M.; DE WACHTER, R. Phylogenetic study of cyanobacteria on the basis of 16S ribosomal RNA sequences. **Belgian Journal of Botany**, Brussels, v.125, p. 210-213, 1992.

NELISSEN, B.; WILMOTTE, A.; NEEFS, J.M.; WACHTER, R. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v.17, p.206-210, 1994.

OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.149–194.

ORCUTT, K.M.; RASMUSSEN, U.; WEBB, E.A.; WATERBURY, J.B.; GUNDERSEN, K.; BERGMAN, B. Characterization of *Trichodesmium* spp. by genetic techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.68, p.2236-2245, 2002.

OREN, A. Salts and brines. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Eds.). *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 281-306.

PALENIK, B. Cyanobacterial community structure as seen from RNA polymerase gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.60, p.3212-3219, 1994.

PALINSKA, K.A.; LIESACK, W.; RHIEL, E.; KRUMBEIN, W.E. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia* like isolates. Archives of Microbiology, Heidelberg, v.166, p.224-233, 1996.

PARK, D.; YUN, Y.-S.; PARK, J.N. Reduction of hexavalent chromium with the brown seaweed *Ecklonia* biomass. Environmental Science and Technology, Easton, v.38, p.4860-4864, 2004.

POTTS, M. *Nostoc*. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. The Ecology of Cyanobacteria. Their diversity in Time and Space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 465-504.

RAJANIEMI, P.; HROUZEK, P.; KASTOVSKA, K.; WILLAME, R.; RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMAREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation of genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, Reading, v.55, p.11-26, 2005.

RAJANIEMI-WACKLIN, P.; RANTALA, A.; MUGNAI, M.A.; TURICCHIA, S.; VENTURA, S.; KOMÁRKOVÁ, J.; LEPISTÖ, L.; SIVONEN, K. Correspondence between phylogeny and morphology of *Snowella* spp. and *Woronichinia naegeliana*, cyanobacteria commonly occurring in lakes. Journal of Phycology, Baltimore, v.42, p.226–232, 2005.

RANGSAYATORN, N.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; LANZA, G.R. Phytoremediation potential of *Spirulina* (*Arthrospira*) platensis: biosorption and toxicity studies of cadmium. Environmental Pollution, London, v.119, p.45-53, 2002.

RAVEN, J.A.; ALLEN, J.F. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? Genome Biology, Dundee, v.4, n.3 (article 209), 2003.

REGEL, R.H.; FERRIS, J.M.; GANF, G.G.; BROOKES, J.D. Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. Aquatic Toxicology, Amsterdam, v.59, p.209-223, 2002.

RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. Methods in Enzymology, New York, v.167, p.28-76, 1988.

RIPPKA, R.; COHEN-BAZIRE, G. The Cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? Annales de Microbiologie, Paris, v.134B, p.21-36, 1983.

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

RIPPKA, R.; HERDMAN, H. Pasteur culture collection of cyanobacteria catalogue and taxonomic handbook. Catalogue of strains. Paris: Institute Pasteur, 1992. v.1, 103p.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.B.; STANIER R.Y. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Eds) The prokaryotes. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p.212-220.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K.S. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7 and V8. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, v.63, p. 2593-2599, 1997.

SAKAGUSHI, T; HORIKOSHI, T.; NAKAJIMA, A. Uptake of uranium from sea water by microalgae. Journal of Fermentation Technology, Osaka, v.56, p.561-565, 1978.

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

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

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SENNA, P.A.C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.27, n.2, p.213-227, 2004.

SATISH, N.; KRUGMAN, T.; VINOGRADOVA, O.N.; NEVO, E.; KASHI, Y. Genome evolution of the cyanobacterium *Nostoc linckia* under sharp microclimatic divergence at "Evolution Canyon", Israel. *Microbial Ecology*, New York, v.42, p.306-316, 2001.

SCHOPF, J.W. Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.91, p.6735-6742, 1994.

SHASHIREKHA, V.; PANDI, M.; SWAMY, M. Bioremediation of tannery effluents and chromium containing wastes using cyanobacterial species. *Journal of the American Leather Chemists Association*, Cincinnati, v.100, n.11, p.419-426, 2005.

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

SILVA, C.S.P. Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SINGH, J.S.; KASHYAP, A.K. Dynamics of viable nitrifier community, N-mineralization and nitrification in seasonally dry tropical forests and savanna. *Microbiological Research*. Amsterdam, 2006, v. 161, p 169-179.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, 1999. chap.3, p.41-111.

SKULBERG, A.M. 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, 1995. p.95-110. (NATO ASI Series E - Applied Sciences, 295).

SMITH, A.J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Annales de Microbiologie*, Paris, v.134, p.93-113, 1983.

SOUZA, V.P. Drenagens ácidas do estéril piritoso da mina de urânio de Poços de Caldas: Interpretação e implicações ambientais. 1995. 143f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

STACKEBRANDT, P.H.A.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.44, p.846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.D.; KÄMPFER, P.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRÜPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C.; WHITMAN, W.B. Report of the Ad Hoc Committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.52, p.1043-1047, 2002.

STAL, L.J. Physiological ecology of Cyanobacteria in microbial mats and other communities. *Tansley Review* Nº. 84. *New Phytologist*, London, v.131, n.1, p.1-32, 1995.

STAL, L.J.; MOEZELAR, R. Fermentation in Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.21, p.179-211, 1997.

STALEY, J.L.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.3.

STAM, W.T.; HOLLEMAN, H.C. Cultures of *Phormidium*, *Plectonema*, *Lyngbya* and *Synechococcus* (Cyanophyceae) under different conditions: Their growth and morphological variability. *Acta Botanica Neerlandica*, Oxford, v.26, p.327-342, 1979.

STAM, W.T.; STULP, B.K. New taxonomic methods: DNA-DNA hybridization. *Methods in Enzymology*, New York, v.167, p.125-132, 1988.

STANIER, R.Y. The position of cyanobacterial in the world of phototrophs. *Carlsberg Research Communication*, Carlsberg, v.42, p.77-98, 1977.

STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, Baltimore, v.35, p.171-205, 1971.

STARMACH, K. Cyanophyta-sinice, Glaucophyta-glaukofity. *Flora Slodkowodna Polski*, Warszawa, v.2, p.1-807, 1966.

STENROOS, S; HÖNABBA, F.; MYLLYS, L.; HYVÖNEN, J.;THELL, A. High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. *Cladistics*, Oxford, v.22, p 230–238, 2006.

SUDA, S.; WATANABE, M.M.; OTSUKA, S.; MAHAKAHANT, A.; YONGMANITCHAI, W.; NOPARTNARAPORN, N.; LIU, Y.; DAY, J.G. Taxonomic revision of water bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.52, p.1577-1595, 2002.

THURET, G. Essai de classification des Nostochiness. *Annales des Sciences Naturelles – Botanique*, Paris, v.6, p.372-382, 1875.

TILLETT, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated pepetide-polyketide synthetase system. *Chemistry and Biology*, Tokyo, v.7, n.10, p.753-764, 2000.

TILLETT, D.; PARKER, D.L.; NEILAN, B.A. 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*, Baltimore, v.67, p.2810-2818, 2001.

TOLEDO, G.; PALENIK, B. *Synechococcus* diversity on the California Current as seen by RNA polymerase (*rpoC1*) gene sequences of isolated strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.63, p.4298-4303, 1997.

TOLEDO Jr., A.P.; TALARICO, N.; CHINEZ, S.J.; Agudo, E.G. Aplicação de modelos simplificados para a avaliação de processo de eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. *Anais 120 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. CETESB, p. 1-34, 1983.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. Oxford, v.5(3), p. 240-245, 2002.

TURNER, S. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. *Plant Systematic and Evolution*, Vienna, v.11, p.13-52, 1997.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.M.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationship among cyanobacteria and plastids by small subunits rRNA sequence analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, Oxford, v.46, p.327-338, 1999.

URBACH, E.; ROBERTSON, D.; CHISHOLM, S.W. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature*, London, v.355, p.267-270, 1992.

URBACH, E.; SCANLAN, D.J.; DISTEL, D.L.; WATERBURY, J.B.; CHISHOLM, S.W. Rapid Diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution*. New York, v. 46, p. 188-201, 1998.

VANNELA, R.; VERMA, S.K. Cu²⁺ Removal and recovery by *Spi* SORB: batch stirred and up-flow packed bed columnar reactor systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Heidelberg, v.29, p.7-17, 2006.

VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Research*, Great Britain, v.35, n.5, p.1354-1357, 2001.

VESTER, F.; INGVORSEN, K. Improved Most-Probable-Number Method To Detect Sulfate-Reducing Bacteria with Natural Media and a Radiotracer. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 1998, v. 64(5), p. 1700-1707.

VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. In: VOLESKY, B. (Ed.). *Biosorption of heavy metals*. Palo Alto: Boca Raton CRC Press. 1990. cap.1, p.15-39.

_____. Advances in biosorption of metals: Selection of biomass types. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v.14, p.291-302, 1994.

_____. Equilibrium biosorption performance. In: VOLESKY, B. (Ed.). *Sorption and biosorption*. Quebec: BV-Sorbex Inc. Press, 2004. chap.6, p.103-116. Disponível em [http://www.biosorption.mcgill.ca/publication/book/6.1-4w\(103-16\).pdf](http://www.biosorption.mcgill.ca/publication/book/6.1-4w(103-16).pdf) (Acesso em: set. 2006).

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRUPER, H.G. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.37, p.463-464, 1987.

WELLER, R.; WELLER, J.W.; WARD, D.M. 16S rRNA Sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v.57, p.1146-1151, 1991.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: _____ *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.1-11.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. *The molecular biology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer, 1994. p.1-25.

WILMOTTE, A.; AUWERA, D.G.V.; WACHTER, D.R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis HTF* ('*Mastigocladus laminosus* HTF')

strain PCC7518, and phylogenetic analysis. FEBS Letters, Amsterdam, v.317, n.1-2, p.96-100, 1993.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. (Eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology: The *Archaea* and deeply branching and phototrophic *Bacteria*: 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, p.487-493.

WILMOTTE, A.; NEEFS, J.M.; WACHTER, R.D. Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain NIBB1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. Microbiology, Reading, v.140, p.2159-2164, 1994.

WILMOTTE, A.; TURNER, S.; PEER, Y.V.D.; PACE, N.R. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (cyanobacteria) with narrow trichomes. Journal of Phycology, Baltimore, v.28, p.828-838, 1992.

WILMOTTE, A.M.R.; STAM, W.T. Genetic-relationships among cyanobacterial strains originally designated as *Anacystis nidulans* and some other *Synechococcus* strains. Journal of General Microbiology, Reading, v.130, p.2737-2740, 1984.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, Washington, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., Washington, v.87, n.12, p.4576-4579, 1990.

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

WOLK, C.P.; ERNST, A.; ELHAI, J. Heterocyst metabolism and development. In: BRYANT, D.A. (Ed.). The molecular biology of cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.769- 823.

YUNES, J.; MATTHIENSEN, A.; CARNEIRO, C.; OROSKI, F.; BECKER, V.; CARVALHO, M.C. Florações de cianobactérias tóxicas: mãos à obra ao problema. In. ROLAND, F.; CESAR, D; MARINHO, M. Lições de Limnologia. São Carlos: RIMA, 2005, p.532.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; HIORNS, W.D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. Microbiology, Reading, v.143, p.1443-1450, 1997.

ANEXOS

ANEXO A – Sequências de RNAr 16S de cianobactérias isoladas de efluentes da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil S/A, Caldas/MG

>*Aphanothece* sp. CENA75 (1483 pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA
CACATGTAAGTCGAACGAGCCTTCGGGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCT
GCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCCGGAACAGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAA
ATGAATTTGCGCTGAGGATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACC
AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCA
ACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGACATG
ACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCGGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTAAGTCTGTCGT
TAAAGCGTGGAGCTTAACCTCATTTCAGCGATGAAACTACAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGG
CAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAA
GGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAG
ATACCCCTGTAGTCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGACCCCCTCG
GTGTCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGAAACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCG
CAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCG
GTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTGGGCTA
CACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGTTGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCTAATCCCATA
AACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTA
ATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACAC
CATGGAAGTTGGCCATGCCCAGAGTCGTTACTCCAACCCTTGTTGGAGGAGGACGCCGAAGGT
GGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATTC

>*Rhabdoderma* sp. CENA114 (1491pb)

GAATTCAGTAGTGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAAT
CTACCTTTAGGACGGGGACAACAATTGGAAACGATTGCTAATACCCGATATGCCCTTCGGGG
TGAAATGTTTTTTTCGCCTAAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTAGGTAGTGTAATGGA
CTACCTAGGCGATGATCGGTAGCTGGTTTGAGAGGACAATCAGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACG
GAGCAATACCGCGTGGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCCCTTTTCTCAGGGAAGAAG
CTCTGACGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTAGATAAGTCT
GCTTTCAAAGAGTGGGGCTCAACCCCATAAAGGGAGTGGAACCTGTTTAGCTAGAGTATGGT
AGGGGCAGAGGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGTG
GCGAAGGCGCTCTGCTGGACCGAGACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGG
ATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCC
GTGCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCGCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCCTCGAATCTCTGTGAAAGCGGAGAGTGCCTTCGG
GAGCGAGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTGGAGAGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACATCCTG
GGCTACACACGTACTACAATGGTTAGGACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCAAAAC
TCATAAACCTAGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACCCTAACCGTTGCGGGAGGGGGACGCC

GAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCGAATTCGCCG
GCC

>*Aphanocapsa* cf. *holsatica* CENA80 (1487pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGGAGTTCTTCGGAACCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGAGA
ACCTACCTTCAGAATGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCAATGTGCCGAAAGG
TGAAAGATTTATCGTCTGAAGATGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAGAGCC
TACCATGGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGG
AGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTTGATTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAAGT
TCTGACGGTACCTGATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA
GGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTATGCAAGTCTG
CCGTTAAAGAATGGAGCTTAACCTCCATAGGAGCGGTGGAACTGCAAGACTAGAGTACAGTA
GGGGTAGCAGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACATCGGTGG
CGAAAGCGTGCTACTGGGCTGAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGA
TTAGATACCCCTGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCG
AGCCGTGCCGAAGCTAACCGCTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGC
GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCCTGGAATCCTGCGGAAACGTGGGAGTGCCTTAGGG
AGCCAGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTTTTGTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGCCTTGG
GCTACACACGTACTACAATGGTTCGGGACAACGGGACGAGCTCGCGAGAGTAAGCGAATCC
CATCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGC
TAGTAATCGCAGGTGAGAATACTGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGCTGGTCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCTTAGGGAGGAGGGCGCCGA
AGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATTC

>*Peudanabaena galeata* CENA84 (1484pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGAAGTCTTCGGAACCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAAT
CTACCTATAGGTTTCGGGACAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGGATATGCCTTCGGGTG
AAAGTTTTAATGCCTGTAGATGAGCTTTCGTTTCGATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCCTA
CCATGGCGACGATCGATAACTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCCTGTGGGTTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAAGATAATG
ACGGTACCTAACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAT
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCTGTTTTATAAGTCTGTTGT
CAAAGCCCCGAGGCTCAACCTTGGATCGGCAATGGAACTGTGAGACTAGAGAGAGATAGGGG
CAGGAGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAAGAACACCAGTGGCGAA
AGCGTCCTGCTGGATCTCAACTGACGCTGAAGTACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAG
ATACCCCAGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGGTCA
GTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCAAGGCTTGACATGTCCAGAATTCTCTTGAAAGGGAGAAGTGCCTTCGGGAGCT
GGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGTTTTTGTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGCCTTGGGCTA
CACACGTACTACAATGGCCGGGACAAGAGTCGCAAGCATGCGAATGCAAGCTAATCTCATA
AACCCGGTCTTAGTTTCAAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTA
ATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
CATGGAAGCTGGTCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCCGCAAGGGAGGGAGGGCGCCTAAGG
CAGGGCTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATTC

>*Pseudanabaena* sp. CENA81 (1460pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGGAGTAGCAATACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAAT
CTGCCTACAGGATGGGGACAACGGTTGGAAACGACCGCTAAAACCCAATGTGCCGAAAGGTG
AAATATTTATAGCCTGTAGATGAGCTTGCCTGCTGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACA
CCAAGGCGACAATCAGTAACCTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAGTTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAATACCGCGTGAGGGACGAAGGTCTGTGGATTGTAAACCTCTTTTGACAGGGACGATAATG
ACGGTACCTGTCTGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAT
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGTGGCTTATCAAGTCTTTTGT
CAAAGACTGGGGCTTAACCTGGGAAGGCAGAGGAACTGATAGGCTAGAGTGTGGTAGGGG
CAGGAGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGCGCGCAA
AGCGTTCTGCTGGACCACAACCTGACACTGAGGTACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAG
ATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGCTTGTATCGACCCAAGCA
GTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTGAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCAGGGCTTGACATCCTGCGAATCCTGCCGAAAGGTGGGAGTGCCTTCGGGAGCG
CAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCACGTTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAAAGACCGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGCCCTGGGCTA
CACACGTACTACAATGGTTGGAACAGAGAGACAATCTCAAATCCAGCCTCAGTTCAGATTG
CAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCCGA
AGTCGTTATCCTAACCGAAAGGAGGGAGACGCTAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAAGT
CGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATTC

>*Leptolyngbya* cf. *tenerima* CENA76 (1486pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAAC
ATGCCTTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTAGGGTG
AAAGATTTATTGTCTAGAGATTGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACA
CCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGATGACCAGGCACACTGGAAGTGAAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGA
TGACGGTACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
ATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCT
GTCAAAGCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAGTGGAACTGATGAACTAGAGTGCGATAGG
GGTAACAGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGGCG
AAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATT
AGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACCTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAG
CCGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTTGTCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGCGTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTCGGAACCCTGATGAAAGTTAGGGGTGCCTTCGGGAG
CCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCACGTTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCTTGGGC
TACACACGTACTACAATGCGTCGGACAAAGAGCAGCCAGCCAGCGATGGTGAGCCAATCTCA
TAAACCGACGCTCAGTTCAGATTGCAAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAG
TAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGACAGAGGAGGACGCCGAA
GGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATTC

>*Leptolyngya* sp. CENA83 (1485pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAAC
ATGCCCTTAGATTGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGCCTTAGGGTG
AAAGATTTATTGTCTAGAGATTGGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGAGTGGTAACGGCACA
CCAAGGCGACGATCTGTACTTGGTCTGAGAGGATGACCAGGCACACTGGAAGTGAAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAATACCGCGTGAGGGAGGACGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTATCAGGGAAGAATCGA
TGACGGTACCTGATGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
ATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTATCAAGTCTGCT
GTCAAAGCGTGCGGCTTAACCGCATAAGGGCAGTGGAACTGATGAACTAGAGTGCATAGG
GGTAACAGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCAGCGGCG
AAAGCGTGTTACTGGGTCTGCACTGACACCGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATT
AGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGACAACTAGGCGTGGTTCGTATCGACCCGAG
CCGTGCCGTAGCCAACGCGTTAAGTTGTCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGA
AGAACCTTACCAAGGCTTGACATCCTCGGAACCTGATGAAAGTTAGGGGTGCCTTCGGGAG
CCGAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCACGTTTTTGTGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGC
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCATACGCTTGGGC
TACACACGTACTACAATGCGTCGGACAAAGAGCAGCCAGCCAGCGATGGTGAGCCAATCTCA
TAAACCGACGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAG
TAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACTGCTTGCAGAGGAGGACGCCGAA
GGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATT

>*Phormidium formosum* CENA86 (1489pb)

GGCCGCGGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTCTGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGGAGTAGCAATACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAA
CTGCCTTCAGGACGGAGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAACCCCCGATGTACCGAGAGGGA
AAATATTTATAGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAAGAGCCCA
CCAAGGCGACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAG
CAAGACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAACGCA
ATGACGGTACCAGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG
GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGTGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTTCAAGTCTGC
TGTCAAAGACCGAGGCTTAACCTTCGGAGAGGCAGTGGAACTGAACAGCTAGAGTATGGTAG
GGGCAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAAGAACATCGGTGGC
GAAAGCGCTCTGCTGGACCAAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGAT
TAGATACCCCACTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGTCTGTATCGACCCGG
ACAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTCCGGAATCCCGGTGAAAGCTGGGAGTGCCTTCGGGA
GCCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTCGTGTTTGTAGTTGCCATCAGGTAAAGCTGGGCACTCTAAAGAGAC
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCCTG
GGCGACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCAGCCAACTCGCGAGAGCGCGCTAATC
CCGCAAAACCTGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGC
TAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCATTACTCTAACCGTTTCGCGGAGGAGGATGCC
GAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAAATCACTAGTGAATT
C

>*Phormidium violaceum* CENA82 (1512)

GAATTCAC TAGTGATTAGAGTTT GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACA
CATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATT CAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACG
TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTC
CGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCCAGACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTCTAGGGTTGTAA
ACCTCTTTTATCAGGGAAGAAGAAAGTGACGGTACCTGAAGAAAAAGCCTCGGCTAACTCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGAG
TCCGTAGGTGGAACCTCAAGTCCATTGTCAAAGAGCAAAGCTTAACCTTTGTAAAGGCAGTGG
AAACTGAAAATCTAGAGAGGGGCGAGGGGCAAAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTTTGCTGGGCCCATTCTGACACTGAGGGA
CGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATA
CTAGGTGTGGCCTGTATCGACCCGGGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCCTGACATGTCCAGAATCCCC
TTGAGAGGGGAGTGCCTACGGGAACTGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTCAGTTGCCATCATT
AGTTGGGAACTCTGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CAGCATGCCCCTTACGTCCTGGGCGACACACGTACTACAATGGTCGGGACAGAGGGTAGCCA
ACGAGCAATCGCGAGCCAATCCCATAAACCCGGCCCCAGTTCAGATCGCTCTCTGCAACTCG
AGAGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGGCGGTGAATCCGTTCCCG
GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCTGGCTACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAA
CCCGCAAGGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGAGCTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
GCCGTAAATCGAATTCCCGCGGCC