

Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

**Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real
(qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos
potencialmente produtores de microcistinas**

Adriana Sturion Lorenzi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências, área de concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente

Piracicaba
2008

Adriana Sturion Lorenzi
Engenheira Agrônoma

**Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real
(qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos
potencialmente produtores de microcistinas**

Orientadora:

Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências, área de concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente

Piracicaba
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
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

Lorenzi, Adriana Sturion

Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real
(qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos
potencialmente produtores de microcistinas /

Adriana Sturion Lorenzi; orientadora Marli de
Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2008.

174 f. : fig.

Tese (Doutorado – 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. Biologia molecular 2. Eutrofização 3. Metabólitos secundários
4. Microbiologia ambiental 5. Monitoramento ambiental 6. PCR
7. Peptídeos cíclicos 8. Saúde pública I. Título

CDU 628:574.64

Aos meus pais, **Laerte e Dorotéa**,

Pelo exemplo de amor, força e moderação em todos os momentos, pelas
oportunidades oferecidas, apoio e carinho que sempre demonstraram
por mim,

DEDICO.

Ao meu irmão **André**,

Pelo companheirismo e amizade,

E ao **Paulo**, meu noivo,

Pelo constante incentivo profissional e por estar ao meu lado,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por mais este sonho realizado;

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação, confiança e compreensão durante os anos de convívio, pela amizade e oportunidade concedida;

Ao CNPq, por ter sido agraciada com a bolsa de estudo como parte do prêmio recebido pelo primeiro lugar conquistado, na categoria Graduados, no XIX Prêmio Jovem Cientista;

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP, pela oportunidade e apoio fornecidos;

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, por todo o suporte fornecido;

Ao Dr. Fernando Dini Andreote e Dra. Jeanne Blanco de Molfetta Machado, pelas sugestões e ensinamentos transmitidos;

À Dra. Livia Fernanda Agujaro, pela amizade, incentivo, suporte nas coletas e colaboração na contagem de cianobactérias pela técnica de Utermöhl;

À Dra. Ana Luiza Fonseca Fortes Furtado, pelo exemplo de superação e valiosa contribuição, especialmente no desenho dos oligonucleotídeos iniciadores;

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira, pela disponibilização de seu laboratório;

À Dra. Maria Estela Stenico, pelo agradável convívio e auxílio nas análises imunológicas;

À Dra. Lilian Maluf de Lima, pela amizade e auxílio prestado nas análises de custos;

Ao professor Dr. Carlos Tadeu Santos Dias, pela atenção recebida e colaboração nas análises estatísticas;

Ao Dr. José Maria dos Santos Vieira, pelo fornecimento das linhagens de cianobactérias da região Amazônica;

Ao Francisco Montrazi, José Elias Gomes, Wagner Piccinini e Fábio Duarte, pelo auxílio prestado no desenvolvimento dos trabalhos;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias: Caroline Dias de Abreu, Caroline Souza Pamplona da Silva, Cristina Martini, Diego Bisson Ferreira, Diego Bonaldo Genuario, Daniele Del Rio, Felipe Dias Pacheco Vieira, Janaina Rigonato, Karla Nishiyama Marques, Ricardo Yukio Honda, Talita Signoreti Graziano, Tânia Keiko Shishido, Victor da Silva Santos e Yasmin Grummt Naddaf, pelas horas de conversa, trabalho e amizade;

À empresa INVITROGEN™, pelo suporte técnico e colaboração neste estudo;

Aos membros do “Barco Escola da Natureza” de Americana, SP, especialmente ao Sr. João, Sr. José e Sra. Aline, pelo apoio e atenção recebidos, além do grande exemplo de trabalho educativo que desenvolvem;

Aos meus tios (as) e primos (as), pela feliz união familiar e pelo crescimento pessoal que sempre me proporcionaram;

À grande família Correia, em especial ao Sr. Benedito e Sra. Maria Aparecida, pelo exemplo de determinação, luz, vida e perseverança;

A todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo,

Muitíssimo obrigada!

***“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.
Mas, se você tiver grandes sonhos ...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.
Por isso, meu ardente desejo é que você
NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS”.***

Augusto Cury

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Ecologia de cianobactérias.....	21
2.2 Sistemática de cianobactérias.....	23
2.2.1 Identificação tradicional e contagem de cianobactérias.....	27
2.3 Sequências gênicas para a detecção molecular de cianobactérias.....	30
2.4 Produção de metabólitos secundários por cianobactérias.....	32
2.4.1 Biossíntese de NRPSs, PKs e sistemas híbridos.....	42
2.4.2 Genes envolvidos na biossíntese de microcistinas.....	48
2.5 Métodos moleculares para detecção de genótipos potencialmente tóxicos.....	52
2.5.1 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	53
2.6 Cianobactérias no reservatório Salto Grande.....	58
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.1 Caracterização molecular da região <i>cpcBA</i> -IGS em linhagens brasileiras de <i>Microcystis</i>	63
3.1.1 Cianobactérias em monocultivo.....	63
3.1.2 Extração de DNA genômico de cianobactérias.....	63
3.1.3 Amplificação por PCR da região <i>cpcBA</i> -IGS.....	65
3.1.4 Clonagem.....	66
3.1.5 Transformação.....	66
3.1.6 PCR usando colônias.....	67
3.1.7 Extração de DNA plasmidial.....	67
3.1.8 Sequenciamento.....	68
3.1.9 Processamento das sequências.....	69
3.2 Caracterização molecular do domínio NMT do gene da sintetase de microcistinas (<i>mcyA</i>) em linhagens brasileiras de <i>Microcystis</i>	69
3.2.1 Cianobactérias em monocultivo e extração do DNA genômico.....	69
3.2.2 Amplificação por PCR do domínio NMT do gene <i>mcyA</i>	69
3.2.3 Sequenciamento e análise das sequências do domínio NMT.....	71
3.3 Análise de microcistinas.....	71
3.4 Desenvolvimento de oligonucleotídeos LUX.....	72
3.4.1 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores.....	73
3.5 Padronização da metodologia.....	73
3.5.1 Culturas de cianobactérias.....	73
3.5.2 Determinação do número de células.....	73
3.5.3 Extração de DNA genômico.....	75
3.5.4 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).....	75
3.5.5 Desenvolvimento da curva de calibração.....	76
3.6 Detecção e quantificação de <i>Microcystis</i> potencialmente tóxicas em amostras da natureza.....	76

3.6.1 Área de estudo e procedimentos de amostragem.....	76
3.6.2 Contagem de células, extração de DNA total e qPCR.....	77
3.6.3 Análise de microcistinas pelo teste ELISA.....	78
3.7 Análise estatística.....	78
3.8 Custos operacionais.....	79
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1 Sequenciamento das regiões <i>cpcBA</i> -IGS e NMT dos isolados brasileiros.....	83
4.2 Desenvolvimento dos oligonucleotídeos LUX.....	89
4.3 Padronização da metodologia.....	91
4.4 Quantificação de genótipos PC em amostras isoladas e ambientais.....	98
4.5 Genótipos <i>mcy</i> em linhagens isoladas e no reservatório Salto Grande.....	106
4.6 Análise de microcistinas.....	112
4.7 Análise estatística.....	115
4.8 Custos operacionais.....	118
4.8.1 Custo operacional usando a técnica de Utermöhl.....	118
4.8.2 Custo operacional usando a técnica de qPCR.....	124
4.8.3 Viabilidade econômica.....	135
5 CONCLUSÕES.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
APÊNDICES.....	165
Apêndice 1 – Sequências de cianobactérias.....	166
Apêndice 2 – Planilhas de custos operacionais	172

RESUMO

LORENZI, A.S. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos potencialmente produtores de microcistinas.** 2008. 174 f. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2008.

Florações de cianobactérias tóxicas em corpos d'água doce usados como fonte para o consumo humano, recreação e irrigação são freqüentes nos dias de hoje devido à eutrofização destes ambientes. O monitoramento de linhagens tóxicas é importante para a prevenção dos efeitos adversos causados por suas toxinas na saúde de humanos e animais. Métodos rápidos e sensíveis para a detecção precoce das cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água e em programas de monitoramento de mananciais são de fundamental interesse para a prevenção desses efeitos. Atualmente, contagem de células, identificação de cianobactérias por microscopia óptica e análises químicas ou imunológicas das toxinas são usadas nos monitoramentos. Em anos recentes, métodos moleculares estão sendo desenvolvidos e propostos para o diagnóstico rápido e sensível da presença de cianobactérias tóxicas em diversos ambientes. Este estudo teve por objetivo implementar uma metodologia capaz de acessar e quantificar as cianobactérias do gênero *Microcystis* na Praia dos Namorados, no reservatório de Salto Grande, Americana, SP, local cujo uso recreacional é bastante intenso e florações de cianobactérias são freqüentemente observadas. Simultaneamente, buscou-se detectar o potencial de produção de microcistinas desses organismos. A técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) foi empregada com essa finalidade e dois conjuntos de oligonucleotídeos LUX foram desenvolvidos tendo como alvo dois genes distintos. Sequências de *cpcBA*-IGS do *operon* da ficocianina (PC) foram obtidas para sete linhagens de cianobactérias brasileiras, as quais foram alinhadas com outras sequências existentes em banco de dados público, e permitiram o desenho dos iniciadores de qPCR QPCF/QPCR, capazes de amplificar fragmentos de 144 pb. Da mesma forma, outras 11 sequências inéditas foram obtidas para uma região do domínio da *N*-methyltransferase do gene da sintetase de microcistinas (*mcyA*) e permitiram o desenvolvimento dos iniciadores QmcyA-NMTF/QmcyA-NMTR, capazes de amplificar fragmentos de 154 pb. Ambos os conjuntos foram marcados uma única vez com os fluoróforos FAM (QPCF/QPCR) ou JOE (QmcyA-NMTF/QmcyA-NMTR). Curvas de calibração para ambos os genes foram estabelecidas com regressão linear simples usando os valores de *Ct* (número de ciclos da qPCR em que a fluorescência atinge um limiar fixo pré-determinado) e concentrações conhecidas de DNA gênomico (em número de células equivalente) da *Microcystis* sp. NPLJ-4 (produtora de microcistina). As diluições utilizadas para o estabelecimento dessas curvas variaram de 1:10 a 1:10⁻⁵ e as concentrações de DNA foram correlacionadas com o respectivo número de células na amostra, obtido pela técnica de Utermöhl em laboratório certificado, como metodologia independente. Para PC e *mcyA*, as equações de regressão foram $y = 43,977 - 1,8097\ln(x)$ ($R^2 = 0,99$, $p < 0,05$) e $y = 42,932 - 1,8449\ln(x)$ ($R^2 = 0,99$, $p < 0,05$), respectivamente, sendo $y = Ct$ com limiar de fluorescência fixo avaliado em 0,03 e x = quantidade de DNA na amostra em concentrações conhecidas (dada como log do número de células equivalente). Para ambos os genes analisados, o limite de detecção foi de 100 células por reação.

Eficiências de 79 e 76% foram alcançadas nas amplificações para PC e *mcyA*, respectivamente. Posteriormente, essa metodologia foi aplicada a duas outras linhagens isoladas de *Microcystis* e em amostras ambientais de água, que foram coletadas sempre no mesmo ponto (Praia dos Namorados), em quatro períodos distintos (dez 06, abr 07, set 07 e nov 07). Genótipos PC (em número de células mL⁻¹) foram quantificados pela técnica de qPCR em todas as amostras analisadas. Porém, genótipos *mcy* puderam ser determinados apenas em *M. aeruginosa* NPJB1 (0,5%) e na amostra referente à primeira coleta (2,7%). Os resultados de número de células em todas as análises feitas usando a técnica de Utermöhl foram superiores aos obtidos pela qPCR. A comparação entre as médias dos valores de quantificações gerados por Utermöhl e qPCR (PC) mostrou diferença significativa (Teste *t* de Student, $p < 0,05$). Nas amostras ambientais, com exceção da primeira coleta, a presença de outros gêneros de cianobactérias cocóides, como *Radiocystis* e *Sphaerocavum*, foi observada, e suas distinções não foram possíveis nas observações microscópicas após a disrupção das colônias. Estudos adicionais realizados com a região *cpcBA*-IGS desses outros gêneros mostraram 96% de identidade com *Microcystis*, e seqüências IGS bastante similares. Assim, existe a possibilidade de que os iniciadores desenhados neste estudo estejam também amplificando esses dois gêneros de cianobactérias. Em adição, a contagem em microscópio pode ter superestimado os resultados, enquanto que a técnica de qPCR mostrou baixa eficiência de amplificação. O ensaio imunológico ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) identificou a produção de microcistinas dos tipos LR, RR ou YR em todas as amostras com concentrações maiores que 0,1 µg L⁻¹, com exceção da *M. aeruginosa* NPCD1 (não produtora de microcistinas). Os resultados obtidos neste estudo indicam que o número de células de *Microcystis*, estimado pela técnica de qPCR pode ser usado para o monitoramento ambiental na Praia dos Namorados, em atendimento à Portaria MS 518. Além disso, demonstram que é possível inferir a proporção de genótipos *mcyA* a partir da determinação de genótipos PC. Contudo, a validação dessa técnica requer maiores estudos, incluindo a utilização de mais gêneros de cianobactérias e análises de outros reservatórios brasileiros, para melhor avaliar sua confiabilidade para uso no monitoramento ambiental. Para fins de monitoramento em larga escala, a técnica de qPCR mostrou-se mais viável economicamente em relação à contagem de células por microscopia, devido a sua maior capacidade de processamento (18 amostras dia⁻¹).

Palavras-chave: ficocianina, metabólitos secundários, monitoramento ambiental, sínteses de peptídeos, PCR.

SUMMARY

LORENZI, A.S. **Implementation of Real Time Quantitative PCR technique (qPCR) for the monitoring of *Microcystis* and potentially microcystin-producing genotypes.** 2008. 174 f. Thesis (PhD.). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2008.

Toxic cyanobacterial blooms in freshwater bodies used as a source for human consumption, recreation and irrigation are frequent nowadays due to the eutrofication of these environments. The monitoring of toxic strains is important for the prevention of the side effects caused by their toxins in human and animal health. Rapid and sensitive methods for early detection of toxic cyanobacteria in water treatment stations and aquatic monitoring programs are essential for the prevention of these effects. Currently, cells counting, cyanobacterial identification using optical microscopy and chemical or immunological analyses of the toxins are applied for monitoring purposes. In recent years, molecular approaches are being developed and proposed for rapid and sensitive diagnosis of the presence of toxic cyanobacteria in several environments. This study aimed to implement a methodology capable of access and quantify *Microcystis* cyanobacterial genus at the Praia dos Namorados, in the Salto Grande reservoir, Americana, SP, where recreation is very intense and cyanobacterial blooms are frequently observed. Simultaneously, it was searched to detect the potential for microcystins production by these organisms. The Real Time Quantitative PCR (qPCR) technique was employed for these purpose and two sets of LUX primers were developed to target two distinct genes. Sequences of *cpcBA*-IGS of the phycocyanin operon (PC) were obtained for seven Brazilian cyanobacterial strains, which were aligned with other existing public database sequences, and allowed to design the qPCR QPCF/QPCR primers, able to amplify fragments of 144 bp. In the same way, 11 novel sequences were obtained from a region of the *N*-methyltransferase domain of the microcystin synthetase gene (*mcvA*) and allowed the development of QmcvA-NMTF/QmcvA-NMTR primers, able to amplify fragments of 154 bp. Both primer sets were labeled only once with FAM (QPCF/QPCR) or JOE (QmcvA-NMTF/QmcvA-NMTR) fluorophors. Standard curves for both genes were established with simple linear regression using the Ct values (the PCR cycle numbers at which the fluorescence reaches a predetermined threshold level) and known *Microcystis* sp. NPLJ-4 (microcystin producer) genomic DNA concentrations (in cell number equivalents). The dilutions used for the establishment of these curves ranged from 1:10 to 1:10⁻⁵ and the DNA concentrations were correlated with the respective cell numbers of the sample, obtained by Utermöhl technique in a certified laboratory, as an independent methodology. For PC and *mcvA*, the regression equations were $y = 43.977 - 1.8097\ln(x)$ ($R^2 = 0.99$, $p < 0.05$) and $y = 42.932 - 1.8449\ln(x)$ ($R^2 = 0.99$, $p < 0.05$), respectively, where y is the Ct at the set fluorescence threshold level (0.03) and x is the amount of known DNA concentrations in the sample (given as log cell number equivalents). For both analyzed genes, the detection limit was 100 cells per reaction. Efficiencies of 79 and 76% were achieved for PC and *mcvA* amplifications, respectively. Subsequently, this methodology was applied to two other isolated *Microcystis* strains and to environmental water samples, which were collected always in the same location (Praia dos Namorados), in four different periods (Dez 06, Apr 07, Set 07 and Nov 07).

PC genotypes (in cell numbers mL^{-1}) were quantified by the qPCR technique in all analyzed samples. However, *mcy* genotypes could be determined only in *M. aeruginosa* NPJB1 (0.5%) and in the first collected sample (2.7%). The results of cell numbers in all the analyses performed using Utermöhl technique were superior than those obtained by qPCR. The comparison between the average quantification values generated by Utermöhl and qPCR (PC) showed significant difference (Test *t* of Student, $p < 0,05$). In the environmental samples, except for the first one collected, the presence of other coccoid cyanobacterial genera, such as *Radiocystis* and *Sphaerocavum*, was observed, and their distinctions were not possible by microscope observation after colonies disruption. Further studies carried out with the *cpcBA*-IGS region of these other genera showed 96% of identity with *Microcystis*, and very similar IGS sequences. Then, there is a possibility that the primers designed in this study are also amplifying these two cyanobacterial genera. In addition, microscopic cells counting may have overestimated the results, whereas qPCR technique showed low efficiency of amplification. The ELISA immunological assay ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") identified the LR, RR or YR microcystins types in all samples analysed with concentrations higher than 0.1 mg L^{-1} , with exception of *M. aeruginosa* NPCD1 (no microcystin producer). The results obtained in this study suggest that *Microcystis* cell numbers estimated by qPCR technique can be used for the environmental monitoring of the Praia dos Namorados, in attendance to the MS 518 regulation. Furthermore, they demonstrate that it is possible to infer the *mcyA* genotypes proportion from the PC genotypes determination. However, further studies are required for the validation of this technique, including the use of more cyanobacterial genera and other Brazilian reservoirs analyses, to better evaluate the reliability for its use in the environmental monitoring. For large scale monitoring, the qPCR technique is more economically viable when compared to the microscopic cells counting, due to its large processing capacity (18 samples day^{-1}).

Keywords: phycocyanin, secondary metabolites, environmental monitoring, peptides synthetase, PCR.

1 INTRODUÇÃO

O processo de eutrofização de ambientes aquáticos, como rios, lagos e reservatórios, constitui um dos principais fatores relacionados ao aumento do número de florações de cianobactérias nestes locais, e é favorecido pelo grande aporte de nutrientes resultantes de descargas de esgotos domésticos, industriais e também das atividades agrícolas (AZEVEDO, 1998).

Algumas características das cianobactérias planctônicas, como a capacidade de crescer em corpos d'água com alta turbidez, controle da flutuabilidade na coluna d'água por meio de aerótopos, capacidade de armazenamento de fósforo (CHORUS; BARTRAM, 1999) e assimilação do nitrogênio atmosférico por algumas espécies (SEVRIN-REYSSAC; PLETIKOSIC, 1990), proporcionam a estes organismos vantagem competitiva em relação a outros tipos fitoplanctônicos. Quando sob condições ótimas, como pH acima de 7,5, temperatura média acima de 25°C e alta concentração de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio (ODEBRECHT et al., 2002), essas espécies podem apresentar crescimento exagerado, caracterizando as florações (*blooms*).

Florações de cianobactérias apresentam grande impacto social, econômico e ambiental, afetando toda a biota aquática desde o zooplâncton até peixes e macrófitas. Muitas mortandades de peixes foram associadas à falta de oxigênio na água após a ocorrência de florações (SEVRIN-REYSSAC; PLETIKOSIC, 1990). Outro problema causado por elas refere-se à produção de metabólitos, representados pela geosmina e pelo MIB (metilisoborneol), que causam odor e sabor desagradáveis à água (ZAGATTO et al., 1997) e também aos peixes (BRUNSON; LUTZ; DURBOROW, 1994). No entanto, a maior preocupação decorrente do aparecimento dessas florações relaciona-se à produção de toxinas.

Intoxicações humanas causadas por cianotoxinas já foram relatadas em diversos países como Austrália, Brasil, China e Índia (KAEBERNICK; NEILAN, 2001). No Brasil, as florações de cianobactérias ocorridas no reservatório de Itaparica, na Bahia, em 1988, provavelmente foram as responsáveis pela morte de 88 pessoas, dentre as 200 intoxicadas (TEIXEIRA et al., 1993). Já em 1996, no reservatório de Tabocas, em

Caruaru, Pernambuco, 52 pacientes com problemas renais faleceram em decorrência da presença de microcistinas (AZEVEDO et al., 2002) na água utilizada para a hemodiálise. Esse foi o primeiro registro mundial de envenenamento humano fatal atribuído às cianotoxinas. Esses episódios contribuíram para um aumento substancial nas pesquisas sobre cianobactérias e suas toxinas. Como resultado, muitas informações sobre toxidez, estruturas das cianotoxinas e métodos analíticos para sua determinação estão disponíveis.

Desde então, o monitoramento de cianobactérias em águas usadas para o abastecimento público tornou-se uma das áreas prioritárias da Organização Mundial da Saúde. No Brasil, a partir da edição da Portaria MS 518/2004 (BRASIL, 2004), passou-se a exigir o monitoramento das cianobactérias em águas de abastecimento, com o objetivo de que fossem implantados monitoramentos sistemáticos para a tomada de ações preventivas e corretivas, que visassem minimizar os impactos à saúde humana causados por suas toxinas. Essa exigência legal trouxe preocupação às companhias estaduais de saneamento, aos serviços autônomos e às prefeituras, pois o monitoramento de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, deve obedecer a uma frequência mensal quando o número de cianobactérias não exceder $10.000 \text{ células mL}^{-1}$ (ou $1 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ de biovolume), e semanal, quando exceder este valor. Também é proibido o uso de algicidas para o controle de cianobactérias ou qualquer outra intervenção no manancial que provoque a lise de suas células quando a densidade exceder $20.000 \text{ células mL}^{-1}$ (ou $2 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ de biovolume), sob pena de comprometimento da avaliação de riscos à saúde associados às cianotoxinas.

A Organização Mundial de Saúde estipulou que a concentração máxima tolerável de microcistinas em água potável é de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 1998). Em nosso país, esse mesmo valor em água potável também foi estabelecido por meio da Portaria MS 518/2004. Valores toleráveis para outras toxinas ainda estão sendo discutidos, mas até o presente momento recomenda-se que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de cilindrospermopsinas e saxitoxinas, observando os limites de $15,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Atualmente, os reservatórios de água do Estado de São Paulo são monitorados para a presença de cianobactérias por meio da contagem de suas células, seguindo a

técnica de contagem de Utermöhl (APHA, 1998), e sua identificação tem sido feita usando microscopia ótica, uma prática trabalhosa que exige especialista em taxonomia desses microrganismos. A identificação das espécies segue as descrições elaboradas por Komárek e Anagnostidis (1989, 1999) e Anagnostidis e Komárek (1988), baseadas em critérios morfológicos.

Existe, portanto, uma necessidade urgente por parte dos órgãos responsáveis pelo gerenciamento da qualidade de água de prever a formação de florações tóxicas e monitorar seu desenvolvimento para que ações corretivas de controle tenham sucesso. No entanto, esse monitoramento é complexo nos dias de hoje, pois além da exigência de pessoal altamente especializado para identificar as cianobactérias por meio da análise morfológica (microscopia óptica), este método não permite a diferenciação de florações tóxicas e não tóxicas (KOMÁREK, 1991; WATANABE, 1996), havendo a necessidade de análise das toxinas.

Dentre os métodos mais freqüentemente usados para detecção de toxinas, encontram-se os bioensaios (testes com camundongos), imunológicos - ensaio imuno enzimático (ELISA), bioquímicos (inibição de atividades enzimáticas), analíticos (cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) e espectrometria de massas.

Em anos recentes, métodos de detecção baseados em DNA também têm sido usados em maior escala pelo grande potencial de especificidade, sensibilidade e rapidez que apresentam. Entretanto, várias tentativas feitas inicialmente visando correlacionar a produção de toxinas com algumas seqüências gênicas de cianobactérias não mostraram resultados satisfatórios. Nessas tentativas iniciais, foram estudados: polimorfismo de aloenzimas (KATO; WATANABE; WATANABE, 1991), composição das bases de nucleotídeos (FAHRENKRUG; BETT; PARKER, 1992), homólogos do gene *rpoD* (SAKAMOTO et al., 1993), hibridização DNA-DNA (WILMOTTE, 1994), região do espaço intergênico da ficocianina (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995), a discriminação de genótipos por RAPD (NEILAN, 1995; NISHIHARA et al., 1997), seqüências repetitivas de DNA (ASAYAMA et al., 1996; ROUHIAINEN et al., 1995), região do espaço intergênico do RNAr 16S-23S (NEILAN et al., 1997; OTSUKA et al., 1999), seqüências de RNAr 16S (NEILAN et al., 1997; OTSUKA et al., 1998; RUDI; SKULBERG; JAKOBSEN, 1998; RUDI et al., 1997).

O desenvolvimento de técnicas para a detecção de cianobactérias ou florações tóxicas, usando genes envolvidos na biossíntese de cianotoxinas, teve início após a publicação de Dittmann et al. (1997), quando parte dos genes biossintéticos da toxina microcistina, produzida pela *Microcystis aeruginosa* PCC7806, foram clonados e sequenciados. A partir daí, os agrupamentos dos genes da biossíntese de microcistinas produzidas por *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (CHRISTIANSEN et al., 2003; NISHIZAWA et al., 2000; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000), de nodularina (MOFFITT; NEILAN, 2001) e cilindrospermopsina (MIHALI et al., 2008; SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001) foram descritos, enquanto que seqüências de genes responsáveis pela produção de saxitoxinas foram identificadas (POMATI; NEILAN, 2004). Com essas descobertas, tem sido possível utilizar as seqüências gênicas envolvidas na biossíntese dessas toxinas para desenhar oligonucleotídeos iniciadores específicos capazes de detectar por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) o potencial de produção de cianotoxinas de linhagens isoladas ou amostras ambientais.

Recentemente, a possibilidade de quantificar número de células e cópias de genes por meio da PCR em tempo real tem permitido o desenvolvimento de métodos rápidos de diagnóstico (resultado em horas), extremamente sensíveis (detecção de células por mL) e específicos (sem falso positivo) para a detecção de cianobactérias tóxicas por meio da seleção de genes específicos do genoma funcional. Até o presente momento, porém, nenhum método relativamente específico e quantitativo foi implementado para o rápido diagnóstico da presença desses organismos em reservatórios brasileiros.

Este estudo teve por finalidade desenvolver uma nova abordagem para atender a esse propósito, além de contribuir para a divulgação do conhecimento na área e dar suporte para a tomada de decisões pelos profissionais dos setores de saúde e de saneamento. Dessa forma, foram desenvolvidos dois conjuntos de oligonucleotídeos LUX para amplificar simultaneamente por qPCR fragmentos da região *cpcBA*-IGS do *operon* da ficocianina (PC) e do domínio da *N*-methyltransferase do gene da sintetase de microcistinas (*mcyA*) em cianobactérias do gênero *Microcystis*. Posteriormente, essa metodologia foi testada em amostras da natureza, coletadas na Praia dos Namorados,

no reservatório de Salto Grande, Americana, SP, teve a sua viabilidade avaliada estatisticamente e economicamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecologia de cianobactérias

Evidências paleontológicas indicam que as cianobactérias possuem uma longa história evolutiva na face da Terra, cujos registros datam de aproximadamente 3,5 bilhões de anos atrás (SCHOPF, 1996). A capacidade de algumas espécies para precipitar carbonato de cálcio, formando estruturas conhecidas como estromatólitos (SHOPF; WALTER, 1982), também contribuíram fortemente para essas descobertas.

As cianobactérias constituem um grupo bastante grande e diverso (WILMOTTE, 1994) de microrganismos. Elas apresentam estrutura celular bacteriana, típica de Gram-negativas (WOESE, 1987), e formam um grupo filogeneticamente coerente de organismos pertencentes ao domínio *Bacteria*. No entanto, realizam fotossíntese oxigênica, como algas e plantas (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997), tendo como modo nutricional dominante o autotrófico (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Suas células contêm clorofila-a e outros pigmentos acessórios característicos (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) organizados em tilacóides e responsáveis pela coloração verde-azulada.

Provavelmente, esses organismos foram os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva. Em geral, necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Mas, apesar de sua natureza tipicamente fotossintética aeróbica, algumas espécies são heterotróficas facultativas, crescem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). Outras, porém, em condições anaeróbicas, utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986).

Algumas espécies também fixam nitrogênio atmosférico (RAI, 1990; STEWART, 1973), contribuindo para a fertilidade dos solos e águas (RAI, 1990). Essa característica está associada à existência de células modificadas chamadas heterocitos, que fixam o N_2 do ar atmosférico e o transformam em amônia, tendo a nitrogenase como principal enzima do processo (STEWART, 1973). Ruschel (1985) relata que a cianobactéria *Anabaena*, em associação com *Azolla*, em ambientes alagados, pode fixar de 21-50 Kg ha^{-1} de N mensalmente.

Morfologicamente, as cianobactérias exibem grande variedade de formas e arranjos, como cocos unicelulares, bacilos, e até filamentosas e filamentosas ramificadas multicelulares (WHITTON; POTTS, 2000). Não possuem flagelos, mas as espécies filamentosas geralmente apresentam movimento deslizante (DREWS, 1973) e podem migrar através de superfícies úmidas. Apesar de serem organismos de dimensões microscópicas, o tamanho de suas células varia de 1 a 100 μm , podendo, muitas vezes, serem observados a olho nu nos locais de ocorrência, pois formam densos tapetes ou mantos, contendo também algumas outras espécies microbianas (BROCK, 1973).

A longa história evolutiva desse grupo reflete uma grande diversidade metabólica, propiciando sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também sua colonização nos ambientes atuais (SCHOPF, 1994). As cianobactérias são cosmopolitas e estão presentes em todos os tipos de ecossistemas bem iluminados (exceto em ambientes com pH muito baixo), inclusive em ambientes extremos, como areia e rochas desérticas, águas termais (“hot springs”) e lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1973; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). Entretanto, ambientes de águas doce são os mais propícios para o crescimento das cianobactérias, pois a maioria das espécies se desenvolve melhor em águas neutro-alcálinas (pH 6-9), temperatura em torno de 25 °C, alta concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999; RIPPKA, 1988).

As cianobactérias, juntamente com as algas, compreendem a maior parte da biomassa do mundo (CANNEL, 1993; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) e, em condições apropriadas, algumas espécies são capazes de formar florações. O termo floração pode ser definido como um aumento muito grande da biomassa fitoplanctônica, com predomínio de uma ou duas espécies e valores de clorofila-a de 10 $\text{mg (m}^3)^{-1}$ ou cerca de $2,0 \times 10^4$ células mL^{-1} (OLIVER; GANF, 2000). De acordo com esses mesmos autores, os gêneros mais comuns presentes nas florações de cianobactérias são: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis* e *Oscillatoria*.

Elas também propiciam uma extraordinária e ampla faixa de contribuição para a vida dos humanos, apresentando inclusive importância econômica (MANN; CARR, 1992). Além da produção primária de matéria orgânica e da fixação biológica de

nitrogênio por algumas espécies, o uso de cianobactérias na produção de alimentos com valores nutricionais elevados, conversão de energia solar e produtos farmacológicos apresentam um potencial promissor para o futuro (KREITLOW; MUNDT; LINDEQUIST, 1999; SKULBERG, 1995).

Outras particularidades fisiológicas importantes do grupo incluem resistência a vários metais pesados em ambientes poluídos (FIORE et al., 2000) e produção de metabólitos secundários (SILVA, 2006), incluindo potentes toxinas que constituem um perigo mundial em potencial para a saúde dos animais e de humanos.

2.2 Sistemática de cianobactérias

Cianobactérias constituem um grupo de microrganismos até hoje muito discutido por botânicos e microbiologistas. Para os botânicos, a presença de clorofila e a liberação de O₂ a partir do processo fotossintético são informações que caracterizam fisiologicamente os fotoautotróficos aeróbios, e constituem argumentos bastante significativos para a inclusão das cianobactérias junto ao grupo das algas eucarióticas (BOLD; WYNNE, 1985). No entanto, para os microbiologistas, a organização da estrutura celular, baseada em microscopia eletrônica, e as análises bioquímicas da composição da parede celular e estrutura dos ribossomos, que revelam a natureza procariótica de suas células, justificam o posicionamento do grupo junto às bactérias tipo Gram-negativas (RIPPKA, 1988; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; WOESE, 1987).

A classificação dos organismos visa o seu arranjo em grupos taxonômicos (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001) e deve refletir as relações evolutivas entre eles (KOMÁREK, 2003; WILMOTTE; GOLUBIC, 1991), além de reger sua identificação e fornecer uma linguagem comum aos especialistas (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001). Vários sistemas de classificação já foram propostos para as cianobactérias, porém sua sistemática tem sido e será ainda bastante alterada.

Por formarem um grupo morfológicamente diverso de organismos, sua classificação tradicionalmente tem se baseado em caracteres morfológicos e revisões bastante completas sobre o assunto podem ser encontradas em Anagnostidis e Komárek (1985), Wilmotte (1994) e Turner (1997).

Atualmente, dois sistemas de classificação são mais comumente usados: a abordagem bacteriana contida no Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001) e a abordagem botânica, porém multidisciplinar, de Anagnostidis e Komárek (1985). Há também uma proposta mais recente para a classificação de cianobactérias elaborada por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005).

Na oitava edição do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática encontra-se contida, pela primeira vez, a Divisão *Cyanobacteria* dentro do Reino Procariota. A proposta apresentada nesse manual ainda era provisória e foi elaborada com algumas modificações a partir da abordagem taxonômica introduzida por um grupo de bacteriologistas liderado por R.Y. Stanier, no início de 1970. O sistema é baseado apenas em culturas axênicas e, além de utilizar os caracteres morfológicos, como na maioria dos outros sistemas, utiliza também características bioquímicas e fisiológicas (RIPPKA; WATERBURY; STANIER, 1981; RIPPKA et al., 1979; STANIER et al., 1971; WATERBURY; STANIER, 1978). As cianobactérias são divididas em cinco seções, alguns contendo subgrupos, conforme a Tabela 1. As seções I e II incluem as unicelulares: na seção I, a reprodução ocorre por fissão binária ou por *budding* (variação da reprodução por divisão binária, onde pequenas células filhas são liberadas sucessivamente do ápice terminal de uma célula mãe) e, na seção II, por fissão múltipla. Na seção III, estão as filamentosas não heterocitadas, com divisão em um único plano. As filamentosas heterocitadas, com divisão em um único plano ou em mais de um, encontram-se classificadas nas seções IV e V, respectivamente.

Na outra abordagem, J. Komárek e K. Anagnostidis (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985, 1988, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005) buscaram conciliar as diferenças entre os sistemas botânico e bacteriano. O sistema de classificação de Anagnostidis e Komárek (1985) propõe quatro ordens (Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales e Stigonematales), subdividas em famílias, subfamílias, gêneros e espécies. Esse sistema também considerou a possibilidade da identificação morfológica de espécies em amostras da natureza e seu uso como uma ferramenta para estudos de diversidade de cianobactérias.

Tabela 1 - Classificação das cianobactérias segundo o Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (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 subgrupo II	<i>Cyanocystis</i> , <i>Dermocarpella</i> , <i>Stanieria</i> , <i>Xenococcus</i> <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>

No entanto, Komárek (2003) ressalta que, apesar da categoria taxonômica “espécie” ser considerada básica para todos os organismos, para o grupo das cianobactérias é bastante problemática. Sua observação baseia-se no fato de que os critérios modernos de classificação, que consideram aspectos paleontológicos, fenotípicos (morfológicos), ecológicos, ultraestruturais (microscopia eletrônica) e moleculares (hibridização DNA-DNA e sequenciamento), devem estar de acordo com as relações filogenéticas encontradas entre os organismos. A caracterização genotípica de vários gêneros usando seqüências de RNAr 16S está, de uma certa forma, coerente e corresponde na maioria das vezes aos caracteres morfológicos tradicionais analisados, sendo informações relativamente robustas para serem aceitas pelo Manual de Bergey. Problemas surgem com a classificação ao nível infra-genérico pela

utilização de características como tamanho e forma das células, presença de bainhas, pigmentação e tipo de ramificação, as quais são freqüentemente variáveis. Em muitos casos, a análise dessas características não coincide com as análises moleculares, provavelmente por omitirem a especificidade ecofisiológica. Em contraste com a variabilidade descrita para gêneros geneticamente um pouco mais definidos, o autor propõe a existência de “morfotipos” dentro dos gêneros que são considerados mais estáveis, os quais podem ocorrer algumas vezes em diferentes áreas e persistirem por muitos anos nos biótopos em condições ecológicas mais ou menos estáveis, apresentando agrupamentos coerentes em análises filogenéticas. Com isso, a estabilidade de critérios fenotípicos, genéticos e aspectos ecológicos devem ser considerados em conjunto para a determinação de espécies numa abordagem polifásica. De acordo com essa mesma abordagem, a maioria dos gêneros e espécies deverão ser reavaliados futuramente e a diversidade de cianobactérias em vários ambientes deverá ser melhor caracterizada. Contudo, a categoria “espécie” faz-se ainda necessária principalmente em estudos ecológicos, pois há carência de dados moleculares para diversas cianobactérias, sendo esta categoria satisfatória para a identificação de ecotipos e morfotipos em estudos de diversidade na natureza.

Ambas as abordagens, botânica ou bacteriana, vêm sendo empregadas em sistemática de cianobactérias com os cianobacteriologistas optando por uma ou outra, mas em alguns casos fazendo as descrições de acordo com ambas. Atualmente, essas duas abordagens estão se convergindo cada vez mais. Nomes botânicos são usados na classificação bacteriológica, e a divisão das cianobactérias em subseções reflete as ordens usadas na classificação botânica. Além disso, informações genéticas além de características morfológicas, citológicas, ecológicas e bioquímicas das cianobactérias estão sendo usadas na classificação botânica (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Não obstante, a nomenclatura difere entre esses dois sistemas, apesar de várias propostas para sua unificação (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005; OREN, 2004; OREN; TINDALL, 2005). Além do mais, a cultura pura da espécie descrita é referência no código de bacteriologia, ao passo que espécimes conservadas em herbários, fotografias e/ou desenhos são usados no código botânico (OREN 2004; OREN; TINDALL, 2005).

Recentemente, Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) propuseram um outro sistema de classificação baseado em relações filogenéticas das cianobactérias (principalmente seqüências de RNAr 16S), morfologia e arranjos dos tilacóides (ultraestrutura). Os autores sugerem que o sistema de classificação em níveis mais altos (supra-genéricos) usado atualmente, separando formas cocóides de filamentosas, não reflete a história evolutiva do grupo e precisa ser modificado. Formas unicelulares e filamentosas simples estão dispersas no sistema, devido a escassez de informações moleculares, enquanto que os táxons heterocitados formam uma subclasse.

A classificação de cianobactérias, assim como sua revisão, são bastante complicadas pelo fato de que na maior parte das vezes os organismos são caracterizados com base apenas em sua morfologia, sem qualquer informação genética (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; WILMOTTE; HERDMAN, 2001). Há casos, porém, em que existem seqüências moleculares de cianobactérias disponíveis em bases de dados, mas sem sua descrição morfológica (CASTENHOLZ, 2001), enquanto que métodos moleculares (GÜRTLER; MAYALL, 2001) e oligonucleotídeos específicos para cianobactérias (URBACH; ROBERTSON; CHISHOLM, 1992) tornaram possível estudos filogenéticos em linhagens não-axênicas e sem cultivo prévio.

Na sistemática atual, *Cyanobacteria* é um importante Filo dentro do domínio *Bacteria* (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001), mas é de consenso geral que abordagens moleculares devem ser aplicadas na tentativa de solucionar o problema da sistemática de cianobactérias (WILMOTTE, 1994; TURNER, 1997).

Além disso, atualmente, apenas cinco espécies de cianobactérias tem descrições validadas de acordo com a nomenclatura bacteriológica (OREN, 2004). Os autores de ambos os sistemas afirmam que a classificação atual de cianobactérias é temporária por causa da escassez de informações genéticas e ressaltam que revisões importantes necessariamente ocorrerão no futuro (CASTENHOLZ, 2001; KOMÁREK, 2003).

2.2.1 Identificação tradicional e contagem de cianobactérias

No Brasil, a presença de cianobactérias em vários ecossistemas aquáticos tem sido freqüentemente observada em diversas localidades do país (AGUJARO, 2007; BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003; BOUVY et al., 1999; CARVALHO, 2003;

DOMINGOS et al., 1999; LAGOS et al., 1999; LORENZI, 2004; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000). Rotineiramente, os levantamentos sobre a ocorrência desses organismos em reservatórios de água são realizados através de técnicas convencionais de observação em microscópio óptico das amostras coletadas e/ou de seu isolamento e cultivo (BOUVY et al., 1999, 2000; BRANCO; SENNA, 1994; DOMINGOS et al., 1999; LAGOS et al., 1999; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000; SOUZA; CARVALHO; TRUZIL, 1998).

A identificação e os estudos taxonômicos das espécies são feitos usando material fresco, preservado com formol 2-4%, de acordo com as descrições elaboradas por Anagnostidis e Komárek (1988), Komárek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005), Sant'Anna e Azevedo (2000) e Sant'Anna et al. (2003, 2006, 2007), as quais baseiam-se em morfologia e requerem a experiência de profissionais altamente qualificados.

O isolamento e cultivo de cianobactérias para sua posterior identificação é uma prática usada em estudos ecológicos e é útil para espécies de crescimento rápido e com meio seletivo bem definido. Existem cianobactérias, assim como muitas bactérias de um modo geral (PACE, 1997), que são resistentes aos métodos de cultivo conhecidos. Para bactérias, por exemplo, sabe-se que menos de 1% dos organismos presentes nos ambientes naturais são capazes de crescer em meio de cultivo (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Além disso, após longos períodos sob cultivo, muitas características morfológicas usadas para a identificação de cianobactérias podem sofrer modificações ou até mesmo serem perdidas. Populações de *Microcystis* são encontradas na natureza com características específicas quanto a forma e o tamanho de suas colônias (REYNOLDS et al., 1980; SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000), mas a variabilidade destas características quando cultivadas dificulta sua identificação por microscopia. Dessa forma, Komárek e Anagnostidis (1989) relatam que mais de 50% das linhagens existentes nas coleções de culturas de cianobactérias não correspondem às características do táxon nas quais elas foram incluídas.

Outros problemas, como o uso incorreto de nomes antigos ou até mesmo a identificação equivocada (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989), são bastante freqüentes. Esses mesmos autores estimam que um grande número de linhagens de em coleções de cultura foram identificadas erroneamente. Cianobactérias bastante

simples, tais como *Synechococcus* e *Cyanothece*, são especialmente difíceis de identificar e de classificar (CASTENHOLZ, 1992; KOMÁREK et al., 2004). Outro agravante seria o fato que linhagens de uma mesma espécie de cianobactéria podem ser morfológicamente idênticas, mas apresentarem diferenças quanto à toxicidade (SIVONEN; JONES, 1999). Como exemplo, a espécie *Microcystis aeruginosa* possui linhagens tóxica e não tóxica (MEISSNER; DITTMAN; BÖRNER, 1996), cuja diferenciação não é possível de ser obtida por análise microscópica.

No Estado de São Paulo, a determinação do número de células das cianobactérias é feita em microscópio invertido (invertoscópio), usando ocular com aumento de 10x, objetiva com 40x e contraste de fase, seguindo a técnica de Utermöhl (APHA, 1998; CHORUS; BARTRAM, 1999), uma prática bastante exaustiva. Câmaras de Utermöhl com capacidade de 2 a 5 mL são utilizadas conforme a densidade da amostra e os resultados destas determinações são multiplicados pelo respectivo fator de conversão, calculado de acordo com a Norma Técnica da CETESB L5. 303 (CETESB, 2005). O objetivo da contagem de cianobactérias visa assegurar que o número quantificado represente o mais próximo possível o tamanho da população. No entanto, em função de erros e limitações inerentes ao método, como a sobreposição de células e/ou indivíduos, o valor real nunca é alcançado. Avalia-se, portanto, a probabilidade de que o valor quantificado esteja em torno do verdadeiro, num certo intervalo de confiança. Em geral, quando no mínimo 400 indivíduos ou células são enumerados, calcula-se um erro de $\pm 10\%$ para um intervalo de confiança de 95%, e uma distribuição randômica das amostras no fundo da câmera de contagem é assumida. A expressão dos resultados pode ser dada em células mL^{-1} , em atendimento a Portaria MS 518/2004.

É importante ressaltar a complexidade de todo esse levantamento, pois além da exigência de pessoal especializado para identificar as cianobactérias por meio de análise morfológica, no Brasil há grande carência de taxonomistas e a maioria dos cursos de graduação não propicia ao aluno esta formação.

2.3 Seqüências gênicas para a detecção molecular de cianobactérias

Os estudos sobre RNAr 16S de cianobactérias iniciaram-se em 1975 e confirmaram a estrutura bacteriana destes organismos (BONEN; DOOLITTLE, 1975; WOESE et al., 1975). Várias outras publicações surgiram a partir daí (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; WELLER; WARD, 1991; WILMOTTE; NEEFS; DE WACHTER, 1994; WILMOTTE; VAN DER AUWERA; DE WACHTER, 1993; WILMOTTE et al., 1992) e uma revisão sobre este assunto pode ser encontrada em Wilmotte (1994). Outras seqüências, tais como *rpoC1* (FERGUSSON; SAINT, 2000; PALENIK, 1992), *nifH* (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997) e *cpcBA*-IGS (BOLCH et al., 1996; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995), têm sido usadas alternativamente como marcadores moleculares em cianobactérias.

Em particular, a taxa de substituição de nucleotídeos da região *cpcBA*-IGS do *operon* da ficocianina (PC) é aparentemente maior do que em seqüências de RNAr 16S amplamente utilizadas (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995; ROBERTSON; TEZUKA; WATANABE, 2001; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). Diversos estudos têm demonstrado que essa região pode ser usada para identificar cianobactérias em diferentes ecossistemas de maneira rápida e direta, usando oligonucleotídeos específicos para ela (BAKER et al., 2001; BARKER et al., 2000; BITTENCOUT-OLIVEIRA; OLIVEIRA; BOLCH, 2001; BOLCH et al., 1996; KIM et al., 2006; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995; ROBERTSON; TEZUKA; WATANABE, 2001). Contudo, assim como seqüências de RNAr 16S, não é capaz de distinguir cianobactérias produtoras de toxinas das não produtoras. A amplificação dessas seqüências tem sido bastante importante para detectar gêneros e/ou espécies conhecidas por produzirem toxinas, enquanto que sua detecção só é possível se forem usadas seqüências gênicas envolvidas na sua biossíntese.

O aparato fotossintético das cianobactérias possui clorofila-a, ficobiliproteínas e vários carotenóides como pigmentos da antena coletora de luz (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). O principal pigmento dessa antena são as ficobiliproteínas que estão organizadas em uma estrutura chamada ficobilissomas, composta de ficoeritrina

(pigmento vermelho que está ausente em algumas cianobactérias), ficocianina (PC – pigmento azul), aloficocianina e aloficocianina B (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) (Figura 1a). Dentro do domínio *Bacteria*, o pigmento ficocianina é encontrado naturalmente nas cianobactérias em ambientes de água doce (BRYANT, 1982; ERNEST, 1991; GLAZER, 1989). Os genes codificadores de PC também são encontrados nos cloroplastos de alguns organismos do domínio *Eukarya*, tais como algas vermelhas (rodófitas), glaucófitas e criptófitas (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; GLAZER; WEDEMAYER, 1995), mas não em algas verdes, plantas ou outras bactérias. Esse fato caracteriza uma grande vantagem para a utilização das seqüências codificadoras de PC, principalmente em ambientes naturais, evitando interferência com material genético de outros organismos.

Em cianobactérias, o *operon* PC apresenta 5 ORFs e possui uma região de espaço intergênico (IGS) entre os genes *cpcB* e *cpcA* (Figura 1b), que é relativamente grande se comparada com outras existentes no mesmo *operon*, e apresenta variações suficientes nas suas seqüências para a identificação de cianobactérias em nível de espécies e/ou linhagens (BOLCH et al., 1996; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). Os genes de PC usualmente ocorrem numa única cópia, mas também podem ser encontrados em até três cópias (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995). *Synechococcus* sp. PCC6301 e PCC7942 e *Pseudanabaena* PCC7409 possuem duas cópias do *operon* *cpc* (BHALERAO et al., 1993; DUBBS; BRYANT, 1991), enquanto que *Calothrix* PCC7601 apresenta três cópias (MAZEL; MARLIÈRE, 1989). A ocorrência de múltiplas cópias do mesmo gene, para o mesmo tipo de pigmento, aparentemente é resultado de processos adaptativos desses organismos às condições ambientais, como qualidade de luz (adaptação cromática complementar) e disponibilidade de nutrientes (APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; NOUBIR et al., 2002).

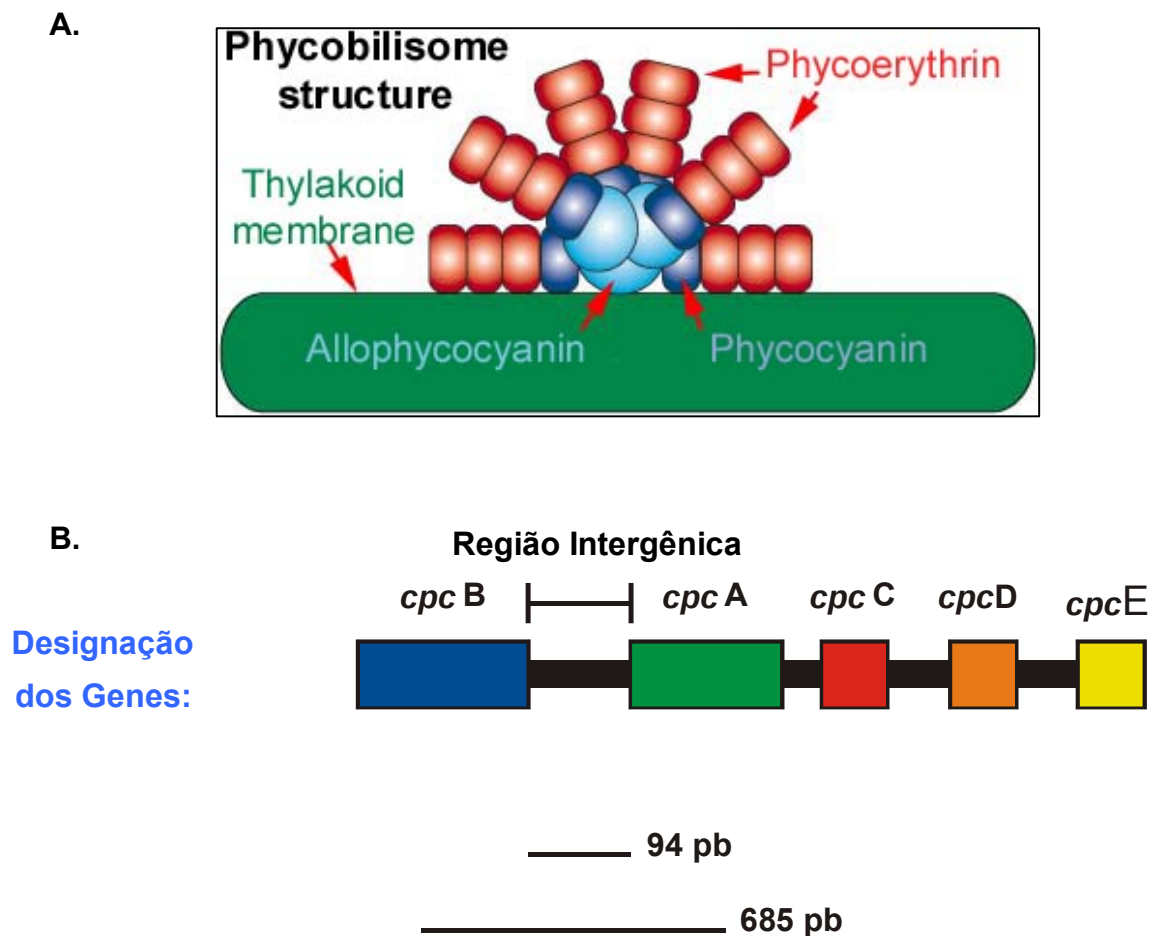


Figura 1 – **A.** Representação estrutural do ficobilissoma. **B.** *Operon* da ficocianina.
 Fonte: NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995.

2.4 Produção de metabólitos secundários por cianobactérias

As cianobactérias são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias com atividade biológica (BURJA et al., 2001) que não são utilizadas no metabolismo primário (divisão celular ou produção de energia), portanto classificadas como metabólitos secundários. Mais de 420 substâncias bioativas pertencentes a diversas classes, incluindo inibidores enzimáticos, inibidores de fotossíntese, antimicrobianos, inibidores de apetite, antimaláricos, imunossupressores e antitumorais já foram isoladas de cianobactérias (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et al., 2004a; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996).

A maioria delas são formadas por estruturas peptídicas, elaboradas por um mecanismo enzimático paralelo à síntese protéica, ou seja, uma via não-ribossômica (Figura 2). A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, muitos dos quais são aminoácidos não-protéicos, hidroxiácidos e substâncias policetônicas, especialmente elaborados para serem incorporados na estrutura peptídica. Essa via biossintética é bastante utilizada por microrganismos para a produção de antibióticos e toxinas (ETCHEGARAY, 1998; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997) e, por causa da variedade de substratos utilizados, é comum a existência de ligações peptídicas, funções cetônicas, insaturações e funções aromáticas na estrutura de uma mesma molécula.

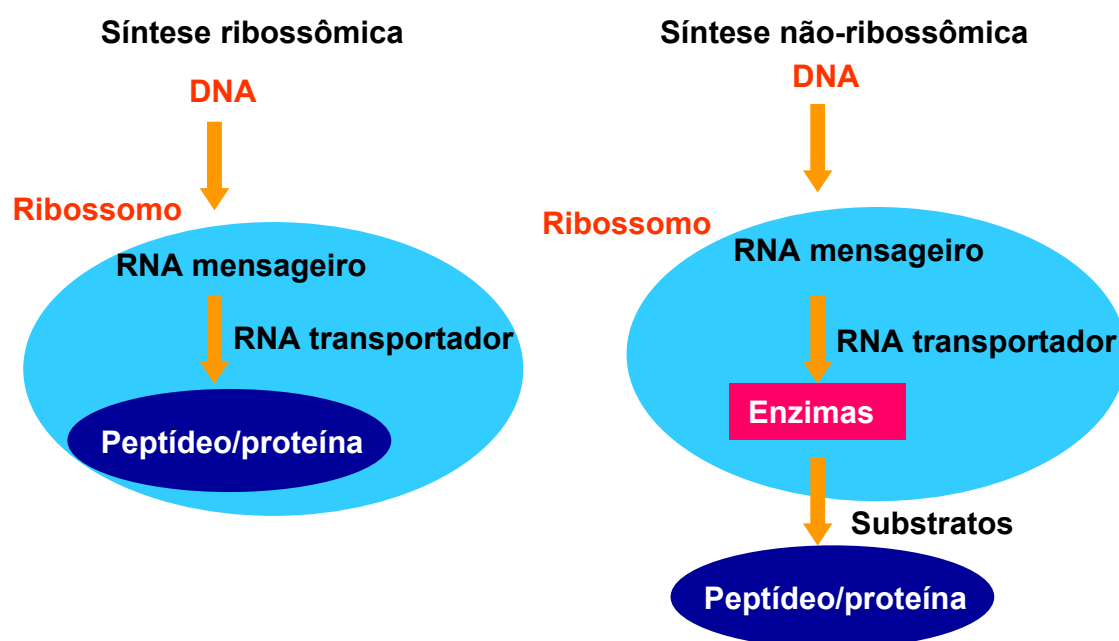


Figura 2 – Ilustração esquemática das vias sintéticas ribossômica e não-ribossômica de peptídeos. Fonte: FIORE; SILVA-STENICO, 2007.

A biossíntese microbiana de peptídeos não-ribossômicos é catalisada por enzimas multifuncionais, os peptídeos sintetases não-ribossômicos (NRPSs), policetídeos sintases (PKSs) e/ou sistemas híbridos de NRPS/PKS (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Essas enzimas são caracterizadas por um arranjo modular dos genes

que as codificam e contêm seqüências altamente conservadas. As NRPSs estão envolvidas na produção de importantes drogas como as penicilinas, vancomicinas e ciclosporinas (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). As PKSs modulares são descritas na biossíntese de antibióticos produzidos por actinomicetos (eritromicinas) (KATZ, 1997). Outros peptídeos não ribossômicos de importância médica (mixotiazóis, epotilones e bleomicinas) são produzidos pelo trabalho cooperativo das NRPSs e PKSs (DU; SANCHEZ; SHEN, 2001).

Em cianobactérias essas duas enzimas estão envolvidas com a biossíntese de microcistinas, barbamida, nodularina, nostopeptidolídeo A, fischerilina A (CHANG et al., 2002; ETCHEGARAY et al., 2004a; HOFFMANN et al., 2003; MOFFITT; NEILAN, 2004; TILLET et al., 2000). Alguns desses produtos encontram-se melhor caracterizados na Tabela 2.

As toxinas produzidas por cianobactérias também são sintetizadas por meio do metabolismo secundário (CARMICHAEL, 1992). De acordo com sua estrutura química, elas podem ser classificadas em peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas), alcalóides (anatoxina-a, anatoxina-a(S), saxitoxinas, cilindrospermopsinas, aplisiatoxinas e lingbiatoxina-a) e lipopolissacarídeos. Também podem ser classificadas conforme seu mecanismo de ação em hepatotóxicas, neurotóxicas, citotóxicas e dermatotóxicas (SIVONEN; JONES, 1999) (Tabela 3).

Tabela 2 - Produtos de cianobactéria sintetizados pela combinação de NRPS e PKS (SILVA, 2006)

Produto	Produtor	Atividade biológica	N° de genes		N° de genes híbridos NRPS/PKS	Referência
			NRPS	PKS		
Barbamida	<i>Lyngbya majuscula</i> 19L	moluscicidal	4	0	1	Chang et al., 2002
Microcistina	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	toxina	3	1	2	Tillett et al., 2000
Microcistina	<i>Microcystis aeruginosa</i> K-139	toxina	3	1	2	Nishizawa et al., 2000
Microcistina	<i>Planktothrix agardhii</i> CYA126	toxina	3	1	2	Christiansen et al., 2003
Microcistina	<i>Anabaena</i> 90	toxina	3	1	2	Rouhiainen et al., 2004
Nodularina	<i>Nodularia spumigena</i> NSOR10	toxina	2	1	2	Moffitt e Neilan, 2004
Nostopeptidolídeo A	<i>Nostoc</i> sp. GSV224	Não conhecida	3	1	0	Hoffmann et al., 2003

Tabela 3 - Características gerais das cianotoxinas (modificado de SIVONEN; JONES, 1999)

Grupos de Toxinas ⁽¹⁾	Gêneros de cianobactérias ⁽²⁾	Órgãos afetados em mamíferos
Peptídeos cíclicos		
Microcistina	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Radiocystis</i>	Fígado
Nodularina	<i>Nodularia</i>	Fígado
Alcalóides		
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Sistema nervoso
Anatoxina-a(S)	<i>Anabaena</i>	Sistema nervoso
Aplisiatoxina	<i>Lyngbia</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Oscillatoria</i>	Pele
Cilindrospermopsina	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Umezakia</i>	Fígado
Lingbiatoxina-a	<i>Lyngbya</i>	Pele, trato gastrointestinal
Saxitoxina	<i>Lyngbya</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Oscillatoria</i>	Sistema nervoso
Lipopolissacarídeos	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Anacystis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Oscillatoria</i>	Potencialmente irritante; afeta qualquer tecido exposto

⁽¹⁾ Muitas variantes estruturais são conhecidas em cada grupo de toxina

⁽²⁾ Nem todas as espécies de um gênero em particular produzem toxinas

Dentre as hepatotoxinas, as microcistinas tem sido extensivamente estudadas por causarem problemas no mundo todo. Elas são formadas por estruturas peptídicas, elaboradas pela via não-ribossômica, na qual participam NRPSs, PKSs e híbridos NRPS/PKS. Agem na inibição das proteínas fosfatases do tipo 1 e 2A e são conhecidas como promotoras de tumores (CHORUS; BARTRAM, 1999; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). Na China, Ueno et al. (1996) relatam que a incidência de câncer primário de fígado provavelmente esteve relacionada à ingestão de água contaminada por microcistinas, o grupo mais comum dentro das hepatotoxinas (CHRISTOFFERSEN, 1996).

As microcistinas são produzidas principalmente por três gêneros de cianobactérias planctônicas formadoras de florações, *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix*, e mais raramente por *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon* e *Nostoc* (SIVONEN; JONES, 1999). Existem aproximadamente 65 isoformas conhecidas de microcistinas, as quais possuem em comum a estrutura cíclica D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-ZAdda-D-Glu-

Mdha, onde Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8,-trimetil-10-fenil-1,4,6-decandienóico, D-MeAsp é o ácido 3-metil-aspartico, Mdha é *N*-metildeidroalanina e L-X e L-Z são posições de aminoácidos variáveis que contribuem para as diferentes isoformas (HONKANEN et al., 1990; RINEHART; NAMIKOSHI; CHOI, 1994). Nesses aminoácidos L variáveis, o X é comumente leucina (L), arginina (R) ou tirosina (Y) e o Z é usualmente arginina (R), alanina (A) ou metionina (M) (NICHOLSON; BURCH, 2001). Embora várias isoformas de microcistinas possam estar sendo produzidas durante uma floração, a microcistina-LR é a de ocorrência mais comum e uma das variantes mais tóxicas (CARMICHAEL, 1992; FAWELL et al., 1993), na qual os L-aminoácidos são leucina e a arginina. Todas as microcistinas apresentam DL₅₀ (i.p.) entre 60 e 70 µg kg⁻¹ de peso corpóreo e sintomas similares de envenenamento (CARMICHAEL, 1994).

Na Tabela 4, Honda et al. (2006) apresentam os principais relatos sobre a ocorrência de cianobactérias tóxicas para diversas regiões do Brasil e o tipo de toxina encontrada, incluindo suas variantes estruturais em alguns casos.

Tabela 4 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas para diversas regiões do país, tipo de material analisado, % de amostras tóxicas, método de análise, toxina encontrada, valor detectado e referência (HONDA et al., 2006)

(continua)

Estado de procedência	Material examinado	Número de amostras (% tóxica) ^{*A}	Origem das amostras tóxicas	Método de análise	Toxina encontrada	Valor detectado	Observação	Referência
AL	Natureza (água bruta)	-	Lagoa Manguaba, Maceió	Bioensaio ^{*B}	MCYST	DL ₅₀ =154,28 mg kg ⁻¹	Dominância de <i>Microcystis aeruginosa</i>	Porfírio et al. 1999
BA, DF, RJ e SP	Linhagens	16 (75%)	DF, RJ e SP	Bioensaio	-	DL _{min} =9,09-577,00 mg kg ⁻¹	Linhagens tóxicas de <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>Oscillatoria</i> sp., <i>O. quadripunctulata</i> , <i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Synechocystis</i> sp. e <i>S. aquatilis</i>	Costa e Azevedo, 1994
CE, PR, RS e Uruguai	Natureza	14 (85,7%)	Todas as regiões	Inibição de AChE	anatoxina-a(S)	2,57-28,2 (100 °C)% de inibição da AChE	30-7.556 filamentos mL ⁻¹ <i>Anabaena spiroides</i> (500.000 filamentos.mL ^{-1C})	Yunes et al., 2003
MG	Natureza (séston), linhagens	-	Alfenas, Belo Horizonte, Carmo do Rio Claro, Confins, Medina, Montes Claros, Pedra Azul, REGAP, Ribeirão das Neves, Três Marias	Bioensaio, HPLC	MCYST-LR, CYL, GTX	-	Espécies presentes nas amostras tóxicas: <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>M. novacekii</i> , <i>M. viridis</i> , <i>M. wesenbergii</i> , <i>Nodularia</i> cf. <i>implexa</i>	Jardim et al., 2000
MG	Natureza	-	Ribeirão São Tomé, Alfenas	Bioensaio, HPLC	MCYST, CYL	DL=525 mg kg ⁻¹ , (691 mg kg ⁻¹ como dosagem subletal)	Dominância de <i>C. raciborskii</i> (20.900 e 48.014 céls mL ⁻¹) e <i>M. viridis</i> (3.000 e 4.500 céls.mL ⁻¹)	Jardim et al., 2001a
MG	Natureza (água bruta)	7 (85,7%)	Carmo do Rio Claro, Medina, Montes Claros, Ninheira, Vargem das Flores	Bioensaio, HPLC, ELISA	MCYST, STX	DL ₅₀ =95,2-450,0 mg kg ⁻¹ , 31,0/100,0 µg MCYST eq L ⁻¹ , 177,6 µg STX eq L ⁻¹	Táxons presentes nas amostras tóxicas: <i>Aphanizomenon tropicale</i> , <i>A. volzii</i> , <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Microcystis</i> spp., <i>M. aeruginosa</i> , <i>M. novacekii</i> , <i>M. protocystis</i> , <i>Radiocystis</i> sp., <i>R. fernandoi</i>	Jardim e Viana, 2003
MG e GO	Natureza (séston)	-	Represa São Simão	Bioensaio, ELISA	MCYST	DL ₅₀ =6,3 mg kg ⁻¹	Dominância de <i>Anabaena circinalis</i> e <i>Microcystis</i> sp. nas amostras com microcistinas	Jardim et al., 2001b
MG, PE, RJ e SP	Linhagens	26 (57,7%)	MG, RJ e SP	ELISA	MCYST	-	Linhagens tóxicas de <i>Microcystis</i> sp., <i>M. aeruginosa</i> , <i>M</i> cf. <i>panniformis</i> Dentre as 26 linhagens analisadas quanto à toxicidade, o gene <i>mcvB</i> esteve presente em 12 linhagens produtoras de microcistina e ausente em 3 linhagens tóxicas (FCLA16, FCLA174, FCLA450)	Bittencourt-Oliveira et al., 2001

Tabela 4 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas para diversas regiões do país, tipo de material analisado, % de amostras tóxicas, método de análise, toxina encontrada, valor detectado e referência (HONDA et al., 2006)

(continuação)

PA	Linhagens <i>Radiocystis fernandoi</i> SPC714	-	Reservatório Utinga, Belém	Bioensaio, HPLC	MCYST-LR	DL ₁₀₀ =60 mg.kg ⁻¹ , 3,83 µg MCYST-LR eq.mg ⁻¹	Primeira citação de toxicidade para <i>Radiocystis</i>	Vieira et al. 2003
PA	Natureza (água bruta), linhagens, água tratada	39 linhagens (43,6%), 32 natureza (31,2%)	Reservatório Utinga, Belém	Bioensaio, HPLC	MCYST-LR	DL ₁₀₀ =45 mg kg ⁻¹ (valor mínimo), 4,22 µg MCYST-LR eq mg ⁻¹ (valor máximo), 1,25 µg L ⁻¹ (maior valor na água bruta)	Primeira citação de floração de cianobactérias (20.000 céls mL ⁻¹) para região amazônica, linhagens tóxicas de <i>Microcystis viridis</i> e <i>Radiocystis fernandoi</i>	Vieira et al., 2005
PE	Linhagens de <i>Aphanocapsa</i> cf. <i>cumulus</i> ¹⁰	-	Reservatórios Engenheiro G. Pontes (Tabocas) e Sr. José Maria	Bioensaio, HPLC, ELISA	MCYST-LR	DL ₁₀₀ =600 mg kg ⁻¹ , 0,08-3,7 ng mg ⁻¹	Primeira citação de toxicidade para o gênero <i>Aphanocapsa</i>	Domingos et al., 1999
PE	Linhagem <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> ITEP-018	-	Reservatório Tabocas, Caruaru	Bioensaio, HPLC-ESIMS	STX, dcSTX, neoSTX e GTX6	9,30 UC mg ⁻¹ , 3,63 µg toxina mg ⁻¹	A linhagem ITEP-018 não produz cilindrospermopsina (hepatotoxina)	Molica et al., 2002
PE	Natureza (água bruta)	-	Reservatório Tapacurá, São Lourenço da Mata	Bioensaio, HPLC	STX, neoSTX e dcSTX	-	Floração de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Bittencourt-Oliveira & Molica 2003
PR	Natureza (água bruta), linhagem	-	Reservatórios Alagados e Pitangui, Ponta Grossa	Bioensaio, HPLC	STX, neoSTX, GTX1, GTX2, GTX3 e GTX4	-	Florações persistentes de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (3,5.10 ⁵ céls mL ⁻¹)	Yunes et al., 2003
PR	Natureza (água bruta), água tratada	50 (18%)	Sta. Terezinha do Iguaçu (Lago Itaipu e estação de tratamento), Lago do Museu do Mate, Passeio Público, Parque do Iguaçu e Praia S. Miguel do Iguaçu e lagoas em fazenda	ELISA	MCYST-LR	267-10.003 pg ml ⁻¹	<i>Microcystis aeruginosa</i> esteve presente em todas amostras	Hirooka et al., 1999
RJ	Linhagem <i>Synechocystis aquatilis</i> f. <i>salina</i> NPLB-2	-	Lagoa da Barra, Maricá	ELISA	MCYST	0,5-5,4 ng g ⁻¹	Morte de peixes pode estar associada com floração dominada por <i>S. aquatilis</i>	Nascimento e Azevedo, 1999
RJ	Natureza (água bruta e séston), tecido de peixe	-	Lagoa de Jacarepaguá	HPLC, ELISA	MCYST-LR	980,0 µg MCYST-LR eq L ⁻¹ (natureza) e 337,3 ng MCYST-LR eq g ⁻¹ (músculo) – valores máximos	Ocorreu bioacumulação de microcistinas nos tecidos musculares de <i>Tilapia rendalli</i>	Magalhães et al., 2001

Tabela 4 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas para diversas regiões do país, tipo de material analisado, % de amostras tóxicas, método de análise, toxina encontrada, valor detectado e referência (HONDA et al., 2006)

(continuação)

RJ	Natureza (água bruta e séston), tecido de peixe, caranguejo	-	Baía de Sepetiba	ELISA	MCYST-LR	0,12 (água) e 0,78 (séston) $\mu\text{g MCYST-LR eq L}^{-1}$ /103,3 (crustáceo) e 39,6 (peixe) $\mu\text{g MCYST-LR eq kg}^{-1}$ – valores máximos	Microcistinas presentes na água e séston provavelmente foram produzidas por cianobactérias picoplanctônicas; ocorreram concentrações de microcistinas acima do valor tolerável de consumo diário ($0,04 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)	Magalhães et al., 2003
RN	Natureza (séston), água tratada	-	Reservatório Armando Ribeiro Gonçalves e Canal Pataxó	HPLC, ELISA	MCYST, B1, C1, C2, GTX e STX	3,14 $\mu\text{g STX L}^{-1}$, 8,8 $\mu\text{g MCYST L}^{-1}$ (valores máximos para natureza), 0,16 $\mu\text{g MCYST L}^{-1}$ (água tratada)	Florações com dominância de <i>Aphanizomenon</i> spp., <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e <i>Microcystis</i> spp.	Costa et al., 2005
RS	Natureza (água bruta e séston)	-	Lagoa dos Patos	HPLC	MCYST-LR	0,276-0,469 $\mu\text{g MCYST-LR eq mg}^{-1}$ (séston), 44,1-289 $\mu\text{g MCYST-LR eq L}^{-1}$ (água)	Dominância de <i>Microcystis aeruginosa</i>	Yunes et al., 1998
RS	Natureza (água bruta e séston)	-	Lagoa dos Patos	Bioensaio, HPLC	MCYST	$\text{DL}_{50}=35,5\text{-}141,4 \text{ mg kg}^{-1}$, $\text{MCYST}_{\text{total(água)}}=0,65\text{-}244 \mu\text{g L}^{-1}$, $\text{MCYST}_{\text{total(séston)}}=0,161\text{-}1,121 \mu\text{g mg}^{-1}$	Predomínio de MCYST-LR/FR	Matthiensen et al., 1999
RS	Natureza (maio/2000)	-	Reservatório Duro, Camaquã	Bioensaio, HPLC	neoSTX, GTX1, GTX2	0,101 $\mu\text{g neoSTX g}^{-1}$, 1,8 $\mu\text{g GTX1 g}^{-1}$, 0,6 $\mu\text{g GTX2 g}^{-1}$, $\text{DL}=25 \mu\text{g kg}^{-1}$	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (490 filamentos mL^{-1}), <i>Pseudanabaena limnetica</i> (653 filamentos mL^{-1})	Yunes et al., 2003
	Natureza (fevereiro-março/2002)		Reservatório Duro, Camaquã	Bioensaio, HPLC	neoSTX, GTX 2/3	-	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> atingiu concentração de até 30.000 filamentos mL^{-1}	
	Natureza (2002)		Reservatório Duro, Camaquã	-	MCYST	0,31 $\mu\text{g MCYST eq L}^{-1}$	Gênero <i>Pseudanabaena</i>	
RS	Natureza (verão/1999)	-	Reservatório Salto, São Francisco de Paula; Rio Caí, Canela e Rio Sinos, Três Coroas	Bioensaio	STX	1,57 $\mu\text{g STX eq L}^{-1}$	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> atingiu até 60.000 filamentos mL^{-1} (Rio Sinos) e 103.603 filamentos mL^{-1} (Rio Caí), não foi detectada <i>cilindrospermopsina</i>	Yunes et al., 2003
SP	Natureza (amostra bruta)	5 (60%)	Lago Porto Feliz (Porto Feliz), Lago Chácara Bela Vista (Valinhos), Lago Indaiatuba (Indaiatuba)	Bioensaio ^{FE}	-	-	Morte de peixes e patos esteve associada às amostras analisadas/ <i>Lyngbya</i> sp., <i>Microcystis</i> sp., <i>Oscillatoria princeps</i> e <i>Raphidiopsis</i> sp. estiveram presentes nas amostras tóxicas	Beyruth et al., 1992

Tabela 4 - Principais relatos de cianobactérias tóxicas para diversas regiões do país, tipo de material analisado, % de amostras tóxicas, método de análise, toxina encontrada, valor detectado e referência (HONDA et al., 2006)

(conclusão)

SP	Linhagem <i>Microcystis aeruginosa</i> NPJB-1	-	Lago das Garças, São Paulo	HPLC, FABMS	MCYST-LR/LF	DL ₁₀₀ =31 mg kg ⁻¹	Primeiro relato de microcistinas para o Brasil	Azevedo et al., 1994
SP	Linhagens	12 (50%)	Reservatório Guarapiranga, São Paulo	Bioensaio	Hepatotoxina	DL ₅₀ =224-742 mg kg ⁻¹	Linhagens tóxicas de <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. incerta</i> , <i>Oscillatoria amphibia</i> , <i>O. limnetica</i> , <i>O. quadripunctulata</i> e <i>Phormidium</i> sp.	Zagatto et al., 1998
SP	Linhagens <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T1, T2 e T3	-	Taquacetuba (Billings) e Amparo	Bioensaio, HPLC-ESIMS	neoSTX, STX, GTX2, GTX3	3,3 UC mg ⁻¹ (linhagem T1), 1,5 UC mg ⁻¹ (linhagem T2), 0,35 nmol neoSTX/STX mg ⁻¹ (linhagem T1), 2,45 nmol STX/GTX2/GTX3 mg ⁻¹ (linhagem T2)	Primeira citação de produção de PSTs por <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Lagos et al., 1999
SP	Natureza (novembro e dezembro/1998)	-	Reservatório Taiaçupeba, São Paulo	Bioensaio, HPLC	STX, GTX	DL ₅₀ =38,4-130,3 mg kg ⁻¹ , 17 µg STX g ⁻¹ , 24 µg GTX g ⁻¹	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (6.000-12.820 filamentos mL ⁻¹)	Yunes et al., 2003
	Natureza (agosto/2002)		Reservatório Taiaçupeba, São Paulo	HPLC, inibição de AChE	STX, neoSTX, GTX2, GTX3, anatoxina-a(S)	0,01 µg STX L ⁻¹ , 0,03 µg neoSTX L ⁻¹ , 0,02 µg GTX2 L ⁻¹ , 0,03 µg GTX3 L ⁻¹ , 10,28% de inibição da AChE	<i>Anabaena</i> sp. (13.000 filamentos mL ⁻¹), <i>Microcystis</i> sp. (1.005 filamentos mL ⁻¹) e <i>Cylindrospermopsis</i> sp. (5.400 filamentos mL ⁻¹)	
SP	Natureza (água bruta)	18 (55,6%)	Reservatórios Billings e Guarapiranga	CCDC	MCYST	-	<i>C. raciborskii</i> , <i>M. aeruginosa</i> , e <i>M. panniformis</i> como espécies mais comuns	Carvalho et al. (comunicação pessoal)

*A apenas para levantamentos quantitativos. Quando ausentes, as percentagens de amostras tóxicas foram calculadas;

*B realizado com camundongo, a menos que seja especificado outro organismo;

*C inibição total (100%) da AChE foi encontrada na amostra Rio Grande – RS de 05.11.1995 com 500.000 filamentos mL⁻¹ de *Anabaena spiroides*;

*D de acordo com Komárek et al. 2001;

*E realizado também com *Daphnia similis*.

Legenda: **AChE**: acetilcolinesterase; **CCDC**: cromatografia em camada delgada comparativa; **CYL**: cilindrospermopsina; **DL**: dose letal; **ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; **eq**: equivalente; **ESIMS**: electron spray ionization mass spectrometry; **FABMS**: fast atom bombardment mass spectrometry; **GTX**: goniautoxina; **HPLC**: high performance liquid chromatography; **MCYST**: microcistina; **PSTs**: paralytic shellfish toxins; **STX**: saxitoxina; **UC**: unidade de camundongo.

2.4.1 Biossíntese de NRPSs, PKSs e sistemas híbridos

Na síntese ribossômica de peptídeo, a formação das pontes peptídicas é comandada pelos ribossomos, enquanto que o RNAm atua como molde, determinando a sequência dos aminoácidos no produto. Na síntese não-ribossômica, enzimas modulares multifuncionais catalizam o agrupamento dos peptídeos. Simultaneamente, elas servem como molde e utilizam diversos precursores (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996), especialmente elaborados para a incorporação na estrutura dos peptídeos (Figura 2). O tamanho desses peptídeos varia de 2 a 48 aminoácidos (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996), em contraste com os peptídeos ribossômicos, que podem conter mais de 3.000 resíduos de aminoácidos.

A biossíntese de metabólitos secundários envolve um sistema integrado entre genes que codificam para enzimas multifuncionais, atividades enzimáticas e formação de proteínas (VON DÖHREN, et al., 1997). Essas enzimas são os NRPSs, PKSs e/ou sistemas híbridos de NRPS/PKS, sendo encontradas em vários organismos, como fungos, bactérias e cianobactérias (DU; SÁNCHEZ; SHEN, 2001; HUTCHINSON; FUJII, 1995; TILLET et al., 2000).

A estrutura dessas enzimas é caracterizada por um arranjo modular, sendo encontrados de forma correspondente, blocos de seqüências repetitivas nos genes que as codificam (ETCHEGARAY, 1998; ETCHEGARAY et al., 2004b; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997). Em muitos dos agrupamentos desses genes a ordem das atividades codificadas é colinear com a estrutura do produto e o número de módulos é o mesmo que o número de resíduos do peptídeo final (VON DÖHREN et al., 1997; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). Consequentemente, é possível deduzir a composição dos peptídeos pela análise das seqüências dos genes de NRPS e/ou PKS. Para cianobactérias, essa estratégia têm sido por meio de oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados (CHRISTIANSEN et al., 2001; DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001; SILVA, 2006). A aplicação dessa abordagem molecular aumenta significativamente a chance de identificar novos metabólitos, cuja produção é dependente de genes correspondentes (BODE; MÜLLER, 2005).

As NRPSs, em geral, funcionam como uma linha de montagem industrial, na qual os aminoácidos que constituem a estrutura do peptídeo são incorporados sequencialmente por meio de uma série de reações enzimáticas parciais e repetitivas. Os módulos em NRPSs estão envolvidos nas etapas de alongamento da estrutura do metabólito, ou seja, na catálise de reações parciais. Assim, para a incorporação de um aminoácido em um peptídeo não-ribossômico, a enzima utiliza um módulo composto por cerca de 1.000 aminoácidos, que é subdividido em regiões menores, os domínios, envolvidas em reações enzimáticas específicas. Existe uma relação linear entre a sequência dos módulos e as etapas de biossíntese (Figura 3). O primeiro módulo de uma NRPS está envolvido na ativação e incorporação do aminoácido *N*-terminal e os demais módulos na incorporação dos aminoácidos subsequentes, obedecendo a uma colinearidade entre o aminoácido incorporado e o módulo responsável pela sua adição. As reações mínimas de NRPS são adenilação, tioesterificação e condensação (ETCHEGARAY, 1998; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997). As regiões envolvidas nessas reações parciais estão localizadas em domínios, ou seja, de adenilação (domínio A), de formação de tioésteres (domínio P) e de condensação (domínio C) (Figuras 4 e 5). O domínio de formação de tioésteres também é conhecido como proteína carreadora de peptídeos (PCP), em analogia à biossíntese de ácidos graxos, onde se tem a proteína carreadora de acilas (ACP) (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). Vários outros domínios já foram descritos embora não sejam essenciais para a incorporação de aminoácidos. Entre eles encontram-se os domínios de *N*-metilação e epimerização, onde o domínio de epimerização constitui uma variação do domínio de condensação. O domínio *N*-metiltransferase (NMT ou M) está envolvido na acilação do aminogruppo com um grupamento metila e, o de epimerização, na conversão de L-aminoácidos para a forma D. Ao término da síntese enzimática de peptídeos, o produto é liberado da enzima por meio da atividade de tioesterase, geralmente catalisada pelo domínio de tioesterase (T). Esse domínio T está comumente inserido no último módulo das NRPSs, e o NMT inserido entre o domínio de adenilação e o domínio PCP (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997) (Figuras 4 e 5).

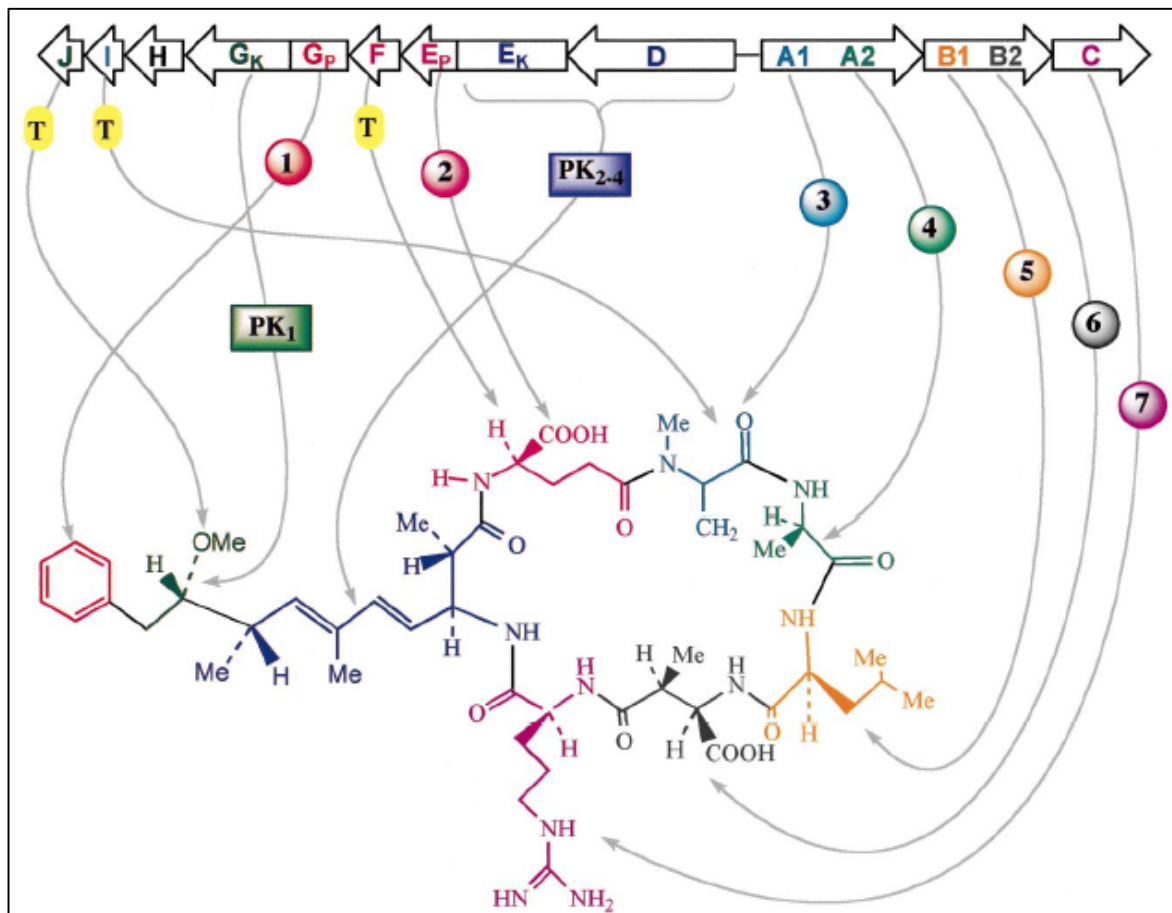


Figura 3 – Modelo proposto para a biossíntese de microcistina-LR, mostrando a organização do agrupamento gênico *mcyA-J* e a estrutura da toxina. Os círculos numerados indicam a ordem dos aminoácidos incorporados na cadeia crescente do peptídeo pelos genes que codificam para NRPSs (*mcyA*, *B*, *C*, *E_p*, *G_p*). Os retângulos numerados mostram a ordem das sínteses de policetídeos (*mcyG_k*, *E_k*, *D*). Fonte: KAEBERNICK; NEILAM, 2001.

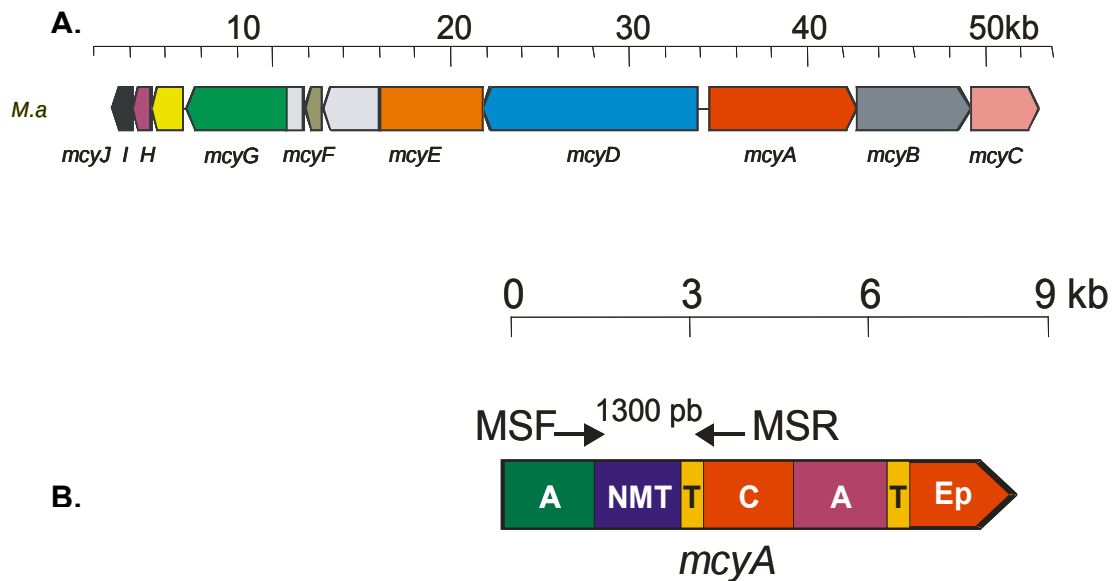


Figura 4 – **A.** Representação esquemática do agrupamento dos genes envolvidos na biossíntese de microcistinas. **B.** Destaque para o gene *mcyA*, **A**: domínio de adenilação, **NMT**: N-metiltransferase, **T**: tiometilação, **C**: condensação, **Ep**: epimerização. Fonte: Adaptado de TILLET; PARKER; NEILAN, 2001.

Após a expressão gênica, para as NRPSs tornarem-se funcionais, elas necessitam sofrer modificação pós-traducional, ocorrendo a incorporação do cofator 4'-fosfopantoteína (PAN) ao domínio PCP, por meio de uma ligação covalente do tipo fosfodiéster ao resíduo de serina (WALSH et al., 1997). Nessa modificação, ocorre a transformação de uma apoenzima (inativa) em haloenzima (ativa). A extremidade R-SH do cofator está envolvida na formação de intermediários ativos na forma de tioéster, importantes nas etapas de biossíntese de peptídeos não-ribossômicos, ácidos graxos e de substâncias policetídicas. Enzimas envolvidas na transferência do cofator PAN, chamadas de fosfopantotenil transferases, já foram descritas (WALSH et al., 1997) e estão, muitas vezes, associadas ao agrupamento de biossíntese de peptídeos não-ribossômicos.

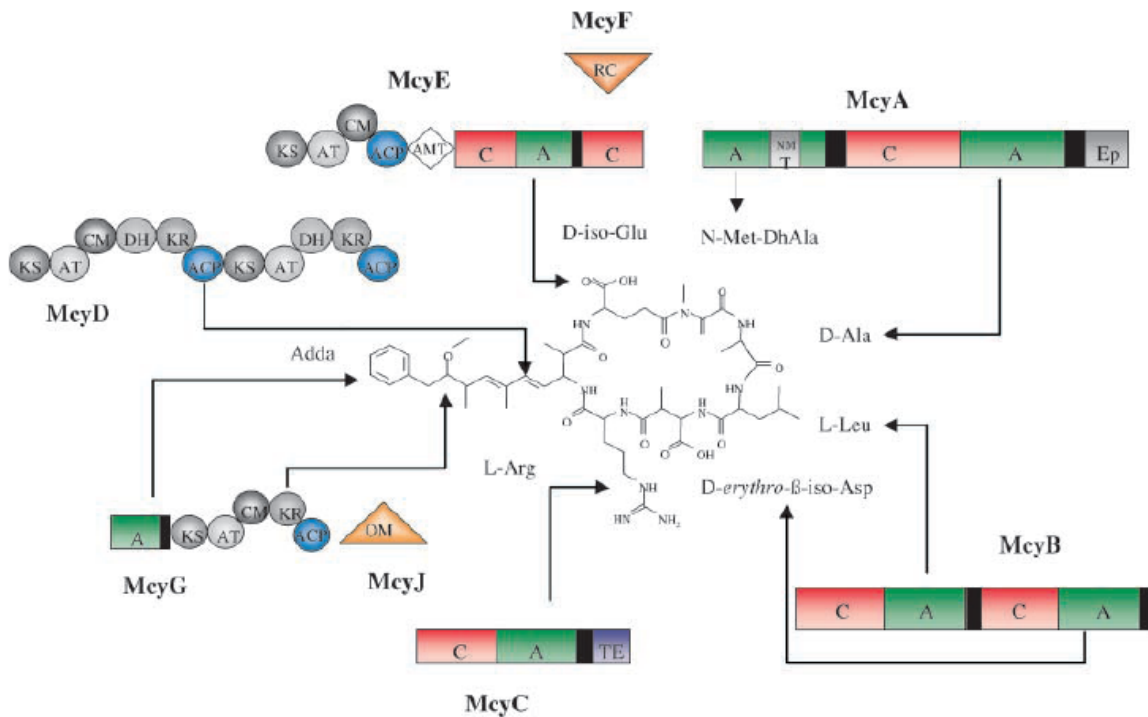


Figura 5 - Modelo para a formação da microcistina, mostrando os domínios em McyA–G, McyI e McyJ, correspondentes aos genes que os codificam (*mcyA–G*, *mcyI* e *mcyJ*). **KS**: β-cetoacilssintase, **AT**: aciltransferase, **ACP**: proteína carreadora de acila, **KR**: cetoacilreductase, **DH**: desidratase, **CM**: C-metiltransferase, **OM**: O-metiltransferase, **A**: adenilação aminoacil, **C**: condensação, **NM**: N-metiltransferase, **AMT**: aminotransferase, **RC**: racemase. O domínio de translocação das NRPSs é mostrado em preto. As setas indicam a posição de componentes individuais do complexo *mcy* para etapas únicas na biossíntese de microcistinas. Fonte: DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001.

A biossíntese dessas substâncias é bastante complexa, pois a expressão das NRPSs requer a expressão concomitante de outras enzimas, como a fosfopantotenil transferase, para que haja atividade enzimática. Em determinadas condições ambientais, a biossíntese pode ser induzida ou reprimida (KAEBERNICK et al., 2000; WIEDNER et al., 2003). Dessa forma, é importante ressaltar que a detecção de genes envolvidos na biossíntese de peptídeos não-ribossômicos não implica necessariamente na sua produção de metabólitos.

Na biossíntese de produtos policetídeos, mecanismos semelhantes aos da biossíntese de ácidos graxos são usados. As PKSs são classificadas de acordo com a semelhança estrutural com as sintases de ácidos graxos (FAS). As PKSs modulares são proteínas multifuncionais, classificadas como tipo I (PKS I), e são semelhantes ao FAS I de fungos e animais. As PKSs iterativas são complexos de multiproteínas e constituem-se de enzimas individuais que são utilizadas repetidamente, ou seja, de forma iterativa, sendo denominadas tipo II (PKS II), como uma FAS II encontrada em bactérias e plantas (JENKE-KODAMA et al., 2005). As PKSs do tipo III são as mais simples e são tipicamente encontradas em plantas e bactérias (MOFFITT; NEILAN, 2003).

Os policetídeos sintases do tipo I são predominantemente encontrados em cianobactérias, actinobactéria, mixobactéria e pseudomonades (BODE; MÜLLER 2005). As PKSs I, assim como as NRPSs, são enzimas multifuncionais, que apresentam uma estrutura modular, e as regiões envolvidas nas reações parciais que estão localizadas em domínios, sintetizam a maioria dos produtos policetídeos não-aromáticos.

A principal diferença entre NRPSs e PKSs reside no fato de que PKSs condensam ácidos carboxílicos a uma cadeia crescente para a formação de um produto, enquanto que NRPSs adicionam aminoácidos.

A biossíntese de PKSs ocorre pela ação de, no mínimo, três domínios por módulo. Os domínios responsáveis pelas reações mínimas são: transferase de acila (AT), proteína carreadora de acila (ACP) e cetossintase (KS). O domínio AT é responsável pela ativação e incorporação da unidade extensora, que é então covalentemente ligada ao carreador fosfopantoteína do domínio ACP adjacente (Figura 5). Para que ocorra a condensação, o domínio de cetossintase (KS) captura o

grupamento acila do domínio ACP anterior via ataque nucleofílico deste carbânion em relação a acila já existente no domínio e condensa os dois grupamentos (KEATING; WALSH, 1999). Ao término da síntese enzimática de policetídeos, o produto é liberado do complexo PKS por meio da atividade de tioesterase, catalisada pelo domínio de tioesterase (T) (DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001). Vários outros domínios já foram descritos embora não sejam essenciais para a incorporação de ácidos carboxílicos. Entre os domínios adicionais estão: cetoreductase (KR), orto-metiltransferase (O-MT) para O-metilação, desidratase (DH), enoil redutase (ER), acil CoA ligase (AL), aminotransferase (AMT) e metiltransferase (MT) (DU; SÁNCHEZ; SHEN, 2001; JENKE-KODAMA et. al., 2005). Acetato e malonato são utilizados pelas PKSs como iniciadores de cadeia, assim como propionato, butirato, benzoato, cinamato e aminoácidos também podem ser iniciadores de cadeia. Malonato, metilmalonato e etilmalonato são utilizados como unidades de elongação, contribuindo assim para a diversidade de compostos produzidos por essas enzimas (SIMPSON, 1995).

Nos sistemas híbridos de NRPS/PKS, os módulos de NRPS são seguidos por módulos de PKS, sendo que a condensação ocorre através do domínio de cetossintase da PKS, entre um ácido carboxílico e um aminoácido. Da mesma forma, existem sistemas PKS/NRPS, nos quais o domínio de condensação da NRPS é responsável pela condensação entre um aminoácido e um ácido carboxílico. Existem dois tipos de sintetases híbridas, em uma delas os módulos das NRPSs e PKSs são ligados covalentemente (Tipo I), e no outro os módulos das NRPSs e PKSs são proteínas separadas fisicamente (Tipo II). Em alguns sistemas híbridos foi detectado um grupo de multienzimas complexas que apresentam um módulo de PKS e de NRPS em um mesmo ORF ("Open Reading Frame" - quadro aberto de leitura) (DITTMANN et al., 1999; SILAKOWSKI et al., 1999). Entretanto, até o momento poucos agrupamentos gênicos codificadores de híbridos de NRPS/PKS são conhecidos.

2.4.2 Genes envolvidos na biossíntese de microcistinas

Na biossíntese de microcistinas participam as NRPSs, PKs e sistemas híbridos (NRPS-PKS e PKS-NRPS), onde todas as sintetases identificadas são modulares (ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000). Além da presença de genes de

NRPSs ser comum em cianobactérias (CHRISTIANSEN et al., 2001), uma única linhagem pode produzir vários peptídeos não-ribossômicos simultaneamente, pela provável co-expressão destes genes em loci distintos (WELKER; CHRISTIANSEN; VAN DÖHREN, 2004).

O alto grau de conservação na estrutura primária dessas enzimas também é evidenciado em nível de DNA. Assim, com a informação prévia sobre o agrupamento dos genes biossintéticos de um determinado peptídeo, é possível desenhar iniciadores capazes de amplificar regiões particularmente distintas dos demais genes. Para as cianobactérias, isso foi possível a partir da descoberta dos agrupamentos dos genes *mcy*, responsáveis pela produção de microcistinas em *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix*, e de nodularina em *Nodularia* (CHRISTIANSEN et al., 2003; MOFFITT; NEILAN, 2004; NISHIZAWA et al., 2000; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000).

O agrupamento *mcy* observado na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* PCC7806, produtora de microcistina LR, localiza-se no cromossomo e contém 55 kb de DNA, capaz de codificar dez (10) ORFS (quadro aberto de leitura), *mcyA-J* (TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). Dois *operons* transcritos em direções opostas foram identificados: *mcyD-J* (*operon* maior), que contém sete (7) ORFs, e *mcyA-C* (*operon* menor), com três (3) ORFs (Figura 6). Os genes *mcyA-G* e *J* codificam módulos de PKS/NRPS (envolvidos nas etapas de elongação de policetídeos/polipeptídeos) e domínios acessórios adicionais (envolvidos em modificações na cadeia de policetídeos/polipeptídeos), enquanto que o *mcyH* codifica para uma proteína putativa homóloga a um transportador ABC, cuja função especulativa seria o transporte extracelular ou subcelular de microcistinas (FIORE et al., 2005). O gene *mcyB* codifica uma NRPS e sua inativação resultou na ausência de produção de microcistina (TILLET et al., 2000). Outros genes de NRPSs são *mcyA* e *mcyC*, e apenas um gene de PKS, o *mcyD*, foi identificado. Genes codificadores de híbridos NRPS/PKS são dois, *mcyE* e *mcyG*.

A comparação entre os agrupamentos *mcy*, responsáveis pela produção de microcistinas nos gêneros *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix*, mostrou que a maioria dos genes estavam numa ordem diferente, nem todos eles estavam presentes nos três

organismos e a identidade entre eles foi baixa, indicando a necessidade de caracterizá-los para cada organismo (ROUHIAINEN et al., 2004) (Figura 6).

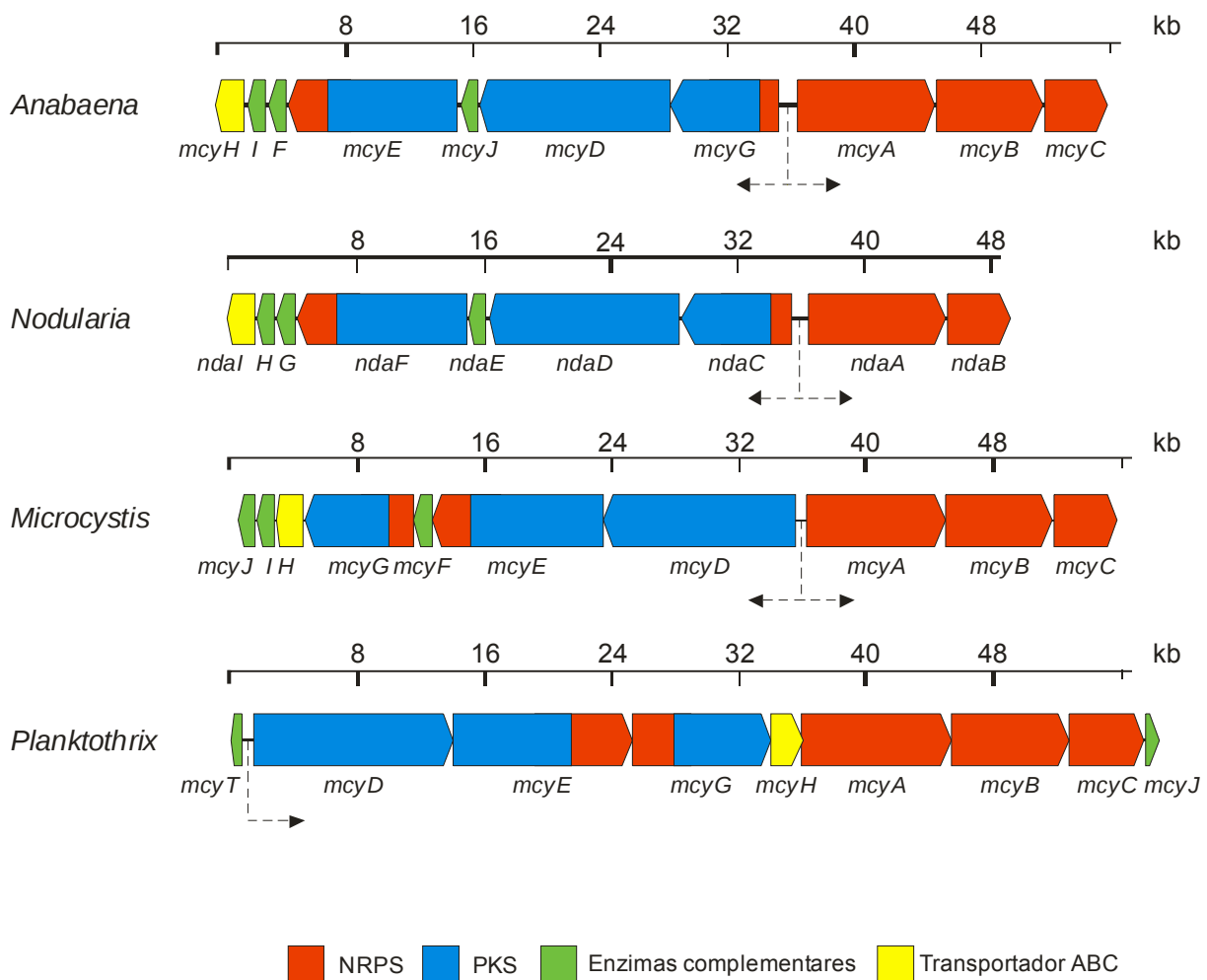


Figura 6 – Agrupamento de genes que codificam para a biossíntese de microcistinas em *Anabaena* (ROUHIAINEN et al., 2004), *Microcystis* (TILLET et al., 2000), *Planktothrix* (CHRISTIANSEN et al., 2003), e nodularina em *Nodularia* (MOFFITT; NEILAN, 2004). As setas indicam o início da transcrição a partir de regiões promotoras putativas. (Fonte: DITTMANN; BÖRNER, 2005).

Inicialmente, as seqüências de nucleotídeos que codificam para o domínio de adenilação do gene *mcyB*, um dos responsáveis pelas diferentes isoformas da microcistina, foram consideradas as mais promissoras como alvo na amplificação por PCR de genes envolvidos na sua síntese. Os primeiros conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores tiveram como alvo parte dessa região e foram denominados FAA/RAA e core1/core2R (degenerados) (NEILAN et al., 1999; NISHIZAWA et al., 1999). Embora esses dois conjuntos de iniciadores tenham mostrado boa correlação com a produção da toxina, foram observados vários problemas de especificidade, possivelmente devido a alta identidade das seqüências da região de adenilação do gene *mcyB* com outros domínios de adenilação de NRPSs (DITTMANN et al., 1997; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001) e a ocorrência de domínios múltiplos de adenilação em *Microcystis* sp. tóxica e não tóxica (NISHIZAWA et al., 1999).

Buscando um domínio de NRPS incomum, Tillett, Parker e Neilan (2001) confeccionaram um conjunto de iniciadores (MSF/MSR) que tinham como alvo o domínio da *N*-metiltransferase (NMT), presente somente numa região do gene *mcyA* (Figura 4). Utilizando esse domínio, Baker et al. (2002) detectaram linhagens tóxicas de *Anabaena* e *Microcystis* sp. na represa de Malpas, Austrália, e demonstraram a rapidez do método usado na identificação de cianobactérias em amostras ambientais, dispensando a necessidade de seu isolamento e/ou cultivo.

Novos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores estão sendo descritos na literatura com freqüência, principalmente diante do crescente aumento no conhecimento de genes envolvidos na biossíntese de cianotoxinas e uma revisão sobre o assunto pode ser encontrada em Fiore et al. (2005). Em vários estudos que empregaram alguns desses conjuntos de iniciadores, a técnica de PCR foi aplicada com sucesso em amostras ambientais, visando detectar precocemente florações de *Microcystis* potencialmente tóxicas (BAKER et al., 2001; 2002; NONNEMAN; ZIMBA, 2002; PAN et al., 2002). No Brasil, essa mesma abordagem já foi usada por Lorenzi (2004) na represa Billings (São Paulo, SP), com o conjunto de iniciadores OmetF/OmetR, e por Bittencourt-Oliveira (2003) em outros reservatórios. Recentemente, seqüências do gene *mcyD* (KAEBERNICK et al., 2002; OUAHID; PÉREZ-SILVA; del CAMPO, 2005; RANTALA et al., 2004) e *mcyE* (OUAHID; PÉREZ-SILVA; del CAMPO, 2005; RANTALA

et al., 2004, 2006) também estão sendo usadas para essa finalidade, inclusive em ambientes naturais.

Num estudo bastante abrangente, Ouahid, Pérez-Silva e del Campo (2005) desenvolveram uma metodologia capaz de distinguir *Microcystis* produtoras das não produtoras de microcistinas usando uma PCR multiplex. Seis seqüências gênicas do agrupamento *mcy*, três delas que codificam para NRPSs (genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyC*), e três outras que codificam para PKs (genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*), foram selecionadas para o estudo. Com essa finalidade, sendo novos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores foram desenvolvidos e testados usando DNA purificado, cultura de células e amostras ambientais. Os *amplicons* esperados foram obtidos para *Microcystis* produtoras de microcistinas, mas estiveram ausentes nas não produtoras. Segundo os autores, esses resultados suportam a idéia de que a presença de vários genes *mcy* em *Microcystis* podem ser usados como critério para acessar o potencial de toxicidade em espécies ambientais, contribuindo significativamente para simplificar os testes de toxicidade.

2.5 Métodos moleculares para detecção de genótipos potencialmente tóxicos

Uma alternativa aos métodos tradicionais de isolamento e cultivo de cianobactérias para sua identificação, seguidos de bioensaios e/ou ensaios físico-químicos, para detecção de suas toxinas, são as técnicas moleculares.

A amplificação por PCR de regiões de genes constitutivos em cianobactérias, como RNAr 16S, *cpcBA*-IGS, *rpoC1*, tem sido bastante usada para estudos filogenéticos em diversos ambientes. No entanto, essa abordagem não é válida para a detecção de linhagens produtoras e não-produtoras de toxinas.

Genes que participam da biossíntese de cianotoxinas estão sendo cada vez mais requisitados para a discriminação de genótipos potencialmente tóxicos, tanto em laboratório como no campo. A recente descoberta dos genes *mcy* levou ao desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores de PCR cada vez mais específicos, tanto para a detecção de linhagens tóxicas em um determinado gênero (DITTMANN; MEIBNER; BÖRNER, 1996; KURMAYER et al., 2002; MOFFITT; NEILAN, 2001; NONNEMAN; ZIMBA, 2002; PAN et al., 2002; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001) ou,

mais recentemente, para a detecção global de cianobactérias produtoras de microcistinas, com subsequente designação do gênero por RFLP (HISBERGUES et al., 2003) ou análise das seqüências.

Outros métodos moleculares usados para a detecção e discriminação de cianobactérias potencialmente tóxicas já foram apresentados na literatura e alguns deles encontram-se sumarizados na Tabela 5.

Para monitoramento ambiental, técnicas usando colônia ou filamento foram desenvolvidas na tentativa de superar as falhas quantitativas decorrentes do isolamento seletivo de cianobactérias (BAKER et al., 2002; KURMAYER et al., 2002; PAN et al., 2002). Em *Microcystis*, a sensível combinação da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF e PCR/colônia correlacionou positivamente a produção de microcistinas com a presença de genes *mcy*, não só em laboratório, mas também no campo. Porém, análises por MALDI-TOF nem sempre são possíveis, especialmente em países em desenvolvimentos, devido ao custo elevado. Técnicas baseadas em PCR são de custo mais baixo, como por exemplo a combinação PCR/RFLP (HISBERGUES et al., 2003), sendo uma alternativa viável em muitos casos.

Essas técnicas, de um modo geral, têm oferecido uma abordagem inovadora, sensível e específica, com potencial de aplicação em ambientes naturais. No entanto, apesar de identificar cianobactérias ou florações potencialmente tóxicas usando oligonucleotídeos específicos do genoma funcional, a técnica de PCR por si só não é quantitativa.

2.5.1 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Recentemente, uma técnica molecular denominada Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), que fornece dados quantitativos do produto amplificado, foi usada para detectar e quantificar *Microcystis* e genótipos produtores de microcistinas em um lago na Alemanha (KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003) e também *Microcystis* e *Anabaena* em vários lagos da Finlândia (VAITOMAA et al., 2003). Na reação de qPCR, os *amplicons* produzidos são marcados com moléculas fluorescentes ou corantes que se ligam ao DNA e quantificados a cada ciclo.

Tabela 5 - Estudos genéticos usando genes da biossíntese de microcistinas/nodularinas para a detecção e discriminação de cianobactérias potencialmente tóxicas (DITTMANN; BÖRNER, 2005)

Gênero	Método	Origem do DNA	Alcance de detecção	Resolução do método	Referência
<i>Microcystis</i>	Hibridização por Southern	linhagens de laboratório	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas de <i>Microcystis</i>	qualitativo	Meissner et al., 1996
<i>Microcystis</i>	PCR, sequenciamento	linhagens de laboratório	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas de <i>Microcystis</i>	qualitativo	Dittmann et al., 1996
<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Aphanizomenon</i>	Hibridização por Dot Blot, PCR, sequenciamento	linhagens de laboratório	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas em diferentes gêneros	qualitativo	Neilan et al., 1999
<i>Microcystis</i>	PCR, sequenciamento	linhagens de laboratório	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas de <i>Microcystis</i>	qualitativo	Tillett et al., 2001
<i>Nodularia</i>	PCR, sequenciamento	linhagens de laboratório	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas de <i>Nodularia</i>	qualitativo	Moffitt e Neilan, 2001
<i>Microcystis</i>	PCR, sequenciamento	linhagens de laboratório e material de campo	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas de <i>Microcystis</i>	semiquantitativo	Pan et al., 2002
<i>Microcystis</i>	PCR	material de campo	detecção de linhagens tóxicas de <i>Microcystis</i>	semiquantitativo	Nonneman e Zimba, 2002
<i>Microcystis</i>	PCR, RFLP, sequenciamento	material de campo	diferenciação de colônias tóxicas e não-tóxicas de <i>Microcystis</i>	semiquantitativo	Kurmayer et al., 2002
<i>Microcystis</i>	PCR	material de campo	detecção de linhagens tóxicas de <i>Microcystis</i>	qualitativo	Baker et al., 2002
<i>Microcystis</i>	PCR, sequenciamento	material de campo	diferenciação de colônias tóxicas e não-tóxicas de <i>Microcystis</i>	semiquantitativo	Kurmayer et al., 2003
<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Nodularia</i>	PCR, RFLP, sequenciamento	linhagens de laboratório e material de campo	diferenciação de linhagens tóxicas e não-tóxicas e indicação para diferentes gêneros	semiquantitativo	Hisbergues et al., 2003
<i>Microcystis</i>	PCR em Tempo Real	linhagens de laboratório e material de campo	detecção de linhagens tóxicas de <i>Microcystis</i>	quantitativo	Kurmayer e Kutzenberger, 2003
<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i>	PCR em Tempo Real	linhagens de laboratório e material de campo	detecção de linhagens tóxicas de <i>Microcystis</i> e <i>Anabaena</i> e indicação para diferentes gêneros	quantitativo	Vaitomaa et al., 2003

A qPCR foi inicialmente desenvolvida com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse (DÖLKEN et al., 1998; HEID et al., 1996; HIGUCHI et al., 1993) e tornou-se amplamente utilizada para quantificar bactérias de importância clínica, como *Listeria monocystogenes* (BASSLER et al., 1995), *Yersinia pestis* (HIGGINS et al., 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (DESJARDIM et al., 1998) e *Borrelia burgdorferi* (PAHL et al., 1999), dentre outras. Como vantagens, a técnica tem se destacado por não requerer a detecção de banda de DNA em gel de agarose, uma vez que a detecção do *amplicon* é feita durante a reação, minimizando a possibilidade de contaminação da amostra. Também apresenta flexibilidade de reação para PCR multiplex com o uso de diferentes fluoróforos associados aos iniciadores e/ou sondas, além de se mostrar extremamente sensível e capaz de fornecer os resultados com grande rapidez.

Os estudos em cianobactérias utilizando a técnica de qPCR ainda são poucos (FOULDS et al., 2002; FURUKAWA et al., 2006; KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003; RINTA-KANTO et al., 2005; SCHOBER; KURMAYER, 2006; SCHOBER et al., 2007; VAITOMAA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2007), mas vários contemplam sua aplicação em amostras naturais, apresentando resultados bastante promissores.

Rinta-Kanto et al. (2005), por exemplo, usaram uma qPCR bplex para seqüências de DNAr 16S e do gene *mcyD*, e sondas *Taq-man* como sistema de detecção, para quantificar *Microcystis* sp. e genótipos produtores de microcistinas em florações ocorridas no lago Erie, nos Estados Unidos, durante os anos de 2003 e 2004. Nesse método, uma sonda de oligonucleotídeos é marcada duplamente com uma molécula “repórter” R na porção 5’ e outra molécula “quencher” (Q) no final 3’. Quando em proximidade, a molécula Q, que atua com um silenciador, absorve a fluorescência emitida pela molécula R, uma vez excitada. Durante a PCR, a sonda se liga à seqüência do DNA a ser amplificado. Quando a *Taq* polimerase encontra essa sonda durante a síntese da nova fita de DNA, a enzima, que possui atividade exonucleotídica 5’ → 3’, remove a molécula R que emitirá fluorescência livremente (Figura 7a). Nessa situação, as moléculas R (“Repórter”) e Q (“Silenciador”) são separadas fisicamente e um detector mede a fluorescência acumulada da molécula R durante a PCR por meio de uma fibra óptica presente no tubo de reação (PE Applied Biosystems, 1998). A fluorescência é, então, correlacionada com a quantidade de produto formado em tempo real durante a amplificação, quando a PCR é considerada quantitativa (HIGUCHI et al., 1993).

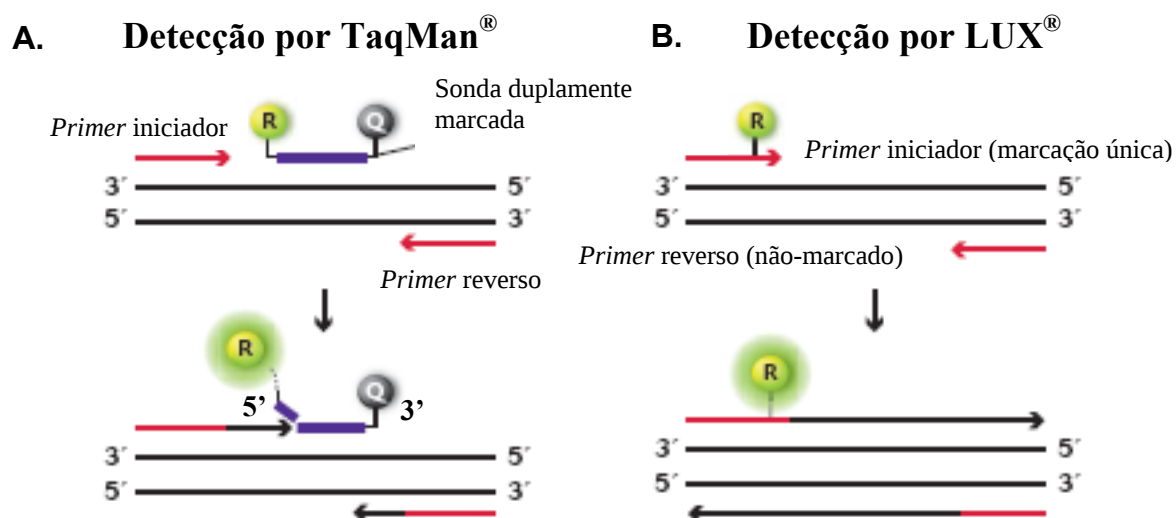


Figura 7 – Sistemas de detecção de fluorescência: **A.** Taq-man; **B.** Oligonucleotídeos LUX. **R:** “Repórter”, molécula que é facilmente excitada; **Q:** “Quencher”, molécula que aceita a energia do fluoróforo (“Repórter”) e a dissipa na forma de luz ou calor. Fonte: Manual do fabricante INVITROGEN™.

A forma mais simples de monitorar a PCR durante a amplificação é utilizando fluorescência. Os sistemas de detecção de fluorescência para a técnica de qPCR podem dispor de mecanismos usando sondas/oligonucleotídeos duplamente marcados (*Taq-man*, Molecular Beacons, etc.) (Figura 7a) ou apenas uma marcação (oligonucleotídeos LUX, sondas FRET, etc.) (Figura 7b), além de outras moléculas que se intercalam na dupla fita de DNA (SYBR Green I) e emitem fluorescência.

O efeito LUX (Light Upon extension) apresenta um mecanismo inovador para análises em tempo real, além de apresentar menor custo em relação às sondas *Taq-man*, por exemplo, as quais requerem um conjunto de iniciadores e uma sonda duplamente marcada. No sistema LUX, um dos oligonucleotídeos é marcado com fluoróforo (“Repórter”), enquanto que o outro não recebe a marcação, e são sintetizados de acordo com o DNA ou RNA de interesse. Além disso, o sistema LUX não se baseia na atividade 5' → 3' exonuclease intrínseca da enzima *Taq* DNA Polimerase. Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos, portanto com a utilização de fluoróforos diferentes é possível acessar alvo também distintos. Esses oligonucleotídeos

apresentam 20-30 bases, e são projetados com o fluoróforo próximo à extremidade 3', numa estrutura em grampo (estrutura secundária). Essa configuração do *primer* marcado, que representa um avanço em relação ao formato de sondas duplamente marcadas, inibe a emissão de fluorescência (*quenching*, silenciador) (NAZARENKO et al., 2002) na ausência de alvo específico (Figura 8). No entanto, a presença desse alvo leva à perda da estrutura, mas a emissão de fluorescência em fita simples ainda é baixa. Quando o *primer* é incorporado ao produto de PCR em fita dupla, a emissão de fluorescência do fluoróforo é desbloqueada (*dequenching*), resultando num aumento significativo de sinal. Esse aumento de sinal, que é baseado nos efeitos da estrutura primária e secundária dos oligonucleotídeos nas propriedades de emissão de fluorescência do fluoróforo conjugado, é a base para a plataforma de detecção LUX. Dessa forma, a fluorescência detectada é correlacionada com a quantidade de produto formado em tempo real durante a amplificação e a PCR passa a ser quantitativa.

Por meio da qPCR é possível obter quantificação relativa ou absoluta para as amostras em análise. A quantificação relativa é a abordagem mais simples, e indica variações quantitativas em uma sequência alvo quando comparada a um gene referência, estimando alterações em nível de expressão do RNAm. A quantificação absoluta é mais exigente, mas expressa a quantidade exata de ácidos nucleicos alvo presentes numa amostra em relação a uma unidade específica (por exemplo, ng/reacção, células/mL), sendo mais fácil a comparação de dados provenientes de diferentes ensaios e/ou laboratórios (FREEMAN; WALKER; VRANA, 2002; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLÉ, 2002).

O estabelecimento de uma curva de calibração é a abordagem mais comum para uma quantificação relativa, e pode ser obtida entre a fluorescência acumulada nos produtos de PCR *versus* o número de ciclos, assemelhando-se a uma curva de crescimento de bactérias. A quantificação absoluta também pode ser realizada por esse método, porém requer que quantidades absolutas de uma amostra padrão sejam obtidas por métodos independentes.

O parâmetro mais importante para a quantificação propriamente dita é o valor do limiar de fluorescência do método. Esse limiar refere-se ao ciclo no qual a reação atinge o início da fase exponencial, ou seja, quando há aumento de sinal associado à formação exponencial do produto de PCR, e é denominado *Cycle Threshold* (Ct). A fluorescência emitida abaixo desse valor é considerada ruído de fundo

(background) (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996). O valor de C_t sempre é calculado durante a fase exponencial da reação de amplificação e é fundamental para a construção da curva de calibração, na qual o eixo x corresponde ao log da concentração de DNA/RNA e o eixo y aos valores de C_t .

Diante desses avanços tecnológicos, até o momento, nenhum método relativamente específico e quantitativo foi desenvolvido para o rápido diagnóstico da presença de cianobactérias tóxicas em reservatórios brasileiros.

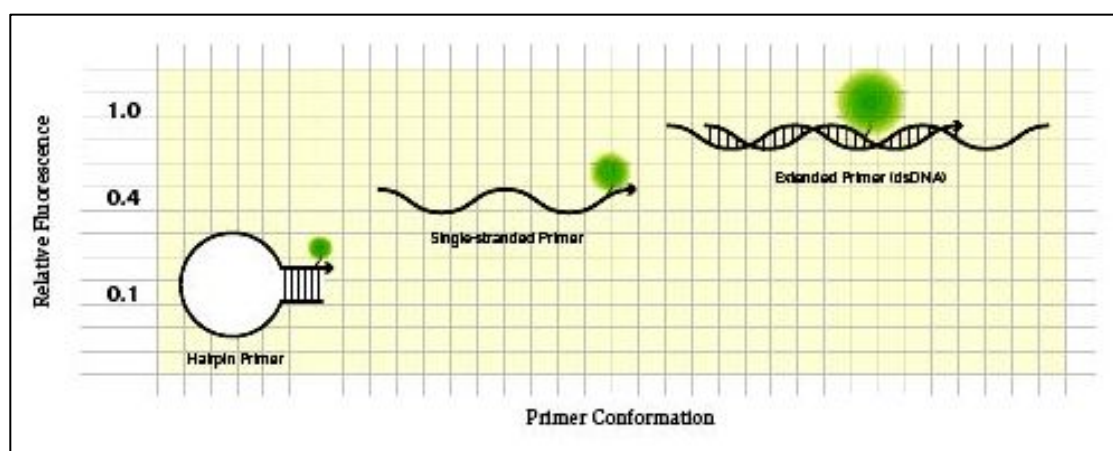


Figura 8 – Efeitos da estrutura primária e secundária dos oligonucleotídeos nas propriedades de emissão de fluorescência de um fluoróforo conjugado. Na estrutura secundária, a alça é complementar à seqüência alvo, enquanto que as hastes são complementares entre si. Fonte: Manual do fabricante INVITROGEN™.

2.6 Cianobactérias no reservatório Salto Grande

O reservatório Salto Grande encontra-se localizado na Bacia do Rio Piracicaba, pertencente ao 5º grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo. As águas desse reservatório destinam-se principalmente à recreação e geração de energia elétrica, e influenciam a qualidade da água das captações de Americana e Piracicaba, localizadas a jusante. Recebe grande aporte de efluentes domésticos e industriais pontuais, e agrícolas difusos de municípios a montante, especialmente Campinas e do Pólo Petroquímico de Paulínia.

Vários estudos já foram realizados sob diversos aspectos para a caracterização desse corpo hídrico e podem ser encontrados em Espíndola, Faria e

Leite (2004).

A presença de cianobactérias no reservatório Salto Grande tem sido registrada principalmente pelo grupo de monitoramento da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB-Campinas) e várias espécies já foram identificadas (AGUJARO, 2007) (Tabela 6).

Estudos realizados por Deberdt (2002) mostraram a predominância das cianobactérias em relação às algas fitoplanctônicas e 19 táxons foram relacionados durante o período avaliado (Tabela 6). *Pseudanabaena mucicola*, *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena crassa* foram os táxons mais abundantes. A autora concluiu que a estrutura da comunidade fitoplanctônica em Salto Grande, nos pontos amostrados, foi governada pela estabilidade da coluna d'água, disponibilidade de luz subaquática, mobilidade dos organismos e interações biológicas, e que o desenvolvimento de *M. aeruginosa* pode ter sido mais favorecido pela alta estabilidade da coluna d'água do que pelas concentrações de nutrientes. Houve também correlação positiva entre a concentração de microcistinas e a densidade de cianobactérias.

Tucci, Deberdt e Deberdt (2004) analisaram os resultados obtidos por cinco outros autores no período compreendido entre 1997 e 2000, cujos estudos foram desenvolvidos nesse reservatório. Todos os trabalhos que quantificaram o fitoplâncton e as cianobactérias, expressaram os resultados em organismos mL⁻¹. As cianobactérias compreenderam 52 táxons identificados (Tabela 6), destacando a elevada presença de espécies potencialmente tóxicas de *M. aeruginosa*, *Microcystis* spp, *Anabaena* spp e *Cylindrospermopsis raciborskii*. Sua dominância nos diferentes períodos estudados também foi grande, especialmente nas porções mais lânticas do reservatório, porém houve diferença quanto aos aspectos sazonais avaliados pelos diferentes autores, ora com dominância apenas no verão, ora com dominância ao longo de todo o ano, com picos no verão e quedas no inverno. Essas diferenças podem ser explicadas pela periodicidade das amostragens, feitas a curto prazo (semanais) ou prazos mais longos (mensais, semestrais ou anuais). Em estudo da comunidade fitoplanctônica realizado por Souza (2000), numa frequência semanal, durante três anos, a dominância das cianobactérias ao longo do ano, sem variação sazonal marcante, caracterizou avançado processo de eutrofização no reservatório.

Tabela 6 – Relatos de táxons de cianobactérias para o reservatório Salto Grande, Americana, SP, Brasil

(continua)

Táxons	Deberdt, 2002	Tucci et al., 2004	Agujaro, 2007
<i>Anabaena circinalis</i> Rabenh. ex Born. & Flah. 1888	x	x	x
<i>A. crassa</i> (Lemmermann) Kom. – Leg. & Cronb. 1992	x	x	x
<i>A. cf smithii</i> (Komárek) Watanabe		x	
<i>A. planctonica</i> Brunnthaler 1903		x	
<i>Anabaena</i> sp. Bory de Saint-Vincent & Flahault 1886	x		
<i>Anabaenopsis</i> sp. (Woloszynska) Mill. 1923	x		
<i>Aphanizomenon tropicalis</i> Horecká et Komárek 1979		x	
<i>A. issatchnikoi</i> (Ussat.) Pr – Lavrenko 1962			x
<i>A. gracile</i> (Lemmerm.) Lemmerm. 1907			x
<i>Aphanocapsa delicatissima</i> W. & G.S. West 1912		x	x
<i>A. elachista</i> W. & G.S. West 1912		x	
<i>A. cf. koordesii</i> Strom, Nyt Mag. 1923	x	x	
<i>A. cf incerta</i> (Lemm.) Cronb. Et Kom. 1994			x
<i>Aphanocapsa</i> sp. Nägeli 1849		x	
<i>Aphanothece</i> spp. Nägeli 1849	x	x	
<i>Borzia</i> sp Cohn ex Gom. 1892	x		
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann 1898	x	x	
<i>C. minor</i> (Kützinger) Nägeli 1849		x	x
<i>C. minutus</i> (Kützinger) Nägeli 1849		x	
<i>C. turgidus</i> (Kützinger) Nägeli 1849		x	
<i>Chroococcus</i> spp.		x	
<i>Coelosphaerium evidenter-marginatum</i> Azevedo e Sant'Anna 1999		x	x
<i>C. kuetzingianum</i> Nägeli 1849		x	
<i>Cyanodictium planctonicum</i> Meyer 1994		x	
<i>Cyanosarcina</i> sp. Kováčik 1988	x	x	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya et S. Raju. 1972	x	x	
<i>Geitlerinema acutissimum</i> (Kuffer) Anagn. & Kom 1989	x		
<i>G. cf unigranulatum</i> (R.N. Singh) Komárek et Azevedo			x
<i>Gloecapsa</i> sp. Kützinger 1843		x	
<i>Jaaginema quadripunctulatum</i> (Brühl & Biswas) Anagn. & Kom. 1988		x	
<i>J. subtilissimum</i> (Kützinger ex De Toni) Anagn. Et Kom. 1988			x
<i>Limnothrix planctonica</i> (Woloz.) Meffert 1988		x	
		x	
<i>Limnothrix</i> sp. Meffert 1988			
<i>Lyngbya hieronymusii</i> Lemmermann 1905		x	

			(conclusão)
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing 1845	x	x	
<i>M. insignis</i> Skorbatov 1923		x	
<i>M. tenuissima</i> Lemmermann 1898		x	x
<i>M. trolleri</i> Bachmann 1920			x
<i>Merismopedia</i> spp.		x	
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846	x	x	x
<i>M. cf. lamelliformis</i> Holsinger 1954	x	x	
<i>M. lamelliformis</i> Holsinger 1954		x	
<i>M. panniformis</i> Kom. et al. 2002			x
<i>M. protocystis</i> Crow 1923		x	x
<i>M. botrys</i> Teil. 1942			x
<i>M. wesenberghii</i> (Kom.) Kom. In Kondrateva 1968			x
<i>Microcystis</i> sp. Kützing ex Lemmerm 1907		x	
<i>Oscillatoria lacustris</i> (Klebahn) Geitler 1925		x	
<i>Oscillatoria</i> spp.		x	
<i>Planktolynghya</i> sp. Anag. Et Kom. 1988			x
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988			x
<i>P. mougeotii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988	x	x	
<i>Planktothrix</i> sp. Ang. Et Kom. 1988		x	
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn 1916	x	x	
<i>P. mucicola</i> (Naumann & Hüber-Pestalozzi) Bourrelly 1970	x	x	x
<i>Pseudanabaena</i> spp.		x	
<i>Radiocystis</i> sp Skuja 1948	x		
<i>R. fernandoi</i> Komárek et Komárkova-Legnerová 1993		x	x
<i>R. geminata</i> Skuja 1948		x	
<i>Rhabdogloea ellipsoidea</i> Schröder 1917	x	x	
<i>R. smithii</i> (R. et. F Chodat) Komárek 1983		x	
<i>Romeria okensis</i> (Meyer) Hindák 1975		x	x
<i>Romeria victoriae</i> Kom & Cronb.			x
<i>Snowella lacustris</i> (Chodat) Komárek et Hindák 1988		x	
<i>Sphaerocavum brasiliensis</i> Azev. Et Sant'Anna 2003			x
<i>Spirulina</i> sp. Turpin ex gomont 1892		x	
<i>Synechocystis</i> sp. Sauvageau 1892		x	
<i>Synechococcus elongatus</i> (Nägeli) Nägeli 1849		x	x
<i>Synechococcus</i> sp. nägeli		x	
<i>Tychonema cf. bourrelly</i> (Lund) Anagnostidis & Komárek 1988		x	

As florações de *Microcystis* spp foram mais prolongadas no inverno, quando são registrados os menores valores de precipitação e ventos menos intensos, o que provocaria uma maior estabilidade da coluna d'água. Uma importante consideração levantada pela autora foi a hipótese das macrófitas funcionarem como barreiras protetoras contra ventos e correntes, podendo contribuir para o aumento das florações de *Microcystis* spp, especialmente nas margens, fato freqüentemente observado no local.

Linhages de *M. aeruginosa* sob cultivo, isoladas de Salto Grande, foram analisadas taxonomicamente por Honda (2005) num estudo considerado pioneiro, pois os trabalhos anteriores abordaram mais os aspectos ecológicos, contendo apenas relatos dos táxons observados, sem contudo apresentarem sua caracterização morfológica e morfométrica. Recentemente, Agujaro (2007) utilizaram essa mesma abordagem, além ter caracterizado filogeneticamente 13 linhagens de cianobactérias isoladas desse reservatório com base em seqüências de RNAr 16S. A autora também concluiu que as variações ambientais sazonais e características morfométricas condicionaram a ocorrência das populações de cianobactérias, que eram dominadas por espécies com elevado potencial toxigêncio, oferecendo riscos à balneabilidade.

Apesar dos vários levantamentos sobre ocorrência e da presença constante de cianobactérias no reservatório Salto Grande, nenhum método molecular quantitativo foi desenvolvido para prever possíveis florações e auxiliar no monitoramento ambiental, de forma a contribuir para a avaliação de riscos à saúde.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de desenvolver oligonucleotídeos iniciadores com o sistema de detecção LUX, capazes de acessar a diversidade de cianobactérias do gênero *Microcystis* em ambientes aquáticos brasileiros, regiões dos genes de ficocianina (*cpcBA*-IGS) e microcistina (domínio *N*-metiltransferase do gene *mcyA*) de linhagens de *Microcystis*, mantidas em monocultivo, no laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, foram seqüenciadas. Essas seqüências foram alinhadas com outras disponíveis em banco de dados público e usadas para o desenho desses oligonucleotídeos.

3.1 Caracterização molecular da região *cpcBA*-IGS em linhagens brasileiras de *Microcystis*

3.1.1 Cianobactérias em monocultivo

As linhagens de cianobactérias selecionadas para este estudo encontram-se depositadas nas coleções de cultura do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, Piracicaba, SP, Instituto de Botânica – SPC, Secretaria do Meio Ambiente, SP, e Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ (Tabela 7). A manutenção desses organismos foi feita em frascos *Erlenmeyer* com capacidade para 125 mL, contendo 50 mL de meio de cultura líquido ASM-1 (Tabela 8, GORHAM et al., 1964), sob iluminação fluorescente constante de 40 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.1.2 Extração de DNA genômico de cianobactérias

A extração de DNA genômico das linhagens de *Microcystis* foi feita seguindo o protocolo descrito por Fiore et al. (2000), usando uma suspensão de células (3 mL), coletadas na fase de crescimento exponencial, após centrifugação a 10.000 $\times g$, durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o pélete foi liofilizado e usado para a extração de DNA.

Tabela 7 - Linhagens brasileiras de *Microcystis* utilizadas no sequenciamento da região *cpcBA*-IGS

Ordem	Linhagens (7)	Origem	Fonte
Chroococcales ⁽¹⁾	<i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777	Reservatório Billings, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPJB1	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	Univ. Federal do Rio de Janeiro
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPCD1	ETE Cidade de Deus, Rio de Janeiro, RJ	Univ. Federal do Rio de Janeiro
	<i>Microcystis botrys</i> SPC759	Reservatório Taiaçupeba, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis panniformis</i> SPC702	Lago das Garças, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis protocystis</i> SPC697	Reservatório Guarapiranga, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis</i> sp. NPLJ4	Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ	Univ. Federal do Rio de Janeiro

⁽¹⁾ BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001

Tabela 8 - Meio de cultura ASM-1 usado na manutenção das cianobactérias (GORHAM et al., 1964)

Solução estoque A		Peso (g)
NaNO ₃	1,70	Completar para 200 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
Solução estoque B		
K ₂ HPO ₄ ou	0,87	Completar para 100 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,14	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ou	1,78	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,33	
Solução estoque C		
H ₃ BO ₃	2,48	Completar para 100 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	
ZnCl ₂	0,335	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
CuCl ₂	0,0014	
Solução estoque D		
EDTA.Na ₂	1,86	Completar para 100 mL

Nota: Para cada litro de ASM-1:

Estoque A 20,0 mL

Estoque B 2,0 mL

Estoque C 0,1 mL

Estoque D 0,4 mL

O volume deverá ser completado para 1L e a solução autoclavada. Após a autoclavagem, o pH deverá ser 7,0.

Após a extração, aliquotas (5 µL) de DNA foram acrescidas de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) e a integridade destes foi verificada em gel de agarose 1,0%, contendo brometo de etídio (0,3 µg mL⁻¹ de gel), após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (TBE1X: Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita pelo programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM Multilmager" (BioRad, Hercules, CA, EUA). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular Lambda DNA/EcoR I + Hind III (Promega, Madison, WI, EUA). O material foi armazenado a temperatura de -20°C até o procedimento seguinte.

3.1.3 Amplificação por PCR da região *cpcBA*-IGS

A amplificação de seqüências parciais dos genes *cpcB* e *cpcA*, e dos nucleotídeos do respectivo espaço gênico, do *operon* da ficocianina (PC) foi

realizada usando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: PC β F (5'-GGCTGCTTGTGTTTACGCGACA-3') e PC α R (5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3') (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). As amplificações foram feitas em solução contendo tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 0,2 mM de cada DNTP, 3,0 mM MgCl₂, 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 10 ng de DNA genômico, 5 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 μ L. A reação foi processada em um termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de amplificação foram 92°C/2 min; 40 ciclos 92°C/40 s, 55°C/50 s, 72°C/2 min e extensão final a 72°C/8 min. A verificação do tamanho e quantificação dos *amplicons* resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), após corrida eletroforética, conforme descrito acima.

3.1.4 Clonagem

A clonagem dos fragmentos de *cpcBA*-IGS produzidas na reação de PCR foi feita usando o *kit* "pGEM[®]-T Easy Vector Systems" (Promega). O vetor utilizado foi o pGEM[®]-T de 3015 pb que é oferecido linearizado com *EcoR* V e com adição de 3' terminal timidina em ambos os lados. Essas terminações 3'-T aumentam a eficiência da ligação. Esse vetor contém sítios de resistência a ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento do *LacZ*. Os procedimentos para a clonagem seguiram as instruções do fabricante, disponíveis no Manual de Instrução do "pGEM[®]-T Easy Vector Systems".

3.1.5 Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto em células competentes de *E. coli* DH5 α foi feita por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Aliquotas de 10 μ L do produto de ligação e 50 μ L de suspensão de células competentes foram gentilmente misturadas em microtubo de 1 mL, esterilizado, e incubado em gelo durante 30 minutos. Após esse tempo, o microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e mantido por 30 segundos, sem agitação. Em seguida, foi novamente resfriado em gelo por 2 min. Posteriormente, adicionou-se 250 μ L de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), a temperatura ambiente, e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm.

As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB (Luria Broth), solidificado com ágar 1,5%, contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de meio. As placas foram incubadas por 14-16 horas, a temperatura de 37°C.

3.1.6 PCR usando colônias

Após o plaqueamento em meio LB com ampicilina e X-Gal, quatro colônias de cor branca de cada linhagem de *Microcystis* foram utilizadas para novas reações de PCR, visando a confirmação da presença dos fragmentos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 μL de reação de PCR, realizada com os iniciadores: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'); M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'). As amplificações foram feitas em solução contendo tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl_2 , 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 5 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Milli-Q, Millipore), esterilizada, para um volume final de 25 μL . A reação foi feita no mesmo termociclador já descrito e as condições de amplificação foram 94°C/5 min; 25 ciclos 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes foi feita em gel de agarose 1,0% - TBE 0,5X, conforme descrito no item 3.1.2, com o auxílio do padrão de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

3.1.7 Extração de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial das células de *E. coli* DH5 α que continham os insertos foram feitas pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina, de acordo com Birnboim e Doly (1979). As colônias brancas que fizeram parte da seleção foram transferidas para 3 mL de meio LB, líquido, com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de meio), e cultivadas por 14-16 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em microtubos de 1,5 mL foram centrifugados 1,5 mL da cultura produzida a 10.000 $\times g$ por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi novamente repetido. O pélete formado foi ressuspenso em 100 μL de solução I (2,5 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0; 2,0 mL de EDTA 0,5 M; 0,9 g de glucose e água ultrapura para volume final de 100 mL), gelada.

Em seguida, 200 μL de solução II (NaOH 0,2 N e SDS 1%, na proporção 1:1) foram adicionados aos microtubos e os volumes foram gentilmente misturados por inversão. Após 5 minutos de incubação em gelo, foram acrescentados aos microtubos 150 μL de solução III (60 mL de acetato de potássio 5 M; 11,5 mL de ácido acético glacial e água ultrapura para volume final de 100 mL), também gelada. Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 12.000 xg durante 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Nessa etapa, o material sobrenadante foi tratado com 1,5 μL de RNase (10 mg mL^{-1}) a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol 100%, gelado, e realizou-se a centrifugação (10.000 xg , 15 min). Após o descarte do sobrenadante, o pélete foi lavado com 750 μL de etanol 70%, gelado, e centrifugado a 12.000 xg por 5 minutos. Depois de seco, o pélete foi ressuspensionado em 30 μL de água ultrapura, esterilizada. Os plasmídios extraídos foram armazenados a -20°C até a próxima etapa.

3.1.8 Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos de interesse foi feita com o *kit* “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmol do iniciador T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ou SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'), 1 μL de “DYEnamic”, 2 μL de tampão “Save Money” 2,5 X (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 μL . As condições de amplificação foram 25 ciclos $95^\circ\text{C}/20 \text{ s}$, $50^\circ\text{C}/15 \text{ s}$, $60^\circ\text{C}/1 \text{ min}$. Após a reação, as amostras foram precipitadas conforme manual de instruções do *kit* “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” e inseridas no seqüenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, para o sequenciamento dos fragmentos de DNA por aproximadamente 2:30 horas. Os dados gerados pelo seqüenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

3.1.9 Processamento das seqüências

As seqüências obtidas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) e assentadas em *contigs* por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em ambiente operacional Linux. Essas seqüências foram posteriormente comparadas com outras seqüências previamente depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

3.2 Caracterização molecular do domínio NMT do gene da sintetase de microcistinas (*mcyA*) em linhagens brasileiras de *Microcystis*

3.2.1 Cianobactérias em monocultivo e extração de DNA genômico

As linhagens de *Microcystis* analisadas quanto a presença do domínio NMT (gene *mcyA*) são apresentadas na Tabela 9. As condições para a manutenção desses organismos seguem as descritas no item 3.1.1 e a extração do DNA genômico foi feita conforme relatado no item 3.1.2.

3.2.2 Amplificação por PCR do domínio NMT do gene *mcyA*

As amplificações do domínio NMT do gene da sintetase de microcistinas (*mcyA*) foram feitas com o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores OMETF (5'-TTATTCCAAGTTGCTCCCCA-3') e OMETR (5'-GGAAATACTGCACAAC CGAG-3') (LORENZI, 2004), tendo como alvo uma pequena região bastante variável deste domínio (NEILAN, B.A. – comunicação pessoal). As reações de amplificação foram feitas em solução contendo tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 0,2 mM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl₂, 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 ng de DNA genômico, 5 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Milli-Q, Millipore), esterilizada, para um volume final de 25 µL. As reações foram feitas no termociclador já descrito, nas seguintes condições: 94°C/4 min, 30 ciclos 94°C/20 s, 50°C/30 s, 72°C/1 min e extensão final a 72°C/7min.

Tabela 9 – Linhagens brasileiras de *Microcystis* utilizadas no sequenciamento do domínio NMT do gene *mcyA*

Ordem	Linhagens (11)	Origem	Fonte
Chroococcales ⁽¹⁾	<i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777	Reservatório Billings, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis aeruginosa</i> NPJB1	Lagoa das Garças, São Paulo, SP	Univ. Federal do Rio de Janeiro
	<i>Microcystis botrys</i> SPC759	Reservatório Taiaçupeba, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis panniformis</i> SPC702	Lago das Garças, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis protocystis</i> SPC697	Reservatório Guarapiranga, São Paulo, SP	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis</i> sp. NPLJ4	Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ	Univ. Federal do Rio de Janeiro
	<i>Microcystis viridis</i> SPC647	Reservatório Utinga, Belém, PA	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis viridis</i> SPC660	Reservatório Utinga, Belém, PA	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis viridis</i> SPC716	Reservatório Utinga, Belém, PA	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis viridis</i> SPC719	Reservatório Utinga, Belém, PA	Instituto de Botânica
	<i>Microcystis viridis</i> SPC722	Reservatório Utinga, Belém, PA	Instituto de Botânica

⁽¹⁾ BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001

Para a verificação do tamanho e quantificação dos *amplicons* foi utilizado o marcador de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A integridade dos produtos amplificados foi verificada em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 3.1.2.

3.2.3. Sequenciamento e análise das seqüências do domínio NMT

Os procedimentos de clonagem, transformação e sequenciamento do domínio NMT (*mcyA*) das linhagens de *Microcystis* selecionadas para este estudo seguem os mesmos detalhados nos itens anteriores.

As seqüências resultantes foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20), conforme o item 3.1.9, e comparadas com outras previamente depositadas no *GenBank* por meio de análise BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

3.3 Análise de microcistinas

A produção de microcistinas pelas *Microcystis* selecionadas para este estudo foi avaliada por meio do ensaio imunológico ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), usando o *Kit* placa Microcistina (Beacon Analytical Systems, Inc., Portland, ME, EUA). Alíquotas de 2 mL das culturas de *Microcystis*, tomadas no final da fase de crescimento exponencial, foram transferidas para tubos de ensaio e submetidas à ação de microondas (potência máxima) por 1 minuto. Logo após, as amostras foram centrifugadas (10.000 xg, 1 minuto) e o sobrenadante coletado. Do volume total, 100 µL de cada amostra, em triplicatas, foram usados para análise pelo método ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante.

Esse *kit* é um teste laboratorial semi-quantitativo, para análise de microcistinas LR, RR, YR e nodularinas em água. Anticorpos policlonais ligam-se às microcistinas e ao conjugado microcistina-enzima. A microcistina na amostra compete com o conjugado microcistina-enzima por um número limitado de sítios de ligação de anticorpos. O resultado é lido colorimetricamente em um leitor de placas a partir de padrões que alcançam o valor máximo de 2,0 µg L⁻¹. Amostras que apresentaram resultados acima desse valor, na primeira leitura, foram refeitas e diluições foram usadas até que o

resultado estivesse condizente com a curva de calibração. Os resultados finais foram multiplicados pelo respectivo fator de conversão, seguindo as recomendações do fabricante.

3.4 Desenvolvimento de oligonucleotídeos LUX

Todas as seqüências produzidas para o gênero *Microcystis*, sete para a região *cpcBA*-IGS e 11 para o domínio NMT da sintetase de microcistinas (*mcyA*), foram usadas para o desenvolvimento dos oligonucleotídeos LUX.

O alinhamento seqüencial múltiplo foi feito pelo programa Clustal W 1.8 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e contou com as seqüências obtidas em nosso laboratório, além de outras disponíveis no *GenBank* do NCBI até o último acesso em 29/06/2006. Todas as seqüências (*cpcBA*-IGS e NMT) de *Microcystis* em monocultivo foram cuidadosamente selecionadas dessa base de dados, dando-se preferência àquelas cujos trabalhos já haviam sido publicados. Em geral, informações moleculares sobre cianobactérias brasileiras depositadas em banco de dados público ainda são escassas. Quinze linhagens brasileiras de *Microcystis* caracterizadas para a região *cpcBA*-IGS existentes no *GenBank* (BITTENCOURT-OLIVEIRA; OLIVEIRA; BOLCH, 2001) foram incluídas no alinhamento. Até a data do último acesso (29/06/2006), não haviam sido disponibilizadas ainda no *GenBank* seqüências para a região do domínio NMT de linhagens brasileiras.

Após o alinhamento, a seqüência consenso foi usada para o desenho dos oligonucleotídeos LUX (*Forward*) e oligonucleotídeos não-marcados (*Reverse*) por meio do *software* LUX™ Designer (Invitrogen). Esses iniciadores, denominados QPCβF/QPCαR e QmcyA-NMTF/QmcyA-NMTR, foram projetados para amplificar fragmentos da região *cpcBA*-IGS e do domínio NMT do gene *mcyA*, respectivamente, com capacidade para quantificar o número de células e indicar o potencial de produção de microcistinas nos organismos analisados.

Os oligonucleotídeos LUX (*Forward*) foram marcados uma única vez com 6-carboxifluoresceína (FAM, *cpcBA*-IGS) ou 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE, NMT). Esses fluoróforos foram posicionados próximos à extremidade 3' na estrutura em forma de grampo, e permitiram a detecção simultânea de

dois produtos distintos de qPCR a cada ciclo em reações biplex. A escala de síntese foi de 50 η moles para os oligonucleotídeos LUX e de 25 η moles para os oligonucleotídeos não-marcados.

De acordo com o fabricante, a excitação das moléculas FAM e JOE ocorre em comprimentos de onda de 490 e 520 η m, enquanto a emissão de fluorescência ocorre a 520 e 550 η m, respectivamente.

3.4.1 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores

A especificidade dos iniciadores desenvolvidos foi avaliada por meio de análise BLAST, disponível no *NCBI* (ALTSCHUL et al., 1990), usando as seqüências previamente depositadas nesta base de dados.

3.5 Padronização da metodologia

3.5.1 Culturas de cianobactérias

A linhagem *Microcystis* sp. NPLJ4 foi selecionada para a padronização do método, em função dos altos teores de microcistinas apontados pelo teste ELISA. Foram inoculados 10 mL de uma pré-cultura, obtida conforme procedimentos descritos no item 3.1.1, em 1 L de meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964). A cultura foi mantida sob crescimento por 15 dias.

Outras duas linhagens, *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. aeruginosa* NPCD1, foram usadas para verificar a funcionalidade do método, sendo as culturas adquiridas de acordo com os procedimentos acima.

3.5.2 Determinação do número de células

Do volume total (1 L), três alíquotas de 100 mL de cultura foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar com capacidade para 130 mL e preservadas com lugol (10 g de iodo puro, 20 g de iodeto de potássio, 20 mL de ácido acético glacial e água destilada para volume final de 200 mL), usando 0,3 a 1,0 mL 100 mL^{-1} de amostra, dependendo da concentração do material para a contagem.

A contagem do número de células foi feita em microscópio invertido

(invertoscópio) (Leica, mod. DM IRB, Westzlar, Alemanha), usando ocular com aumento de 10x, objetiva com 40x ou 63x e contraste de fase, seguindo a técnica de Utermöhl (APHA, 1998; CHORUS; BARTRAM, 1999). Câmaras de Utermöhl com capacidade para 2 mL foram utilizadas para todas as amostras. Os volumes preservados com lugol foram homogeneizados e diluídos, conforme a necessidade, e em seguida usados para o preenchimento total dessas câmaras. Foram utilizadas 3 câmaras para a enumeração da amostra, as quais foram contadas 5 vezes de maneira independente. Os resultados dessas determinações foram multiplicados pelo respectivo fator de conversão, calculado de acordo com a Norma Técnica da CETESB L5. 303 (CETESB, 2005).

Dependendo da quantidade de células, o fundo da câmara foi analisado parcialmente por meio da contagem de 10 campos aleatórios, com o auxílio do retículo de *Whipple* calibrado. Os campos foram distribuídos aleatoriamente no fundo da câmara de contagem por coordenadas geradas em uma tabela de números aleatórios e posicionadas nas réguas horizontais e verticais que se encontram no *charriot* do microscópio. O número de campos depende do erro aceitável. Ao se iniciar a contagem, é essencial avaliar o nível de precisão requerido. Para um limite de confiança de 95%, o erro de contagem expresso em porcentagem pode ser estimado pela fórmula:

$$\text{Erro de contagem (\%)} = 2 / \sqrt{N} \times 100\%$$

Onde,

N é o número de unidades contadas

Para este estudo, foram enumeradas no mínimo 400 células a fim de se obter um erro de $\pm 10\%$ para um intervalo de confiança de 95%, assumindo uma distribuição randômica destas células no fundo da câmara de contagem. A expressão dos resultados foi dada em número de células mL⁻¹, conforme a Portaria MS 518, em notação científica com dois algarismos significativos. Os valores obtidos para *Microcystis* sp. NPLJ4 foram referência para a curva de calibração na técnica de qPCR.

3.5.3 Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico das cianobactérias *Microcystis* sp. NPLJ4, *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. aeruginosa* NPCD1 foi feita a partir de células liofilizadas, as quais foram obtidas de uma suspensão de 300 mL de células, divididas em subamostras de 100 mL, usando o Power Soil™ DNA KIT (MoBio, Solana Beach, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Por oferecer um protocolo relativamente simples e rápido, além de DNA com boa qualidade, esse *kit* foi essencial para a extração de DNA, posteriormente usado nos ensaios por qPCR.

Alíquotas (5 µL) de cada DNA extraído tiveram sua integridade verificada em gel de agarose 1%, conforme item 3.1.2. Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III (Promega). Já a sua quantificação foi feita por comparação com o padrão de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e as amostras foram armazenadas à -20°C até a próxima etapa.

3.5.4 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As reações de amplificação foram feitas em solução contendo Platinum® Quantitative PCR Supermix UDG 2X (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂, oligonucleotídeos QPCβF/QPCαR e QmcyA-NMTF/QmcyA-NMTR em concentrações finais de 100 e 200 nM, respectivamente, 15 ng de DNA (concentração inicial para *Microcystis* sp. NPLJ4) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) para volume final de 25 µL de reação, conforme as recomendações do fabricante. Diluições em série (variando de 1:10 a 1:10⁵) foram feitas a partir da concentração inicial de DNA (15 ng) da *Microcystis* sp. NPLJ4. Para *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. aeruginosa* NPCD1, a concentração analisada foi de 1,5 ng reação⁻¹ de DNA (diluição 1:10). As condições de ciclagem foram 1 ciclo 50°C/2 min, 1 ciclo 95°C/2 min, 50 ciclos 95°C/15 s e 60°C/30 s. A análise da curva de desnaturação dos produtos amplificados de qPCR foi feita na faixa de 60-95°C. Todas as reações foram processadas com 4 repetições em equipamento Corbett Research Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Life Science, Cambridge, Reino Unido), disponível no Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP.

3.5.5 Desenvolvimento da curva de calibração

A curva de calibração baseou-se na concentração de células da cianobactéria *Microcystis* sp. NPLJ4 na amostra, pré-determinada pela técnica de Utermöhl, e foi estabelecida relacionando-se as concentrações conhecidas de DNA (em equivalente celular) com os respectivos valores do limiar de fluorescência (*Ct - threshold cycle*) para cada diluição.

3.6 Detecção e quantificação de *Microcystis* potencialmente tóxicas em amostras da natureza

3.6.1 Área de estudo e procedimentos de amostragem

O estudo foi desenvolvido no reservatório Salto Grande (Figura 9), localizado no município de Americana, SP, e o ponto de coleta foi alocado na Praia dos Namorados (S22°42'15,3"; W47°16'00,3" – altitude: 550m).

Foram realizadas 4 coletas (16/12/06, 19/04/07, 06/09/07 e 14/11/07) ao longo de 1 ano para abranger eventos de seca e cheia que pudessem influenciar o desenvolvimento de florações. Duas coletas (setembro e novembro de 2007) foram também realizadas visando a obtenção de amostras com menor concentração de células de cianobactérias. Todas as coletas foram feitas na sub-superfície, sempre no período da manhã, entre 9:00 e 10:00 horas, em balde de plástico com capacidade para 20 L, e uma quantidade de 4L foi imediatamente transferida para recipiente de vidro âmbar com tampa. Em seguida, foram transportadas rapidamente para o laboratório e, após serem homogeneizadas por inversão (20 vezes), foram redistribuídas: alíquotas de 300 mL foram destinadas à contagem de células pela técnica de Utermöhl, 300 mL para a extração de DNA total e 2 mL para análise de microcistinas.



Figura 9 – Ilustração do reservatório Salto Grande e do local de coleta na Praia dos Namorados (seta em vermelho). (Fonte: Google Earth, acesso em 15/11/2006, às 17:00hs).

3.6.2 Contagem de células, extração de DNA total e qPCR

Para a quantificação das células de *Microcystis* sp., três alíquotas de 100 mL dessas amostras foram preservadas com lugol, conforme descrito anteriormente. Uma solução de hidróxido de potássio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, na proporção de 1:1, foi usada para a dissolução da mucilagem das colônias de *Microcystis*, aquecendo-se posteriormente em banho maria a $80-90^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, quando as amostras estavam muito densas. Dependendo da quantidade de material, o fundo da câmara foi analisado parcialmente

por meio da contagem de transectos ou campos aleatórios (10 ou 15 campos) com o auxílio do retículo de *Whipple* calibrado. Os demais procedimentos adotados seguem os já descritos no item 3.5.2.

A extração de DNA total foi feita em triplicatas (100 mL cada), após centrifugação a 12.000 xg, durante 15 min, a 4 °C. Os péletes formados foram lavados três vezes com água ultrapura, esterilizada, e liofilizados. O método de extração foi o mesmo usado no item 3.5.3

A detecção e quantificação por qPCR de genótipos PC e *mcy* nas amostras ambientais de água foram feitas usando 1,5 ng reação⁻¹ de DNA, seguindo os procedimentos descritos no item 3.5.4.

3.6.3 Análise de microcistinas

As análises para a detecção de microcistinas nas amostras ambientais de água foram feitas de acordo com o item 3.3, por meio de ensaio imunológico ELISA, o qual é específico para microcistinas LR, RR, YR e nodularinas.

3.7 Análise estatística

A estatística descritiva utilizada para a análise dos resultados expressos em valores de *Ct* (qPCR) ou número de células mL⁻¹ (contagem microscópica e qPCR) foi a média aritmética como medida de tendência central e o desvio padrão (DP) como medida do grau de dispersão absoluto dos dados.

Os valores expressos em número de células, cuja determinação foi feita por microscopia óptica, foram transformados em log para a normalização dos dados e o método dos quadrados mínimos foi usado para estabelecer a relação funcional entre as variáveis de qPCR, *Ct* e número de células na amostra (como uma variável independente), por meio de regressão linear simples, em Microsoft Excel. Esse método baseia-se na menor soma de quadrados dos erros, obtendo-se assim a equação da reta de quadrados mínimos ou reta de regressão linear simples, que é dada por: $y = \alpha + \beta x$, sendo α o coeficiente de posição na qual a reta corta o eixo y e β o coeficiente de regressão linear, que determina a declividade da reta. O coeficiente β fornece ainda a variação em y causada pela variação de uma unidade em x.

A comparação entre as médias (número de células mL⁻¹) dos valores de PC, obtidos pela técnica de Utermöhl e por qPCR para cianobactérias isoladas (*M. aeruginosa* NPJB1 e *M. aeruginosa* NPCD1) e amostras ambientais, foi feita pelo Teste *t* de Student, com $p < 0,05$, usando o pacote estatístico BioEstat 2.0, e testes associados. A proporção (%) de genótipos *mcy* estimada pela técnica de qPCR foi obtida pelo quociente *mcy* / PC .

3.8 Custos operacionais

A elaboração das planilhas de custos para análise pela técnica de Utermöhl e por qPCR baseou-se na relação de custos operacionais relacionados a cada técnica.

Custo operacional é definido na teoria econômica como o custo dos recursos variáveis e, neste caso, está associado ao capital de giro necessário às análises (BIZOTTO, 2007). Considera-se que os investimentos já existem (benfeitorias, equipamentos, mão de obra qualificada, etc), sem contudo incluir eventuais reparos necessários aos equipamentos. No entanto, a depreciação desses equipamentos deve ser estimada em médio prazo e o consumo de água, assim como de energia elétrica, durante os procedimentos de análise também devem ser computados. Em termos de orçamento de custo, seria a estimativa ou previsão de quanto deverá custar à amostra analisada o uso dos recursos estabelecidos nos orçamentos (serviços de mão-de-obra, operação dos equipamentos, aquisição de material de consumo para as análises, etc).

Basicamente, o custo operacional é a soma dos gastos por recurso variável, adicionada à depreciação dos equipamentos. As planilhas contendo esses dados para ambas as técnicas encontram-se no Apêndice 2. Compreendem os custos de materiais de consumo, depreciação dos equipamentos em 8 anos de uso e outros custos relacionados, como por exemplo, a mão-de-obra do analista e consumo de água para diversas finalidades.

Considerou-se R\$ 0,02 L⁻¹ o custo estimado para a água de torneira, de acordo com informações fornecidas pelo SEMAE (Serviço Municipal de Água e Esgoto), incluindo a tarifa de esgoto. Para o consumo de energia de 1 kW h, estimou-se um custo de R\$ 0,35, conforme dados fornecidos pela CPFL (Companhia Paulista de Força e Luz), sem contudo considerar o ICMS. Nesse caso, o consumo de energia elétrica

para cada equipamento foi calculado por meio de sua potência elétrica e intervalo de tempo durante o qual o equipamento permaneceu em uso durante os procedimentos de análise (PARANÁ, 1993), ou seja:

$$\Delta E(kWh) = P(kW) \times \Delta t(h) \quad (1)$$

Onde:

ΔE = Consumo de energia requerido por um equipamento

P = Potência, quantidade de energia transformada por unidade de tempo pelo equipamento

Δt = Intervalo de tempo de uso do equipamento

Em alguns casos, a potência dos equipamentos foi dada em kVA. Para a conversão dessa unidade em kW, utilizou-se 0,6 como fator de potência.

Os preços, assim como as quantidades adquiridas de cada produto (material de consumo) para as análises, referem-se às marcas indicadas no Apêndice 2, e apresentam seu respectivo número de catálogo, com orçamento referente ao mês de fevereiro de 2008. A partir dessas informações, a quantidade necessária para a análise de uma única amostra foi calculada separadamente.

Os custos de depreciação (NEVES; ANDIA, 1995) dos equipamentos foram calculados com base no número de amostras analisadas no ano, a partir de seu valor inicial, levando-se em conta 8 anos de uso:

$$D(R\$) = \frac{VI}{VU} \times \frac{1}{TA} \quad (2)$$

Onde:

D = Custo de depreciação do equipamento por amostra analisada

VI = Valor inicial do equipamento

VU = Vida útil do equipamento (em anos)

TA = Número total de amostras analisadas no ano

Adotou-se também 4 amostras dia⁻¹ e 18 amostras dia⁻¹ como sendo a capacidade máxima de análise por meio das técnicas de Utermöhl e qPCR, respectivamente. Além disso, foram considerados 4 dias semana⁻¹ para os trabalhos práticos, sendo o quinto dia usado para a compilação dos dados e emissão de

resultados. O turno de trabalho de ambos os analistas foi de 8 h dia⁻¹, com remuneração mensal no valor de R\$ 2.500,00.

Todos os valores obtidos foram dados em R\$ amostra⁻¹, onde cada uma delas corresponde ao volume fornecido para análise de 100 mL. Com essa metodologia, buscou-se calcular o custo de cada recurso necessário à quantificação de uma única amostra, de forma que se pudesse obter como resultado seu custo operacional de análise pela técnica de Utermöhl e de qPCR para fins comparativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sequenciamento das regiões *cpcBA*-IGS e NMT dos isolados brasileiros

As amplificações por PCR de seqüências da região *cpcBA*-IGS do *operon* PC e seqüências do domínio NMT do gene *mcyA* das linhagens de *Microcystis* selecionadas para este estudo foram realizadas com sucesso, comprovando a boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos.

Os *amplicons* produzidos nessas amplificações resultaram em aproximadamente 700 pares de bases (pb) para a região *cpcBA*-IGS, conforme o esperado, enquanto que produtos de amplificação em torno de 200 pb foram obtidos para o domínio NMT do gene *mcyA*. Posteriormente, as sete linhagens de *Microcystis* foram seqüenciadas para a região *cpcBA*-IGS e onze para o domínio NMT.

Após a remoção dos oligonucleotídeos iniciadores das seqüências de *cpcBA*-IGS, processadas em *contigs*, fragmentos com 623 pb foram observados para todas as linhagens analisadas, com exceção da *Microcystis* sp. NPLJ4 (506 pb) (Tabela 10). Entretanto, o alinhamento múltiplo, realizado exclusivamente para a região do espaço intergênico (IGS) entre os genes *cpcB*-*cpcA*, com *start codon* ATG no gene *cpcA* e *stop codon* TAG no gene *cpcB*, revelou fragmentos de tamanhos iguais para todas as linhagens com 66 pb (Apêndice 1). As seqüências IGS de *M. aeruginosa* NPJB1, *M. aeruginosa* NPCD1 e *Microcystis* sp. NPLJ4 mostraram-se idênticas tanto no tamanho do fragmento quanto na composição de suas bases. *M. aeruginosa* SPC777 e *M. botrys* SPC759 diferiram desse grupo em apenas uma base, sendo uma adenina na primeira e uma guanina na segunda, em posições distintas. *M. protocystis* SPC697 e *Microcystis panniformis* SPC702 também diferiram do grupo, apresentando três bases diferentes. Entre elas, porém, a diferença residiu em apenas uma base, sendo, citosina e timina para SPC702 e SPC697, respectivamente (Figura 10).

Tabela 10 – Identidades (%) das seqüências de *cpcBA*-IGS das linhagens selecionadas para este estudo com outras seqüências de cianobactérias depositadas no *GenBank*

Morfotipo	Tamanho do fragmento (pb) ¹	Identidade (%)	Cobertura (%)	Seqüências do <i>GenBank</i> com maior similaridade (número de acesso)
<i>M. aeruginosa</i> SPC777	623	99	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806 (AF195177) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC 017 (AF195170) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC 023 (AF195169) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC 001 (AF195158)
<i>M. aeruginosa</i> NPJB1	623	97	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC MR-C (AF195173) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC MR-D (AF195172) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC K (AF195160) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC P3 (AF195159)
<i>M. aeruginosa</i> NPCD1	623	98	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 (AP009552) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC F (AF195178) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC Q (AF195179)
<i>M. botrys</i> SPC759	623	98	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 (AP009552) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC F (AF195178) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC C5 (AF195171) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC Q (AF195179) <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806 (AF195177) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC 017 (AF195170)
<i>M. panniformis</i> SPC702	623	97	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC 019 (AF195167) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC MR-C (AF195173) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC MR-D (AF195172) <i>Microcystis flos-aquae</i> UWOCC C2 (AF195162)
<i>M. protocystis</i> SPC697	623	97	100	<i>Microcystis</i> sp. UWOCC K (AF195160) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC P3 (AF195159) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC MR-C (AF195173) <i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC MR-D (AF195172) <i>Microcystis flos-aquae</i> UWOCC C2 (AF195162)
<i>Microcystis</i> sp. NPLJ4	506	98	97	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843 (AP009552) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC F (AF195178) <i>Microcystis</i> sp. UWOCC Q (AF195179)

¹Sem os primers

Para fragmentos do domínio NMT, após a remoção das seqüências dos iniciadores dos *contigs*, seqüências com 162 pb foram obtidas para todas as linhagens, com exceção de *M. aeruginosa* SPC777, que apresentou a deleção de uma base (161 pb) (Tabela 11). As linhagens isoladas da região Amazônica (*M. viridis* SPC647, *M. viridis* SPC660, *M. viridis* SPC716 e *M. viridis* SPC719) apresentaram seqüências idênticas quanto ao tamanho e composição de bases, após o alinhamento. *M. viridis* SPC722 diferiu do grupo em apenas uma base (citosina). *M. panniformis* SPC702, *M. protocystis* SPC697 e *Microcystis* sp. NPLJ4 formaram um segundo grupo de seqüências idênticas. *M. aeruginosa* SPC777, *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. botrys* SPC759 apresentaram fragmentos diferentes das demais, sendo a seqüência de *M. aeruginosa* SPC777 hipervariada (Figura 11).

Os resultados da análise BLAST para fragmentos de PC com 506 pb (*Microcystis* sp. NPLJ4) e 623 pb (demais *Microcystis*) também são mostrados na Tabela 10. Identidades variando de 97 a 99%, com 100% de cobertura dos fragmentos analisados, foram obtidas pela comparação com outras seqüências de cianobactérias depositadas no *GenBank* com base no *E value*. Esse valor representa a probabilidade de que a seqüência em análise tenha se alinhado com outra do banco de dados por acaso, sem significado biológico. Portanto, espera-se que esse valor seja o mais próximo possível de 0. Sob essa condição, *Microcystis* sp. NPLJ4 mostrou 98% de identidade com cianobactérias isoladas dos Estados Unidos [*Microcystis* sp. UWOCC F (tóxica) e *Microcystis* sp. UWOCC Q (não tóxica)] e Japão [*M. aeruginosa* NIES-843 (tóxica)]. As demais linhagens selecionadas para o estudo mostraram identidades com cianobactérias isoladas da África do Sul [*M. aeruginosa* UWOCC 017, *M. aeruginosa* UWOCC 019 e *M. aeruginosa* UWOCC 023 (todas tóxicas)], Austrália [*M. aeruginosa* UWOCC MR-C (tóxica) e *M. aeruginosa* UWOCC MR-D (detecção do domínio NMT, mas sem comprovação de toxicidade)], Canadá [*M. aeruginosa* UWOCC 001 e *M. aeruginosa* UWOCC E7 (tóxicas)], Estados Unidos [*M. flos-aquae* UWOCC C2, *M. aeruginosa* UWOCC C5, *Microcystis* sp. UWOCC K, *M. aeruginosa* UWOCC P3, *Microcystis* sp. UWOCC Q (todas não tóxicas) e *Microcystis* sp. UWOCC F (tóxica)], Holanda [*M. aeruginosa* PCC7806 (tóxica)] e Japão [*M. aeruginosa* NIES-843 (tóxica)], comprovando a ocorrência cosmopolita do grupo. *M. aeruginosa* NPCD1, *M. botrys*

SPC759 e *Microcystis* sp. NPLJ4 foram as únicas que apresentaram identidades (98%) com *M. aeruginosa* NIES-843, sendo de 97% a cobertura para *Microcystis* sp. NPLJ4. Sequências para *M. botrys*, *M. panniformis* e *M. protocystis* não estavam disponíveis no banco de dados.

Resultados para essa mesma análise, realizada com fragmentos NMT de 161 pb (*M. aeruginosa* SPC777) e 162 pb (demais linhagens), encontram-se na Tabela 11. As cinco linhagens brasileiras, provenientes da região amazônica, mostraram identidade/cobertura de 95/94% e 88/100% com *M. aeruginosa* UWOCC E7, isolada dos Estados Unidos, e *M. novacekii* T20-3, isolada da Tailândia, respectivamente, sendo ambas tóxicas. *M. paniformis* SPC702, *M. protocystis* SPC697 e *Microcystis* sp. NPLJ4 apresentaram 100% de identidade com *M. aeruginosa* UWOCC E7, em 100% de cobertura, enquanto que *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. botrys* SPC759 resultaram em 99% (100% de cobertura) e 96% (94% de cobertura) de identidade, respectivamente, com esta mesma cianobactéria. Com exceção de *M. aeruginosa* SPC777, todas as demais linhagens brasileiras apresentaram correspondência com *M. aeruginosa* UWOCC E7. *M. aeruginosa* SPC777 foi a única linhagem que resultou em identidade (99%) com *M. aeruginosa* NIES 89, cianobactéria tóxica, isolada do Japão. Sequências de *M. botrys* e *M. viridis* estavam disponíveis no banco de dados, mas não apresentaram identidades com as cianobactérias utilizadas neste estudo. Sequências de *M. panniformis* e *M. protocystis*, porém, não estavam disponíveis.

A relação entre toxicidade e filogenia para o grupo das *Microcystis* não é clara (TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). Os genes *cpcB* e *cpcA*, juntamente com o espaço intergênico compreendido entre eles, exibem variações em suas sequências capazes de distinguir genótipos em nível de linhagens (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). Além disso, essas sequências são fáceis de serem alinhadas por apresentarem deleções e inserções em número limitado (BITTENCOURT-OLIVEIRA; OLIVEIRA; BOLCH, 2001) e a sua distribuição única em cianobactérias dentro do domínio *Bacteria* facilita a sua detecção em ambientes de água doce.

Tabela 11 – Identidades (%) das seqüências do domínio NMT das linhagens selecionadas para este estudo com outras seqüências de cianobactérias depositadas no *GenBank*

¹Sem os primers

Morfotipo	Tamanho do fragmento (pb) ¹	Identidade (%)	Cobertura (%)	Seqüências do <i>GenBank</i> com maior similaridade (número de acesso)
<i>M. aeruginosa</i> SPC777	161	99	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES 89 (AB110104)
<i>M. aeruginosa</i> NPJB1	162	99	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
<i>M. botrys</i> SPC759	162	96	94	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
		90	100	<i>Microcystis novacekii</i> T20-3 (AB110113)
<i>M. panniformis</i> SPC702	162	100	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
<i>M. protocystis</i> SPC697	162	100	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
<i>Microcystis</i> sp. NPLJ4	162	100	100	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
<i>M. viridis</i> SPC647	162	96	94	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
		89	100	<i>Microcystis novacekii</i> T20-3 (AB110113)
<i>M. viridis</i> SPC660	162	96	94	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
		89	100	<i>Microcystis novacekii</i> T20-3 (AB110113)
<i>M. viridis</i> SPC716	162	96	94	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
		89	100	<i>Microcystis novacekii</i> T20-3 (AB110113)
<i>M. viridis</i> SPC719	162	96	94	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
		89	100	<i>Microcystis novacekii</i> T20-3 (AB110113)
<i>M. viridis</i> SPC722	162	95	94	<i>Microcystis aeruginosa</i> UWOCC E7 (AF139341)
		88	100	<i>Microcystis novacekii</i> T20-3 (AB110113)

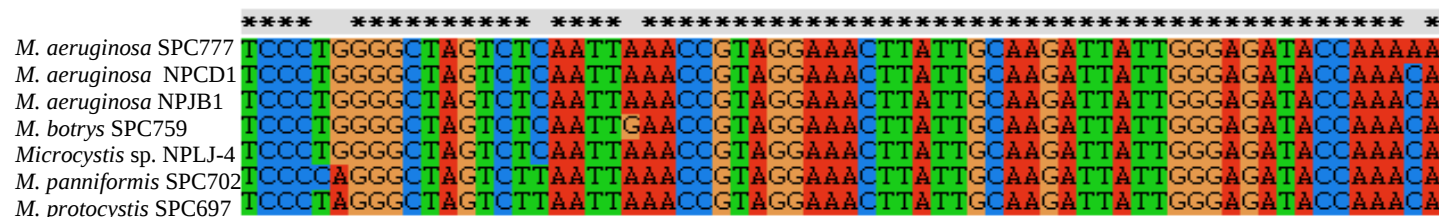


Figura 10 – Alinhamento múltiplo de seqüências (66 pb) do espaço intergênico entre os genes *cpcB*-*cpcA* de 7 linhagens brasileiras de *Microcystis*.

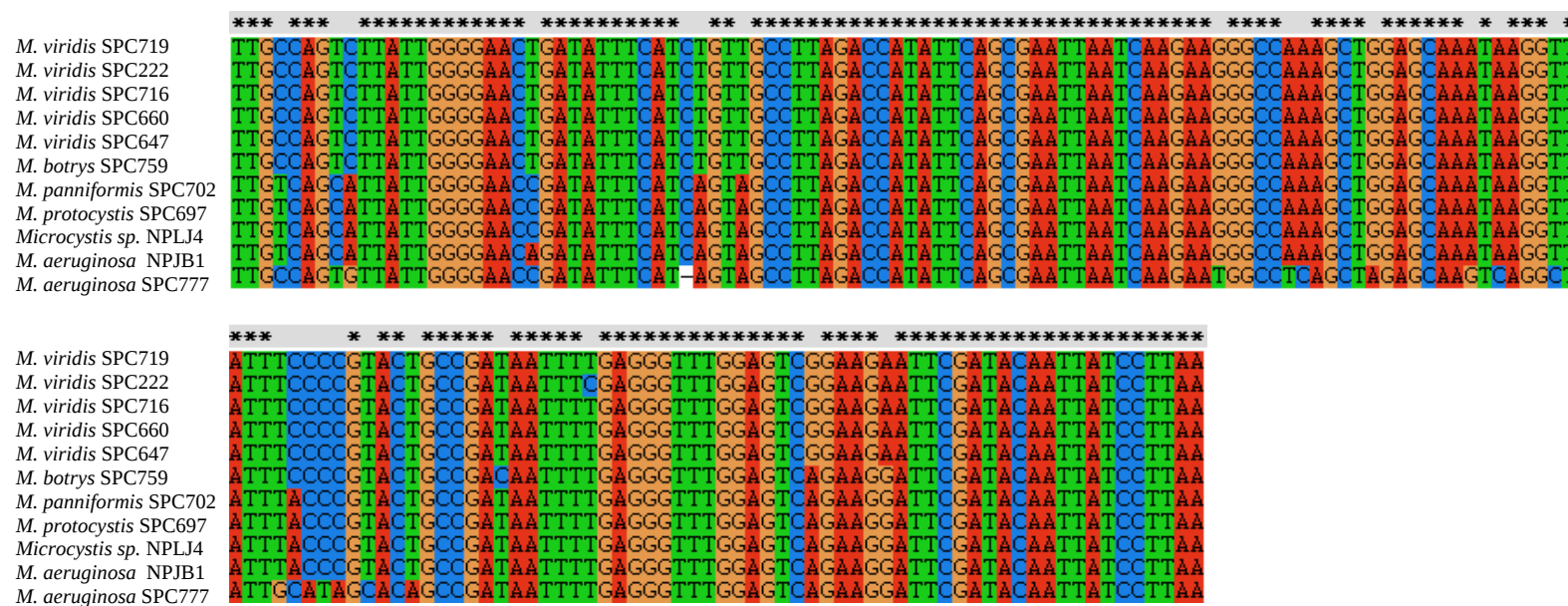


Figura 11 – Alinhamento múltiplo de seqüências (162 pb) do domínio NMT de 11 linhagens brasileiras de *Microcystis*.

Contudo, não são capazes de distinguir *Microcystis* potencialmente produtoras de toxinas das não produtoras, uma vez que linhagens tóxicas e não-tóxicas podem aparecer irregularmente distribuídas num mesmo agrupamento monofilético (TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). Com o intuito de investigar essa questão, Tillet, Parker e Neilan (2001) estudaram também a distribuição do domínio NMT do gene da sintetase de microcistinas (*mcyA*) em 37 linhagens de *Microcystis* sp. A região NMT estava presente em 18 linhagens analisadas, cuja toxicidade foi comprovada por reações positivas em ensaios de inibição de atividade enzimática, mas estava ausente em outras 17 linhagens não-tóxicas. Essa região também estava presente em duas linhagens não produtoras de toxinas, numa das quais a produção de microcistinas havia sido reportada previamente. Esse resultado pode estar sugerindo que existe uma região gênica nessas duas linhagens idêntica à região amplificada pelos iniciadores MSF/MSR, usados no estudo, que não faz parte da sintetase de microcistinas, ou ainda que os genes codificadores da toxina estavam inativos. Os mesmos autores, porém, apontam mecanismos que poderiam explicar a toxicidade ou não dessas linhagens, incluindo mutações em *Microcystis* tóxicas ou transferência genética lateral a partir de outro organismo.

Curiosamente, neste estudo, a *M. aeruginosa* NPCD1, não resultou em amplificação para a região NMT do gene *mcyA*, mas apresentou 98% (100% de cobertura) de identidade com seqüências *cpcBA*-IGS das *Microcystis* tóxicas UWOCF e NIES-843, isoladas dos Estados Unidos e Japão, respectivamente. Bittencourt-Oliveira (2003), relatou a ausência do gene *mcyB* e da produção de toxina nessa mesma linhagem. De acordo com Silva (2006), essa cianobactéria não produz microcistinas, mas apresenta genes de NRPS e PKS envolvidos na produção de sideróforos ou outros peptídeos.

4.2 Desenvolvimento dos oligonucleotídeos LUX

Todos os *contigs* produzidos no sequenciamento das linhagens de *Microcystis* foram utilizados como referência para o alinhamento seqüencial múltiplo, que contou com outras seqüências selecionadas do *GenBank* até o último acesso em 29/06/2006.

A seleção dessas seqüências privilegiou todos os estudos com *Microcystis* em monocultivo, cujos trabalhos já haviam sido publicados.

A seqüência consenso foi então usada com êxito para o desenho de oligonucleotídeos LUX (*Forward*) e oligonucleotídeos não-marcados (*Reverse*) por meio do *software* LUX™ Designer (Invitrogen). Os iniciadores QPCβF e QPCαR foram projetados para amplificar por meio de qPCR fragmentos de 144 pb da região *cpcBA*-IGS do *operon* PC. As amplificações feitas com QmcyA-NMTF e QmcyA-NMTR para o domínio NMT do gene *mcyA* correspondem a fragmentos de 154 pb. O tamanho desses *amplicons* está de acordo com as orientações do fabricante, para as quais as amplificações por qPCR devem resultar em fragmentos entre 50 e 200 pb.

Os iniciadores QPCβF e QmcyA-NMTF receberam FAM e JOE, respectivamente, como fluoróforos conjugados, os quais foram posicionados próximos à extremidade 3', e permitiram amplificações simultâneas para os alvos distintos.

Todas essas informações encontram-se sumarizadas na Tabela 12, mas as seqüências projetadas para esses oligonucleotídeos serão patenteadas e não poderão ser divulgadas na íntegra.

Tabela 12 – Informações gerais sobre os oligonucleotídeos desenvolvidos neste estudo, com destaque para a localização dos fluoróforos em **negrito**

Iniciadores	Seqüências	Número de bases	Marcação	Tamanho do fragmento (pb)
QPCβF	5'-xxxxTACTTCxxxxGCGC c G-3'	20	FAM	144
QPCαR	5'-GAATCAxxxxTGCTACGG-3'	19		
QmcyA-NMTF	5'-xxxxxTTGCCTTAGACCxxxxCAG c G-3'	27	JOE	154
QmcyA-NMTR	5'-TTGGAAATACTGCxxxxCCGAGT-3'	23		

O programa LUX™ Designer utiliza como pontuação uma escala que varia de 1-5 estrelas para avaliar o desempenho dos oligonucleotídeos projetados. Essa pontuação leva em consideração a porcentagem de GC nos iniciadores marcado e não-marcado, além de sua seqüência e tamanho do *amplicon* produzido. A alta qualidade representa uma maior possibilidade de sucesso na qPCR. Baseado em análises experimentais realizadas pelo fabricante, as estrelas indicam ainda probabilidades de

êxito nas amplificações. Dessa forma, 5 estrelas correspondem a 90% de probabilidade de sucesso na reação, 4 estrelas correspondem a 80%, três estrelas a 70%, duas estrelas a 60% e uma estrela corresponde a apenas 50% de probabilidade de sucesso.

Nesse sentido, os iniciadores QPC β F e QPC α R foram pontuados com 5 estrelas, enquanto que os iniciadores QmcyA-NMTF e QmcyA-NMTR receberam 3 estrelas.

4.3 Padronização da metodologia

A extração de DNA genômico da *Microcystis* sp. NPLJ4, cianobactéria usada para o desenvolvimento das curvas de calibração (PC e *mcyA*), foi feita em triplicata e a qualidade do material genético extraído pode ser verificada na Figura 12. A concentração total de DNA da tréplica selecionada para a padronização da metodologia (DNA 2) foi estimada em 20 ng μL^{-1} . A partir dessa informação, a quantidade inicial de DNA usada para o estabelecimento dessas curvas foi de 15 ng reação $^{-1}$ (7,5 μL de DNA + 2,5 μL de água ultrapura para volume final de 10 μL), com diluições em série variando de 1:10 a 1:10 5 . Essas concentrações de DNA foram posteriormente relacionadas com o número de células estimado em 4,34 x 10 6 células mL $^{-1}$ por meio da técnica de Utermöhl. Para a obtenção desses dados, correlacionou-se o volume de 100 μL , obtido após a ressuspensão do DNA extraído, à concentração de DNA total estimada em 20 ng μL^{-1} . A partir daí foi possível concluir que esse volume (100 μL) continha 2.000 ng de DNA, equivalentes a 4,34 x 10 8 células na alíquota de 100 mL de cultura. Essa abordagem permitiu também pressupor que 15 ng de DNA estavam ressuspensos num volume de 0,75 mL, sendo equivalente a 3,25 x 10 6 células na amostra.

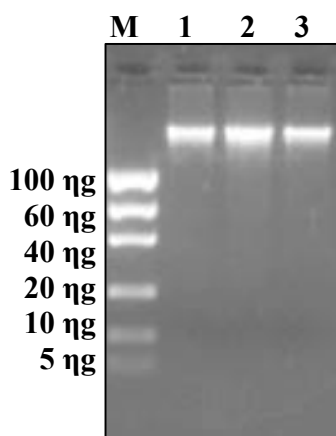


Figura 12 – DNA genômico extraído da cianobactéria *Microcystis* sp. NPLJ4, em triplicata.

A escolha das diluições para as curvas foram baseadas nos estudos conduzidos por Furukawa et al. (2006) e visaram o atendimento à Portaria MS 518. Todos os volumes finais de amostra adicionados à reação de qPCR foram calculados para 10 μ L, conforme sugestão do fabricante do Platinum[®] Quantitative PCR Supermix UDG 2X (Invitrogen). Em seus estudos, Furukawa et al. (2006) usaram cinco diluições para uma suspensão da *M. viridis* NIES 102, variando de $1:10^2$ a $1:10^6$, que foram equivalentes a $8,8 \times 10^4$ e 8,8 células, respectivamente. Seu limite de detecção, portanto, foi de 8,8 células reação⁻¹ usando SYBR Green I e os iniciadores MSF-MSR-2R. Já para Kurmayer e Kutzenberger (2003), o limite de detecção encontrado foi inferior a 5 células com sistema de detecção *Taq-man*, enquanto que neste estudo o limite obtido foi de 100 células reação⁻¹ (aproximadamente 100 células mL⁻¹) para ambas as regiões gênicas. Apesar do sistema *Taq-man* apresentar mais especificidade nas reações, a sensibilidade deste e do sistema LUX são bastante similares, conforme as indicações feitas no manual do fabricante (Invitrogen). Além disso, Nazarenko et al. (2002) relatam que *primers* monomarcados com fluoróforo são eficientes, confiáveis e representam uma alternativa econômica aos sistemas com sondas duplamente marcadas. Os mesmos autores discutem ainda a possibilidade de detecção simultânea para alvos distintos, objetivo que não pode ser alcançado quando moléculas fluorescentes que se

ligam ao DNA são usadas, como SYBR Green I, por exemplo, sistema que apresenta baixa sensibilidade e especificidade.

A Figura 13 ilustra o gráfico de amplificação para PC e *mcyA*. A variação nos *Ct*s dentro de cada diluição (1:10 a 1:10⁵) foi menor para ambas as curvas na região compreendida entre 10³ e 10⁵ células, sendo bastante pronunciada em direção aos valores mais altos de *Ct* (10¹ e 10² células). Para quantidades pequenas de DNA, o equipamento pode não apresentar sensibilidade adequada e os dados tornarem-se irreais. De acordo com o fabricante do Platinum[®] Quantitative PCR Supermix UDG 2X (Invitrogen), recomenda-se a utilização de 100 pg a 1 µg de DNA genômico por reação. Dessa forma, por se tratar de DNA genômico, a quantidade de DNA alvo na diluição 1:10⁵ (10 células reação⁻¹) provavelmente foi insuficiente para que ocorresse a amplificação, uma vez que os valores de *Ct* mostraram-se bastante discrepantes. Conseqüentemente, os dados correspondentes a essa diluição não foram considerados nas demais análises, fato que elevou o limite de detecção do método a 100 células reação⁻¹. Para Kurmayer e Kutzenberger (2003), menor variação nos *Ct*s foi obtida entre 10² e 10⁴ células, sendo mais acentuada nos valores mais baixos ou altos de *Ct* (10⁵ e <10 células, respectivamente).

Diante disso, nas análises em campo, a quantificação de células com genótipos PC e *mcy* foi estabelecida com base em 1,5 ng reação⁻¹ de DNA, quantidade correspondente a 10⁵ células (diluição 1:10) nas curvas construídas.

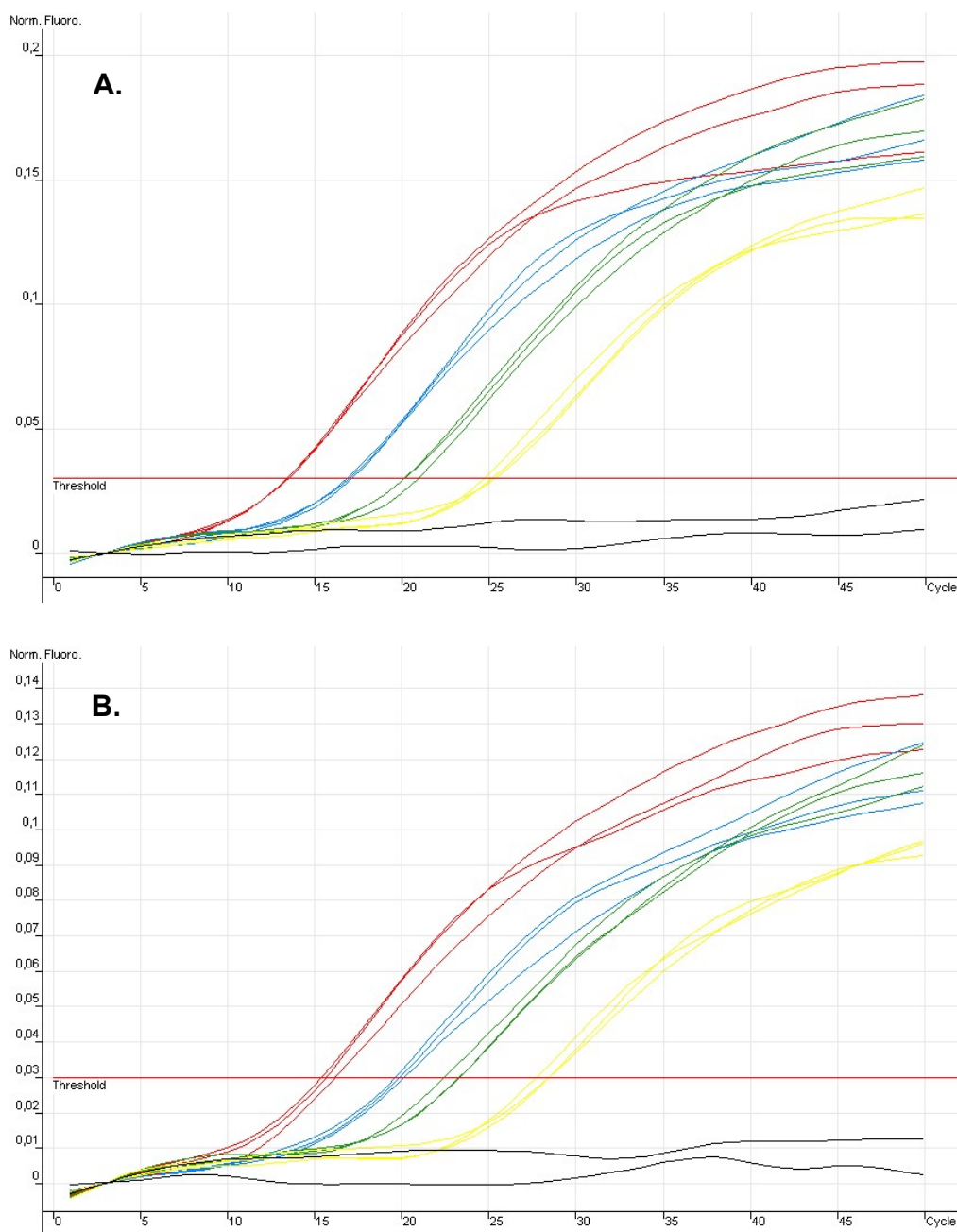


Figura 13 – Gráfico de amplificação de seqüências da *Microcystis* sp. NPLJ4 por qPCR.

A. Região PC. **B.** Região NMT do gene *mcyA*. Linhas vermelhas correspondem a concentração de $15 \text{ ng reação}^{-1}$ de DNA, linhas azuis, verdes e amarelas mostram diluições até $1:10^3$, respectivamente, e linhas pretas representam o controle negativo, sem DNA.

Independentemente do sistema de detecção usado, vários autores adotaram 0,1 como limiar de fluorescência para as medições (KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003; NAZARENKO, et al., 2002; SCHOBER, et al., 2007). Neste estudo, não foi possível a utilização desse limiar, pois os valores do coeficiente de determinação ou explicação (R^2) e eficiência da reação (Ef) decaíam bastante a medida em que valores acima de 0,03 eram estipulados. Em geral, a determinação do Ct deve ser fixada o mais próximo possível do início da fase exponencial, no ciclo em que a fluorescência observada está cerca de 10 x acima do *background*. Nessas condições, o parâmetro adotado foi considerado apropriado para as demais determinações, uma vez que visualmente indicava o início da fase exponencial. Em geral, a linha de amplificação mostrou clara ascensão em torno do 13º ciclo da reação para PC e 15º para *mcyA* nas amostras mais concentradas (15 ng reação⁻¹ de DNA).

A análise das curvas de dissociação dos produtos amplificados mostraram picos bem definidos em torno de 87-88 °C para PC e 81-82 °C para *mcyA* (Figura 14), indicando que não houve formação de dímeros. Esses picos aproximam-se bastante dos obtidos para a *M. aeruginosa* NIES298 (89 °C para PC e 86 °C para *mcyA*) em estudos realizados por Yoshida et al. (2007), usando SYBR Green I como sistema de detecção. No entanto, as determinações feitas pelos autores resultaram em dados expressos em número de cópias mL⁻¹, diferentemente desta abordagem. Mais próximo ainda esteve o pico obtido por Furukawa et al. (2006), avaliado para o gene *mcyA* à temperatura de 83 °C, também com SYBR Green I, para a mesma abordagem.

Tanto para a região do *operon* PC como para o gene *mcyA*, curvas lineares bastante significativas foram obtidas entre a quantidade de DNA (em número de células) e o valor de Ct para cada diluição. As equações de regressão foram $y = 43,977 - 1,8097\ln(x)$ ($R^2 = 0,99$, $p < 0,05$) e $y = 42,932 - 1,8449\ln(x)$ ($R^2 = 0,99$, $p < 0,05$) para PC e *mcyA*, respectivamente, onde y é o Ct avaliado em nível fixo de fluorescência (0,03) e x é a quantidade de DNA para cada diluição (dada como log do número de células correspondente). Os valores de Ct são médias de três repetições $\pm$ desvio padrão, pois excluiu-se a quarta determinação de cada ponto da curva (Figura 15).

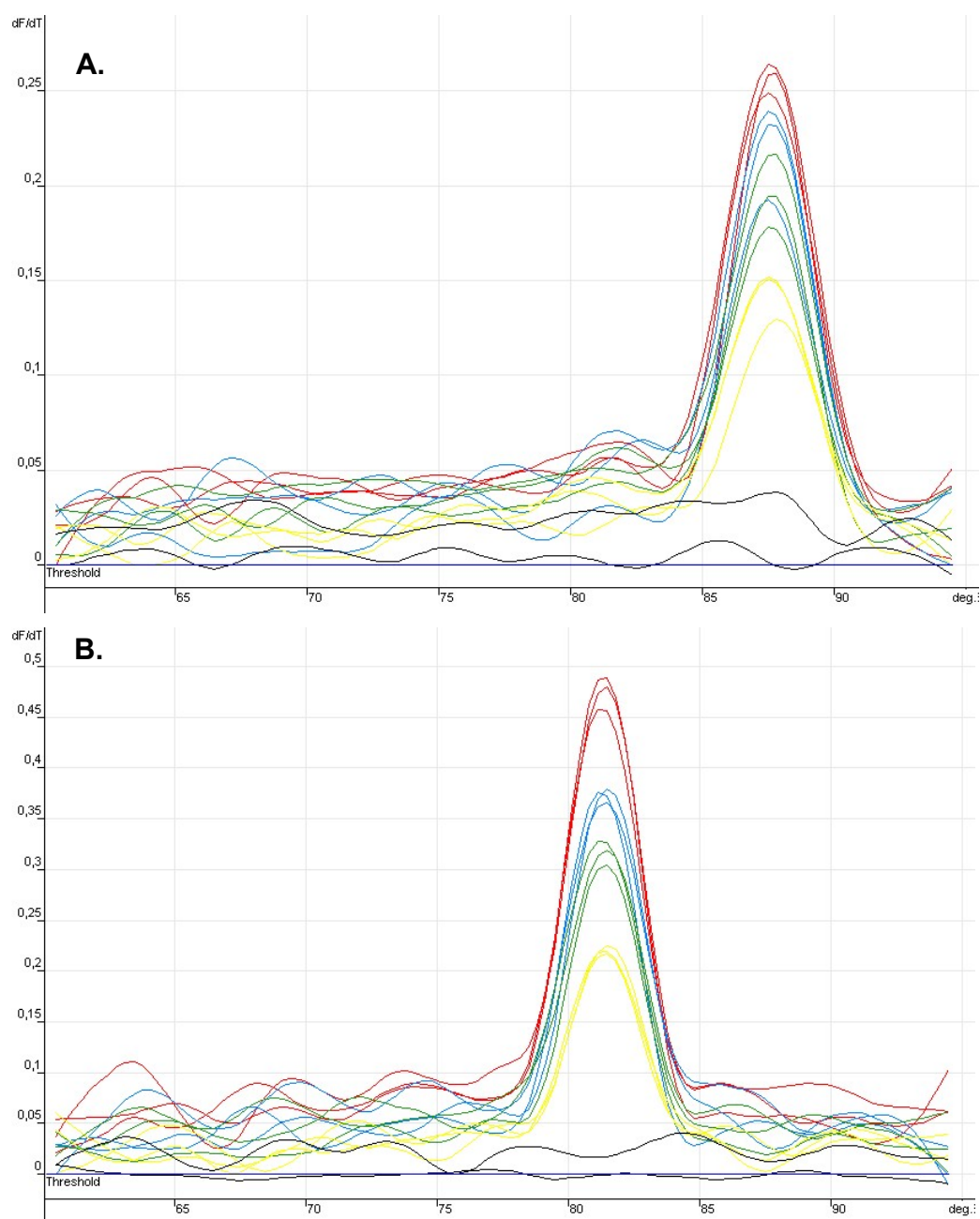


Figura 14 – Produtos dissociados entre 60 e 95 °C, com gradiente variando 1 °C a cada 60 s na primeira etapa (95 °C/15 s) e 5 s na segunda etapa (60 °C/5 s). **A.** Região PC. **B.** Região NMT do gene *mcyA*. Linhas vermelhas correspondem a concentração de 15 ng reação⁻¹ de DNA, linhas azuis, verdes e amarelas mostram diluições até 1:10³, respectivamente, e linhas pretas representam o controle negativo, sem DNA.

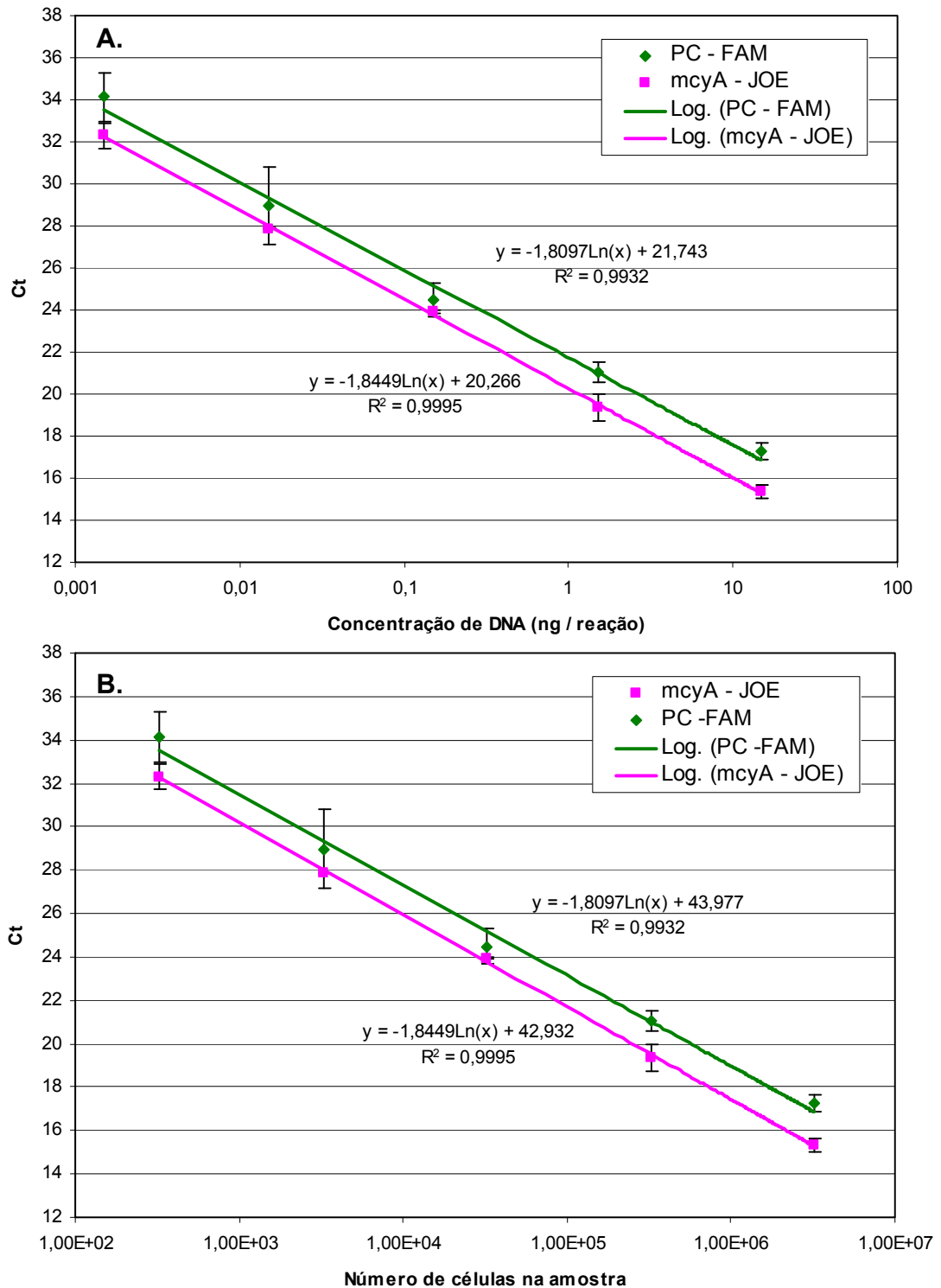


Figura 15 – Curvas com diluições para padronização da metodologia. **A.** Ct x concentração de DNA na amostra. **B.** Ct x número de células na amostra.

O uso de 0,03 como limiar fixo de fluorescência permitiu que o coeficiente de determinação ou explicação (R^2) fosse 0,99 para ambas as curvas construídas. Estabeleceu ainda eficiência (Ef) de 79% para PC e 76% para *mcyA* nas reações de amplificação. No entanto, a Ef ideal para a PCR seria 100%, quando se assume a duplicação do produto a cada ciclo. Eficiência em torno de 90% é bastante aceitável e, em grande parte, está intimamente relacionada aos iniciadores de PCR utilizados na reação. Schober et al. (2007), porém, em estudo interlaboratorial, mostraram que variações na Ef (%) da PCR podem ser determinadas pelo equipamento usado. Com esse intuito, a quantificação de uma *Microcystis* sp. tóxica foi feita com base em seqüências de PC e do gene *mcyB*, com sistema *Taq-man* de detecção, e os seguintes equipamentos foram usados: (a) ABI7300 Real Time PCR System (Helsinki), (b) ABI GeneAmp5700 Sequence Detection System (Mondsee) e (c) ABI PRISM7500 Sequence Detection System (Ingénitix, Vienna). Os equipamentos (b) e (c) mostraram Ef (%) de 94% para a região PC, enquanto que o aparelho (a) resultou em 93%. Para o gene *mcyB*, Ef (%) de 81, 76 e 80% foram obtidas para os equipamentos (a), (b) e (c), respectivamente.

No presente estudo, os valores inferiores a 90% revelados para a Ef (%) da PCR, provavelmente, podem ter determinado os Cts máximos observados para PC (34º ciclo) e *mcyA* (32º ciclo), na diluição 1:10⁴. Além disso, a quantidade de DNA nessa diluição também pode ter sido um fator consideravelmente limitante para a obtenção de valores mais altos. Mesmo assim, tanto os Cts máximos como mínimos aqui obtidos são similares aos mostrados por Furukawa et al. (2006), Kurmayer e Kutzenberger (2003), Nazarenko et al. (2002), Schober e Kurmayer (2006), Yoshida et al. (2007), em diferentes abordagens.

4.4 Quantificação de genótipos PC em amostras isoladas e ambientais

A qPCR permitiu a determinação da densidade total da população de *Microcystis* nas linhagens isoladas e nas amostras coletadas na Praia dos Namorados, durante o período de dezembro de 2006 a novembro de 2007, com base na curva de calibração da *Microcystis* sp. NPLJ4.

A Tabela 13 mostra o valor médio de C_t obtido para cada uma dessas amostras e sua correspondência em células $\text{mL}^{-1} \pm$ desvio padrão. As médias foram calculadas a partir de três repetições, sendo a quarta determinação de cada amostra excluída. Apesar da dificuldade para se concentrar as células presentes nas amostras ambientais de água, em procedimento anterior à extração de DNA, devido à existência de aerótopos (vesículas gasosas), todas as amplificações feitas com $1,5 \text{ ng reação}^{-1}$ de DNA foram obtidas com sucesso. Nesse caso, a densidade celular estimada por qPCR para cada amostra foi diretamente correlacionada a essa quantidade de DNA. Para o cálculo expresso em número de células mL^{-1} , levou-se em consideração a quantificação de DNA genômico feita em gel de agarose (dados não mostrados) para as extrações. O volume (em μL) correspondente a $15 \text{ ng reação}^{-1}$ de DNA foi usado para calcular sua quantidade total contida em $100 \mu\text{L}$ (volume em que o DNA foi ressuspendido após sua extração). Posteriormente, essa concentração foi recalculada com base na alíquota inicial de 100 mL usada na análise, dada em ng mL^{-1} de DNA. Essas informações geraram resultados em número de células mL^{-1} quando a densidade celular correspondente $1,5 \text{ ng reação}^{-1}$ de DNA, obtida por qPCR, foi relacionada à concentração de DNA contida no volume de 1 mL .

Na Figura 16, apenas para fins de ilustração, são mostrados em gel de agarose 1% os *amplicons* PC produzidos com aproximadamente 140 pb .

As análises das curvas de *melt* confirmaram produtos únicos, sem variantes e/ou formação de dímeros em todas elas. Em geral, a temperatura de desnaturação (T_m) de cada amostra pode diferir pela concentração de GC e pelo comprimento das seqüências de nucleotídeos que apresentam, e é importante para a identificação do produto por perfil térmico. Essas curvas mostraram picos em torno de $87\text{-}88^\circ\text{C}$ em todas as análises, conforme o esperado, correspondendo ao valor observado para *Microcystis* sp. NPLJ4.

Tabela 13 – Valores de *Ct* para linhagens isoladas de *Microcystis* e amostras ambientais de água determinados na concentração de 1,5 ng reação⁻¹ de DNA

Amostras	Ct	Número de células mL ⁻¹ (1)
<i>M. aeruginosa</i> NPJB1	20,01	6,21 x 10 ⁵ ± 2,98 x 10 ⁵
<i>M. aeruginosa</i> NPCD1	19,10	9,37 x 10 ⁵ ± 1,06 x 10 ⁵
Coleta 1 - floração	21,73	4,25 x 10 ⁵ ± 7,41 x 10 ⁴
Coleta 2 - floração	22,77	1,23 x 10 ⁵ ± 8,94 x 10 ³
Coleta 3 - floração	25,22	3,20 x 10 ⁴ ± 5,54 x 10 ³
Coleta 3 - menos densa	27,38	9,49 x 10 ³ ± 2,83 x 10 ³
Coleta 4 - floração	25,85	2,31 x 10 ⁴ ± 2,68 x 10 ³
Coleta 4 - menos densa	27,78	7,87 x 10 ³ ± 1,99 x 10 ³

(1) Dados são médias de 3 repetições ± desvio padrão

Grandezas da ordem de 10⁵ células mL⁻¹ foram encontradas para *M. aeruginosa* NPJB1, *M. aeruginosa* NPCD1 e florações das coletas 1 e 2 (dez 06 e abr 07). Para as coletas 3 e 4 (set 07 e nov 07), o número de células determinado por qPCR foi 10 x menor que o observado para as 2 coletas anteriores (10⁴ células mL⁻¹). Já para as amostras menos densas, de setembro de 2007 e novembro de 2007, cerca de 10³ células mL⁻¹ foram detectadas.

Ainda são poucos os estudos usando a técnica de qPCR para a quantificação de células em cianobactérias. Abordagem similar à adotada neste estudo pode ser observada apenas em Kurmayer e Kutzenberger (2003), Schober e Kurmayer (2006) e Schober et al. (2007). Outros autores, porém, Foulds et al. (2002), Rinta-Kanto et al. (2005), Vaitomaa et al. (2003) e Yoshida et al. (2007), usaram estratégias um pouco divergentes ao trabalharem com o número de cópias do gene de interesse. Dessa forma, torna-se difícil a comparação da eficiência obtida pelo método no que diz respeito ao número de células detectados em outros estudos.

Para todas as linhagens quantificadas na fase estacionária, Schober e Kurmayer (2006), encontraram valores relativamente próximos (1 x 10⁶ células mL⁻¹ - 7 x 10⁷ células mL⁻¹) usando *Taq-man*. As suspensões de *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. aeruginosa* NPCD1 foram analisadas após 15 dias de crescimento e apresentaram 6,21 x 10⁵ células mL⁻¹ e 9,37 x 10⁵ células mL⁻¹, respectivamente. Possivelmente, maior densidade celular poderia ter sido constatada, se as quantificações feitas neste estudo tivessem sido realizadas na fase estacionária de crescimento. De acordo com Furukawa

et al. (2006), *M. viridis* apresentou crescimento em escala logarítmica até o 18^o dia de cultivo e, subseqüentemente, alcançou a fase estacionária.

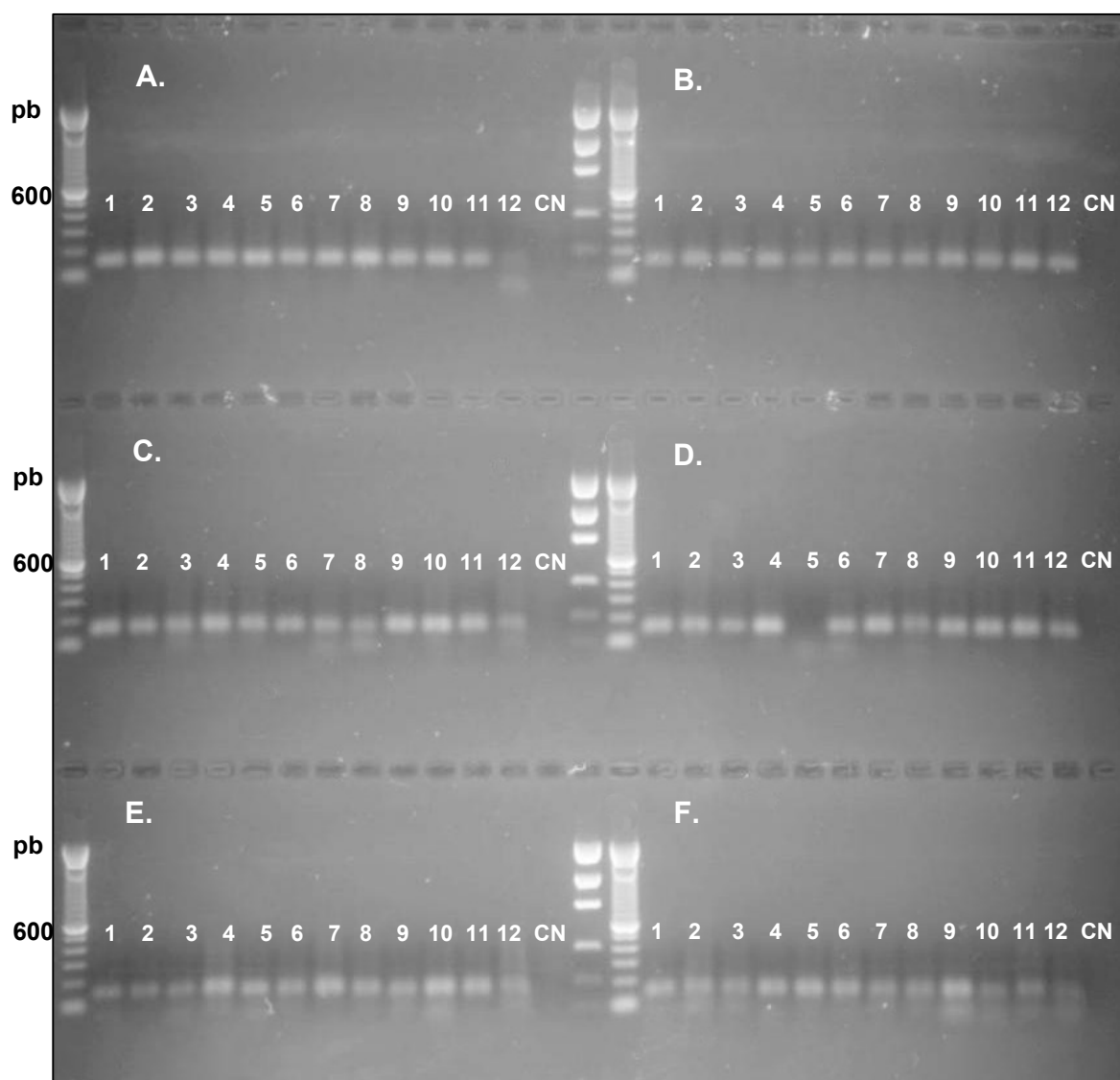


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando *amplicons* com aproximadamente 140 pb. **A.** *M. aeruginosa* NPJB1, **B.** *M. aeruginosa* NPCD1, **C.** Coleta 1 - floração (dez 06), **D.** Coleta 2 - floração (abr 07), **E.** Coleta 3 - floração (set 07), **F.** Coleta 4 - floração (nov. 07). **1, 2, 3, 4** = DNA 1; **5, 6, 7, 8** = DNA 2; **9, 10, 11, 12** = DNA 3; **CN** = controle negativo (sem DNA).

Mínimo de 125 células mL⁻¹ (jan 2000) e máximo de $6,10 \times 10^5$ células mL⁻¹ (ago 2000) foram definidas para florações de *Microcystis* sp. no Lago Wannsee (Berlim, Alemanha), por Schober et al (2007), com *Taq-man*, em estudo interlaboratorial. Os resultados alcançados, no presente estudo, para as florações das coletas 1 e 2 (dezembro 2006 e abril 2007) correspondem a mesma ordem de grandeza observada pelos autores em agosto de 2000.

Na Tabela 14 são mostrados os resultados quantitativos obtidos por meio da técnica de Utermöhl para as linhagens de cianobactérias utilizadas neste estudo e amostras ambientais. A solução de hidróxido de potássio foi usada apenas na primeira coleta para facilitar a contagem, pois a amostra estava bastante densa.

A ordem de grandeza encontrada para *M. aeruginosa* NPJB1 e *M. aeruginosa* NPCD1 foi de 10⁶ células mL⁻¹, após um período de crescimento de 15 dias. As coletas 1 e 3 (dezembro 2006 e setembro 2007) também apresentaram essa mesma grandeza, enquanto que a 2 e a 4 (abril 2007 e novembro 2007) resultaram em 10⁷ células mL⁻¹. Em paralelo, as coletas adicionais, realizadas em setembro e novovembro de 2007, visando a obtenção de material menos denso, mostraram 10⁵ células mL⁻¹.

A observação prévia em microscópio óptico das amostras coletadas na Praia dos Namorados também indicou a presença de outros gêneros de cianobactérias, os quais encontram-se relacionados na Tabela 14.

Tabela 14 – Contagem de cianobactérias por meio da técnica de Utermöhl e parâmetros utilizados

Amostra	Data da coleta	Câmara	Aumento ⁽¹⁾	Hidróxido de potássio 0,10 mol L ⁻¹ 1:1	Campos	Transectos	Diluição	Número de células mL ⁻¹ ⁽²⁾	Gêneros observados
<i>Microcystis</i> sp. NPLJ4	-	2 mL	630 X	-	10	-	-	$4,34 \times 10^6$ $\pm 2,40 \times 10^5$	-
<i>M. aeruginosa</i> NPJB1	-	2 mL	630 X	-	10	-	1:1 e 1:2	$5,15 \times 10^6$ $\pm 4,55 \times 10^5$	-
<i>M. aeruginosa</i> NPCD1	-	2 mL	630 X	-	10	-	1:2	$5,83 \times 10^6$ $\pm 4,55 \times 10^5$	-
Coleta 1 - Floração	16/12/2006	2 mL	630 X	sim	10	-	1:1	$5,90 \times 10^6$ $\pm 1,16 \times 10^6$	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i>
Coleta 2 - Floração	19/04/2007	2 mL	400 X	-	10	-	1:9	$2,26 \times 10^7$ $\pm 1,36 \times 10^6$	<i>Microcystis</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Sphaerocavum</i>
Coleta 3 - Floração	06/09/2007	2 mL	400 X	-	-	1	1:9	$4,39 \times 10^6$ $\pm 1,72 \times 10^6$	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Aphanocapsa</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Sphaerocavum</i>
Coleta 3 - Amostra menos densa	06/09/2007	2 mL	400 X	-	10	-	1:9	$3,88 \times 10^6$ $\pm 2,06 \times 10^5$	-
Coleta 4 - Floração	14/11/2007	2 mL	400 X	-	10	-	1:9	$1,85 \times 10^7$ $\pm 4,70 \times 10^6$	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i> , <i>Sphaerocavum</i>
Coleta 4 - Amostra menos densa	14/11/2007	2 mL	400 X	-	15	-	1:9	$3,60 \times 10^6$ $\pm 2,34 \times 10^5$	-

⁽¹⁾ O aumento de 630 X foi usado preferencialmente para a contagem das linhagens isoladas

⁽²⁾ Dados são médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão, com 5 contagens independentes para uma mesma câmara

Cianobactérias filamentosas estiveram presentes em todas as épocas amostradas na Praia dos Namorados. No entanto, a presença de outros gêneros cocóides, como *Sphaerocavum* e *Radiocystis*, dificultou a quantificação das *Microcystis*. A discriminação entre esses indivíduos foi praticamente impossível durante a contagem, devido a presença de células soltas ou colônias muito jovens. Por esse motivo, a solução de hidróxido de potássio não foi usada para as coletas 2, 3, e 4. *Sphaerocavum brasiliensis* foi dominante na coleta 3 (setembro 2007), juntamente *Anabaena crassa*. O gênero *Sphaerocavum* foi também observado nas coletas 2 e 4 (abril e novembro 2007), mas não na coleta 1 (dezembro 2006). A contagem para essas amostras foi feita considerando-se um grupo “*Microcystis* sp. / *Sphaerocavum brasiliensis* / *Radiocystis fernandoii*”.

Abordagem semelhante foi usada por Schober et al. (2007). Todas as morfoespécies de *Microcystis* sp. estudadas por esses autores foram consideradas variações morfológicas de indivíduos da mesma população e está de acordo com a unificação de 5 espécies de *Microcystis* Kützinger ex Lemmerman 1907, proposta por Otsuka et al. (2001), no código de Bacteriologia. Otsuka et al. (2001) e Kondo et al. (2000) argumentam que a classificação do gênero *Microcystis* não é mais válida, pois características de muitas morfoespécies se sobrepuseram. Além disso, muitas características morfológicas usadas para a identificação das espécies (KOMÁRAK; ANAGNOSTIDIS, 1986), como a forma das colônias, padrões de mucilagem e arranjo das células nas colônias, são frequentemente variáveis e dependem do ambiente (OTSUKA et al., 2000).

Apesar das considerações feitas por Schober et al. (2007) serem válidas apenas para o gênero *Microcystis*, a unificação adotada neste estudo justifica-se, em parte, pelo fato de que a análise BLAST da sequência de RNAr 16S da *Sphaerocavum brasiliensis* SPC484, disponível em nosso laboratório, apresentou alta identidade (99%) com cianobactérias do gênero *Microcystis* exclusivamente. Por outro lado, a mesma análise mostrou apenas 96% de identidade entre esses dois gêneros para a região *cpcBA*-IGS. Entretanto, salienta-se que não existem sequências de RNAr 16S e de *cpcBA*-IGS de *Sphaerocavum* em bancos de dados públicos.

Seqüências de *cpcBA*-IGS de *Radiocystis fernandoii* SPC736 e *Planktothrix mougeotii* SPC788, também disponíveis em nosso laboratório, apresentaram 96 e 78-79% de identidade com as de *Microcystis*, respectivamente. O resultado mostrado para SPC788, compôs-se ainda de dois fragmentos com porcentagens diferentes (78 e 79%).

Já a comparação base a base feita apenas para seqüências IGS da SPC484 e SPC736, com as demais linhagens de *Microcystis* usadas neste estudo, revelaram seqüências de tamanhos idênticos (66 pb) e apenas a troca de uma citosina pela timina, quando comparadas ao grupo definido pela *M. aeruginosa* NPJB1, *M. aeruginosa* NPCD1 e *Microcystis* sp. NPLJ4.

Kurmayer e Kutzenberger (2003) relatam que, apesar da ocorrência de diversos gêneros de cianobactérias (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Limnothrix*, *Microcystis*, *Planktothrix* e *Pseudanabaena*), típicos do fitoplâncton do lago Wannsee, na Alemanha, espera-se que a metodologia usada, com oligonucleotídeos exclusivos para a detecção das *Microcystis*, atue de forma bastante específica em qualquer outro corpo d'água.

Neste estudo os resultados obtidos sugerem que os oligonucleotídeos desenvolvidos estão também acessando populações de *Sphaerocavum* e *Radiocystis*. Isso de uma certa forma é esperado uma vez que geneticamente esses três gêneros aparentam ser bastante próximos, apesar das diferenças morfológicas. Sugere-se, portanto, o desenvolvimento de maiores estudos taxonômicos para *Sphaerocavum* e *Radiocystis*, incluindo a disponibilização de suas informações genéticas em base de dados público para que oligonucleotídeos mais específicos possam ser desenhados.

As nítidas diferenças observadas entre a contagem obtida por qPCR e pela técnica de Utermöhl podem ser atribuídas às perdas de material durante o processamento das amostras (presença de aerotópos) para a extração de DNA e à baixa eficiência nas amplificações (79%), uma vez que em ambos os métodos a unificação do grupo "*Microcystis* sp. / *Sphaerocavum brasiliensis* / *Radiocystis fernandoii*" parece ter sido estabelecida. De acordo com Yoshida et al. (2007), para minimizar essas perdas, procedimentos de sonicação (47 Hz, 300 W) podem ser adotados. É importante ressaltar ainda que, segundo Schober et al. (2007), curvas de regressão construídas em equipamentos diferentes podem tanto subestimar (0-50%)

quanto superestimar (0-72%) as quantificações por qPCR. Os dados apresentados neste estudo poderão servir como base para pesquisas futuras com essa técnica, visando a obtenção de eficiência superior à apresentada.

4.5 Genótipos *mcy* em linhagens isoladas e no reservatório Salto Grande

Genótipos *mcy* foram quantificados com êxito, simultaneamente aos de PC, para a linhagem *M. aeruginosa* NPJB1 e para a amostra ambiental coletada em dezembro de 2006 (Coleta 1).

Por razões desconhecidas, a determinação desses genótipos ficou comprometida para as demais amostras, ocorrendo amplificações inespecíficas até mesmo para *M. aeruginosa* NPCD1. Apesar da constatação do gênero *Microcystis* em todas as coletas realizadas na Praia dos Namorados e da quantidade inicial de DNA ter sido a mesma para todas as reações de amplificação ($1,5 \text{ ng reação}^{-1}$), os *Cts* estiveram fora do alcance da curva de calibração (>40) para essas amostras e nenhum resultado foi alcançado. Problemas semelhantes também já haviam sido reportados por Kurmayer e Kutzenberger (2003) em seis amostragens (22 fev, 12 e 25 abr, 4 e 9 mai, 22 ago de 2000), quando a concentração de *mcyB* foi inferior ao limite de detecção da curva e *Cts* maiores que 45 foram obtidos. Da mesma forma, Schober et al. (2007) obtiveram curvas de amplificação lineares incomuns durante o processo de amplificação para o gene *mcyB*, usando o equipamento ABI7500, para duas amostras ambientais (22 fev e 05 junh de 2000). Essas curvas foram geradas após 6-8 ciclos (a 0,1) durante a amplificação, mas não resultaram em curva sigmóide típica com a fase platô. Conseqüentemente, valores baixos de *Ct* foram calculados, resultando em superestimação do número de células.

A Figura 17 ilustra o cenário em que foi realizada a primeira coleta deste estudo (dez 06). A Figura 18 mostra o gráfico de amplificação de seqüências (PC e *mcyA*) de *Microcystis* sp. para essa mesma amostra. Valores médios de *Ct* iguais a 28,01 e 26,96 foram, respectivamente, observados para *M. aeruginosa* NPJB1 e *Microcystis* sp.

As curvas de dissociação para os produtos amplificados de NMT mostraram picos de 81-82 °C, correspondendo à temperatura de dissociação da *Microcystis* sp. NPLJ4, cianobactéria usada como referência (Figura 19).

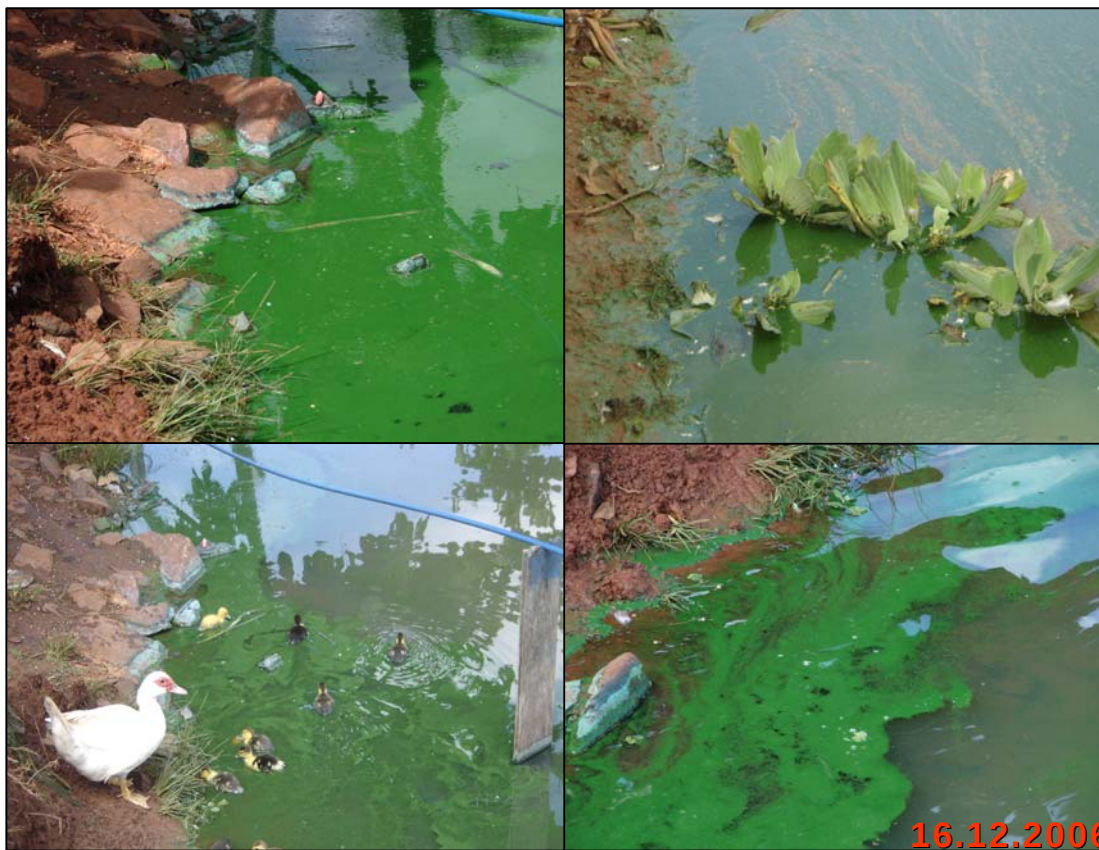


Figura 17 – Retrato do processo de eutrofização observado na Praia dos Namorados durante a realização da primeira coleta.

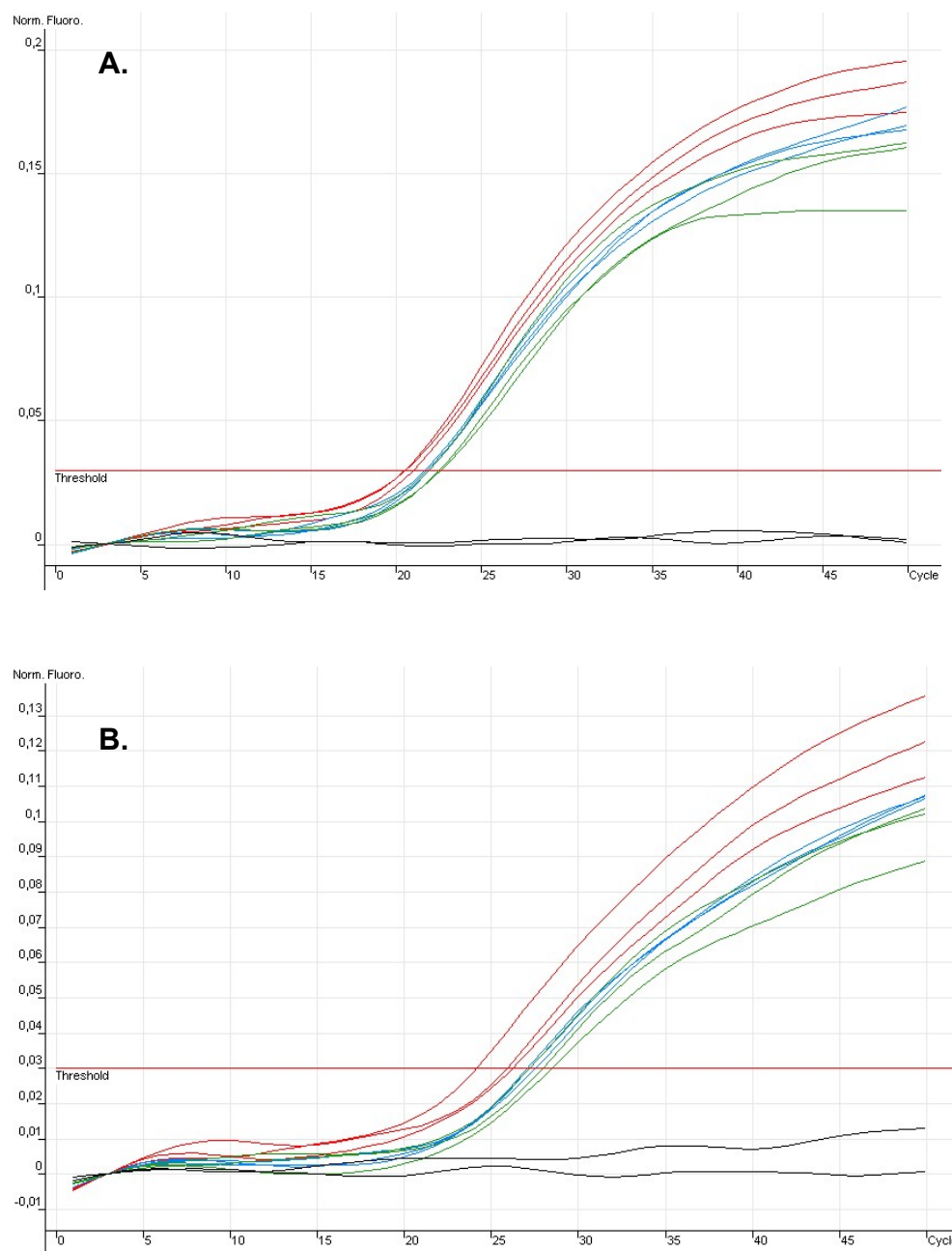


Figura 18 – Gráfico de amplificação por qPCR de seqüências de *Microcystis* sp. presentes na primeira coleta (dez 06). **A.** Região PC. **B.** Região NMT do gene *mcyA*. Linhas vermelhas, azuis e verdes indicam as tréplicas de extração de DNA e linhas pretas representam o controle negativo, sem DNA.

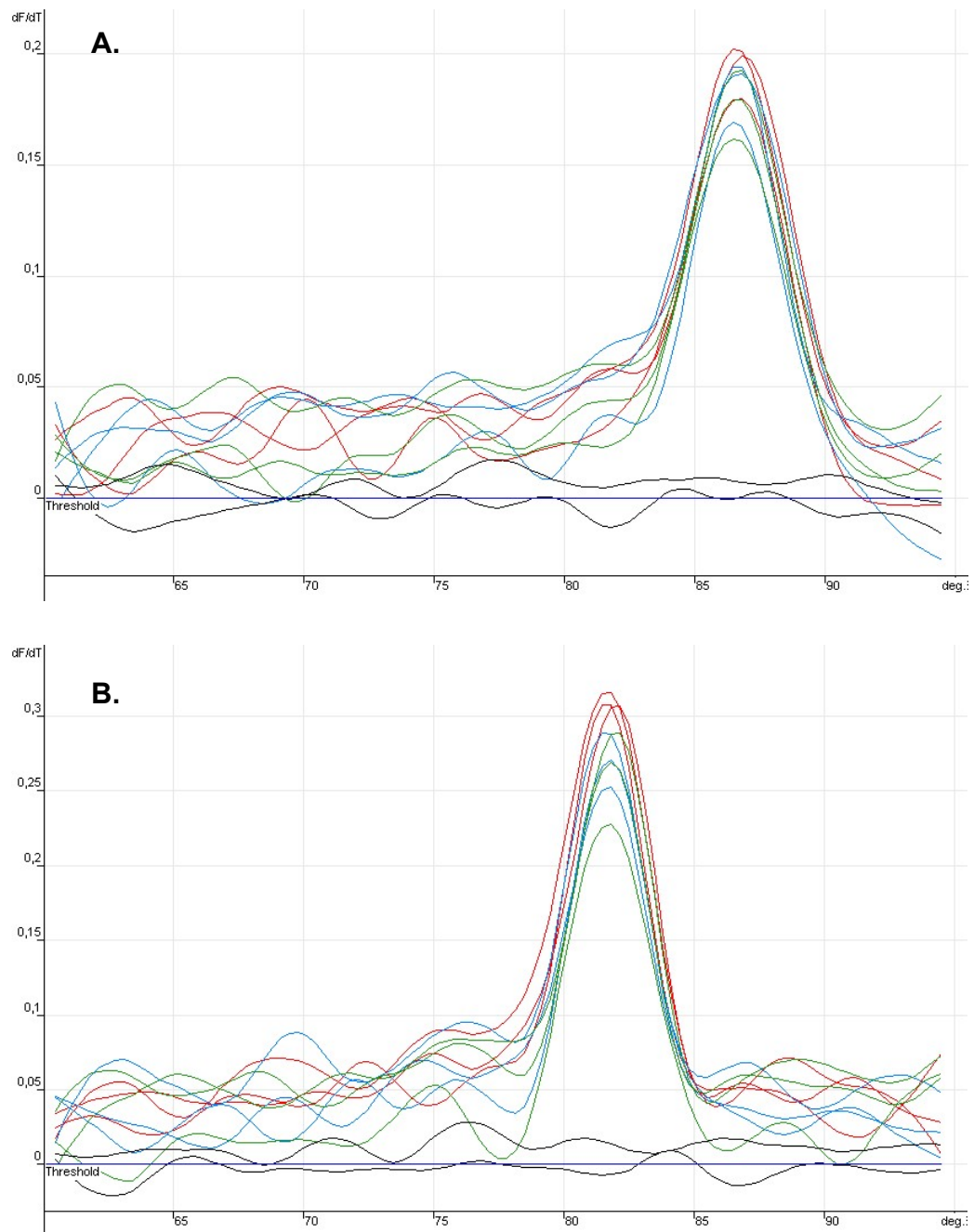


Figura 19 – Produtos dissociados entre 60 e 95 °C, com gradiente variando 1 °C a cada 60 s na primeira etapa (95 °C/15 s) e 5 s na segunda etapa (60 °C/5 s). **A.** Região PC. **B.** Região NMT do gene *mcyA*. Linhas vermelhas, azuis e verdes indicam as trélicas de extração de DNA e linhas pretas representam o controle negativo, sem DNA.

Os cálculos para a obtenção dos resultados em número de células mL⁻¹ seguem os mesmos descritos no item anterior. É importante lembrar que NPJB1 estava praticamente na fase de transição, entre a logarítmica e a estacionária, no momento em que a suspensão foi coletada para a análise. *M. aeruginosa* NPJB1 e *Microcystis* sp., de dez 06, resultaram em $3,27 \times 10^3$ e $1,21 \times 10^4$ células mL⁻¹, respectivamente.

A proporção de genótipos *mcyA* foi determinada pelo quociente estabelecido entre o número de células contendo estes genótipos (estimados pela técnica de qPCR) e número correspondente de genótipos PC (SCHOBER et al., 2007). Essa proporção foi de 0,5 e 2,7%, respectivamente, para *M. aeruginosa* NPJB1 e *Microcystis* sp. Nos estudos conduzidos por Kurmayer e Kutzenberger (2003), a proporção de genótipos *mcyB* variou de 1-38% na população de *Microcystis* observada no lago Wannsee. Flutuações semelhantes (0,5-35%) foram encontradas por Yoshida et al. (2007) para subpopulações com genótipo *mcyA* no lago Mikata, no Japão. Em Schober et al. (2007), a proporção de genótipos *mcyB* variou de 2-28% e não diferiu entre os três equipamentos usados. De acordo com Carmichael e Gorham (1977, 1981), a toxicidade é variável nas florações devido à coexistência no mesmo nicho ecológico de linhagens tóxicas e não tóxicas. Dessa forma, torna-se evidente que populações de *Microcystis* compõe um mosaico nas floração (PARK et al., 1993), com indivíduos geneticamente diferentes em uma mesma população, cada um, possivelmente, com suas próprias tolerâncias aos fatores ambientais e com potencial distinto para toxicidade. Coexistência de genótipos tóxico e não-tóxico numa mesma população já foi relatada nos reservatórios de Cantareira e Barra Bonita, São Paulo, Brasil (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003).

Em linhagens isoladas de cianobactérias, o conhecimento prévio da fase de crescimento, na qual a cultura se encontra, parece ser fundamental para as quantificações. Kurmayer e Kutzenberger (2003) relatam que, durante a transição da fase logarítmica para a estacionária, a concentração celular obtida por qPCR foi superestimada quando comparada aos dados de contagem no microscópio. De acordo com os mesmos autores, essas variações ocorrem devido à incompatibilidade existente entre a duplicação do DNA e a subsequente divisão celular. Em contraste, Furukawa et al. (2006), mostraram que a concentração celular na fase estacionária foi subestimada

pela técnica. Os autores atribuem esse fato ao aumento na quantidade de pigmentos fotossintetizantes capazes de inibir as reações enzimáticas, particularmente a PCR e a transcriptase reversa (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995).

A baixa porcentagem de genótipos *mcyA* observada na subpopulação da NPJB1 sugere também pouca eficiência na amplificação de fragmentos do domínio NMT, apesar de seu *Ct* (28,01) estar de acordo com o limite superior da curva de calibração. Esse fato já era esperado, de certa forma, em função da eficiência de apenas 76% estimada para essas amplificações. Assomam-se a esse fato as perdas de material genético decorrentes da etapa de peletização das amostras. Trabalhando com possibilidades mais remotas, o isolamento, cultivo e manutenção de linhagens em laboratório por períodos prolongados poderiam promover mutações (KAEBERNICK et al., 2001; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001) e seleção de organismos, cujo metabolismo estivesse mais adaptado às condições controladas oferecidas, como exposição à alta concentração de nutrientes e alta intensidade luminosa (WHITTON; POTTS, 2000), sugerindo seleção aleatória de linhagens tóxicas e não-tóxicas.

Nenhuma associação entre a observação de morfotipos e a presença de genes *mcy*, como já foi demonstrado por Neilan et al. (1999), Nishizawa et al. (1999), Otsuka et al. (1999) e Tillett et al. (2001), foi verificada. No entanto, há fortes evidências neste estudo da possibilidade de uso do número de células de *Microcystis* para inferir a proporção de genótipos *mcy* na Praia dos Namorados. A proporção de *mcyA* compôs a menor parte dos genótipos PC em Salto Grande, porém estudos mais detalhados seriam de grande valia para se investigar a variabilidade sazonal desta subpopulação. A detecção de cianobactérias tóxicas por métodos moleculares representa uma ferramenta poderosa para análises de rotina em ecossistemas aquáticos, capaz de antecipar ações corretivas de controle, mas para isso estudos complementares são imprescindíveis. Além disso, a construção de novos iniciadores de qPCR faz-se necessária, uma vez que para os quatro períodos amostrados em Salto Grande, apenas para um deles (dez 06) esta determinação foi possível.

Na tentativa de se obter amplificações para as demais coletas (abr, set e nov 07), quantidades adicionais de DNA e *primers* foram usadas sem sucesso. Quantidade extra de magnésio não foi testada, pois todas as reações já haviam usufruído da quantidade

máxima do reagente sugerida pelo fabricante. Suposta perda de fluorescência pelos iniciadores também foi totalmente descartada a partir da confecção de novos *primers* com seqüências idênticas às originais, para os quais amplificações inespecíficas se repetiram.

Outro ponto importante a ser considerado diz respeito à presença de *Anabaena*, *Radiocystis* e *Planktothrix* nessas amostras. Apesar de nenhum produto de qPCR ter sido produzido, amplificação por PCR convencional para a região NMT de *Radiocystis fernandoii* SPC714 foi obtida. Vieira et al. (2003) foram os pioneiros a relatarem produção de microcistinas para esse gênero ($3,83 \mu\text{g mg}^{-1}$) por HPLC. A análise BLAST também revelou 95% de identidade com *M. aeruginosa* UWOCCE7, cianobactéria tóxica, isolada do Canadá. De acordo com Rouhiainen et al. (2004), comparação feita para o gene *mcyA* da *Anabaena* 90 com *M. aeruginosa* PCC7806 resultou em 69% de identidade para DNA, 68% de identidade para aminoácidos e 41% de correspondência para G + C. A comparação dessa mesma *Anabaena* com *Planktothrix agardii* CYA 126/8 resultou em % de 67, 66 e 45, respectivamente, para os mesmos elementos analisados.

4.6 Análise de microcistinas

O ensaio imunológico ELISA, realizado nas amostras de cianobactérias isoladas e nas ambientais, identificou a produção de microcistinas do tipo LR, RR ou YR nas amostras com concentração maior que $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Embora várias microcistinas possam estar sendo produzidas durante uma floração, a microcistina-LR é a de ocorrência mais comum e uma das variantes mais tóxicas (CARMICHAEL, 1992; FAWELL et al., 1993).

Com exceção da *M. aeruginosa* NPCD1 e Coleta 3 (set 07, amostra menos densa), diluições foram necessárias para todas as demais análises, de forma que o resultado final pudesse estar dentro da curva de calibração estabelecida pelo método. Em alguns casos, mesmo usando diluições altas, os valores detectados não puderam se correlacionar com o limite de $2 \mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde ao alcance máximo da curva (Tabela 15). Apenas para NPCD1 a produção de microcistinas não foi detectada, conforme já observado anteriormente (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003).

Correspondência entre a metodologia molecular desenvolvida neste estudo e a imunodeteção de microcistinas para NPJB1 e *Microcystis* sp. (dez 06) sugerem fortemente a aplicação de técnicas baseadas em marcadores moleculares para o monitoramento de ecossistemas aquáticos em associação com outros métodos. Esses resultados corroboram com a produção de microcistinas e a ocorrência de *mcyB* na população do lago Wannsee (KURMAYER et al., 2002; KURMAYER; CHRISTIANSEN; CHORUS, 2003).

Tabela 15 - Detecção de microcistinas pelo método ELISA

Amostra	Diluição	Concentração detectada ($\mu\text{g L}^{-1}$)
<i>Microcystis</i> sp. NPLJ4	50 ×	86,76
<i>M. aeruginosa</i> NPJB1	40 ×	144,79 *
<i>M. aeruginosa</i> NPCD1	-	0,04 **
Coleta 1 - Floração	6 ×	10,18
Coleta 2 - Floração	2 ×	3,44
Coleta 3 - Floração	19 ×	6,10
Coleta 3 - Amostra menos densa	-	0,93
Coleta 4 - Floração	45 ×	185,11 *
Coleta 4 - Amostra menos densa	40 ×	6,38

* Concentração maior do que o maior calibrador

** Concentração menor do que o menor calibrador

Alguns estudos sobre identificação de genes responsáveis pela produção de microcistinas sugeriram que a diferença entre uma linhagem produtora de microcistinas (tóxica) de uma não produtora (não tóxica) residia primariamente na presença ou ausência do agrupamento de genes da sintetase de microcistinas (MEISSNER; DITTMANN, BÖRNER, 1996; NISHIZAWA et al., 2000). Contudo, para a elucidação da biossíntese de cianotoxinas nos ambientes aquáticos, existe a necessidade de informações quantitativas e qualitativas sobre a regulação desses genes, RNAm, níveis de proteínas e quantificação das toxinas produzidas. Atualmente, o principal problema com relação à eficiência de utilização de seqüências gênicas responsáveis pela produção de cianotoxinas para monitoramento de águas é a constatação de que nem sempre a detecção destas seqüências é indicativo de produção de toxinas. Vários

estudos têm mostrado que em algumas linhagens de *Microcystis* (KAEBERNICK et al., 2001; MIKALSEN et al., 2003; NISHIZAWA et al., 1999; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001) e *Planktothrix* (KURMAYER et al., 2004), que continham genes da sintetase de microcistina (*mcy*), esta toxina não foi detectada. Diante desse fato, foi sugerido que a expressão de genes *mcy* pode ter sido reprimida nessas linhagens, em particular por fatores ambientais. Um fator ambiental conhecido atualmente por afetar a expressão dos genes *mcy* é a intensidade luminosa (KAEBERNICK et al., 2000; WIEDNER et al., 2003). Outro fator preocupante, foi a constatação de que, mesmo havendo a transcrição dos genes *mcyA* e *mcyB* em uma linhagem de *Microcystis*, a produção de microcistinas não foi detectada (MIKALSEN et al., 2003). Esse resultado levantou suspeita de que a regulação da produção de microcistinas não ocorreria em nível de transcrição, mas de tradução (ou até mesmo pós-tradução).

Vários autores sugeriram que a inativação dos genes da biossíntese de microcistinas pode estar ocorrendo devido à mutações espontâneas nos genes *mcy* durante longos períodos de cultivo (KAEBERNICK et al., 2001; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). Entretanto, a ocorrência natural de nove linhagens de *Planktothrix* que continham os genes *mcy*, mas não produziam microcistinas, foi observada em vários lagos da Europa (KURMAYER et al., 2004). Recentemente, num estudo de filogenia molecular de microcistinas, sugeriu-se que a distribuição esporádica dos genes da sintetase de microcistinas nas cianobactérias atuais é uma herança de seus antigos ancestrais e que a ausência desta via metabólica em vários gêneros e espécies de cianobactérias é resultado de deleções repetitivas do *mcy* durante a evolução (RANTALA et al., 2004).

Contudo, a ocorrência de transferência lateral de genes *mcy* entre diferentes linhagens de *Microcystis* seguida de recombinação também tem sido descrita como uma possível causa da variação genética do agrupamento de genes *mcy* (TANABE; KAYA; WATANABE, 2004). Esses autores especulam que plasmídeos ou fagos ainda desconhecidos mediam trocas gênicas entre diferentes linhagens de *Microcystis*. Para corroborar com essa suposição, uma possível transposase foi identificada em *Anabaena circinalis* tóxica (POMATI; NEILAN, 2004), o que segundo esses autores, suporta a hipótese de que a transferência lateral de genes talvez ocorra entre linhagens

de cianobactéria. De acordo com os resultados dos estudos relatados acima, pode-se supor que em algumas linhagens os genes da biossíntese de microcistinas estão presentes, mas foram inativados, ou que sua ativação é determinada por fatores ainda não conhecidos.

4.7 Análise estatística

A comparação entre os dados gerados pela contagem de cianobactérias em microscópio invertido e por qPCR, amostra-a-amostra, em pares para médias, foi significativa ($p < 0,05$, Teste t de Student) para todas as análises feitas. Esses resultados já eram visivelmente esperados (Figura 20), pois diferença de ao menos 10 x pode ser observada entre ambas as quantificações. Dessa forma, rejeita-se a hipótese de nulidade entre as contagens e assume-se que há diferença estatística nos valores determinados entre os métodos de análise.

O coeficiente de correlação linear de Pearson foi também usado para estabelecer a relação entre as duas variáveis (quantificações por Utermöhl e qPCR). Nesse contexto, segundo lemma (1992), valores -1 e +1 descrevem, respectivamente, a correlação linear perfeita negativa e positiva entre X e Y (Figura 21). Valores em torno de $\pm 0,5$ indicam uma correlação linear moderada, negativa ou positiva. Quanto mais próximo de $r = 1$ (positiva) e $r = -1$ (negativa), maior é a correlação indicada. De forma, forte tendência à correlação positiva foi observada para NPCD1 ($r = 0,82$), enquanto que para NPJB1 a correlação existente entre as variáveis foi mais moderada ($r = 0,69$). Para as demais amostras, as correlações foram todas negativas, indicando possível tendência à ausência de correlação para a coleta 3 (set 07, amostra menos densa) e coleta 4 (nov 07, floração), com valores de r próximos de zero, sendo -0,14 e -0,26, respectivamente.

Schober e Kurmayer (2006), porém, avaliaram a influência do método de extração de DNA nas amplificações por qPCR, usando diferentes concentrações celulares da *Microcystis* HUB53 (10^2 - 10^8 células filtro⁻¹), mas não constatarem diferença significativa quando compararam a contagem obtida por microscopia e os dados gerados por qPCR. Os mesmos autores encontraram diferenças significativas entre os métodos de análise para a população de *Planktothrix* no lago Wannsee. Nos três

equipamentos avaliados por Schober et al. (2007) em seus estudos, o número de células em amostras da natureza, tanto para genótipos PC quanto *mcyB*, mostraram relação linear significativa com o número de células determinado no microscópio. Em contraste, as curvas de regressão definidas para cada equipamento podem tanto subestimar (0-50%) quanto superestimar (0-72%) a proporção de genótipos *mcyB*.

Kurmayer e Kutzenberger (2003), também relatam diferença significativa durante todo o período estudado entre o número de células estimado via microscópio invertido e por qPCR. Superestimação dos dados (10 vezes) por qPCR foi verificada na transição entre a fase logarítmica e estacionária para genótipos *mcyB*.

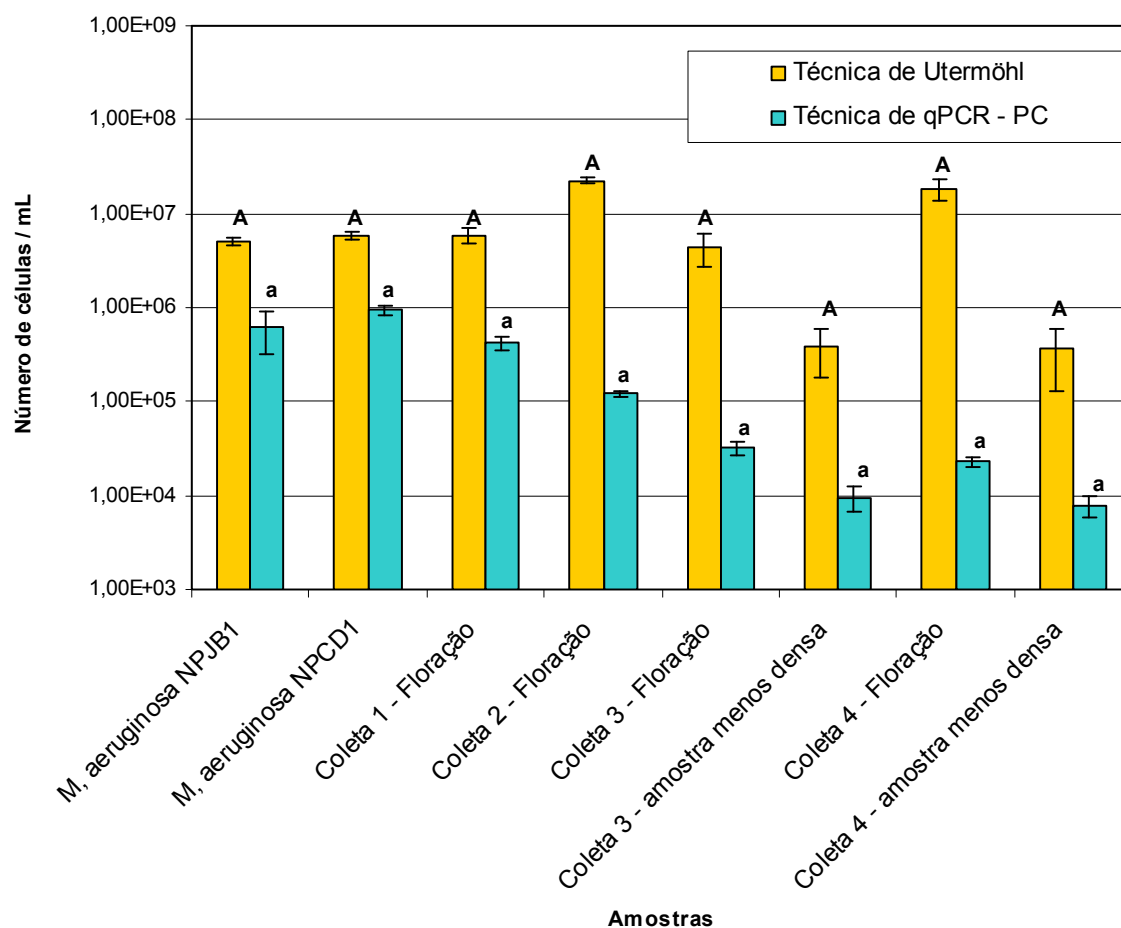


Figura 20 – Comparação entre os resultados observados na contagem de células de *Microcystis* pela metodologia tradicional e por qPCR. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias avaliadas ($p < 0,05$, Teste t de Student).

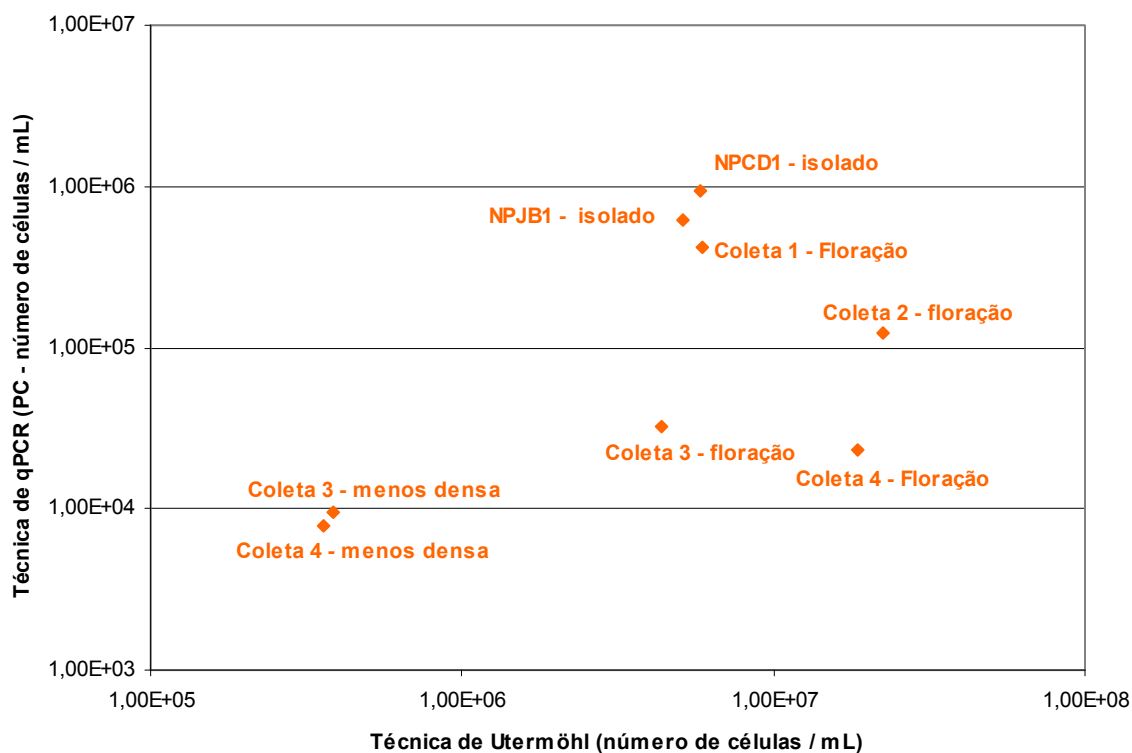


Figura 21 – Correlação amostra-a-amostra para dados obtidos por técnicas de contagem distintas.

4.8 Custos operacionais

4.8.1 Custo operacional usando a técnica de Utermöhl

A planilha de custos elaborada para esta técnica encontra-se no Apêndice 2. Abaixo, tem-se o detalhamento para a obtenção do custo operacional por amostra analisada, cujo cálculo é especificado para cada célula da planilha:

a) Material de consumo (reagentes, solventes e soluções):

Solução Lugol

1. Ácido acético glacial: foram adquiridos 4 L do produto a R\$ 190,00. Para o preparo de Lugol são necessários apenas 20 mL, portanto o custo para este volume é de R\$ 0,95.
2. Iodeto de potássio: foram adquiridos 500 g do reagente a R\$ 399,02. Para o preparo de Lugol são necessários apenas 20 g, assim o custo para esta quantidade é de R\$ 15,96.
3. Iodo (em grânulos) 99,7%: foram adquiridos 250 g do reagente a R\$ 355,38. São necessários 10 g do reagente para o preparo de Lugol. O custo referente a essa quantidade é de R\$ 14,22.
4. Água destilada para o preparo de Lugol: custo estimado em R\$ 0,10 L⁻¹ de água, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, baseando-se em dados obtidos pela UNICAMP. Esse valor pressupõe o consumo energético do equipamento em kW h e o consumo de água da torneira, gastando-se aproximadamente 7 a 8 kW h para saturar um reservatório com capacidade para 30 L em 10 h. Como são utilizados 200 mL de água destilada para o preparo de Lugol, tem-se um custo de R\$ 0,02 para este volume.
5. Solução Lugol: o custo para o preparo de 200 mL de Lugol é de R\$ 31,15 (somatória dos itens 1, 2, 3 e 4).
6. Solução Lugol necessária por amostra: para cada 100 mL de amostra é necessário aproximadamente 1 mL de Lugol para a fixação das células, logo tem-se um custo de R\$ 0,16 amostra⁻¹.

Solução de hidróxido de potássio (KOH)

7. Hidróxido de potássio (KOH): adquiriu-se 1 kg do reagente a R\$ 260,00. Para o preparo da solução 0,1 mol L⁻¹ de KOH são necessários 5,6 g, logo tem-se um custo de R\$ 1,46 para esta quantidade.
8. Água destilada para solução de KOH: custo estimado em R\$ 0,10 L⁻¹ de água destilada, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante.
9. Solução de KOH: o custo total da solução de KOH é R\$ 1,56 (somatória dos itens 7 e 8).

10. Solução de KOH necessária por amostra: a solução de KOH é usada na proporção de 1:1 para desagregar as células, assim tem-se um custo de R\$ 0,16 para cada amostra de 100 mL.

b) Equipamentos:

1. Depreciação - destilador de água (Dd): custo estimado em R\$ 2,84 amostra⁻¹. O valor orçado para o equipamento foi de R\$ 17.475,00. Foram considerados 8 anos de uso, para cada qual faz-se a análise de 768 amostras ano⁻¹ (para esta técnica são avaliadas 4 amostras no dia para um mês de 4 semanas; logo, em um ano, ou seja, em 12 meses, tem-se 768 amostras):

$$Dd = \left(\frac{R\$17.475,00 / 8\text{anos}}{768\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (3)$$

2. Depreciação - banho maria (Db): custo estimado em R\$ 0,30 amostra⁻¹. Considerou-se o valor do equipamento e sua depreciação em 8 anos. O valor obtido foi repartido pelo número total de amostras analisadas no ano, ou seja, 768 amostras:

$$Db = \left(\frac{R\$1.872,38 / 8\text{anos}}{768\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (4)$$

3. Consumo de energia - banho maria: são necessários 40 min dia⁻¹ de uso do equipamento para o preparo simultâneo de 4 amostras. Mensalmente, ou seja, em 16 dias (4dias/semana × 4semanas/mês), tem-se cerca de 11 h de utilização do equipamento (40min/dia × 16dias/mês). Além disso, de acordo com o fabricante, a potência do equipamento é de 1,4 kW. Como são gastas 11 h mês⁻¹ para a análise de 64 amostras (4amostras/dia × 4dias/semana × 4semanas/mês), tem-se o consumo mensal de 15,4 kW h (1,4kW × 11h). Considerou-se ainda, de acordo com informações obtidas na CPFL, o custo de R\$ 0,35 para kW h. Dessa forma, o custo mensal de energia para o banho maria é de R\$ 5,40

(R\$0,35/kWh $\times$ 15,4kWh/mês). Logo, o gasto total de energia no mês (R\$ 5,40), contabilizado para cada amostra analisada, é de R\$ 0,08, ou seja, de $\left(\frac{R\$5,40 / \text{mês}}{64 \text{ amostras} / \text{mês}} \right)$.

4. Depreciação - microscópio invertido (Dm): o orçamento para este equipamento foi fornecido em dólar (US\$ 19,140.00). Portanto, utilizou-se a média dessa moeda referente aos 3 últimos meses (R\$ 1,7653 – CEPEA, ESALQ/USP) para o cálculo de seu valor em reais (R\$ 33.787,84). Como a capacidade de análise do analista é de 4 amostras dia⁻¹ e são considerados 4 dias semana⁻¹ para a contagem das células, tem-se 64 amostras analisadas em 1 mês (4amostras/dia $\times$ 4dias/semana $\times$ 4semanas/mês). Em 1 ano, são 768 amostras analisadas (64amostras/mês $\times$ 12meses/ano). Portanto, a depreciação estimada para o equipamento é de R\$ 5,50 ano⁻¹ amostra⁻¹:

$$Dm = \left(\frac{R\$33.787,84 / 8 \text{ anos}}{768 \text{ amostras} / \text{ano}} \right) \quad (5)$$

5. Consumo de energia - microscópio invertido: são necessárias 1:30 h amostra⁻¹ de utilização do equipamento. Como são analisadas 4 amostras dia⁻¹, tem-se um tempo total de uso de 6 h dia⁻¹ (4amostras/dia $\times$ 1,5h/amostra). Logo, no mês, o microscópio é usado durante 96 h (6horas/dia $\times$ 4dias/semana $\times$ 4semanas/mês). Considerando-se sua potência de 0,1 kW, tem-se ainda que o consumo mensal de energia do equipamento é de 9,6 kW h mês⁻¹ (0,1kW $\times$ 96h/mês). Sendo de R\$ 0,35 o custo de 1 kW h, o gasto mensal do equipamento é de R\$ 3,36 (R\$0,35/kWh $\times$ 9,6kWh/mês). Para a análise de 64 amostras mês⁻¹, o custo de energia para cada uma delas é R\$ 0,05, ou seja, de $\left(\frac{R\$3,36 / \text{mês}}{64 \text{ amostras} / \text{mês}} \right)$.
6. Depreciação - câmaras de Utermöhl (Dc): o custo unitário da câmara de Utermöhl é de R\$ 440,00 (16 amostras mês⁻¹ são analisadas por meio de cada

câmara). Como as amostras analisadas no dia são preparadas simultaneamente, utilizam-se 4 câmaras dia⁻¹ (R\$ 1.760,00). Considerando-se ainda que o analista ocupa 4 dias semana⁻¹ para a contagem das células, são analisadas 768 amostras ano⁻¹. Portanto, a depreciação estimada para cada câmara de Utermöhl é de R\$ 0,29 amostra⁻¹:

$$Dc = \left(\frac{R\$1.760,00 / 8anos}{768amostras / ano} \right) \quad (6)$$

7. Depreciação - autoclave (65 L) (Da): para este cálculo, utilizou-se o valor do equipamento e sua depreciação em 8 anos. O valor obtido foi dividido pelo número total de amostras analisadas no ano, resultando em R\$ 2,08 amostra⁻¹:

$$Da = \left(\frac{R\$12.800,00 / 8anos}{768amostras / ano} \right) \quad (7)$$

8. Consumo de energia - autoclave (65 L): utiliza-se a autoclave 45 min semana⁻¹, portanto 3 h mês⁻¹ (45min/semana × 4semanas/mês). A potência do equipamento é de 2,8 kW. Logo, seu consumo mensal de energia é de 8,4 kW h (2,8kW × 3h/mês), representando um custo de R\$ 2,94 mês⁻¹ (R\$0,35/kWh × 8,4kWh/mês). Como são analisadas 64 amostras mês⁻¹, são gastos aproximadamente R\$ 0,05 amostra⁻¹.

c) Demais custos relacionados

1. Analista (mão-de-obra): considerou-se que o analista desenvolve apenas atividades relacionadas à contagem de cianobactérias pela técnica de Utermöhl, com capacidade de análise para 4 amostras dia⁻¹. Conforme já demonstrado acima, são analisadas mensalmente 64 amostras. Portanto, o custo de mão de obra para cada amostra é de R\$ 39,06, supondo-se que a remuneração mensal do analista é R\$ 2.500,00.

2. Água de torneira para lavagem de materiais: conforme dados fornecidos pelo SEMAE, o custo estimado para a água de torneira é de R\$ 0,02 L⁻¹. Supondo um consumo de 5 L dia⁻¹ dessa água para a lavagem de 4 câmaras de Utermöhl, tem-se um gasto de 80 L mês⁻¹ ($5L/dia \times 4dias/semana \times 4semanas/mês$). Assim, o custo mensal para esse consumo é de R\$ 1,60 ($R\$0,02/L \times 80L/mês$), representando R\$ 0,03 amostra⁻¹.

3. Água destilada para banho maria: o custo para a água destilada estimado pelo fabricante é de R\$ 0,10 L⁻¹. Supondo um consumo de 5 L semana⁻¹ dessa água para o banho maria, tem-se um gasto de 20 L mês⁻¹ ($5L/semana \times 4semanas/mês$). O custo mensal para esse consumo é de R\$ 2,00 ($R\$0,10/L \times 20L/mês$), representando R\$ 0,03 amostra⁻¹.

4. Água de torneira para autoclave: o custo estimado para a água de torneira é de R\$ 0,02 L⁻¹. Supondo um consumo de 20 L semana⁻¹ dessa água para a autoclave, tem-se um gasto de 80 L mês⁻¹ ($20L/semana \times 4semanas/mês$). Logo, o custo mensal para esse consumo é de R\$ 1,60 ($R\$0,02/L \times 80L/mês$), representando R\$ 0,03 amostra⁻¹.

Tabela 16 - Síntese dos custos envolvidos na análise pela técnica de Utermöhl

Categoria	Custo total amostra⁻¹ (R\$)
Produtos (itens 6 e 10)	0,31
Equipamentos (todos os itens)	11,20
Demais custos relacionados (todos os itens)	39,14
Total	50,65

Fonte: Dados de pesquisa

Com base nos dados apresentados, o custo operacional obtido para a análise usando a técnica de Utermöhl é de aproximadamente R\$ 51,00 amostra⁻¹.

4.8.2 Custo operacional usando a técnica de qPCR

A planilha de custos elaborada para esta técnica encontra-se no Apêndice 2. A seguir, encontra-se o detalhamento para a obtenção do custo operacional por amostra analisada, cujo cálculo é especificado para cada célula da planilha. Ressalta-se que os valores (preços orçados para os materiais de consumo e equipamentos) referem-se a valores correspondentes ao mês de fevereiro de 2008.

a) Material de consumo (reagentes, soluções e plásticos para laboratório):

Solução tamponante TBE 5X

1. Tris UltraPure: adquiriu-se 1 kg do produto a R\$ 292,00. Para o preparo de TBE 5X são necessários 54 g. O custo para essa quantidade é de R\$ 15,77.
2. Ácido bórico: adquiriu-se 1 kg do produto a R\$ 27,00. No preparo de TBE 5X são utilizados 27,5 g. O custo para essa quantidade é de R\$ 0,74.
3. Na₂EDTA: adquiriu-se 500 g do produto a R\$ 335,74. Para o preparo de 500 mL de Na₂EDTA 0,5 M, pH 8,0, foram utilizados 93,05 g. O custo para essa quantidade é de R\$ 62,48.
4. Água ultrapura para solução de Na₂EDTA: de acordo com informações fornecidas pelo fabricante do equipamento, o custo da água ultrapura é de R\$ 0,15 L⁻¹. Para o preparo de 500 mL de solução Na₂EDTA 0,5 M, pH 8,0, são gastos R\$ 0,08 dessa água.
5. Solução de Na₂EDTA: são gastos R\$ 62,56 para o preparo de 500 mL dessa solução (somatória dos itens 3 e 4). Nesse valor, deve-se subentender que estão incluídos 10 g de hidróxido de sódio (NaOH) para que o pH da solução seja elevado a 8,0, de forma que o Na₂EDTA possa se dissolver.
6. Solução de Na₂EDTA necessária: para o preparo de TBE 5X são usados 20 mL de Na₂EDTA 0,5 M, pH 8,0. Portanto, seu custo é de R\$ 2,50.
7. Água ultrapura para solução TBE 5X: para o preparo de 1 L de TBE 5X, gastam-se R\$ 0,15 de água ultrapura.
8. Solução de TBE 5X: para o preparo de 1 L desta solução são gastos R\$ 19,16 (somatória dos itens 1, 2, 6 e 7).

Solução tamponante TBE 0,5X para cuba de eletroforese

9. Solução de TBE 5X necessária: são usados 100 mL de TBE 5X para se obter 1 L de TBE 0,5X. O custo desse volume é de R\$ 1,92.
10. Água ultrapura para solução TBE 0,5X: para o preparo de 1 L de TBE 0,5X, são necessários 900 mL de água ultrapura. Sabe-se que o custo de 1 L dessa água é de R\$ 0,15, portanto são gastos R\$ 0, 14 para o volume desejado.
11. Solução de TBE 0,5X: para o preparo de 1 L desta solução são gastos R\$ 2,05 (soma dos itens 9 e 10). No entanto, 500 mL de TBE 0,5X são usados semanalmente para o preenchimento da cuba de eletroforese, sendo necessários 2 L de tampão por mês. Levando-se em consideração que são analisadas 18 amostras dia⁻¹, durante 4 dias semana⁻¹, tem-se 288 amostras analisadas no mês ($18\text{amostras}/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$). O custo da solução atribuído a cada uma delas é de R\$ 0,01, ou seja, de $\left(\frac{R\$4,10}{288\text{amostras}}\right)$.

Gel de agarose 1%-TBE 0,5X

12. Agarose: adquiriu-se 500 g do produto a R\$ 1.826,00. Para o preparo de 50 mL de gel 1%-TBE 0,5X, necessita-se de 0,5 g. O custo para essa quantidade é de R\$ 1,83.
13. Solução de TBE 0,5x para gel de agarose 1%: para o preparo de 1 L desta solução são gastos R\$ 2,05, conforme item 11. Para o preparo de 50 mL de gel de agarose 1%-TBE 0,5X são gastos R\$ 0,10.
14. Gel de agarose 1%-TBE 0,5X: o custo para a confecção de um gel com estas características é de R\$ 1,93 (soma dos itens 12 e 13). Nesse valor, deve-se subentender que estão incluídos 2 g de sacarose e azul de bromofenol para um volume final de 5 mL de água ultrapura, compondo o tampão de carregamento da amostra. Considera-se também 1 µL de brometo de etídio como corante. Em 1 mês, são produzidos 16 géis ($1\text{gel}/\text{semana} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$) para a análise de 288 amostras, e o custo atribuído a cada uma delas é de R\$ 0,11.

Demais materiais de consumo

15. Kit Power Soil DNA: para a análise mensal de 288 amostras ($18\text{amostras}/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$) são necessários aproximadamente 6 kits de extração de DNA genômico. O valor unitário para cada um deles é de R\$ 1.200,00 e são oferecidos reagentes para 50 extrações de DNA. Sob essas considerações, pode-se atribuir um custo de R\$ 24,00 a cada amostra ($R\$1.200,00/1\text{Kit} \times 1\text{Kit}/50\text{extrações}$).
16. Low DNA Mass Ladder: 200 μL deste marcador são comercializados a R\$ 374,00. Para cada gel de agarose confeccionado são utilizados 2 μL , representando um custo de R\$ 3,74. Mensalmente, são necessários 16 géis para a análise de 288 amostras, portanto 32 μL do marcador, o que corresponde a R\$ 59,84. Dessa forma, tem-se um custo de R\$ 0,21 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$59,84}{288\text{amostras}} \right)$.
17. Microtubos (0,2 mL): o pacote de microtubos de 0,2 mL contém 1.000 unidades e é comercializado a R\$ 84,00. Por mês, são necessários 288 microtubos para as amplificações por qPCR, cujo valor total é R\$ 24,19. Fracionando-se esse custo, tem-se R\$ 0,08 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$24,19}{288\text{amostras}} \right)$.
18. Microtubos (1,5 mL): o pacote de microtubos de 1,5 mL contém 500 unidades e é comercializado a R\$ 30,00. São utilizadas 288 unidades por mês, cujo valor total é R\$ 17,28. Fracionando-se esse custo, tem-se R\$ 0,06 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$17,28}{288\text{amostras}} \right)$.
19. Ponteiras amarelas: o custo para o pacote contendo 1.000 unidades de ponteiras é de R\$ 48,90. Mensalmente, para a análise de 288 amostras, são necessárias cerca de 2.000 unidades, ou seja, 2 pacotes. Dessa forma, tem-se um custo de R\$ 0,34 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$97,80}{288\text{amostras}} \right)$.

20. Ponteiras azuis: o pacote comercializado contém 1.000 unidades e seu custo é de R\$ 50,00. Utiliza-se o pacote todo para a análise de 288 amostras no mês e seu custo é de R\$ 0,17 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$50,00}{288\text{amostras}} \right)$.
21. Caixa de luvas: o custo para a caixa de luvas com 100 unidades, tamanho P, é de R\$ 13,00. Por mês, utiliza-se 1 caixa para a análise de 288 amostras, sendo R\$ 0,05 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$13,00}{288\text{amostras}} \right)$.
22. Platinum Quantitative PCR Supermix UDG: seu custo é de R\$ 480,00 e oferece 2 mL de Supermix. Para cada reação (25 µL) de amplificação por qPCR são usados 12,5 µL amostra⁻¹. Portanto, para a análise de 288 amostras mês⁻¹, são necessários 3,6 mL, o que corresponde a 2 kits. Sendo assim, são R\$ 3,33 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$960,00}{288\text{amostras}} \right)$.
23. Oligonucleotídeos - FAM: considerando-se que, em média, os oligonucleotídeos marcado e não-marcado correspondiam a 17 ηmoles, para a obtenção de estoques com 50 pmoles µL⁻¹ foram adicionados aos microtubos 340 µL de água ultrapura esterilizada $\left(\frac{17 \times 1.000\text{pmoles}}{50\text{pmoles}/\mu\text{L}} \right)$. A partir daí, foram usados 10 µL do estoque e 90 µL de água ultrapura para se obter a concentração de 5 pmol µL⁻¹, num volume final de 100 µL. Portanto, atribuiu-se o custo de R\$ 553,47 ao volume da primeira diluição (340 µL), de forma que o custo para os 10 µL usados na segunda diluição foi de R\$ 16,28. Fracionando-se esse custo, tem-se R\$ 0,06 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$16,28}{288\text{amostras}} \right)$. Assim, o custo total para o conjunto de oligonucleotídeos foi R\$ 0,11 amostra⁻¹, ao se considerar iniciadores marcados e não marcados.
24. Oligonucleotídeos - JOE: o mesmo raciocínio foi seguido para o segundo conjunto de iniciadores. No entanto, a quantidade usada de cada iniciador nas reações de amplificação é o dobro em relação ao primeiro conjunto (0,25 µL reação⁻¹ de cada iniciador), sendo necessária a utilização de 20 µL do estoque e 180 µL de água

ultrapura esterilizada para a análise de 288 amostras. Por isso, tem-se um custo de R\$ 0,23 amostra⁻¹, ao se considerar iniciadores marcados e não marcados.

b) Equipamentos:

1. Depreciação - kit de micropipetas (Dk): considerando-se que são analisadas 18 amostras dia⁻¹ e que o analista utiliza 4 dias na semana para as determinações, sendo o último dia destinado à compilação dos dados e emissão de resultados, tem-se a análise de 3.456 amostras ano⁻¹ ($18\text{amostras}/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês} \times 12\text{meses}/\text{ano}$). Portanto, a depreciação estimada é de R\$ 0,08 amostra⁻¹, levando-se em conta 8 anos de uso:

$$Dk = \left(\frac{R\$2.292,00 / 8\text{anos}}{3.456\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (8)$$

2. Depreciação - cuba para eletroforese (Dce): o mesmo raciocínio utilizado para o item anterior se aplica a este caso. Assim, a depreciação calculada para esse equipamento é de R\$ 0,05 amostra⁻¹:

$$Dce = \left(\frac{R\$1.425,15 / 8\text{anos}}{3.456\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (9)$$

3. Depreciação - fonte para eletroforese: igualmente calculado, conforme itens anteriores. A depreciação para esse equipamento é de R\$ 0,08 amostra⁻¹:

$$Dfe = \left(\frac{R\$2.247,00 / 8\text{anos}}{3.456\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (10)$$

4. Consumo de energia – fonte para eletroforese: são gastos 40 min dia⁻¹ para a corrida eletroforética de 18 amostras, em uma única vez. Logo, mensalmente, o equipamento é usado cerca de 11 horas ($40\text{min}/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$). De acordo as especificações do fabricante, sua potência é de 0,12 kW. Com isso, para o tempo de uso de 11 h

8. Consumo de energia - computador (1): gastam-se 15 min dia⁻¹ para o registro dos géis, após a eletroforese de 18 amostras. Logo, mensalmente, estimam-se em 4 h o tempo total de utilização do computador para esse procedimento (15min/dia × 4dias/semana × 4semanas/mês). A potência para um computador hipotético INTEL, com 2 GB de memória RAM, é 0,5 kW. Como são gastas 4 horas mês⁻¹ com seu uso, tem-se um consumo de energia de 2,0 kW h (0,5kW × 4h), representando um custo de R\$ 0,70 (R\$0,35/kWh × 2,0kWh) no mês. Dessa forma, o custo de energia referente a cada amostra analisada no mês (18amostras/dia × 4dias/semana × 4semanas/mês) é praticamente nulo, ou seja,
- $$\left(\frac{R\$0,70 / \text{mês}}{288 \text{ amostras} / \text{mês}} \right) .$$

9. Depreciação - no break (computador 1) (Dnb): o custo de depreciação para esse aparelho é de R\$ 0,02 amostra⁻¹:

$$Dnb = \left(\frac{R\$490,00 / 8 \text{ anos}}{3.456 \text{ amostras} / \text{ano}} \right) \quad (13)$$

10. Depreciação - Termociclador para qPCR (Dt): o preço do equipamento é de R\$ 51.209, 31, incluindo um computador, mas sem o no break. São analisadas anualmente 3.456 amostras. A depreciação calculada para o equipamento é de R\$ 1,85 amostra⁻¹:

$$Dt = \left(\frac{R\$51.209,31 / 8 \text{ anos}}{3.456 \text{ amostras} / \text{ano}} \right) \quad (14)$$

11. Consumo de energia - termociclador para qPCR: são gastas 2 horas dia⁻¹ para amplificar simultaneamente 18 amostras. O tempo total de utilização para o equipamento são 32 h mês⁻¹ (2h/dia × 4dias/semana × 4semanas/mês). De acordo com informações fornecidas pelo fabricante, a potência do equipamento é de 0,5 kW. Sendo assim, seu consumo mensal de energia é de R\$ 16,0 kW h (0,5kW × 32h), o que corresponde a R\$ 5,60 mês⁻¹ (R\$0,35/kWh × 16,0kWh). O

gasto mensal de energia é de R\$ 0,02 amostra⁻¹, ou seja, de $\left(\frac{R\$5,60 / \text{mês}}{288 \text{ amostras} / \text{mês}} \right)$.

12. Consumo de energia - computador (2): gastam-se 2 h dia⁻¹ para amplificar simultaneamente 18 amostras. Mensalmente, estimam-se em 32 h o tempo total de utilização do computador para esse procedimento ($2h/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$). Seu preço encontra-se computado no valor de R\$ 51.209, 31 (termociclador para qPCR), mas não inclui o no break. Dessa forma, o custo de depreciação desse computador está relacionado ao do equipamento como um todo (item 10), sendo apenas seu consumo de energia calculado a parte. Como são gastas 32 horas mês⁻¹ com seu uso e, de acordo com o fabricante, sua potência é de 0,5 kW, tem-se um consumo mensal de energia de 16,0 kW h ($0,5kW \times 32h$). A esse consumo corresponde um gasto de de R\$ 5,60 mês⁻¹ ($R\$0,35/kWh \times 16,0kWh$) e de R\$ 0,02 amostra⁻¹, ou seja, $\left(\frac{R\$5,60 / \text{mês}}{288 \text{ amostras} / \text{mês}} \right)$.

13. Depreciação - no break (computador 2) (Dnb2): seu custo de depreciação é de R\$ 0,02 amostra⁻¹:

$$Dnb2 = \left(\frac{R\$490,00 / 8\text{anos}}{3.456 \text{ amostras} / \text{ano}} \right) \quad (15)$$

14. Depreciação - centrífuga de bancada (Dcb): a depreciação estimada para o equipamento é de R\$ 0,17 amostra⁻¹, considerando-se a análise de 3.456 amostras ano⁻¹ :

$$Dcb = \left(\frac{R\$4.800,00 / 8\text{anos}}{3.456 \text{ amostras} / \text{ano}} \right) \quad (16)$$

15. Consumo de energia - centrífuga de bancada: são gastos 8 min dia⁻¹ para centrifugar 18 amostras, incluindo etapas de peletização e extração de DNA

genômico. Dessa forma, o tempo de utilização mensal do equipamento é de 2 h ($8\text{min}/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$). Sua potência é de 0,165 kW, conforme informações do fabricante, sendo responsável por um consumo mensal de energia de 0,33 kW h ($0,165\text{kW} \times 2\text{h}$). Para esse consumo, estima-se um custo de R\$ 0,12 mês^{-1} ($\text{R\$}0,35/\text{kWh} \times 0,33\text{kWh}$). Logo, o custo total da energia gasta no mês (R\$ 0,12) é praticamente nulo, quando contabilizado para cada amostra analisada, ou seja, $\left(\frac{\text{R\$}0,12 / \text{mês}}{288\text{amostras} / \text{mês}} \right)$.

16. Depreciação - sistema para ultrapurificação de água (30 L) (Dsu): custo estimado em R\$ 0,63 amostra⁻¹:

$$Dsu = \left(\frac{\text{R\$}17.465,00 / 8\text{anos}}{3.456\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (17)$$

17. Depreciação - autoclave (12 L) (Dau): valor estimado em R\$ 0,08 amostra⁻¹:

$$Dau = \left(\frac{\text{R\$}2.100,00 / 8\text{anos}}{3.456\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (18)$$

18. Consumo de energia - autoclave (12 L): são necessários 45 min semana⁻¹ de uso. Mensalmente, o tempo total de utilização do equipamento é de 3 h ($45\text{min}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$). Sua potência é de 0,8 kW, portanto o consumo mensal de energia é de 2,4 kW h ($0,8\text{kW} \times 3\text{h}$). A esse consumo atribui-se um gasto de R\$ 0,84 mês^{-1} ($\text{R\$}0,35/\text{kWh} \times 2,4\text{kWh}$), que é praticamente irrisório (R\$ 0,003 amostra⁻¹) quando calculada por amostra, ou seja de $\left(\frac{\text{R\$}0,84 / \text{mês}}{288\text{amostras}} \right)$.

19. Depreciação - liofilizador (DI): valor estimado em R\$ 1,45 amostra⁻¹:

$$DI = \left(\frac{\text{R\$}40.000,00 / 8\text{anos}}{3.456\text{amostras} / \text{ano}} \right) \quad (19)$$

20. Consumo de energia - liofilizador: são gastas 8 h dia⁻¹ para liofilizar 18 amostras, sendo 128 h mês⁻¹ ($8h/dia \times 4dias/semana \times 4semanas/mês$). A potência do equipamento é de 0,45 kW, de acordo com o fabricante, resultando num consumo mensal de energia de 57,6 kW h ($0,45kW \times 128h$). Assim, são gastos R\$ 20,16 mês⁻¹ ($R\$0,35/kWh \times 57,6kWh$), sendo R\$ 0,07 amostra⁻¹.

21. Depreciação - freezer (-20°C) (Df): valor estimado em R\$ 0,06 amostra⁻¹:

$$Df = \left(\frac{R\$1.678,00 / 8anos}{3.456amostras / ano} \right) \quad (20)$$

22. Consumo de energia - freezer (-20°C): conforme informações fornecidas pelo fabricante, seu consumo mensal de energia é de 43,5 kW h. Portanto, são gastos R\$ 15,30 mês⁻¹ ($R\$0,35/kWh \times 43,5kWh$), sendo R\$ 0,05 amostra⁻¹.

23. Depreciação - microondas (Dmi): valor estimado em R\$ 0,01 amostra⁻¹:

$$Dmi = \left(\frac{R\$300,00 / 8anos}{3.456amostras / ano} \right) \quad (21)$$

24. Consumo de energia - microondas: são gastos cerca de 3 min dia⁻¹ para dissolver a agarose em tampão TBE 0,5X durante o preparo do gel. O tempo de utilização mensal do microondas é de 0,8 h ($3min/dia \times 4dias/semana \times 4semanas/mês$). De acordo com o fabricante, sua potência é de 0,70 kW, resultando num consumo mensal de energia de 0,56 kW h ($0,70kW \times 0,8h$). Para esse consumo, estima-se um custo de R\$ 0,20 mês⁻¹ ($R\$0,35/kWh \times 0,56kWh$). No entanto, o custo mensal atribuído a cada amostra analisada é praticamente nulo, ou seja de $\left(\frac{R\$0,20 / mês}{288amostras} \right)$.

25. Depreciação – balança analítica (Db): valor estimado em R\$ 0,15 amostra⁻¹:

$$Db = \left(\frac{R\$4.270,00 / 8anos}{3.456amostras / ano} \right) \quad (22)$$

26. Consumo de energia – balança analítica: gasta-se cerca de 1 min dia⁻¹ para pesar a agarose durante o preparo do gel. O tempo de utilização mensal dessa balança é de 0,3 h ($1\text{min}/\text{dia} \times 4\text{dias}/\text{semana} \times 4\text{semanas}/\text{mês}$). De acordo com o fabricante, sua potência é de 7×10^{-3} kW. Como praticamente não há consumo de energia na utilização desse equipamento, não foram computados gastos para esse quesito.

Demais custos relacionados

1. Analista (mão-de-obra): considerou-se que o analista desenvolve apenas atividades relacionadas às análises pela técnica de qPCR, quantificando 18 amostras dia⁻¹. Conforme já demonstrado acima, são analisadas mensalmente 288 amostras. Portanto, o custo de mão de obra para cada amostra analisada é de R\$ 8,68, supondo-se que a remuneração mensal do analista é de R\$ 2.500,00.
2. Água de torneira para a lavagem de materiais: conforme dados fornecidos pelo SEMAE, o custo estimado para a água de torneira é de R\$ 0,02 L⁻¹. Supondo um consumo de 20 L dia⁻¹ dessa água para a lavagem dos recipientes usados para o processamento de 18 amostras, tem-se um gasto diário de 1,11 L amostra⁻¹ de água. Assim, o custo é de aproximadamente R\$ 0,02 amostra⁻¹.
3. Água de torneira para autoclave: supondo-se um consumo de 5 L semana⁻¹ dessa água para saturar o reservatório da autoclave, tem-se um consumo de 20 L mês⁻¹ de água. Logo, o valor contabilizado para 288 amostras analisadas no mês é quase nulo.
4. Água ultrapura para procedimentos de biologia molecular: de acordo com o fabricante do equipamento para a obtenção deste tipo de água, são R\$ 0,15 L⁻¹. Gasta-se em torno de 1 L de água ultrapura para a diluição das amostras e demais procedimentos de biologia molecular, portanto são gastos R\$ 0,15.

Tabela 17 - Síntese dos custos envolvidos na análise pela técnica de qPCR

Categoria	Custo total amostra⁻¹ (R\$)
Produtos (itens 11 e 14-24)	28,70
Equipamentos (todos os itens)	5,89
Demais custos relacionados (todos os itens)	8,70
Total	43,30

Fonte: Dados de pesquisa

Com base nos dados apresentados, o custo operacional obtido para a análise usando a técnica de qPCR é de aproximadamente R\$ 43,50 amostra⁻¹.

4.8.3 Viabilidade econômica

Os custos operacionais calculados para a análise de uma amostra pelas técnicas de Utermöhl e de qPCR foram R\$ 51,00 e R\$ 43,50, respectivamente.

A somatória dos itens “material de consumo” e “equipamentos”, descritos no Anexo 2 para a técnica de Utermöhl, totalizaram R\$ 11,51. Esse valor representa um número 3 vezes menor do que o estimado para a técnica de qPCR, que corresponde a R\$ 34,89 para os mesmos itens. Apesar de bem menos equipamentos e reagentes/solventes serem necessários para a análise pela metodologia tradicional, o custo de mão-de-obra do analista encarece a análise devido à baixa capacidade diária de processamento (64 amostras mês⁻¹). O contrário ocorre para a análise pela técnica de qPCR, uma vez que a demanda de equipamentos e reagentes/solventes é bastante superior, porém os custos totais, incluindo a mão-de-obra do analista, são distribuídos entre um maior número de amostras analisadas (288 amostras mês⁻¹). No entanto, supondo-se que esse número fosse reduzido a 4 amostras dia⁻¹, o custo estimado para a análise de uma única amostra aumentaria consideravelmente, tornando inviável a manutenção de um laboratório para esse fim. Conclui-se, portanto, que a técnica de qPCR torna-se bastante viável economicamente quando se tem a necessidade de análise em larga escala e com bastante rapidez.

Kurmayer e Kutzenberger (2003), assumem ainda que o tempo necessário para a contagem de células de *Microcystis* em microscópio invertido, necessitando de

intensa mão-de-obra e maior grau de formação do analista, torna-se desvantajoso, enquanto que a técnica de qPCR exige menos tempo e mão-de-obra qualificada. Contudo, os autores também complementam que a aquisição de reagentes e demais produtos para as análises, além dos custos para aquisição e manutenção dos equipamentos, podem representar uma desvantagem maior em situações em que a técnica de qPCR não é aplicada em larga escala.

5 CONCLUSÕES

Sete seqüências da região *cpcBA*-IGS do *operon* PC e onze seqüências inéditas do domínio NMT do gene *mcyA* foram obtidas neste estudo para o gênero *Microcystis*, um dos mais conhecidos pelo potencial toxicológico que apresenta e capacidade de formar intensas florações. Essas seqüências serão depositadas em banco de dados público e, além de contribuir para a ampliação do conhecimento sobre cianobactérias brasileiras, também poderão possibilitar a construção de novos iniciadores de PCR.

O alinhamento dessas seqüências e de outras escolhidas do banco de dados permitiu o desenho de dois conjuntos de oligonucleotídeos LUX, capazes de amplificar simultaneamente alvos distintos por qPCR. Este estudo é pioneiro, pois trata-se do primeiro relato sobre quantificação de cianobactérias usando o sistema LUX. O conjunto QPCF/QPCR foi projetado para amplificar fragmentos da região *cpcBA*-IGS de 144 pb, enquanto que o outro conjunto, denominado Q*mcyA*-NMTF/Q*mcyA*-NMTR, amplificou fragmentos de 154 pb da região NMT do gene *mcyA*.

Curvas de calibração bastante significativas para ambas as regiões gênicas foram estabelecidas relacionando-se quantidades conhecidas de DNA genômico da *Microcystis* sp. NPLJ4 (em número de células) e os Cts obtidos para cada diluição da curva. A técnica de Utermöhl foi usada como método independente para a padronização dessas curvas. A metodologia foi aplicada a duas outras linhagens de *Microcystis* e amostras coletadas na natureza, na Praia dos Namorados, município de Americana, SP, em quatro períodos distintos.

A comparação estatística ($p < 0,05$, Teste-*t* de Student) feita para médias aos pares, cujas variáveis foram as quantificações feitas por Utermöhl e por qPCR (em número de células mL⁻¹) mostrou diferenças significativas para todas as análises e a contagem obtida pela metodologia tradicional foi sempre superior à observada para a técnica de qPCR. Essas diferenças podem estar relacionadas às perdas de material genético na etapa de peletização das amostras, para posterior extração de DNA, em função da presença de aerótopos. A baixa eficiência revelada nas reações de amplificação para PC (79%) sugerem também que não houve duplicação de DNA a cada ciclo. Possíveis problemas na sedimentação e contagem das amostras pela

técnica de Utermöhl não podem ser descartados. Apesar disso, os resultados mostrados neste estudo indicam a possibilidade de uso da técnica de qPCR em atendimento à Portaria MS 518, uma vez que seu limite de detecção foi de 100 células mL⁻¹, ao se excluir a diluição correspondente a 1:10⁵ células (10 células reação⁻¹) da curva de calibração.

Cabe salientar que em uma mesma floração podem haver linhagens tóxicas e não tóxicas de cianobactérias, além do que a detecção dos genes *mcy* não indica necessariamente que há produção de cianotoxinas. Nesse sentido, a proporção de genótipos *mcyA* foi determinada com sucesso para NPJB1 e *Microcystis* sp. (dez 06), com resultados comparáveis aos já descritos por outros autores. A proporção desses genótipos foi consideravelmente inferior aos genótipos PC em ambas as situações, porém a técnica de qPCR mostrou-se uma ferramenta poderosa para auxiliar no monitoramento do ambiente. Por necessitar de curvas de calibração, a qPCR é sensível à variações nos *Cts*, apresentando reprodutividade na técnica. No entanto, vale ressaltar que a interpretação desses dados precisam ser avaliadas com bastante cautela e estudos complementares serão fundamentais para a validação dessa metodologia para fins de monitoramento.

O teste ELISA realizado para as onze linhagens, que também foram seqüenciadas para o domínio NMT, confirmou a produção de uma das isoformas de microcistinas (LR, RR ou YR) por estes organismos, alertando sobre o notável potencial das cianobactérias para a produção de produtos bioativos em Salto Grande.

Em nosso país, este foi o primeiro estudo feito para a quantificação de *Microcystis* no reservatório Salto Grande usando técnicas moleculares. Esta pesquisa resultou no desenvolvimento de uma qPCR bplex para as regiões PC e NMT do gene *mcyA*, que poderá ser aprimorada em estudos posteriores podendo incluir outros reservatórios brasileiros, a qual apresentou grande potencial para ser implementada em análises de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUJARO, L. F. **Subsídios para um plano de monitoramento de cianobactérias em reservatórios com vistas à balneabilidade. Estudo de caso:** reservatório de Salto Grande, Americana, SP. 2007. 221 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: APHA/WEF/AWWA, 1998, 1137 p.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 1 - Introduction. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 38/39, p. 291-302, 1985.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 – Oscillatoriales. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 50/53, p. 327-472, 1988.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5 – Stigonematales. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 59, p. 1-73, 1990.
- APT, K. E.; COLLIER, J. L.; GROSSMAN, A. R. Evolution of the phycobiliproteins. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 248, p. 79-96, 1995.
- ASAYAMA, M. et al. Highly repetitive sequences and characteristics of genomic DNA in unicellular cyanobacterial strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 137, p. 175-181, 1996.
- AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública. **Medicina On-Line**, v. 1, n. 3, 1998. Disponível em: <http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/microcis.htm>. Acesso em: 08 nov. 2007.
- AZEVEDO, S. M. F. O. et al. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the

cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 6, p. 261-265, 1994.

AZEVEDO, S.M.F.O. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

BAKER, J. A. et al. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6070-6076, 2002.

BAKER, J. A. et al. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, p. 472-482, 2001.

BARKER, G. L. A. et al. Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (Cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 2865-2875, 2000.

BASSLER, H. I. et al. Use of fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3724-3728, 1995.

BEYRUTH, Z. et al. Toxic algae in freshwaters of São Paulo state. In: CORDEIRO-MARINO, M. et al. (Ed.). **Algae and environment: a general approach**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 1992. p. 53-64.

BHALERAO, R. P. et al. Cloning of the phycobilisome rod linker genes from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301 and their inactivation in *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 237, p. 89-96, 1993.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, p. 1513-1518, 1979.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 2, p. 51-60, 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora. Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 30, p. 82-90, 2003.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, M. C.; BOLCH, C. J. S. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). **Journal of Phycology**, Malden, v. 37, p. 810-818, 2001.

BIZOTTO, A. P. **Métodos de gestão para a alocação dos custos de transporte**: um estudo de caso para a coleta de leite. 2007. 141 f. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BODE, H. B.; MÜLLER, R. The impact of bacterial genomics on natural product research. **Angewandte Chemie**, New York, v. 44, p. 6828-6846, 2005.

BOLCH, C. J. S. et al. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* Intergenic Spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, Malden, v. 32, p. 445-451, 1996.

BOLD, H. D.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae, structure and reproduction**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985. 720 p.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 72, p. 2310-2314, 1975.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. Partial sequences of 16S rRNA and the phylogeny of blue-green algae and chloroplasts. **Nature**, London, v. 261, p. 669-673, 1976.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. 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. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: the Archaea and deeply branching and phototrophic Bacteria. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, 721 p.

BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical

reservoirs during the 1988 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 23, p. 13-27, 2000.

BOUVY, M. et al. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 20, p. 285-297, 1999.

BRANCO, C. W.; SENNA, P. A. C. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. **Archiv fur Hydrobiology**, Amsterdam, v. 75, p. 85-96, 1994. Supplement, 105.

BRASIL. Portaria Nº 518, 25 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. p. 70.

BRENNER, D. J.; STALEY, J. T.; KRIEG, N. R. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 27-31.

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

BRUNSON, M. W.; LUTZ, C. G.; DURBOROW, R. M. **Algae blooms in commercial fish production ponds**. Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center (SRAC), 1994. (Publication, 466).

BRYANT, D. A. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 128, p. 835-844, 1982.

BURJA, A. M. et al. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products. **Tetrahedron**, Killington, v. 57, p. 9347-9377, 2001.

CANNEL, R. J. P. Algae as a source of biologically active products. **Pesticide Science**, London, v. 39, p. 147-153, 1993.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacterial secondary metabolites – the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 72, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 270, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P.R. Factors influencing the toxicity and animal susceptibility of *Anabaena flos-aquae* (cyanophyta blooms). **Journal of Physiology**, Paris, v. 13, p. 97-101, 1977.

CARMICHAEL, W. W.; GORHAM, P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: CARMICHAEL, W. W. (Ed.). **The Water Environmental: Algal Toxins and Health**. New York: Plenum Press, 1981, p. 161-172.

CARVALHO, M. C. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios no Estado de São Paulo**. 2003. 167 f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

CASTENHOLZ, R. W. Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae). **Journal of Phycology**, Malden, v. 28, p. 737-745, 1992.

CASTENHOLZ, R. W. General characteristics of the cyanobacteria. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 474-487.

CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J. T. et al. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989. p. 1710-1799.

CHANG, Z. et al. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroethyl starter unit. **Gene**, Amsterdam, v. 296, p. 235-247, 2002.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health, consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. 416 p.

CHRISTIANSEN, G. et al. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. **Archives of Microbiology**, New York, v. 176, p. 452-458, 2001.

CHRISTIANSEN, G. et al. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and

manipulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 564-572, 2003.

CHRISTOFFERSEN, K. Ecological implications of cyanobacteria toxins in aquatic food webs. **Phycologia**, Amsterdam, v. 35, p. 42-50, 1996.

COHEN Y. et al. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 398-407, 1986.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Fitoplâncton de água doce. Métodos qualitativo e quantitativo**. São Paulo: CETESB, 2005. 23 p. (Norma Técnica, L5.303).

COSTA, I. A. S. et al. The occurrence of toxin-producing cyanobacterial blooms in a Brazilian semiarid reservoir. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, p. 211-219, 2006.

COSTA, S. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas. **Iheringia. Série Botânica**, Porto Alegre, n. 45, p. 69-74, 1994.

DEBERDT, G. L. B. **Estudo de cianobactérias em reservatório com elevado grau de trofia (Reservatório Salto Grande – Americana – SP)**. 2002. 207 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

DESJARDIN, L.E.; CHEN, Y.; PERKINS, M.D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M.D.; EISENNACH, K.D. Comparison of the ABI 7700 system (Taqman) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1964-1968, 1998.

DITTMANN, E.; BÖRNER, T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 203, p. 192-200, 2005.

DITTMANN, E.; MEIBNER, K.; BÖRNER, T. Conserved sequences of peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 779-787, 1996.

DITTMANN, E.; NEILAN, B. A.; BÖRNER, T. Molecular biology of peptide and poliketide biosynthesis in cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 467-473, 2001.

- DITTMANN, E. et al. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 779-787, 1997.
- DITTMANN, E. et al. peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria. In: PESCHEK, G. A.; LÖFFELHARDT, W.; SCHEMETTERER, G. (Ed.). **The phototrophic prokaryotes**. New York: Kluwer Academic, 1999. p. 615-621.
- DÖLKEN, L.; SCHÜLER, F.; DÖLKEN, G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cell by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques**, Natick, v. 6, p. 1058-1064, 1998.
- DOMINGOS, P. et al. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a Northeast Brazilian drinking water supply. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, p. 31-35, 1999.
- DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. **Archiv für Hydrobiologie**, Amsterdam, v. 83, p. 197-206, 1996. Supplement, 117.
- DREWS, G. Fine structure and chemical composition of the cell envelopes. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Ed.). **The biology of blue-green algae**. Berkeley: University of California Press, 1973. p. 99-116. (Botanical Monographs, v.9).
- DU, L.; SÁNCHEZ, C.; SHEN, B. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. **Metabolic Engineering**, San Diego, v. 3, n. 1, p. 78-95, 2001.
- DUBBS, J. M.; BRYANT, D. A. Molecular cloning and transcriptional analysis of the cpeBA operon of the cyanobacterium *Pseudanabaena* species PCC7409. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 3073-3085, 1991.
- ERNEST, A. Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 13, p. 1307-1312, 1991.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; FARIA, O. B.; LEITE, M. A. Reservatório Salto Grande: Uma caracterização geral do sistema. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; LEITE, M. A.; DORNFELD, C. B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, SP): Caracterização, impactos e propostas de manejo**. 1. ed. São Carlos: Rima, 2004. cap. 1, p. 1-17.

ETCHEGARAY, A. Biossíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1998. p. 393-419.

ETCHEGARAY, E. et al. Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, n. 3, p. 237-243, 2004a.

ETCHEGARAY, A. et al. In silico analysis of nonribosomal peptide synthetases of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: identification of putative siderophore and lipopeptide biosynthetic genes. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 159, p. 425-437, 2004b.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

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

FAHRENKRUG, P. M.; BETT, M. B.; PARKER, D. L. Base composition of DNA from selected strains of the cyanobacterial genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, New York, v. 18, p. 120-125, 1992.

FAWELL, J. et al. Blue-green algae and their toxins: analysis, toxicity, treatment, and environmental control. **Water Supply**, London, v. 11, p. 109-121, 1993.

FERGUSON, K. M.; SAINT, C. P. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4145-4148, 2000.

IORE, M. F.; SILVA-STENICO, M. E. Bioprospecção de cianobactérias. **O Biólogo**, São Paulo, p.22-24, 2007. Suplemento.

IORE, M. F. et al. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 39, p. 159-169, 2000.

IORE, M. F. et al. Monitoramento de cianobactérias produtoras de toxinas através de métodos moleculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA, 10., 2004, Salvador. **Formação de ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos; anais...** Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2005. p. 33-56. (Série Livros, 10).

FOULDS, I. V. et al. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water

by 5'-nuclease PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 825-834, 2002.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, Natick, v. 26, p. 112-125, 1999.

FURUKAWA, K. et al. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 102, n. 2, p. 90-96, 2006.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 995-1001, 1996.

GIOVANNONI, S. J. et al. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 3584-3592, 1988.

GLAZER, N. A. Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, p. 1-4, 1989.

GLAZER, A. N.; WEDEMAYER, G. J. Cryptomonad biliproteins: an evolutionary perspective. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 46, p. 93-105, 1995.

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

GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie**, Stuttgart, v. 15, p. 796-804, 1964.

GÜRTLER, V.; MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 3-16, 2001.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Woodbury, v. 6, p. 986-994, 1996.

HIGGINS, J. A. et al. 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 2284-2288, 1998.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HIROOKA, E. Y. et al. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil, using ELISA. **Natural Toxins**, New York, v. 7, p. 103-109, 1999.

HISBERGUES, M. et al. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. **Archives of Microbiology**, New York, v. 180, p. 402-410, 2003.

HOFFMANN, D. et al. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptoline. A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. **Gene**, Amsterdam, v. 311, p. 171-180, 2003.

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

HONDA, R. K. **Estudos taxonômicos e de desenvolvimento *in vitro* de *Microcystis* spp (Cyanobacteria/Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo, São Paulo, 2005.

HONDA, R. Y. et al. Cianotoxinas em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. In: ESTEVES, K. E.; SANT'ANNA, C. L. (Ed.). **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo**. Um estudo da Região Metropolitana de São Paulo. São Carlos: RiMa, 2006. cap. 8, p. 105-120.

HONKANEN, R. E. et al. Characterization of microcystin- LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 265, p. 19401-19404, 1990.

HUTCHINSON, C. R.; FUJII, I. Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 201-238, 1995.

IEMMA, A. F. **Estatística descritiva**. Piracicaba: fõp Publicações, 1992. 182 p.

JARDIM, F. A.; VIANA, T. H. Análise das algas-cianobactérias e cianotoxinas como parâmetro de controle do tratamento da água para abastecimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais...** Joinville: ABES, 2003. 1 CD-ROM.

JARDIM, F. A. et al. A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água – Minas Gerais - Brasil. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABES, 2000. 1 CD-ROM.

JARDIM, F. A. et al. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA-Minas Gerais-Brasil. **Bios. Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas**, Belo Horizonte, v. 9, p. 83-91, 2001a.

JARDIM, F. A. et al. Primeira detecção de cianobactérias tóxicas em uma represa da CEMIG-São Simão-MG/GO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 8., 2001, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2001b. 1 CD-ROM.

JENKE-KODAMA, H. et al. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, p. 2027-2039, 2005.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 1-9, 2001.

KAEBERNICK, M. et al. Multiple alternative transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 449-455, 2002.

KAEBERNICK, M. et al. light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3387-3392, 2000.

KAEBERNICK, M. et al. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 669-679, 2001.

KATO, T.; WATANABE, M. F.; WATANABE, M. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. **Archiv fur Hydrobiologie**, Amsterdam, v. 92, p. 129-140, 1991.

KATZ, L. Manipulation of modular polyketide suntheses. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 97, p. 2557-2575, 1997.

KEATING, T. A.; WALSH, C. T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide

and polypeptide antibiotic biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 3, p. 598-606, 1999.

KIM, S.-G. et al. Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung reservoir, Korea, on the basis of *cpcBA* intergenic spacer region analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3252-3258, 2006.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 236, p. 335-351, 1996.

KOMÁREK, J. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 64, p. 115-127, 1991.

KOMÁREK, J. Problem of the taxonomic category "species" in cyanobacteria. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 109, p. 281-297, 2003.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 – Chroococcales. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 43, p. 157-226, 1986.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 56, p. 247-354, 1989.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H. et al. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B. et al. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Munique: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1-759.

KOMÁREK, J. et al. What are the cyanobacterial genera *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 113, p. 1-36, 2004.

KONDO, R. et al. DNA-DNA reassociation of a bloom-forming cyanobacteria genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 767–770, 2000.

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.

KURMAYER, R.; KUTZENBERGER, T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 69, p. 6723-6730, 2003.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; CHORUS, I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 787-795, 2003.

KURMAYER, R. et al. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). **Microbial Ecology**, New York, v. 43, p. 107-118, 2002.

KURMAYER, R. et al. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in population of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 831-841, 2004.

LAGOS, N. et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

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

MAGALHÃES, V. F.; SOARES, R. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystin contamination in fish from Jacarepaguá lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risks. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 1077-1085, 2001.

MAGALHÃES, V. F. et al. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brazil, RJ). **Toxicon**, Oxford, v. 42, p. 289-295, 2003.

MANN, N. H.; CARR N.G. **Photosynthetic prokaryotes**. London: Plenum Press, 1992. 275 p. (Biotechnology handbooks, v.6).

MARAHIEL, M. A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D. Modular peptide synthetases in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2651-2673, 1997.

MATTHIAENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 59, p. 361-376, 1999.

MAZEL, D.; MARLIERE, P. Adaptive eradication of methionine and cysteine from cyanobacterial light-harvesting proteins. **Nature**, London, v. 341, p. 245-248, 1989.

MEISSNER, K.; DITTMAN, E.; BÖRNER, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 135, p. 295-303, 1996.

MIHALI, T. K. et al. Characterization of the gene cluster responsible for cylindrospermopsin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.74, n.3, p.716-722, 2008.

MIKALSEN, B. et al. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 2774-2785, 2003.

MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 196, p. 207-214, 2001.

MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 56, p. 446-457, 2003.

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

MOLICA, R. et al. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, Amsterdam, v. 41, n. 6, p. 606-611, 2002.

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

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p. 15-37.

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

NASCIMENTO, S. M.; AZEVEDO, S. M. F. O. Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios – an ecophysiological study. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, p. 37-44, 1999.

NAZARENKO, I. et al. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, e37, 2002. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/30/9/e37>>. Acesso em: 07 nov. 2007.

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

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**, Washington, v. 61, p. 3875-3883, 1995.

NEILAN, B.A. et al. 16S ribosomal RNA gene sequence and phylogeny of toxic *Microcystis* sp. (cyanobacteria). **DNA Sequence**, London, v. 4, p. 333-337, 1994.

NEILAN, B. A. et al. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 693-697, 1997.

NEILAN, B. A. et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 4089-4097, 1999.

NELISSEN, B. et al. 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. et al. 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, 1995a.

NELISSEN, B. et al. 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, 1995b.

NELISSEN, B. et al. 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.

NEVES, E. M.; ANDIA, L. H. **Economia e Administração Agroindustrial**. Piracicaba: CALQ, 1995. cap. 12, p. 182-194. (Série Didática nº 96).

NICHOLSON, B. C.; BURCH, M. D. **Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines**. Canberra: National Health & Medical Research Council, 2001. Disponível em: <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/_files/eh22.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2008.

NISHIHARA, H. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, p. 1067-1072, 1997.

NISHIZAWA, T. et al. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 126, p. 520-529, 1999.

NISHIZAWA, T. et al. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 127, p. 520-529, 2000.

NONNEMAN, D.; ZIMBA, P. V. A PCR-based test to assess the potential for microcystin occurrence in channel catfish production ponds. **Journal of Phycology**, Malden, v. 38, p. 230-233, 2002.

NOUBIR, S. et al. Co-ordinated expression of phycobiliprotein operons in the chromatically adapting cyanobacterium *Calothrix* PCC 7601: a role for RcaD and RcaG. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 749-762, 2002.

ODEBRECHT, C. et al. Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERRA, B. (Ed.). **Floraciones algales nocivas en el cono sur Americano**. Madrid: Instituto Español de Oceanografía, 2002. p. 219-233.

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.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1895-1902, 2004.

OREN, A.; TINDALL, B. J. Nomenclature of the cyanophyta/ cyanobacteria/cyanoprokaryotes under the international code of nomenclature of prokaryotes. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 117, p. 39-52, 2005.

OTSUKA, S. et al. 16S rRNA sequences and phylogenetic analysis of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 164, p. 119-124, 1998.

OTSUKA, S. et al. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23 S internal transcribed spacer sequence. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 172, p. 15-21, 1999.

OTSUKA, S. et al. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 46, p. 39-50, 2000.

OTSUKA, S. et al. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 873-879, 2001.

OUAHID, Y.; PERÉZ-SILVA, G.; del CAMPO, F. F. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. **Environmental Toxicology**, New York, v. 20, p. 235-42, 2005.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PAHL, A. et al. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1958-1963, 1999.

PALENIK, B. Polymerase evolution and organism evolution. **Current Opinion in Genetics & Development**, Philadelphia, v. 2, p. 931-936, 1992.

PALINSKA, K. A. et al. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. **Archives of Microbiology**, New York, v. 166, p. 224-233, 1996.

PAN, H. et al. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. **Archives of Microbiology**, New York, v. 178, p. 421-427, 2002.

PARANÁ, D. N. Potência elétrica, rendimento, cálculo. In: _____. **Física: eletricidade**. São Paulo: Editora Ática S.A., 1993. cap. 8, p. 177-183.

PARK, H. -D. et al. Seasonal variations of *Microcystis* species and toxic heptapeptide microcystins in lake Suwa. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 8, p. 425-435, 1993.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, e36, 2002. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/cgi/reprint/30/9/e36>>. Acesso em: 07 nov. 2007.

POMATI, F.; NEILAN, B. A. PCR-based positive hybridization to detect genomic diversity associated with bacterial secondary metabolism. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 1-9, 2004.

PORFIRIO, Z. et al. Hepatosplenomegaly caused by na extract of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* bloom collected in the Manguaba Lagoon, Alagoas- Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 278-285, 1999.

RAI, A. N. **CRC handbook of symbiotic cyanobacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 253 p.

RANTALA, A. et al. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 101, p. 568-573, 2004.

RANTALA, A. et al. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and associations with environmental factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6101-6110, 2006.

REYNOLDS, C. S. et al. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (Kütz. Emend. Elenkin.) **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Serie B**, London, v. 293, p. 419-477, 1980.

RINEHART, K. L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B. M. Structure and biosynthesis of toxin from blue-green algae (Cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 6, p. 159-176, 1994.

RINTA-KANTO, J. M. et al. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 Booms in Western Lake Erie using Quantitative Real-Time PCR. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 39, p. 4198-4205, 2005.

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

RIPPKA, R.; WATERBURY, J. B.; STANIER, R. Y. Provisional generic assignments for cyanobacteria in pure culture. In: STARR, M. P. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. Berlím: Springer-Verlag, 1981. p. 247-256.

RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 111, p. 1-61, 1979.

ROBERTSON, B. R.; TEZUKA, N.; WATANABE, M. M. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 861-871, 2001.

ROUHIAINEN, L. et al. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 6021-6026, 1995.

ROUHIAINEN, L. et al. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the

cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 686-692, 2004.

ROUHIAINEN, L. et al. Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 3453-3461, 1998.

RUDI, K. et al. 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**, Washington, v. 63, p. 2593-2599, 1997.

RUSCHEL, A. P. Efeito sazonal sobre o desenvolvimento e fixação biológica de N de diferentes espécies de *Azolla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, 1985.

SAKAMOTO, T. et al. Characteristics of DNA and multiple *rpoD* homologs of *Microcystis* (*Synechocystis*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 844-847, 1993.

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.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 71, p. 359-385, 2000.

SANT'ANNA, C. L. et al. Planktic cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 213-227, 2003.

SANT'ANNA, C. L. et al. Planktic cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2007.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2006. 58 p.

SCHEMBRI, M. A.; NEILAN, B. A.; SAINT, C. P. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, p. 472-482, 2001.

SCHOBER, E.; KURMAYER, R. Evaluation of different DNA sampling techniques for the application of the real-time PCR method for the quantification of cyanobacteria in water. **Letters**

in **Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 412-417, 2006.

SCHOBBER, E. et al. Interlaboratory comparison of Taq Nuclease Assays for the quantification of the toxic cyanobacteria *Microcystis* sp. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, p. 122-128, 2007.

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 Science of the USA**, Washington, v. 91, p. 6735-6742, 1994.

SCHOPF, J. W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 112, p. 13-32, 1996.

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

SEVRIN-REYSSAC, J.; PLETIKOSIC, M. Cyanobacteria in fish ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 88, p. 1-20, 1990.

SILAKOWSKI, B. et al. New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, p. 3791-3799, 1999.

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.

SIMPSON, T. J. Polyketide biosynthesis. **Chemistry and Industry**, London, v. 5, p. 407-415, 1995.

SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 686-692, 2004.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxin. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacterial in water**. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. London: Spoon. 1999. chap. 3, p. 41-111.

SKULBERG, O. 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. **Annals of Microbiology**, Paris, v. 134B, p. 93-113, 1983.

SOUZA, R. C. R. **Dinâmica espaço-temporal da comunidade fitoplanctônica de um reservatório hipereutr[ofico]**: Salto Grande, Americana, São Paulo. 2000. 159 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

SOUZA, R. C. R.; CARVALHO, M. C.; TRUZZI, A. C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolloszynska) Seenayya et Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and contribution to the knowledge of Rio Pequeno Arm, Billings reservoir, Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 13, p. 73-81, 1998.

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

STANIER, R. Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225-274, 1977.

STANIER, R. Y. et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 35, p. 171-205, 1971.

STEWART, W. D. P. Nitrogen fixation. **Botanical Monographs**, Washington, v. 9, p. 260-278, 1973.

TANABE, Y.; KAYA, K.; WATANABE, M. M. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 58, p. 633-641, 2004.

TEIXEIRA, M. G. L. C. et al. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of PAHO**, Washington, v. 27, p. 244-253, 1993.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap

penalties and weigh matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TILLET, 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**, Washington, v. 67, p. 2810-2818, 2001.

TILLET, D. et al. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry and Biology**, London, v. 7, p. 753-764, 2000.

TUCCI, A.; DEBERDT, G. L. B.; DEBERDT, A. J. Análise da comunidade de fitoplâncton do reservatório de Salto Grande (Americana, SP): uma revisão dos estudos desenvolvidos em um sistema eutrófico. In: ESPÍNDOLA, E. G.; LEITE, A. M.; DORNFELD, C. B. **Reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo):** caracterização, impactos e propostas de manejo. São Carlos: RIMA, 2004. p. 107-153.

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

UENO, Y. et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, London, v. 17, p. 1317-1321, 1996.

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

VAITOMAA, J. et al. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7289-7297, 2003.

VIEIRA, J. M. S. et al. Microcystin production by *Radiocystis fernonoi* (Chroococcales, Cyanobacteria) isolated from a drinking water reservoir in the city of Belém, PA, Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, Oxford, v. 42, p. 709-713, 2003.

VIEIRA, J. M. S. et al. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, Oxford, v. 45, p. 901-909, 2005.

VON DÖHREN, H. et al. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Review**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2675-2705, 1997.

WALSH, C. T. et al. Pos-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthetases. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 1, p. 309-315, 1997.

WATANABE, M. Isolation, cultivation, and classification of bloom-forming *Microcystis* from Japan. In: WATANABE, M. F. et al. (Ed.). **Toxic microcystis**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 13-43.

WATERBURY, J. B.; STANIER, R. Y. Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 42, p. 2-44, 1978.

WELKER, M.; VAN DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 530-563, 2006.

WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; VAN DÖHREN, H. Diversity of coexisting *Planktothrix* (Cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microcystins and other oligopeptides. **Archives of Microbiology**, New York, v. 182, p. 288-298, 2004.

WELLER, R.; WELLER, J. W.; WARD, D. M. 16S rRNA sequences of uncultivated hot springs cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 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.

WHO. **Guidelines for drinking water quality**. 2. ed. Geneva: WHO, 1998.

WIEDNER, C. et al. Effects of light on the microcystin content of *microcystis* strain PCC7806. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1475-1481, 2003.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 203, p. 201-218, 2005.

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

WILMOTTE, A.; GOLUBIĆ, S. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. **Algological Studies**, Amsterdam, v. 64, p. 1-24, 2001.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 487-493.

WILMOTTE, A.; NEEFS, J. M.; DE WACHTER, R. Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain NIBB 1067, derived by 16S ribosomal RNA sequence analysis. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 2159-2164, 1994.

WILMOTTE, A.; VAN DER AUWERA, G.; DE WACHTER, 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, p. 96-100, 1993.

WILMOTTE, A. et al. Taxonomic study of marine *Oscillatoriacean* strains (*Cyanophyceae*, *Cyanobacteria*) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. **Journal of Phycology**, Malden, v. 28, p. 828-838, 1992.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOESE, C. R. et al. Sequence studies on 16S ribosomal RNA from blue-green alga. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.4, p.307-315, 1975.

YOSHIDA, M. et al. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, p. 49-53, 2007.

YUNES, J. S. et al. Cyanobacterial neurotoxins from southern Brazilian freshwaters. **Comments on Toxicology**, Lausanne, v. 9, p. 103-115, 2003.

YUNES, J. S. et al. *Microcystis aeruginosa* growth stages and the occurrence of microcystins in Patos Lagoon, Southern Brazil. In: REGUERA, B. et al. (Ed.). **Harmful Algae**. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1988. p. 18-21.

ZAGATTO, P. A. et al. **Manual de orientação em casos de florações de algas tóxicas**: um problema ambiental e de saúde pública. São Paulo: CETESB, 1997. (Série Manuais, 14).

ZAGATTO, P. A. et al. Avaliação ecotoxicológica do Reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase nos problemas das algas tóxicas e dos algicidas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE FICOLOGIA, 4., 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe, 1998. p. 63-81.

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

APÊNDICES

Apêndice 1

Seqüências da região *cpcBA*-IGS de linhagens brasileiras de *Microcystis*

>*Microcystis aeruginosa* SPC777

TGGAAATCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGAT
CGTTGCTTAAATGGTCTTGCAGAAACCTATGTAGCTTTGGGAGTACCAGGAGCTTCCGTAGCTGC
TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTATCCATTGCTAACGATCGCAACGGTATCACCCCG
GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTGCGC
TAGTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
AAAA**ATG**AAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGTCGTTTCTTAAGCA
GCACCGAAATCCAACTGCTTTCGGTCGTTTTCGTCAAGCTTCTGCTGGCCTCAGCGCCGCTAAA
GTGTTGACCGAAAAAGCCAATTCTTGATCTCTGGCGCTGCTCAAGCTGTGTACAACAAGTACCC
CTACACCACCCAAATGCAAGGGGCTAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGAAAAATGCGCTC
GTGACATCGGTTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Microcystis aeruginosa* NPJB1

TGGAAGTCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTACCTTCGCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGAT
CGTTGCTTAAATGGTCTTGCAGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCCGC
TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTATCCATTGCTAACGATCGCAACGGTATCACCCCTG
GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTGCGC
TAGTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTGAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
AACA**ATG**AAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGACGTTTCTTAAGCA
GCACCGAAATCCAAGTTGCTTTCGGTCGTTTTCGTCAAGCTTCTGCCAGCCTCACCGCCGCTAAA
GCGTTGACCGAAAAAGCCAGTTCTTTGATCTCTGGCGCTGCTCAAGCTGTGTACAACAAGTACCC
CTACACCACCCAAATGCAAGGGGCTAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGACAAATGCGCTC
GCGACATCGGTTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Microcystis aeruginosa* NPDC1

TGGAAATCATCTTGCGTTATGTTACCTACGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGAT
CGTTGCTTAAATGGTCTTGCAGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCTGC
TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTATCCATTGCTAACGATCGCAACGGTATCACCCCG
GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTGCGC
TAGTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
AACA**ATG**AAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGTCGTTTCTTAAGCA
GCACCGAAATCCAACTGCTTTCGGTCGTTTTCGTCAAGCTTCTGCTGGCCTCAGCGCCGCTAAA
GTGTTGACCGAAAAAGCCAGTTCTTTGATCTCTGGCGCTGCTCAAGCCGTGTACAACAAGTACCC
CTACACCACCCAAATGCAAGGGGCTAACTTTGCGGCAGACCAACGCGGTAAAGAAAAATGCGCTC
GTGACATCGGTTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Microcystis botrys* SPC759

TGGAAATTATCTTGCGTTATGTTACCTACGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGAT
CGTTGCTTAAATGGTCTTGCAGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCTGC
TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTATCCATCGCTAACGATCGCAACGGTATCACCCCG
GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTGCGC

TAGTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
 AACAAATGAAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGTCGTTTCTTAAGCA
 GCACCGAAATCCAACTGCTTTCGGTCGTTTTTCGTCAAGCTTCTGCTGGCCTCAGCGCCGCTAAA
 GTGTTGACCGAAAAAGCCAGTTCTTTGATCTCTGGCGCTGCTCAAGCCGTGTACAACAAGTACCC
 CTACACCACCCAAATGCAAGGGGCTAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGACAAATGCGCTC
 GTGACATCGGTTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Microcystis panniformis* SPC702

TGGAAATCATCTTGCGTTATGTTACCTATGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGAT
 CGTTGCTTAAATGGTCTTCGCGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCTGC
 TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTGTCCATCGCTAACGATCGCAACGGTGTTACCCCCG
 GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTCGCC
 TAGTCCCCAGGGCTAGTCTTAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
 AACAAATGAAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGTCGTTTCTTAAGCA
 GCACCGAAATCCAAGTTGCTTTCGGTCGTTTTTCGTCAAGCTTCTGCCAGCCTCACCGCTGCTAAA
 GTGTTGACCGAAAAAGCCAGTTCTTTGATCTCTGGCGCTGCTCAAGCCGTGTACAACAAGTACCC
 CTACACCACCCAAATGCAAGGGGCTAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGACAAATGCGCTC
 GTGACATCGGTTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Microcystis protocystis* SP697

TGGAAATCATCTTGCGTTATGTTACCTACGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGACGAT
 CGTTGCTTAAATGGTCTTCGCGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCAGGAGCTTCCGTAGCTGC
 TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTGTCCATCGCTAACGATCGCAACGGTGTCACCCTCG
 GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTCGCC
 TAGTCCCTAGGGCTAGTCTTAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
 AACAAATGAAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGACGTTTCTTAAGCA
 GCACCGAAATCCAAGTTGCTTTCGGTCGTTTTTCGTCAAGCTTCTGCCAGCCTCACCGCTGCTAAA
 GCTTTAACCGAAAAAGCTAGTTCTTTAATCTCCGGTGCAGCTCAAGCTGTGTACAACAAGTACCC
 CTACACCACCCAAATGCAGGGGAATAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGACAAATGCGCTC
 GTGACATCGGTTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Microcystis* sp. NPLJ4

TGGAAATCATCTTGCGTTATGTTACCTACGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGAT
 CGTTGCTTAAATGGTCTTCGCGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCTGC
 TGGCGTAAGCAAAATGAAAGAAGCTGCTTTATCCATTGCTAACGATCGCAACGGTATCACCCCCG
 GCGATTGCAGTGCTTTAATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTCGCC
 TAGTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCA
 AACAAATGAAAACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGTCGTTTCTTAAGCA
 GCACCGAAATCCAACTGCTTTCGGTCGTTTTTCGTCAAGCTTCTGCTGGCCTCAGCGCCGCTAAA
 GTGTTGACCGAAAAAGCCAGTTCTTTGATCTCTGGCGCTAATCACTAGTGA

Seqüências do domínio NMT do gene da sintetase de microcistinas (*mcyA*) de linhagens brasileiras de *Microcystis*

>*Microcystis aeruginosa* SPC777

TTGCCAGTGTTATTGGGGAACCGATATTTTCATAGTAGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATCA
AGAATGGCCTCAGCTAGAGCAAGTCAGGCTATTGCATAGCACAGCCGATAATTTTGAGGGTTTG
AGTCAGAAGGATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis aeruginosa* NPJB1

TTGTCAGCATTATTGGGGAACAGATATTTTCATCAGTAGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTACCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCAGAAGGATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis botrys* SPC759

TTGCCAGTCTTATTGGGGAAGTATATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCAGAAGGATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis panniformis* SPC702

TTGTCAGCATTATTGGGGAACCGATATTTTCATCAGTAGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTACCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCAGAAGGATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis protocystis* SPC697

TTGTCAGCATTATTGGGGAACCGATATTTTCATCAGTAGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTACCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCAGAAGGATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis* sp. NPLJ4

TTGTCAGCATTATTGGGGAACCGATATTTTCATCAGTAGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTACCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCAGAAGGATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis viridis* SPC647

TTGCCAGTCTTATTGGGGAAGTATATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCGGAAGAATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis viridis* SPC660

TTGCCAGTCTTATTGGGGAAGTATATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCGGAAGAATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis viridis* SPC716

TTGCCAGTCTTATTGGGGAAGTATATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTAAGTCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCGGAAGAATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis viridis* SPC719

TTGCCAGTCTTATTGGGGAACTGATATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTACTGCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCGGAAGAATTCGATACAATTATCCTTAA

>*Microcystis viridis* SPC722

TTGCCAGTCTTATTGGGGAACTGATATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTACTGCCGATAATTTGAGGGTTTG
GAGTCGGAAGAATTCGATACAATTATCCTTAA

Demais seqüências apresentadas neste estudo

>*Sphaerocavum brasiliensis* SPC484 (seqüência de RNAr 16S)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGAATCTTCGGATTCTAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAACTTCAGGACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAAT
ACCCGGTGTGCCGCAAGGTGAAACCTAATTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTG
GGA CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAA
GCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGTCTTTGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGA
AGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTG
CCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAACTGGCAGACTAGAGATCAGTAGGG
GTAGCAGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAG
CGTGCTACTGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC
CCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAA
GCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGAC
TTGACATGTCGCGAACCCTGGTGAAAGCTAGGGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCA
TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTC
TTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCGACACACGTACTACAATGGTCGGGACAA
AGGGCAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGAATCCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCT
GCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATAACGGCGGTGAATTCGT
TCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTC
AACCGCAAGGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAA

>*Sphaerocavum brasiliensis* SPC484 (seqüência de *cpcBA*-IGS)

CTTGCGTTATGTTACCTACGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGATCGTTGCTTAA
ATGGTCTTCGCGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTGCCCGGAGCTTCCGTAGCTGCTGGCGTAAGC
AAAATGAAAGAAGCTGCTTTGTCCATTGCTAACGATCGCAACGGTGTCACCCTCGGCGATTGCAG
TGCTTTGATGTCTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTGCGCTAGTCCCTGG
GGCTAGTCTTAATTAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACAATGAAA
ACCCCCCTTACCGAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGCCGTTTCTTAAGCAGCACCGAAAT
CCAAGTTGCTTTTCGGTCGTTTTCTGCTAAGCTTCTGCTAGCCTCACCCTGCTAAAGCTTTAACC
AAAAAGCCAGTTCTTTGATCTCTGGCGCCGCTCAAGCTGTGTACAACAAGTACCCCTACACCACC
CAAATGCAGGGGAATAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGACAAATGCGCTCGTGACATCGG
TTACTACCTCCGCATGGTGACCTACTGC

>*Radiocystis fernandoi* SPC736 (seqüência de *cpcBA*-IGS)

AAACCTATGTAGCTTTAGGAGTGCCCGGAGCTTCCGTAGCTGCTGGCGTAAGCAAAATGAAAGAA
GCTGCTTTGTCCATTGCTAACGATCGCAACGGTGTCACCCTCGGCGATTGCAGTGCTTTGATGTC
TGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCCGCTGCTGTGCGCTAGTCCCTGGGGCTAGTCTTAA
TTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATACCAAACAATGAAAACCCCCCTTACC
GAAGCCGTAGCAGCCGCTGATTCTCAAGGCCGTTTCTTAAGCAGCACCGAAATCCAAGTTGCTTT
CGGTCGTTTTCTGCTAAGCTTCTGCTAGCCTCACCCTGCTAAAGCTTTAACCAGAAAAGCCAGTT
CTTTGATCTCTGGCGCCGCTCAAGCTGTGTACAACAAGTACCCCTACACCACCAAATGCAGGGG
AATAACTTTGCGGCGGACCAACGCGGTAAAGACAAATGCGCTCG

>*Planktothrix mougeotii* SPC788 (seqüência de *cpcBA*-IGS)

TGGAAATCATCTTACGTTATGTCACCTATGCAGTTTTTCGCTGGAGATGCTAGCGTTCTCGATGAT
CGTTGCTTAAACGGTCTGCGTGAAACCTACCTGGCTTTAGGCGTTCCTGGTGCTTCCGTTGCTGT
TGGCGTTGGCAAAATGAAAGATGCCGCTCTGGCTATCGTCAACGATCCCGCAGGAATCACTCCTG
GAGATTGTAGCGCCCTGGCTTCTGAAATCGCCAGCTACTTTGATCGCGCTGCGGCTGCTGTTGCC
TAGTTTTTCAAAAATCTGA TTTTTCATAAATCCATAGAAGTCTAATTAAATGACTTCAATTTGTAC
CTCAACTTTGTAAACCACATCGGGAGATAATTCAAGCATGAAAACCCCCCTGACTGAAGCAGTAA
CCACCGCCGATTCTCAAGGCCGTTTCTTAAGCAGCACTGAACTGCAAGTGGCTTTCGGACGTTTC
CGTCAAGCCAAAGCTGGCTTAGAAGCTGCTAAAGCTCTGAGCAATAAAGCCGATAGCCTGGTCAG
TGGTGCTGCCCAAGCAGTGATAACAAGTTCCCTTACACCACCCAAATGCAAGGGCCCAACTACG
CTTCTAGCGAACGTGGTAAAGGCAAATGCGCTCGTGACATCGGTTACTACCTCCGTATGGTCACC
TACTGC

>*Radiocystis fernandoi* SPC736 (seqüência de *mcyA*)

TTGCCAGTCTTATTGGGGAAGTGAATTTTCATCTGTTGCCTTAGACCATATTCAGCGAATTAATC
AAGAAGGGCCAAAGCTGGAGCAAATAAGGTTATTTCCCGTACTGCCGATAATTTTGAGGGTTTG
GAGTCGGAAGAATTCGATACAATTATCCTTAA

Apêndice 2

Estrutura de custo operacional para a técnica de Utermöhl

Material de consumo#	Marca	Quantidade de venda	Unidade produto	N. catálogo	Valor (R\$)	Quantidade necessária	Unidade produto utilizado	Custos parciais	R\$/amostra
Acido acético glacial	TEDIA	4	L (litros)	-	190,00	20	mL (mililitros)	0,95	-
Iodeto de potássio	RIEDEL	500	g (gramas)	30315	399,02	20	g (gramas)	15,96	-
Iodo (em grânulos) 99,7%	SIAL	250	g (gramas)	266426	355,38	10	g (gramas)	14,22	-
Água destilada para o preaparo de Lugol	-	-	-	-	0,1	200	mL (mililitros)	0,02	-
Solução Lugol	-	-	-	-	-	200	mL (mililitros)	31,15	-
Solução Lugol necessária por amostra	-	-	-	-	-	1	mL (mililitros)	-	0,16
Hidróxido de potássio	TEDIA	1000	g (gramas)	-	260,00	5,611	g (gramas) referente a 0,1mol/L	1,46	-
Água destilada para solução de KOH	-	-	-	-	0,1	1	L (litros)	0,10	-
Solução de KOH	-	-	-	-	-	1	L (litros)	1,56	-
Solução de KOH necessária por amostra	-	-	-	-	-	100	mL (mililitros)	-	0,16
Custo total dos produtos									0,31
Equipamentos									
Depreciação - destilador de água	MILLIPORE	-	-	-	17.475,00	768	amostras de 100 mL/ano	-	2,84
Depreciação - banho maria	FANEM	-	-	-	1.872,38	768	amostras de 100 mL/ano	-	0,30
Consumo de energia - banho maria	-	-	-	-	-	11	horas de uso/mês	-	0,08
Depreciação - microscópio invertido	LEICA	-	-	-	33.787,84	768	amostras de 100 mL/ano	-	5,50
Consumo de energia - microscópio invertido	-	-	-	-	-	96	horas de uso/mês	-	0,05
Depreciação - câmaras de Utermöhl	LEICA	-	-	-	1760,00	768	amostras de 100 mL/ano	-	0,29
Depreciação - autoclave (65 L)	TERMOTRON	-	-	-	12.800,00	768	amostras de 100 mL/ano	-	2,08
Consumo de energia - Autoclave	-	-	-	-	-	3	horas de uso/mês	-	0,05
Custo total dos equipamentos									11,20
Demais custos relacionados									
Analista (mão-de-obra)	-	-	-	-	2500,00	-	-	-	39,06
Água de torneira para lavagem de materiais	-	1	L (litros)	-	0,02	80	L (litros)	-	0,03
Água destilada para banho maria	-	1	L (litros)	-	0,1	20	L (litros)	-	0,03
Água de torneira para autoclave	-	1	L (litros)	-	0,02	80	L (litros)	-	0,03
Total demais custos relacionados									39,14
Custo total (produtos + equipamentos + demais custos)									50,65

#Material de consumo = reagentes, solventes e soluções

Estrutura de custo operacional para a técnica de qPCR

(Continua)

[illegible]

Estrutura de custo operacional para a técnica de qPCR

(Conclusão)

Equipamentos									
Depreciação - kit micropipetas (Pipetman Ultra Starter Kit, U20, U200, U1000)	ANALITICA	-	-	F267630	2.292,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,08
Depreciação - cuba completa p/ eletroforese submarina HE33 (géis 7x10 cm)	AMERSHAM BIOSCIENCE	-	-	80-6052-45	1.452,15	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,05
Depreciação - fonte para eletroforese EPS 301 Power Supply	AMERSHAM BIOSCIENCE	-	-	18-1130-01	2.247,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,08
Consumo de energia - fonte para eletroforese	-	-	-	-	-	11	horas de uso/mês	-	0,00
Depreciação - digitalizador para géis (fotodocumentador)	GE	-	-	63005650, 28923662, 28919445, 28927278	26.987,91	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,98
Consumo de energia - digitalizador para géis	-	-	-	-	-	4	horas de uso/mês	-	0,00
Depreciação - computador (1) acoplado ao digitalizador para géis	INTEL - 2GB RAM	-	-	-	2.500,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,09
Consumo de energia - computador (1)	-	-	-	-	-	4	horas de uso/mês	-	0,00
Depreciação - no break (computador 1) ***	SMS (1400 VA, 50 min)	-	-	-	490,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,02
Depreciação - termociclador para qPCR****	APPLIED BIOSYSTEMS	-	-	4376374	51.209,31	3456	amostras de 100 mL/ano	-	1,85
Consumo de energia - termociclador para qPCR	-	-	-	-	-	32	horas de uso/mês	-	0,02
Consumo de energia - computador (2)	-	-	-	-	-	32	horas de uso/mês	-	0,02
Depreciação - no break (computador 2)***	SMS (1400 VA, 50 min)	-	-	-	490,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,02
Depreciação - centrífuga de bancada	HETTICH	-	-	Modelo MIKRO 120	4.800,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,17
Consumo de energia - centrífuga de bancada	-	-	-	-	-	2	horas de uso/mês	-	0,00
Depreciação - sistema para ultrapurificação de água	MILLIPORE	-	-	ZRQSVPOBR, MPGP02001, SPR00SIA1, JBRPRT1, TANKPE030, TANKPECKT, TANKMPK01, CDUFBI001	17.475,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,63
Autoclave (12 L)	TERMOTRON	-	-	-	2.100,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,08
Consumo de energia - autoclave (12 L)	-	-	-	-	-	3	horas de uso/mês	-	0,00
Depreciação - liofilizador (12 Kg / 24 h)	CHRIST	-	-	-	40.000,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	1,45
Consumo de energia - liofilizador (alteração do estado físico da amostra)	-	-	-	-	-	128	horas de uso/mês	-	0,07
Depreciação - freezer (-20°C)	BOSCH	-	-	GSD32 (300 L)	1.678,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,06
Consumo de energia - freezer (-20°C)	-	-	-	-	-	-	horas de uso/mês	-	0,05
Depreciação - microondas	BRASTEMP	-	-	BMS25AB (18L)	300,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,01
Consumo de energia - microondas	-	-	-	-	-	0,8	horas de uso/mês	-	0,00
Depreciação - balança analítica (210 g)	AND (11 VA)	-	-	-	4.270,00	3456	amostras de 100 mL/ano	-	0,15
Consumo de energia - balança analítica	-	-	-	-	-	0,03	horas de uso/mês	-	0,00
Custo total dos equipamentos									5,89
Demais custos relacionados									
Analista (mão-de-obra)	-	-	-	-	2500,00	-	-	-	8,68
Água de torneira para lavagem de materiais	-	1	L (litros)	-	0,02	320	L (litros)	6,40	0,02
Água de torneira para autoclave	-	1	L (litros)	-	0,02	20	L (litros)	0,40	0,00
Água ultrapura para procedimentos de biologia molecular	-	1	L (litros)	-	0,15	1	L (litros)	0,15	0,00
Total demais custos relacionados									8,70
Custo total (produtos + equipamentos + demais custos)									43,30

Material de consumo = reagentes, soluções e materiais plásticos para laboratório

* Inclui o uso de 10 g de hidróxido de sódio (NaOH)

** Inclui os custos de sacarose (2 g) + azul de bromofenol para 5 mL de água ultrapura (tampão de carregamento da amostra) e brometo de etídio

*** Consumo de energia não computado

****Capacidade para 48 amostras, com três filtros de emissão e fotodiódio, e computador incluso, mas sem no break

OBS: Para a conversão de KVA em Kw, utilizou-se um fator de potência igual a 0,6