**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análises moleculares, químicas e ecotoxicológicas de cianobactérias
presentes em florações de lagoas do Estado de São Paulo**

Luciana Mecatti Elias

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2011**

Luciana Mecatti Elias
Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

**Análises moleculares, químicas e ecotoxicológicas de cianobactérias presentes
em florações de lagoas do Estado de São Paulo**

Orientadora:
Prof^ª. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Elias, Luciana Mecatti

Análises moleculares, químicas e ecotoxicológicas de cianobactérias presentes em
florações de lagoas do Estado de São Paulo / Luciana Mecatti Elias. - - Piracicaba, 2011.
119 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Cianobactérias - Análise genética 2. Ecotoxicologia 3. Espectrometria de massas
4. Eutrofização 5. Floração 6. Lagoas 7. Toxinas I. Título

CDD 589.46
E42a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Zito e Lucia,

Pelas oportunidades oferecidas, por sempre terem sido um exemplo de honestidade, dignidade e paciência para mim. Mas principalmente pelo amor a mim dedicado, respeito e apoio durante todos os momentos fáceis e difíceis da minha vida

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Simone Possedente de Lira pela orientação, pelo apoio e pela amizade.

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore por conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade de São Paulo pelo suporte e pela oportunidade de ingresso no curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo pela colaboração nas análises de LC-MS/MS.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai por disponibilizar o sequenciador e ao Fábio Rodrigo Sanches Duarte pelo apoio técnico.

À Profa. Dra. Regina T. Rosim Monteiro, Tâmara G. Messias e Sérgio B. Sartori pela colaboração nos ensaios ecotoxicológicos.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, Adriana Sturion Lorenzi, Ana Cláudia Carraro Alleoni, Ana Paula Dini Andreote, Caroline Hoff, Caroline Souza Pamplona da Silva, Diego Bonaldo Genuário, Elaine Crespim e Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz, pela ajuda e pelo companheirismo. Mas principalmente aos amigos que conquistei, Danillo Oliveira de Alvarenga, Marina Gumiere Alves e Natália Juliana Nardelli Gonçalves, por terem feito esse período mais feliz e agradável, pelo apoio e união.

À minha família, cujo apoio me permitiu chegar até aqui.

Às minhas queridas amigas, Thaiane Ortolan Calderari e Maria Clara Mecatte Varga, por sempre estarem ao meu lado e me ajudarem de alguma forma.

A todas as pessoas que tiveram alguma contribuição direta ou indireta para a realização deste trabalho.

“NAVEGUE, DESCUBRA TESOUROS, MAS NÃO OS TIRE DO FUNDO DO MAR, O LUGAR DELES É LÁ. ADMIRE A LUA, SONHE COM ELA, MAS NÃO QUEIRA TRAZÊ-LA PARA A TERRA. CURTA O SOL, SE DEIXE ACARICIAR POR ELE, MAS LEMBRE-SE QUE O SEU CALOR É PARA TODOS. SONHE COM AS ESTRELAS, APENAS SONHE, ELAS SÓ PODEM BRILHAR NO CÉU. NÃO TENDE DETER O VENTO, ELE PRECISA CORRER POR TODA PARTE, ELE TEM PRESSA DE CHEGAR SABE-SE LÁ ONDE. NÃO APARE A CHUVA, ELA QUER CAIR E MOLHAR MUITOS ROSTOS, NÃO PODE MOLHAR SÓ O SEU. AS LÁGRIMAS? NÃO AS SEQUE, ELAS PRECISAM CORRER NA MINHA, NA SUA, EM TODAS AS FACES. O SORRISO! ESSE VOCÊ DEVE SEGURAR, NÃO DEIXE-O IR EMBORA, AGARRE-O! QUEM VOCÊ AMA? GUARDE DENTRO DE UM PORTA JÓIAS, TRANQUE, PERCA A CHAVE!”

FERNANDO PESSOA

“A NOSSA MAIOR GLÓRIA NÃO RESIDE NO FATO DE NUNCA CAIRMOS, MAS SIM EM LEVANTARMO-NOS SEMPRE DEPOIS DE CADA QUEDA.”

CONFÚCIO

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 DESENVOLVIMENTO	25
2.1 Revisão Bibliográfica	25
2.1.1 Características gerais das cianobactérias	25
2.1.2 O fenômeno da eutrofização e a ocorrência de florações	28
2.1.3 Cianotoxinas.....	30
2.1.3.1 Hepatotoxinas	32
2.1.3.1.1 Microcistina	32
2.1.3.1.2 Cilindrospermopsina.....	34
2.1.3.2 Neurotoxinas	35
2.1.3.2.1 Saxitoxina.....	35
2.1.3.2.2 Anatoxina	36
2.1.4 Cianopeptídeos	37
2.1.4.1 Aeruginosina e cianopeptolina	37
2.1.5 Amostras ambientais	41
2.1.6 Análises moleculares	42
2.1.6.1 O gene RNAr 16S.....	43
2.1.6.2 DGGE.....	43
2.1.6.3 Construção de uma biblioteca genômica.....	44
2.1.7 Análises químicas	45
2.1.8 Estudos ecotoxicológicos	47
2.1.8.1 <i>Hydra attenuata</i>	48
2.2 Objetivos	49
2.3 Material e Métodos	49
2.3.1 Coleta das amostras ambientais	49
2.3.2 Extração do DNA genômico das amostras ambientais	54
2.3.3 Amplificação por PCR do gene RNAr 16S	55
2.3.4 Análise da biodiversidade de cianobactérias por DGGE	55

2.3.5 Análise da biodiversidade de cianobactérias por meio da construção de bibliotecas genômicas	56
2.3.5.1 Clonagem	57
2.3.5.2 Transformação em células de <i>E. coli</i> competentes.....	57
2.3.5.3 PCR de colônias	58
2.3.5.4 Extração do DNA plasmidial	58
2.3.5.5 Sequenciamento das bibliotecas genômicas	59
2.3.5.5.1 Análises das sequências e geração de UTOs	60
2.3.5.5.2 Curvas de rarefação, índice de riqueza e índice de diversidade	60
2.3.5.5.3 Análise filogenética	61
2.3.6 Amplificação por PCR de genes codificadores de toxinas.....	61
2.3.7 Análises químicas	63
2.3.7.1 Extração de cianotoxinas	63
2.3.7.2 Purificação de cianopeptídeos	63
2.3.7.3 Espectrometria de massas	64
2.3.8 Ensaios com cnidários	65
2.4 Resultados e Discussão	65
2.4.1 Extração de DNA de cianobactérias das amostras ambientais de água e amplificação do gene RNAr 16S.....	66
2.4.2 Análise da biodiversidade de cianobactérias por meio de DGGE.....	66
2.4.3 Análise da biodiversidade de cianobactérias por meio da construção de bibliotecas genômicas	68
2.4.3.1 Índices de riqueza e de diversidade e curvas de rarefação	72
2.4.3.2 Comparação entre as bibliotecas genômicas e análises das UTOs	75
2.4.3.3 Análise filogenética.....	77
2.4.4 Amplificação por PCR de genes codificadores de toxinas.....	81
2.4.5 Espectrometria de massas	82
2.4.6 Ensaios ecotoxicológicos	92
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
REFERÊNCIAS	99

RESUMO

Análises moleculares, químicas e ecotoxicológicas de cianobactérias presentes em florações de lagoas do Estado de São Paulo

Cianobactérias são microrganismos que desempenham um papel ecológico fundamental na natureza. O processo de eutrofização em ambientes aquáticos, tais como lagos e reservatórios, constitui um dos principais fatores relacionados à ocorrência de florações de cianobactérias nestes locais. Quatro lagoas presentes no Estado de São Paulo, nas cidades de Campinas, Limeira e Piracicaba foram estudadas visando descobrir a diversidade de cianobactérias presentes, seu potencial para a produção de cianotoxinas e os efeitos destas em organismos aquáticos bioindicadores, como *Hydra attenuata*. As amostras foram coletadas no mês de setembro de 2010 e divididas em 3 partes: a primeira foi utilizada para extração de DNA de cianobactérias para análises em DGGE, construção de bibliotecas genômicas e amplificação de genes produtores de toxinas; a segunda para a extração de cianotoxinas e análises em LC-MS/MS; e a terceira parte foi usada em ensaios ecotoxicológicos utilizando organismos aquáticos bioindicadores. A análise de DGGE mostrou que o padrão de bandas entre as diferentes amostras ambientais de água pareceu não apresentar grandes variações entre si e mostrou a predominância de poucas UTOs em todas as amostras, o que sugere que nessas localizações algumas espécies são predominantes sobre as outras. A construção de bibliotecas genômica gerou 233 clones, distribuídos da seguinte maneira: 57 clones da lagoa de Limeira, 60 clones da Lagoa do Taquaral, 59 clones da lagoa ESALQ1 e 57 clones da lagoa ESALQ2. Um total de 9 gêneros de cianobactérias foi observado nas amostras das lagoas, os quais são *Anabaena*, *Brasilanema*, *Cylindrospermopsis*, *Limnococcus*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus* e *Woronichinia*. Neste estudo, as lagoas ESALQ2, Taquaral e Limeira apresentaram mais do que 80% da comunidade de cianobactérias avaliadas como sendo do gênero *Microcystis*. Este fato comprovou que no período analisado estavam ocorrendo florações de *Microcystis* em 3 das 4 lagoas analisadas. Pela amplificação de genes codificadores de cianotoxinas e cianopeptídeos foi possível detectar a presença de aeruginosina, cianopeptolina, microcistina e saxitoxina nas amostras ambientais. Estes dados foram comprovados através das análises em LC-MS/MS onde foi possível detectar a presença de aeruginosina, cianopeptolina e microcistina. Somente a presença de saxitoxina não foi confirmada por esta análise. Os ensaios toxicológicos com *H. attenuata* mostraram que todos os extratos foram tóxicos para este organismo teste, com exceção do extrato da lagoa ESALQ2, que causou apenas efeitos sub-letais nestes organismos.

Palavras-chave: Cianobactérias; *Microcystis*; Biblioteca genômica; Toxinas; Espectrometria de massas

ABSTRACT

Molecular, chemical and ecotoxicological analysis of cyanobacterial blooms in lakes of Sao Paulo State

Cyanobacteria are microorganisms that play a crucial ecological role in nature. The process of eutrophication in aquatic environments such as lakes and reservoirs, is one of the main factors related to the occurrence of cyanobacterial blooms in these locations. Four ponds located in the state of São Paulo at Campinas, Limeira and Piracicaba cities were studied in order to explore the diversity of cyanobacteria, their potential for cyanotoxins production and their effects on aquatic organisms as biological indicators, such as *Hydra attenuata*. The samples were collected in September 2010 and divided into 3 parts: the first one was used for cyanobacterial genomic DNA extraction, DGGE analysis, genomic library construction and amplification of toxin-producing genes; the second was used for the cyanotoxins extraction and LC-MS/MS analysis; and the third part was used in ecotoxicological tests using aquatic bioindicators. DGGE analysis showed that the banding pattern between the different water environmental samples did not seem to vary widely among themselves and showed the dominance of a few UTOs in all samples, suggesting that some species in these locations are predominant over the others. The construction of genomic libraries generated 233 clones, distributed as follow: 57 clones from Limeira lake, 60 clones from Taquaral Lake, 59 clones from ESALQ1 lake and 57 clones from ESALQ2 lake. A total of nine genera of cyanobacteria were observed in samples of the ponds, which are *Anabaena*, *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis*, *Limnococcus*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus* and *Woronichinia*. In this study, the lake ESALQ2, Taquaral and Limeira had more than 80% of the community of cyanobacteria assessed as belonging to the genus *Microcystis*. This fact proved that in the analyzed period the occurring blooms were of *Microcystis* in three of the four lakes studied. By amplification of genes coding for cyanotoxins and cyanopeptides it was possible to detect the presence of aeruginosin, cyanopeptolin, saxitoxin and microcystin in environmental samples. These data were confirmed by LC-MS/MS analysis and it was possible to detect the production of aeruginosin, cyanopeptolin and microcystin. Only the presence of saxitoxin was not confirmed by this analysis. The toxicological tests with *H. attenuata* demonstrated that all extracts were toxic to this organism, except the extract of ESALQ2 lake, which caused only sub-lethal effects in these organisms.

Keywords: Cyanobacteria; *Microcystis*; Genomic library; Toxins; Mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura química geral da microcistina (SILVA-STENICO et al., 2009)...34
- Figura 2 - Estrutura química da cilindrospermopsina (FERRÃO-FILHO, 2009).....35
- Figura 3 - Estrutura química da saxitoxina (FERRÃO-FILHO, 2009).....36
- Figura 4 - A) Estrutura química da anatoxina-a; B) Estrutura química da anatoxina-a(s) (FERRÃO-FILHO, 2009).....37
- Figura 5 - Estrutura química da cianopeptolina A (MARTIN et al., 1993). AA, ácido acético; AB, ácido butanóico; AH, ácido hexanóico; AO, ácido octanóico; AG, ácido glicérico; AF; ácido fórmico. Linhas em negrito na estrutura plana representam as partes conservadas da molécula que pode ser encontrado em todos ou na maioria das congêneros; linhas finas referem-se a partes variáveis. Na estrutura todos os aminoácidos e outros resíduos encontrados nas respectivas posições da molécula estão listados juntamente com as eventuais modificações (Cl, cloração; Br, bromação; Su, sulfatação; pent, glicosilação; M, α -aminometilação; m, O-metilação). A primeira linha representa a estrutura plana. A numeração dos aminoácidos e outros resíduos está geralmente de acordo com as etapas biossintéticas. Os aminoácidos estão em códigos de três letras, incluindo homovariantes de aminoácidos proteinogênicos. Estruturas adaptadas de WELKER; VON DÖHREN (2006).....39
- Figura 6 - Estrutura química da aeruginosina 98-A (MURAKAMI et al., 1994). Aeap, 3-aminoetil-1-N-amidino-D-3-pirrolina. Linhas em negrito na estrutura plana representam as partes conservadas da molécula que pode ser encontrado em todos ou na maioria das congêneros; linhas finas referem-se a partes variáveis. Na estrutura todos os aminoácidos e outros resíduos encontrados nas respectivas posições da molécula estão listados juntamente com as eventuais modificações (Cl, cloração; Br, bromação; Su, sulfatação; pent, glicosilação; M, α -aminometilação; m, O-metilação). A primeira linha representa a estrutura plana. A numeração dos aminoácidos e outros resíduos está geralmente de acordo com as etapas

	biossintéticas. Os aminoácidos estão em códigos de três letras, incluindo homovariantes de aminoácidos proteinogênicos. Estruturas adaptadas de WELKER; VON DÖHREN (2006).....	40
Figura 7 -	Organismo utilizado nos testes de toxicidade - <i>H. attenuata</i>	48
Figura 8 -	Locais onde foram realizadas as coletas de cianobactérias no Estado de São Paulo (Limeira, Piracicaba e Campinas).....	49
Figura 9 -	Planta baixa ilustrando a área total do Parque (LIMA, 1987). Em vermelho as lagoas ESALQ1 e ESALQ2.....	51
Figura 10 -	Lagoa ESALQ1 e lagoa ESALQ2.....	51
Figura 11 -	Lagoa do Taquaral.....	52
Figura 12 -	Lagoa de Limeira.....	53
Figura 13 -	Processo de extração de cianopectídeos. A) Amostra ambiental; B) Rompimento celular com metanol; C) Extrato metanólico; D) Coluna C ₁₈ para purificação de cianopectídeos; E) Extratos das frações coletadas da coluna C ₁₈ (20, 60, 70 e 100% metanol).....	64
Figura 14 -	Perfil de bandas de DGGE para as amostras ambientais. T – Lagoa do Taquaral, L – lagoa de Limeira, E1 – lagoa ESALQ1, E2 – lagoa ESALQ2 e M – marcador.....	67
Figura 15 -	Distribuição dos gêneros de cianobactérias entre as quatro lagoas.....	69
Figura 16 -	Porcentagem dos gêneros encontrados na Lagoa de Limeira, lagoa do Taquaral, lagoa ESALQ1 e lagoa ESALQ2.....	71
Figura 17 -	Comparação do índice de riqueza (Chao1) entre as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S obtidas das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo.....	73
Figura 18 -	Comparação do índice de diversidade (Shannon) entre as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S obtidas das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo.....	74
Figura 19 -	Curvas de rarefação de cobertura das sequências de cianobactérias obtidas para as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo.....	75

- Figura 20 - Número de sequências de cada biblioteca genômica dentro de cada UTO.....77
- Figura 21 - Árvore filogenética obtida pelo método de “Neighbor-Joining” (Kimura 2-parameter) de sequências do gene rRNA 16S de clones de cianobactérias presentes em florações de lagoas do Estado de São Paulo. Os valores de reamostragem maiores que 50 se encontram nos nós da árvore. Em negrito se encontram clones representantes das UTOs obtidas neste estudo.....79
- Figura 22 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ frações 40-60% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon *m/z* 981 fragmentado, correspondente a uma variante de microcistina-LR (Asp³).....84
- Figura 23 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ frações 40-60% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon *m/z* 995 fragmentado, correspondente a uma microcistina-LR.....84
- Figura 24 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon *m/z* 561 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina.....86
- Figura 25 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ frações 40-60% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon *m/z* 593 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina.....86
- Figura 26 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon *m/z* 593 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina.....87
- Figura 27 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da Lagoa do Taquaral. A

- seta no espectro apresenta o íon m/z 601 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina.....87
- Figura 28 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa ESALQ2. A seta no espectro apresenta o íon m/z 601 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina clorada.....88
- Figura 29 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa ESALQ2. A seta no espectro apresenta o íon m/z 635 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina clorada.....88
- Figura 30 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa ESALQ2. A seta no espectro apresenta o íon m/z 669 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina clorada.....89
- Figura 31 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da Lagoa do Taquaral. A seta no espectro apresenta o íon m/z 633 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina diclorada.....89
- Figura 32 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 505 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina.....90
- Figura 33 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 959 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina.....90
- Figura 34 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 969 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina.....91
- Figura 35 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 973 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina.....91

- Figura 36 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 987 fragmentado, correspondente a uma cianopectolina.....92
- Figura 37 - Alterações morfológicas que podem ser causadas em *H. attenuata* após um ensaio ecotoxicológico. A) Organismo normal; B) Organismo com formação de bulbos nos tentáculos; C) Organismo com encurtamento dos tentáculos; D) Organismo com perda dos tentáculos; E) Morte do organismo.....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição de gêneros, número de clones, número de UTOs e cobertura estimada para as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S obtidas das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo.....	69
Tabela 2 -	Distribuição dos gêneros encontrados nas lagoas dentro das ordens segundo o sistema de classificação de Hoffmann, Komárek e Kaštovsky (2005).....	70
Tabela 3 -	Valores de p para comparação múltipla entre bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S das populações de cianobactérias de quatro lagoas do Estado de São Paulo (distância evolutiva 0,03).....	76
Tabela 4 -	Deteção de cianopeptídeos e cianotoxinas através de amplificação de genes codificadores de toxinas e posterior eletroforese em gel de agarose.....	82
Tabela 5 -	Cianopeptídeos encontrados nas amostras das lagoas ESALQ2, Limeira e Taquaral, através de análises realizadas em LC-MS/MS.....	83
Tabela 6 -	Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo <i>H. attenuata</i> após exposição às cianotoxinas do extrato da lagoa ESALQ1.....	93
Tabela 7 -	Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo <i>H. attenuata</i> após exposição às cianotoxinas do extrato da lagoa ESALQ2.....	93
Tabela 8 -	Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo <i>H. attenuata</i> após exposição às cianotoxinas do extrato da lagoa de Limeira.....	94
Tabela 9 -	Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo <i>H. attenuata</i> após exposição às cianotoxinas do extrato da Lagoa do Taquaral.....	94

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos, tais como lagoas e reservatórios, frequentemente recebem descargas de esgotos domésticos e industriais, como também de atividades ligadas a agricultura, como por exemplo, a cultura da cana-de-açúcar. Estas descargas geralmente contêm grande quantidade de nutrientes, como nitrogênio, carbono e fósforo, os quais são essenciais para o crescimento de cianobactérias e em grandes quantidades podem gerar um crescimento acelerado destes microrganismos causando florações nestes corpos d' água.

As cianobactérias possuem algumas características importantes que favorecem o seu sucesso em ambientes eutrofizados, tais como: controle da flutuabilidade na coluna d' água; capacidade de crescer em corpos d' água altamente túrbidos; capacidade de armazenar fósforo; assimilação de nitrogênio atmosférico por algumas espécies, etc. Tais características proporcionam vantagem competitiva nestes ambientes em relação a outros organismos do fitoplâncton.

As florações de cianobactérias causam impactos tanto ambientais quanto sociais e econômicos, uma vez que afetam toda a biota do ambiente aquático, além de geralmente conter cianotoxinas. Dentre estas, as mais comumente encontradas e estudadas são as microcistinas, que são hepatotoxinas associadas à inibição da proteína fosfatase.

Para o estudo das cianobactérias presentes em florações podem ser utilizadas diversas metodologias, dentre as quais podemos citar as análises moleculares que permitem avaliar a diversidade das comunidades microbianas em amostras ambientais sem que haja a necessidade de cultivo. Destas, a forma mais comum é a amplificação, clonagem e sequenciamento de genes presentes nos organismos da comunidade, os quais podem ser utilizados para a sua identificação, além de indicar potenciais metabólitos produzidos por estas espécies. Conjuntamente com a técnica molecular, espectrometria de massas é comumente utilizada para a identificação de cianotoxinas, por ser uma técnica que permite identificar compostos de baixa concentração em um curto espaço de tempo. Além disso, pode ser utilizada uma avaliação toxicológica dos cianopeptídeos presentes em corpos d' água, pelo uso de

organismos bioindicadores. A utilização de tais metodologias neste trabalho propiciou um conhecimento amplo sobre a diversidade de cianobactérias presentes nas quatro lagoas analisadas e uma análise tanto química quanto biológica das cianotoxinas que estavam presentes.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Características gerais das cianobactérias

Estima-se que as cianobactérias tiveram sua origem a aproximadamente 2,4 bilhões de anos, sendo inicialmente representadas por formas unicelulares de pequeno diâmetro, habitantes de água doce (BLANK; SÁNCHEZ-BARACALDO, 2010). A evolução da fotossíntese oxigênica nestes organismos resultou em uma elevação na concentração de oxigênio presente na atmosfera terrestre, o que provocou a transição de um ambiente de temperatura elevada, que era dominado por metano, para uma era glacial em um período de tempo curto em termos evolutivos (1 milhão de anos) (KOPP et al., 2005).

O aparato fotossintético cianobacteriano permite a captação da energia solar através de pigmentos como a clorofila-*a*, a ficocianina e a ficoeritrina. Nestes organismos podem também ser encontrados carotenóides com a dupla função de servir como pigmentos acessórios à fotossíntese e de proteger as células contra danos foto-oxidativos (HIRSCHBERG; CHAMOVITZ, 1994). Além de realizarem a fixação de carbono inorgânico por meio da fotossíntese, algumas cianobactérias possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (FIORE; HONDA, 2008), fato que constitui uma grande vantagem adaptativa para estes organismos por conferir maior autonomia às células e permitir a colonização de ambientes deficientes em nitrogênio (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003).

As ferramentas de sequenciamento de DNA permitiram profundas modificações nas relações taxonômicas. Em 1977, Carl Woese e colaboradores, da Universidade de Illinois, introduziram métodos de classificação baseados na comparação das sequências do gene da subunidade menor do ribossomo (RNAr 16S) (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Assim sendo, o sequenciamento do gene RNAr 16S é considerado atualmente o método molecular padrão na determinação dos gêneros de cianobactérias, onde duas linhagens são classificadas dentro do mesmo gênero desde que haja um percentual de similaridade igual ou maior que 95% entre as sequências (KOMÁREK, 2010).

A introdução de técnicas moleculares e a mudança dos conceitos taxonômicos, dando mais ênfase à filogenia e à formação de grupos monofiléticos levaram à revisão das formas de classificação dos seres vivos em três domínios (Bacteria, Archaea e Eukarya), sendo que, a análise das sequências do gene RNAr 16S forneceu a primeira evidência de o mundo vivo estar dividido nesses três domínios. De acordo com esta classificação, as cianobactérias pertencem ao domínio Bacteria (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Segundo o sistema de classificação de Hoffmann; Komárek e Kaštovsky (2005), o qual é baseado em semelhança genética (principalmente do gene RNAr 16S), características morfológicas e arranjo dos tilacóides, as cianobactérias são classificadas em quatro subclasses: Gloeobacterophycidae (ordem Gloeobacterales), Synechococcophycidae (ordens Synechococcales e Pseudanabaenales), Oscillatoriothycidae (ordens Chroococcales e Oscillatoriales) e Nostocophycidae (ordem Nostocales).

As cianobactérias possuem uma estrutura celular que apresenta parede celular contendo lipopolissacarídeos (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005), membrana plasmática, cápsula ou bainha mucilaginosa, nucleóide, ribossomos, inclusões de fosfato, proteínas e lipídios, citoplasma e lamelas fotossintéticas (tilacóides), nas quais são encontrados os pigmentos fotossintetizantes. O DNA localiza-se no centro do protoplasma, em uma região denominada nucleoplasma (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Elas podem ser unicelulares ou filamentosas, ocorrer individualmente ou em colônias, geralmente envolvidas em mucilagem. Não possuem cílios nem flagelos como as bactérias; por isso, toda a sua mobilidade está relacionada à expulsão de material orgânico produzido pelas células ou, no caso de espécies filamentosas, por movimentos deslizantes, como outras bactérias, e de rotação (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Estes microrganismos são membros colonizadores dos mais variados ambientes como: aquáticos, terrestres e aerofíticos, sendo comuns em plânctons de águas marinha, salobra e doce. Também ocorrem em rochas, solos e em simbiose com plantas e fungos (METCALF; CODD, 2004). A ampla distribuição destes

microrganismos deve-se ao seu metabolismo versátil e às adaptações estruturais e enzimáticas. Entre estas adaptações são citadas por Sant'Anna et al., (2006):

- Ficobiliproteínas: estruturas presentes em todas as cianobactérias e que promovem a captação de luz para a realização da fotossíntese, possibilitando sua sobrevivência em ambientes com baixa luminosidade;
- Heterócitos: células especializadas presentes nas espécies da ordem Nostocales, onde os genes responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico são ativados, o que favorece seu desenvolvimento em ambientes com baixa concentração de compostos nitrogenados;
- Acinetos: células diferenciadas que funcionam similarmente a esporos de resistência em condições ambientais adversas, permitindo que a célula sobreviva por longos períodos;
- Aerótopos: vacúolos gasosos que permitem a migração vertical das células na coluna d'água, possibilitando a busca de uma profundidade aonde tanto a intensidade luminosa quanto a concentração de nutrientes são favoráveis;
- Grânulos de fosfato: onde pode ocorrer o armazenamento de fósforo na forma de grãos de polifosfatos em seu citoplasma; também as cianobactérias podem ser tóxicas a outros organismos e tolerar grandes variações de temperatura.

Luz e nutrientes são os dois principais fatores que alteram a produção fotossintética e suas disponibilidades influenciam diretamente a densidade e a composição da comunidade fitoplanctônica. Os organismos fitoplanctônicos usam o resultado da produção fotossintética para crescimento celular e, conseqüentemente, aumento da biomassa e são constituintes da base da cadeia alimentar em sistemas aquáticos (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Cianobactérias geralmente crescem melhor em temperaturas acima de 25 °C (PAERL; HUISMAN, 2008). Os ecossistemas de água doce são os ambientes mais apropriados para o desenvolvimento de cianobactérias, pois a maioria das espécies apresenta melhor crescimento em águas neutroalcalinas com pH de 6 a 9 e com alta concentração de nutrientes (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

A capacidade de utilizar a luz em ambos os extremos do espectro visível (no comprimento de onda vermelho, que penetra até o fundo da coluna de água, e no

comprimento de onda azul, que geralmente se extingue em menor profundidade) se apresenta como outra vantagem ecológica das cianobactérias no ambiente aquático (PAERL, 1988).

O crescimento intenso desses microrganismos na superfície da água geralmente se dá com predomínio de poucas ou mesmo de apenas uma espécie de cianobactéria produtora de toxinas, ou de outros metabólitos, que inibem a sua predação por microcrustáceos, larvas de peixes, moluscos, etc. Portanto, como resultado desses processos, muitas vezes restará no meio aquático apenas as cianobactérias tóxicas como organismos fitoplanctônicos dominantes. Este fato, pode ocorrer nos mananciais de abastecimento presentes em muitas regiões brasileiras (BRASIL, 2003).

2.1.2 O fenômeno da eutrofização e a ocorrência de florações

Nas águas doces, que representam um importante recurso natural sendo utilizadas, sobretudo, para lazer e abastecimento, a biodiversidade vem sendo afetada principalmente pelos processos acelerados de eutrofização, provocando mudanças ambientais (COSTA; BARBOSA; CONSOLI, 2007). Os usos e ocupações sem planejamento de bacias hidrográficas, gerando esgotos e efluentes industriais, e a utilização de fertilizantes em áreas agriculturáveis, têm acelerado este processo nos sistemas aquáticos, favorecendo a proliferação e a predominância de espécies de cianobactérias produtoras de toxinas, fato que acarreta na elevação dos custos do tratamento de águas de abastecimento e em consequências, principalmente, à saúde da população. Ainda, o desenvolvimento industrial, o crescimento dos centros urbanos e a expansão de áreas agriculturáveis levam ao aumento de nutrientes essenciais para o fitoplâncton, principalmente fósforo, nitrogênio, carbono e ferro (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006; PAERL, 2008). Segundo Calijuri; Alves; Santos (2006) como consequência do processo de eutrofização podem ocorrer as seguintes situações:

- Mudanças na qualidade da água, provocadas por aumento da biomassa, por meio da produção primária do fitoplâncton;
- Alteração na diversidade de espécies, geralmente com dominância de poucas espécies;

- Diminuição na concentração de oxigênio dissolvido na coluna de água e diminuição na transparência da água;
- Mortandade de peixes;
- Aumento nas concentrações iônicas e na condutividade elétrica da água;
- Acúmulo de fósforo no sedimento;
- Produção de odores desagradáveis nas águas, em razão da decomposição de organismos, como consequências da diminuição da transparência da água e eventual desoxigenação;
- Mudanças no pH;
- Florações de cianobactérias com possível produção de toxinas.

Temperaturas elevadas favorecem a estratificação térmica, o que aumenta a estabilidade da coluna d'água e estimula a ocorrência de florações (FERNANDES et al., 2009). No entanto, o termo floração é vago e não define exatamente uma quantidade específica de células por unidade de volume. Normalmente, diz-se que há uma floração quando o número total de células passa a ser maior que a média do corpo d'água (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

As mudanças climáticas em decorrência do aquecimento global causam aumento da temperatura da água, inclusive nos períodos de temperaturas mais amenas, o que pode acarretar em um desenvolvimento acelerado das algas e principalmente das cianobactérias, em qualquer época do ano (NICKLISCH; SHATWELL; KÖLLER, 2008). O aquecimento global também afeta os padrões de precipitação e seca, e essas alterações no ciclo hidrológico pode aumentar ainda mais o domínio de cianobactérias. Além disso, os períodos de seca, o aumento do nível do mar e o aumento da retirada de água doce para uso agrícola, levaram a um aumento da salinidade nos lagos em muitas regiões. As cianobactérias são mais tolerantes ao sal do que outros organismos fitoplanctônicos de água doce, e por este motivo vem aumentando os relatos de florações em águas salobras (PAERL; HUISMAN, 2008).

A decomposição destas florações causa odor e sabor desagradável, além da liberação de metabólitos tóxicos para seres humanos, animais e comunidades aquáticas (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005).

2.1.3 Cianotoxinas

Várias espécies de cianobactérias que formam florações são responsáveis por produzirem toxinas conhecidas como cianotoxinas. As causas para essa produção ainda não estão bem esclarecidas, mas alguns pesquisadores acreditam que as cianotoxinas desempenham funções protetoras contra espécies zooplancônicas, seus predadores primários. Outros pesquisadores sugerem que a produção de toxinas esteja relacionada às condições de crescimento ou à competição (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Um fator importante tanto para a produção de toxinas quanto para o crescimento é a oferta de nutrientes, uma vez que a produção de toxinas é maior quando há um aumento destes nos corpos hídricos (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005). Há evidências de que a produção e a acumulação estão relacionadas com o crescimento das colônias. De fato, nos períodos de crescimento exponencial, a produção de toxinas tende a aumentar enquanto que na fase estacionária de crescimento, a produção tende a diminuir (WATANABE; OISHI, 1985).

As cianotoxinas estão presentes no interior da célula, sendo liberadas em situações de lise celular, decorrentes de processo de senescência natural ou pela ação de fatores ambientais (CYBIS et al., 2006). Em termos de estrutura química, as cianotoxinas podem ser divididas em peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos. Quanto aos mecanismos da toxicidade, são muito diversos e variam de efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos até a inibição geral de síntese protéica (SIVONEN; JONES, 1999). A exposição humana à cianotoxinas pode acontecer de diferentes maneiras, tais como: contato com a pele, inalação, ingestão oral, intravenosa e por meio da bioacumulação na cadeia alimentar (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

A maioria das cianobactérias oriundas de uma floração possui a capacidade de produzir toxinas. Em estudos sistemáticos, cerca de 25 a 70% das florações de cianobactérias mostraram ser potencialmente tóxicas. As representantes de água doce possuem a capacidade de produzir toxinas em larga escala, liberadas como metabólitos secundários (DUY et al., 2000). Estes metabólitos podem apresentar potencial

farmacêutico, nutricional, agrícola e outras aplicações (BARRIOS-LLERENA; BURJA; WRIGHT, 2007). A maioria dos metabólitos bioativos isolados das cianobactérias são sintetizados pelas enzimas poliketídeos sintases (PKS, do inglês “polyketide synthases”), peptídeos sintetases não-ribossômicas (NRPS, do inglês “non-ribosomal peptide synthetase”) ou um híbrido das duas (NRPS/PKS). A síntese não-ribossômica de peptídeos é uma rota alternativa da síntese de peptídeos de baixa massa molecular, com diversas estruturas e grande espectro de atividade biológica (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOZ, 1997). Estas enzimas possuem sequências altamente conservadas, refletindo em sua estrutura o caráter multifuncional, ou seja, a catálise de várias reações parciais por uma mesma enzima (FIORE et al., 2009).

Os metabólitos não tóxicos são usualmente membros de cinco famílias de inibidores de proteases: micropeptinas, anabaenopeptinas, aeruginosinas, microgininas e microviridinas. Assim, florações de cianobactérias, tóxicas e não tóxicas, geralmente contém um ou vários desses grupos de inibidores de proteases (GESNER-APTER; CARMELI, 2008).

Para avaliar o risco específico das toxinas de cianobactérias é necessário compreender as suas propriedades químicas e físicas, sua ocorrência nas águas, os fatores que regulam a sua produção e o seu decaimento no ambiente (CYBIS et al., 2006). Os métodos para detectar cianotoxinas geralmente envolvem bioensaios, análises químicas e/ou imunoensaios (SOTERO-SANTOS et al., 2008).

A partir de trabalhos realizados no Brasil, tem sido possível constatar a ocorrência de florações tóxicas em todas as regiões, havendo uma maior predominância de florações de cianobactérias tóxicas produtoras de microcistinas e saxitoxinas (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Porém, grande parte das toxinas de cianobactérias ainda não foram suficientemente estudadas quanto à sua toxicocinética e toxicodinâmica. No Brasil, os dados sobre florações ainda são muito escassos, apesar da legislação brasileira contemplar o monitoramento de cianobactérias em água doce pela portaria 518 de 2004 do Ministério da Saúde para microcistina, saxitoxina e cilindrospermopsina (OLIVEIRA et al., 2010).

2.1.3.1 Hepatotoxinas

As hepatotoxinas estão divididas em três grupos: os heptapeptídeos cíclicos (microcistinas), os pentapeptídeos cíclicos (nodularinas) e os alcalóides (cilindrospermopsinas). Todas foram assim nomeadas por terem sido primeiramente isoladas dos gêneros *Microcystis*, *Nodularia* e *Cylindrospermopsis*, respectivamente (SOARES, 2009).

O mecanismo de ação das hepatotoxinas consiste em disfunções hepáticas como hemorragia e morte dos animais em um curto intervalo de tempo e em doses agudas. Os efeitos a longo prazo das hepatotoxinas podem causar tumores e os lipopolissacarídeos podem agravar as lesões do fígado causadas pelas hepatotoxinas (FERRÃO-FILHO, 2009).

As hepatotoxinas parecem ser o tipo de cianotoxina mais amplamente distribuído em ambientes aquáticos. Destas, as mais comumente encontradas em água doce, e mais extensamente estudadas, são as microcistinas (METCALF; CODD, 2004).

2.1.3.1.1 Microcistina

As microcistinas foram descritas pela primeira vez no início da década de 1980 e desde então são largamente estudadas sendo uma das cianotoxinas mais conhecidas devido a sua ampla presença em florações de cianobactérias em todo o mundo (SOARES, 2009). São produzidas por várias linhagens de gêneros planctônicos, bentônicos ou terrestres e são as mais prevalentes cianotoxinas (FIORE et al., 2009). As mais estudadas deste grupo são as microcistinas produzidas pelos gêneros *Microcystis*, *Nostoc*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Anabaenopsis* (SIVONEN; JONES, 1999) e *Fischerella* (FIORE et al., 2009).

Estas toxinas são sintetizadas pela via metabólica não-ribossômica onde participam as enzimas NRPSs e PKSs (DITTMANN; BÖRNER, 2005). Aproximadamente noventa diferentes variáveis de microcistinas são conhecidas (KAASALAINEN et al., 2009), e a mesma floração pode produzir diferentes variantes, em diferentes concentrações e que podem apresentar níveis tóxicos distintos

(MATTHIENSEN; YUNES; CODD, 1999). Elas são peptídeos cíclicos formados por sete aminoácidos (cinco D-aminoácidos e dois L-aminoácidos), sendo que duas posições na cadeia (2 e 4) podem ser ocupadas por diferentes aminoácidos, formando uma série de variantes da molécula (figura 1). Sendo que, a mais comum e a mais tóxica é a microcistina-LR (MACKINTOSH et al., 1990), que é caracterizada pela presença de uma leucina (L) e uma arginina (R) como L-aminoácidos na posição 2 e 4 (CARMICHAEL et al., 1988) e é considerada a mais potente hepatotóxica (FUNARI; TESTAI, 2008). A estrutura geral das microcistinas pode ser descrita como: ciclo-(D-alanina¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-Adda⁵-D-glutamato⁶-Mdha⁷), onde D-MeAsp³ é D-eritro-β-ácido metilaspártico, Mdha é *N*-metildehidroalanina e Adda é o ácido (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (SOARES, 2009).

O mecanismo de ação dessa toxina está associado com a inibição da proteína fosfatase de serina/treonina (PP1 e PP2A), alterando a fosforilação de proteínas celulares envolvidas na transdução de sinais (GEHRINGER, 2004). A microcistina-LR é altamente hidrofílica e não consegue penetrar nas membranas celulares pelo transporte passivo. Ela é absorvida ativamente pela mucosa intestinal, devido ao sistema de transporte de ânion orgânico, conseguindo desta forma, atingir os hepatócitos (FISCHER et al., 2005).

Microcistinas são extremamente tóxicas para animais e estão envolvidas em numerosos incidentes de intoxicações humanas e envenenamento animal (DUY et al., 2000). Um dos episódios mais graves envolvendo intoxicação por cianotoxina foi o caso ocorrido na cidade de Caruaru (PE) em 1996, quando mais de 60 pacientes com problemas renais morreram devido à presença de microcistina na água utilizada nas sessões de hemodiálise (AZEVEDO et al., 2002). Casos de intoxicação por cianotoxinas também são comumente relatados em animais aquáticos, como é o caso dos peixes que têm seu fígado e rins afetados quando em contato com florações que contêm microcistinas. Estudos de peixes do tipo trutas, carpas, tilápias e paulistinhas com microcistinas contribuíram para mostrar os aspectos toxicocinéticos e toxicodinâmicos desta toxina (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005).

Figura 1 - Estrutura química geral da microcistina (SILVA-STENICO et al., 2009)

2.1.3.1.2 Cilindrospermopsina

Esta toxina foi descoberta pela primeira vez após um incidente de intoxicação em Palm Island (Queensland, Austrália) em 1979, quando 148 pessoas, principalmente crianças, foram internadas com sintomas de hepatointerite após a ingestão de água de uma represa contaminada, na qual foi identificada a presença de *Cylindrospermopsis raciborskii* (BOURKE et al., 1983).

Até agora, foram descritas algumas espécies de cianobactérias produtoras de cilindrospermopsina, sendo representantes do gênero *Cylindrospermopsis*, além de outros gêneros, tais como *Umezakia*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis* e *Lyngbya* (FIORE; ALVARENGA; SILVA-STENICO, 2011).

A cilindrospermopsina (figura 2) é um alcalóide guanidínico inibidor da síntese protéica (KUIPFER-GOODMAN; FALCONER; FITZGERALD, 1999). Apesar de frequentemente serem denominadas como hepatotoxinas, apresentam efeitos bem mais amplos conhecidos como citotóxicos, pois além de causarem danos ao fígado, também afetam rins, trato gastrointestinal, órgãos endócrinos, sistema imune, sistema vascular e músculos. Geralmente apresentam duas respostas de toxicidade: uma

rápida, provavelmente devido à formação de um metabólito tóxico no organismo, e outra mais lenta, resultado da inibição da síntese protéica (SOARES, 2009).

A biossíntese da cilindrospermopsina é complexa e envolve além de outras enzimas uma amidinotransferase, uma NRPS e uma PKS, que codificam os genes *aoaA*, *aoaB* e *aoaC*, respectivamente (SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001).

Figura 2 - Estrutura química da cilindrospermopsina (FERRÃO-FILHO, 2009)

2.1.3.2 Neurotoxinas

As neurotoxinas produzidas por cianobactérias podem ser divididas em três sub-grupos: anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxinas (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Estas toxinas já foram isoladas dos seguintes gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* (SOARES, 2009). Recentemente foi relatado o primeiro caso da presença de saxitoxina em *Microcystis*, até então este gênero era somente conhecido pela produção de microcistinas (SANT'ANNA et al., 2010).

2.1.3.2.1 Saxitoxina

Saxitoxinas (figura 3) constituem um grupo de alcalóides carbamatos não sulfatados altamente tóxicos. Essas toxinas agem em vertebrados por meio de diferentes mecanismos fisiológicos, entretanto, todas as variantes levam à morte por parada respiratória, sendo esta geralmente bastante rápida (MOLICA; AZEVEDO,

2009). As saxitoxinas inibem a condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio e cálcio, afetando a permeabilidade ao potássio (CARMICHAEL, 1994; WANG; SALATA; BENNETT, 2003).

Figura 3 - Estrutura química da saxitoxina (FERRÃO-FILHO, 2009)

2.1.3.2.2 Anatoxina

A anatoxina-a (figura 4A) é um alcalóide que age como bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos. A ligação irreversível desta molécula aos receptores de acetilcolina gera o efeito neurotóxico pelo fato da toxina não ser degradada pela acetilcolinesterase. Já a anatoxina-a(s) (figura 4B) é um organofosforado natural e tem um mecanismo de ação semelhante à anatoxina-a, uma vez que inibe a ação da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina ligada aos receptores (SOARES, 2009).

Figura 4 - A) Estrutura química da anatoxina-a; B) Estrutura química da anatoxina-a(s) (FERRÃO-FILHO, 2009)

2.1.4 Cianopeptídeos

2.1.4.1 Aeruginosina e cianopeptolina

Cianopeptídeos dos grupos da aeruginosina (figura 5) e cianopeptolina (figura 6) são produzidos por NRPSs e apresentam grande diversidade estrutural, com suas moléculas podendo receber halogenação adicional. A presença de cianopeptolinas e aeruginosinas já foi constatada em diversos táxons cianobacterianos, mas apesar de se saber que diversas variantes atuam como inibidoras de serina proteases, a função celular destas substâncias ainda não foi completamente esclarecida (CADEL-SIX et al., 2008).

A aeruginosina foi primeiramente isolada de *Microcystis aeruginosa* por Murakami e colaboradores (1994) e faz parte de uma das classes de peptídeos produzidos pelas cianobactérias, que formam uma família de peptídeos lineares caracterizados estruturalmente, em sua maioria, pela presença de quatro subunidades: um grupo amino ácido N-terminal (ácido hidroxifenil láctico - Hpla), um aminoácido hidrofóbico, um resíduo central 2-carboxiperhidroindol (Choi) e um grupo com uma guanidina C-terminal (ERSMARK; DEL VALLE; HANESSIAN, 2008; ISHIDA et al., 2009; NIE; WANG, 2008). Algumas modificações podem ocorrer na subunidade Hpla, tais como monocloração, dicloração e sulfatação e na subunidade Choi, tais como sulfatação, glicosilação e

cloração. Deste modo, cerca de 500 variantes de aeruginosina podem ser encontradas, apesar de apenas uma pequena parte ser conhecida (ISHIDA et al., 2009; WELKER; VON DÖHREN, 2006).

Este peptídeo possui um arranjo estrutural e características funcionais que o tornam responsável pela afinidade ao sítio catalítico de enzimas serina proteases envolvidas na cascata de coagulação sanguínea, como por exemplo, tripsina e trombina. A atividade biológica associada à família das aeruginosinas está sendo avaliada principalmente por estudos *in vitro*, na tentativa de demonstrar suas atividades inibitórias contra serina proteases (ERSMARK; DEL VALLE; HANESSIAN, 2008).

As cianopectolinas fazem parte de uma classe de peptídeos cíclicos, com uma estrutura química altamente variável, sintetizadas não ribossomicamente. Esses cianopectídeos apresentam atividade inibidora de protease, porém sua função biológica ainda é desconhecida (ROUNGE et al., 2009). Elas são peptídeos cíclicos que variam bastante, tanto entre gêneros de cianobactérias, como entre linhagens do mesmo gênero (WELKER; VON DÖHREN, 2006). A estrutura geral destes peptídeos é: uma peptidolactona ramificada, formada por sete aminoácidos, na qual seis aminoácidos C-terminal formam um anel (JAKOBI et al., 1996). Todas as cianopectolinas contêm o resíduo 3-amino-6-hidroxi-2-piperidona (Ahp) (MARTIN et al., 1993).

Cerca de 70 variantes estruturais de cianopectolinas já são conhecidas (WELKER et al., 2004) e em cianobactérias as cianopectolinas já foram isoladas de diversos gêneros, tais como: *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Nostoc*, *Lyngbya* e *Oscillatoria* (WELKER et al., 2006). Linhagens produtoras de microcistinas também podem produzir cianopectolinas, fato que demonstra que esses dois agrupamentos gênicos podem coexistir em um mesmo genoma e estarem envolvidos na síntese destes dois peptídeos (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

Já foi relatada a presença de cianopectolinas cloradas e não cloradas em linhagens axênicas de *Microcystis*, pela detecção por espectrometria de massas. No entanto, a função de oligopeptídeos clorados ou não clorados produzidos por cianobactérias ainda precisa ser melhor estudada (CADEL-SIX et al., 2008).

Figura 5 - Estrutura química da aeruginosina 98-A (MURAKAMI et al., 1994). Aeap, 3-aminoetil-1-N-amidino-D-3-pirrolina. Linhas em negrito na estrutura plana representam as partes conservadas da molécula que pode ser encontrado em todos ou na maioria das congêneros; linhas finas referem-se a partes variáveis. Na estrutura todos os aminoácidos e outros resíduos encontrados nas respectivas posições da molécula estão listados juntamente com as eventuais modificações (Cl, cloração; Br, bromação; Su, sulfatação; pent, glicosilação; M, α -aminometilação; m, O-metilação). A primeira linha representa a estrutura plana. A numeração dos aminoácidos e outros resíduos está geralmente de acordo com as etapas biossintéticas. Os aminoácidos estão em códigos de três letras, incluindo homovariantes de aminoácidos proteinogênicos. Estruturas adaptadas de WELKER; VON DÖHREN (2006)

Figura 6 - Estrutura química da cianopeptolina A (MARTIN et al., 1993). AA, ácido acético; AB, ácido butanóico; AH, ácido hexanóico; AO, ácido octanóico; AG, ácido glicérico; AF; ácido fórmico. Linhas em negrito na estrutura plana representam as partes conservadas da molécula que pode ser encontrado em todos ou na maioria das congêneros; linhas finas referem-se a partes variáveis. Na estrutura todos os aminoácidos e outros resíduos encontrados nas respectivas posições da molécula estão listados juntamente com as eventuais modificações (Cl, cloração; Br, bromação; Su, sulfatação; pent, glicosilação; M, α -aminometilação; m, O-metilação). A primeira linha representa a estrutura plana. A numeração dos aminoácidos e outros resíduos está geralmente de acordo com as etapas biossintéticas. Os aminoácidos estão em códigos de três letras, incluindo homovariantes de aminoácidos proteinogênicos. Estruturas adaptadas de WELKER; VON DÖHREN (2006)

2.1.5 Amostras ambientais

Do ponto de vista da ecologia, os microrganismos são partes importantes do ecossistema, pois têm papel crucial na transformação de energia e em processos biogeoquímicos. Considerando esse fato, são de grande importância os estudos que permitem o isolamento, a identificação e a quantificação desses organismos em vários habitats. Nos últimos anos, novas abordagens metodológicas, principalmente de biologia molecular, vem sendo muito úteis na geração de um quadro mais completo sobre ecologia microbiana em um dado habitat (MELO; AZEVEDO, 1998).

A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucléicos presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente porque tais técnicas permitem a análise de maneira independente do cultivo, fato que exclui grandes problemas e limitações que ocorrem devido à baixa culturabilidade de algumas comunidades (ANDREOTE, 2007).

Os métodos utilizados para contagem de microrganismos em cultura pura podem ser adaptados para amostras obtidas em populações naturais. Por exemplo, o procedimento de diluição, seguido de semeadura e contagem de colônias em placa tem sido usado para contar microrganismos coletados de amostras do solo e da água. No entanto, em alguns casos, o microrganismo de interesse em um ecossistema encontra-se em frequência muito baixa ou não é passível de ser cultivado em meio de cultura. Diante desse fato, vários estudos foram conduzidos no sentido de desenvolver metodologias que permitam detectar microrganismos em amostras obtidas de ambientes naturais, sem a necessidade de cultivá-los em laboratório (MELO; AZEVEDO, 1998).

A abordagem mais utilizada para o estudo de comunidades microbianas em amostras ambientais é a amplificação, clonagem e sequenciamento de genes presentes nos organismos da comunidade, os quais são utilizados para a sua identificação (JESUS, 2008).

2.1.6 Análises moleculares

As técnicas de biologia molecular têm revelado uma grande diversidade microbiana que não era detectada previamente com as técnicas dependentes de cultivo e identificação morfológica (HUGHES et al., 2001). Adicionalmente, essas novas ferramentas têm permitido o desenvolvimento de pesquisas com menor custo e tempo, e com maior capacidade de produção de dados (ARMOUGOM; RAOULT, 2009).

A análise da diversidade microbiana é importante para aumentar o conhecimento dos recursos genéticos em uma comunidade, entender padrões da distribuição relativa dos microrganismos, aumentar o conhecimento do papel funcional da diversidade, identificar diferenças na diversidade associada a distúrbios no manejo, entender a regulação da biodiversidade, e entender até que ponto o funcionamento e a sustentabilidade do ecossistema dependem da manutenção no nível específico da diversidade (OVREAS, 2000).

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “polimerase chain reaction”) permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. É uma técnica pela qual se obtém *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA, e por essa razão teve grande impacto na biologia molecular.

Comparando-se com outras técnicas de biologia molecular, uma das vantagens da PCR é que é possível utilizar métodos simplificados de extração de DNA, uma vez que essa técnica requer quantidades mínimas de DNA, e este não necessariamente precisa apresentar alto grau de pureza (MELO; AZEVEDO, 1998).

Menos de 1% dos microrganismos existentes são conhecidos por serem cultivados e as metodologias independentes de cultivo permitem alcançar os 99% que permanecem desconhecidos (DeLONG; PACE, 2001). Deste modo, as metodologias que se baseiam na extração e amplificação do DNA direto de amostras ambientais são ferramentas valiosas utilizadas para tentar ampliar os conhecimentos destes grupos (RIGONATO, 2010).

2.1.6.1 O gene RNAr 16S

O gene RNAr 16S se tornou a região alvo mais utilizada para estudos de filogenia, fornecendo uma visão geral da composição da comunidade. Esse gene é universalmente distribuído nos diferentes grupos de seres vivos, sendo que apresentam o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (LANE et al., 1985). Este gene consiste em um fragmento de aproximadamente 1.500 nucleotídeos e pode gerar grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (AMANN; LUDWING, 2000).

Uma das vantagens da utilização do gene RNAr 16S consiste na disponibilidade de um grande número de sequências em bancos de dados, como: GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Ribossomal Data Base Project (RDP), entre outros, todos de acesso gratuito, o que permite a comparação de novas sequências obtidas com as sequências depositadas nestes bancos (COUTINHO et al, 1999).

O sequenciamento desse gene possivelmente permite a identificação de microrganismos tanto em nível de gênero e em vários casos em nível de espécie, como também permite fazer correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000).

2.1.6.2 DGGE

O PCR-DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Esta técnica apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica das comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 1998). A técnica baseia-se na separação de “amplicons” de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de sequências em um gel com gradiente desnaturante (MUYZER; de WALL; UITTERLINDEN, 1993).

As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração no gel, fazendo com que fragmentos diferentes terminem sua migração em posições diferentes (MUYZER, 1999).

2.1.6.3 Construção de uma biblioteca genômica

As bibliotecas genômicas consistem em coleções de sequências de DNA, construídas considerando-se material genético de qualquer organismo, bem como de sequências obtidas de amostras ambientais (TINGRE; RUBIN, 2005).

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones de genes ribossomais é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas, que possibilita a comparação entre genótipos de microrganismos não cultiváveis, que representam 99% do total de espécies presentes em amostras ambientais (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

O processo de construção de bibliotecas genômicas consiste na extração do DNA/RNA dos organismos da comunidade; as sequências de interesse são amplificadas por PCR; os fragmentos amplificados são clonados em vetores, geralmente plasmídeos; estes são inseridos em células competentes de *Escherichia coli*, onde são multiplicados; o vetor é extraído das células e o fragmento clonado é sequenciado. O sequenciamento realizado nas diferentes cópias do gene obtidas por PCR e sua comparação com bases de dados fornecem informação sobre a diversidade filogenética dos organismos presentes no material estudado (JESUS, 2008).

Esta forma de análise combinada com técnicas mais rápidas e menos onerosas, como DGGE e T-RFLP fornecem informações consistentes da composição das comunidades microbianas nos ambientes (MENDES, 2009).

O uso de bibliotecas do gene RNAr 16S para mapear a diversidade de organismos não cultiváveis tem se tornado um avanço revolucionário para se interpretar as relações evolucionárias microbianas (CLEMENTINO et al., 2007). Este método fornece informações detalhadas de sequências representativas da comunidade, e sua utilidade como ferramenta na descoberta da diversidade e estabelecimento da filogenia é inquestionável, porém, é um método demorado e caro quando a tentativa é acumular

dados suficientes para comparações estatísticas entre múltiplas amostras (BROWN et al., 2005).

2.1.7 Análises químicas

Técnicas analíticas tais como Cromatografia Gasosa (GC, do inglês “gas chromatography”) e Cromatografia Líquida (LC ou HPLC, do inglês “high performance liquid chromatography”) associadas à diversos detectores, inclusive à espectrometria de massas, vem contribuindo constantemente para a análise de amostras ambientais, na determinação de compostos em baixas concentrações. No caso dos compostos mais voláteis, a preferência é por técnicas de GC, por outro lado, para compostos termolábeis, as técnicas envolvendo LC são consideradas mais adequadas (PÉREZ-RUIZ et al., 2005). A cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS, do inglês “liquid chromatography–mass spectrometry”) é considerada uma das ferramentas analíticas mais poderosas da atualidade para a detecção de compostos orgânicos, uma vez que permite que compostos pré-separados sejam identificados e quantificados com alto grau de seletividade e sensibilidade. Um dos motivos que resultou no bom desempenho dessa técnica foi a possibilidade de introdução da amostra líquida em pressão atmosférica no espectrômetro de massas (MORACCI, 2008).

Considerando-se configurações específicas, a técnica de LC-MS permite desde a determinação de moléculas com baixas massas moleculares (<1000 Da) como alguns fármacos, agrotóxicos e metabólitos até compostos biopolímeros com massas moleculares mais elevadas (>100.000 Da) (ARDREY, 2003). Em função da capacidade de separação e de discriminação e monitoração de múltiplas massas, esta técnica permite que a preparação das amostras seja rápida; e a quantidade de reagentes na preparação seja reduzida, fato que minimiza a geração de resíduos (MORACCI, 2008).

Os compostos eletricamente carregados, ou íons, são selecionados e medidos de acordo com a razão massa/carga (m/z). Um espectrômetro de massas é constituído de unidades fundamentais como: uma fonte de ionização, na qual são gerados os íons na fase gasosa, um analisador e um detector (MORACCI, 2008).

A etapa de ionização é aquela em que os compostos são ionizados (positivamente ou negativamente). Em razão da grande variedade de amostras, diferentes estratégias de ionização são necessárias para que se consiga gerar as espécies com carga adequada para a discriminação. Como exemplos de fontes de ionização empregados na espectrometria de massas, podemos citar a ionização química, a ionização por impacto de elétrons, a ionização por spray aquecido, a ionização por átomos rápidos, ionização química à pressão atmosférica, fotoionização à pressão atmosférica, a ionização por dessorção a laser assistida pela matriz e a ionização por electrospray (MARTINS JÚNIOR, 2005).

Os analisadores são dispositivos responsáveis pela separação dos íons conforme sua razão m/z . No equipamento utilizado, como na maioria dos equipamentos recentes, os analisadores são do tipo quadrupolo formados por quatro hastes condutoras paralelas e equidistantes sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua e radio frequência, que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo. Conforme o campo elétrico gerado, consegue-se que somente íons com a razão m/z específica atinjam o detector, enquanto os não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (BUSTILLOS; SASSINE; MARCH, 2003). A operação de um sistema triploquadrupolo permite que os íons formados e seus fragmentos possam ser conduzidos em modos adequados para a monitoração durante a análise (MORACCI, 2008).

O sistema de detecção, formado por uma célula multiplicadora de elétrons, é sensível aos íons provenientes do analisador de massas. O detector irá multiplicar os elétrons, transformando a corrente de elétrons em corrente elétrica. A magnitude do sinal elétrico é convertida em um espectro de massas onde aparecem os picos para cada íon selecionado, m/z . Esse mesmo sinal também é utilizado para a quantificação desses íons (MORACCI, 2008).

2.1.8 Estudos ecotoxicológicos

A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos. Os instrumentos de análise utilizados nesta ciência são capazes de responder preditivamente a toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos, a partir da obtenção de curvas concentração-efeito e concentração-resposta, bem como na detecção de ecotoxicidade de ambientes impactados. Inserir os ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos surgiram principalmente a partir da década de 60, período considerado um marco na preocupação do homem por toda a poluição gerada devido aos seus processos tecnológicos e industriais. E neste contexto, a ecotoxicologia surgiu para suprir as necessidades de respostas quanto aos efeitos da poluição ambiental sobre os seres vivos em geral (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). A avaliação ecotoxicológica aguda de corpos d'água, com organismos aquáticos, é uma abordagem exploratória que evidencia um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos domésticos e industriais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A associação do monitoramento químico com o monitoramento biológico permite uma melhor avaliação das causas dos efeitos nos organismos, através da identificação de substâncias que podem estar influenciando na toxicidade das amostras (CAIRNS, 2002). Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas (RAND; PETROCELLI, 1985). Estes testes possuem o objetivo de determinar a concentração letal média (CL_{50}) ou a concentração efetiva média (CE_{50}), ou seja, a concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou efeitos sub-letais a 50% dos organismos-teste depois de determinado tempo de exposição (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Quando é utilizado um teste de toxicidade, seja para avaliação de substâncias puras ou amostras ambientais, se apenas uma espécie for utilizada, apenas uma resposta será obtida, e então a toxicidade estimada irá refletir apenas a sensibilidade deste teste. Sendo assim, pode-se correr o risco de se subestimar a toxicidade da amostra testada. Portanto, nenhum bioensaio é capaz de responder à vasta quantidade de agentes tóxicos existentes (CASTILLO; VILA; NIELD, 2000).

2.1.8.1 *Hydra attenuata*

H. attenuata (figura 7) é um celenterado de água doce, pertencente ao filo Cnidária e a classe Hydrozoa. Este organismo pode ser encontrado em todos os corpos d'água continentais, com exceção da Antártida e em profundidades com ausência de oxigênio. Os indivíduos desta classe possuem locomoção por contração ou curvação da haste corporal e dos tentáculos, reprodução por brotamento e alimentação à base de microcrustáceos (MASSARO, 2006). São organismos atrativos para estudos ecotoxicológicos devido ao fato de apresentarem mudanças morfológicas em condições de progressiva intoxicação, fácil cultivo e manutenção em laboratório, além disso, os testes são de simples realização e baixo custo (TROTIER et al., 1997). Estudos utilizando este organismo para avaliação da toxicidade de cianotoxinas vêm ocorrendo e um exemplo é o estudo de Massaro (2011), no qual foram realizados testes de toxicidade aguda para avaliação da sensibilidade das espécies *H. viridissima* e *H. salmacidis* a cianotoxinas produzidas pela linhagem tóxica *M. aeruginosa* NPLJ-4.

Figura 7 - Organismo utilizado nos testes de toxicidade - *H. attenuata*

Fonte: Environment Canada

2.2 Objetivos

- Analisar a diversidade de cianobactérias presentes em quatro diferentes lagoas do Estado de São Paulo através de metodologias moleculares independentes de cultivo.
- Detectar a presença de cianopeptídeos nas amostras das lagoas através da espectrometria de massas e da amplificação por PCR dos genes codificadores de toxinas.
- Analisar a toxicidade das amostras através de ensaios ecotoxicológicos com organismos bioindicadores.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Coleta das amostras ambientais

As amostras de água foram coletadas em quatro diferentes lagoas, todas localizadas no Estado de São Paulo (figura 8), no mês de setembro de 2010.

Figura 8 - Locais onde foram realizadas as coletas de cianobactérias no Estado de São Paulo (Limeira, Piracicaba e Campinas)

Ponto 1: Lagoa localizada dentro da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, Avenida Pádua Dias, 11 – Vila Independência, Piracicaba/SP (22°42’34.49”S/47°37’57.80”O), com aproximadamente 60 metros de diâmetro (figura 10), identificada neste trabalho como ESALQ1.

Ponto 2: Lagoa localizada dentro da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP, Avenida Pádua Dias, 11 – Vila Independência, Piracicaba/SP (22°42’32.78”S/47°37’50.22”O), com aproximadamente 160 metros de diâmetro (figura 10), identificada neste trabalho como ESALQ2.

O parque da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (figura 9), Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba, foi idealizado pelo arquiteto-paisagista belga, Arsenio Puttemans, sendo a implantação do projeto original iniciada ao redor de 1905, com o auxílio de Luiz Teixeira Mendes, professor de Fruticultura e Silvicultura da Escola na época, e a inauguração ocorreu em meados de 1907. Entre os anos de 1922 e 1959, iniciou-se uma fase de expansão e manutenção do projeto original, sob responsabilidade do Prof. Philippe Westin Cabral de Vasconcellos, que idealizou os canteiros ao redor dos pavilhões de Química (1930), Horticultura (1946) e Engenharia (1947 - 1948), orientando a introdução de espécies tanto nativas quanto exóticas. Em 1935 ocorreram algumas modificações, como a construção de dois lagos, na parte esquerda do parque, projetados pelo Prof. Philippe Westin Cabral de Vasconcellos, responsável pelo parque na época. No local da implantação havia anteriormente um galpão destinado à ginástica e depois, ocupado pelo laboratório de Química. Estes dois lagos, além do lago em frente ao pavilhão de Engenharia construído em 1948 e o em frente ao prédio da Horticultura construído em 1946, foram idealizados para servirem de reservatórios de água, na prevenção de incêndios e irrigação de diversas culturas (LIMA, 1987).

Figura 9 - Planta baixa ilustrando a área total do Parque (LIMA, 1987). Em vermelho as Lagoas ESALQ1 e ESALQ2

Figura 10 - Lagoa ESALQ1 e lagoa ESALQ2

Ponto 3: Lagoa localizada no interior do Parque Portugal localizado no Bairro Taquaral da cidade de Campinas/SP ($22^{\circ}52'25.25''\text{S}/47^{\circ}3'0.51''\text{O}$), com aproximadamente 2.370 metros de diâmetro e 3 metros de profundidade média (figura 11). O Parque Portugal localiza-se numa região baixa da cidade e é circundado por estabelecimentos residenciais, comerciais e industriais. É o mais movimentado espaço público de lazer da cidade de Campinas, sendo que no verão recebe milhares de visitantes semanalmente. Possui atrações como bonde elétrico, pedalinhas e a réplica em tamanho real da Caravela Anunciação, além de pistas para caminhar e pedalar.

A Lagoa recebe toda a água de escoamento na época de precipitação, além de esgotos domésticos clandestinos, o que com o decorrer dos anos, provocou um acentuado processo de eutrofização em suas águas, que causa uma queda no número de peixes e pássaros nativos. Atualmente, a população campineira vem sofrendo com o odor desagradável de esgoto e outros poluentes lançados na lagoa. O abandono, a falta de manutenção, a poluição e as erosões, além de estarem afastando os frequentadores, também estão afetando diretamente o microclima da região e o seu ecossistema. O assoreamento, provocado pela erosão no entorno e pelo material, inclusive areia, carregado por águas pluviais, tem-se acumulado no fundo da Lagoa e diminuído de forma assustadora a sua profundidade.

Em agosto de 2010 a SANASA (Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento) começou a realizar obras para evitar o odor das tubulações de esgoto. Próximo ao portão da lagoa foi instalada uma estação elevatória, que direciona os esgotos coletados na região do Alto Taquaral e Santa Genebra para a Estação de Tratamento de Esgoto Anhumas.

Figura 11 - Lagoa do Taquaral

Ponto 4: Lagoa localizada em uma região de plantação de cana-de-açúcar próxima a Rodovia SP-330 da cidade de Limeira/SP ($22^{\circ}30'56.06''\text{S}/47^{\circ}23'55.94''\text{O}$), com aproximadamente 760 metros de diâmetro (figura 12).

Outro fator importante que tem afetado a qualidade da água na Lagoa do Parque Portugal é a indústria canaveira que gera sérios riscos ambientais. A começar pelo plantio de cana-de-açúcar, caracterizado como monocultura, a qual ocupa vastas áreas e provoca desequilíbrios na flora e na fauna da região onde é plantada. Deste modo, inicia-se o processo de desmatamento com a eliminação de animais e plantas nativos. Em seguida, prepara-se a terra com material químico de natureza diversa procurando adequar o solo às necessidades da cana e causando a poluição do solo. Na época de colheita, as queimadas poluem o ar e enfraquecem o solo ao destruir, pelo fogo, nutrientes e microrganismos. Na fase industrial, os subprodutos dessa atividade, como a vinhaça, são atirados em rios e córregos, matando peixes e deixando a água contaminada com resíduos químicos típicos do preparo do açúcar e do álcool (SILVA; SILVA; SOUSA, 2008). A vinhaça é gerada à razão de 12 litros por cada litro de álcool e apresenta temperatura elevada, pH ácido, corrosividade, alto teor de potássio, além de quantidades significativas de nitrogênio, fósforo, sulfatos, cloretos, entre outros. Seu despejo em rios e lagos provoca o fenômeno de eutrofização.

Figura 12 - Lagoa de Limeira

Todas as amostras de água foram coletadas em uma profundidade de 0-20 cm e as amostras acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 4 L com punho, sendo posteriormente armazenadas em câmara fria a 4 °C. Em seguida, 1 L de cada amostra foi concentrado em centrífuga a 13.000 x *g* por 15 minutos a temperatura de 4 °C. O precipitado obtido foi armazenado a -20 °C para posteriores análises em LC-MS e ensaios ecotoxicológicos. Uma pequena fração do precipitado foi separada para a extração de DNA e subseqüentes análises moleculares.

2.3.2 Extração do DNA genômico das amostras ambientais

O DNA total das amostras de água foi extraído utilizando-se kit MO BIO Powersoil DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Os precipitados foram transferidos para tubos “PowerBead” (2 mL), onde foi adicionado um volume de 60 µL da solução C1, necessária para a lise celular e colocados horizontalmente em um agitador Vortex-Genie® (MoBio Laboratories Inc.) em velocidade máxima por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x *g* durante 30 segundos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes obtidos (cerca de 450 µL) foram transferidos para tubos novos e 250 µL da solução C2, necessária para a precipitação dos componentes orgânicos foram adicionados. Os tubos foram então agitados e incubados por 5 minutos a 4 °C, sendo posteriormente centrifugados a 10.000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente. Cerca de 600 µL dos sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e acrescidos 200 µL da solução C3, necessária também para a precipitação dos componentes orgânicos, sendo novamente incubados a 4 °C por 5 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente. Aproximadamente 750 µL dos sobrenadantes obtidos foram transferidos para tubos novos e misturados a 1,2 mL da solução C4, necessária para ligar o DNA a uma coluna de purificação. Todo o volume foi eluído nesta coluna por centrifugação a 10.000 x *g* por 1 minuto a temperatura ambiente. Depois disso, o DNA aderido à coluna foi lavado com 500 µL da solução C5, e centrifugados a 10.000 x *g* por 30 segundos a temperatura ambiente. As colunas foram colocadas em novos tubos e 100 µL da solução C6, necessária para eluir

o DNA foram adicionados. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 x *g* durante 30 segundos. Para checar a qualidade do DNA e quantificá-lo, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR[®] Green I (1:1000) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e utilizou-se como padrão de tamanho e massa molecular o marcador “Low Mass DNA Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida o gel foi visualizado e documentado em luz UV em fotodocumentador (Kodak Gel Logic 212 Imaging System, Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA).

2.3.3 Amplificação por PCR do gene RNAr 16S

A amplificação do gene RNAr 16S foi realizada em um termociclador “Techne[®] TC-412” (Techne, Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra), utilizando os iniciadores 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3') (NEILAN *et al.*, 1997). A reação de PCR foi realizada utilizando 2,5 µL tampão para Taq Polimerase 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 0,5 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas Life Sciences, Lituânia, EU), cada iniciador numa concentração final de 0,25 µM, 200 µM de cada dNTP numa concentração de 10 mM, MgCl₂ a 3 mM, 10 ng de DNA genômico e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado para a amplificação foi de: 3 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, 30 ciclos de 94 °C por 10 segundos de desnaturação, 50 °C por 20 segundos de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C. Para checar a amplificação do fragmento gerado foi realizada uma eletroforese em gel de agarose que em seguida foi visualizado e documentado em luz UV em fotodocumentador como descrito no item 2.3.2.

2.3.4 Análise da biodiversidade de cianobactérias por DGGE

Os produtos resultantes da amplificação do gene RNAr 16S foram utilizados como molde para NESTED-PCR que consiste na utilização do iniciador CYA359F (5'-GGGGAATTTTCCGCAATGGG-3') acrescido de um grampo de GC com 40 bases (5'-

CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') e dos iniciadores CYA781aR (5'-GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT-3') e CYA781bR (5'-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3') (NÜBEL et al., 1997). A reação de PCR foi realizada utilizando tampão para Taq polimerase 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 1,0 U de Taq DNA Polymerase, cada iniciador numa concentração final de 0,25 µM, 200 µM de cada dNTP numa concentração de 10 mM, MgCl₂ a 3 mM, 50 a 100 ng de produto da amplificação do gene RNAr 16S, 0,5 µL de formamida e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado para a amplificação foi de: 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto de desnaturação, 63 °C por 1 minuto de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C. A quantificação foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item 2.3.2.

Os produtos obtidos através dessa reação de amplificação foram separados por DGGE. Para a realização desta metodologia foi utilizado o equipamento Ingeny phor U2 (Ingeny, International BV, Goes, Holanda) e a eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 6% (37,5:1 acrilamida:bisacrilamida) em solução tampão 0,5 X (Tris Base 0,04 M, acetato de sódio 0,02 M e 10 mM EDTA pH 7,4). O gel foi preparado com um gradiente desnaturante variando de 30 a 60%, utilizando-se duas soluções de poliacrilamida: uma 100% desnaturante contendo uréia 7 M e formamida 40% (v/v) e outra sem uréia e sem formamida (0%). Foi aplicado o volume total da reação (~ 20 µL) acrescido de 3 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30% preparado em tampão 1X TE) por canaleta. A eletroforese ocorreu a 60 °C a 100 V por um período de 15 horas. Decorrido este período o gel foi corado com nitrato de prata e registrado com câmera digital (SONY Cyber-shot 10.1 Mega Pixels).

2.3.5 Análise da biodiversidade de cianobactérias por meio da construção de bibliotecas genômicas

A construção das bibliotecas genômicas foi realizada a partir da amplificação do gene RNAr 16S como descrito no item 2.3.4, porém o iniciador CYA359 não foi acrescido de grampo GC.

2.3.5.1 Clonagem

Para a clonagem dos fragmentos gerados pela PCR do gene RNAr 16S, utilizou-se o kit pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, em uma reação de ligação contendo: 20 ng do inserto, 5 µL do tampão da ligase (2 X Rapid Ligation Buffer), 1 µL de plasmídeos (pGEM[®]-T Easy Vector 50 ng), 1 µL de enzima T4 DNA Ligase e água ultrapura esterilizada para um volume final de 10 µL. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* DH5α (One shot TOP Electrocomp *E. coli*, Invitrogen).

2.3.5.2 Transformação em células de *E. coli* competentes

As células competentes de *E. coli* armazenadas a -80 °C foram descongeladas e adicionadas aos 10 µL de ligação. O vetor contendo o inserto foi transformado em células competentes de *E. coli* DH5α por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Foi adicionado cerca de 250 µL de meio LB líquido (25 g L⁻¹) às células e estas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e 30 minutos, sob agitação de 250 rpm. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 6.000 × *g* por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB contendo 40 µL de ampicilina e 20 µL de X-gal, sendo os dois últimos numa concentração de 100 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 12 horas. As colônias transformantes foram visualizadas e selecionadas de acordo com a coloração branca ou azul, sendo que colônias brancas geralmente significam transformação. A seleção destas ocorreu aleatoriamente e as mesmas foram cultivadas em placas de cultura com 96 cavidades de 2 mL cada, contendo em cada cavidade 1 mL de meio LB líquido e ampicilina (10 µg mL⁻¹). As placas de cultura foram então incubadas a 37 °C por aproximadamente 15 horas sob agitação constante de 250 rpm.

2.3.5.3 PCR de colônias

A confirmação da presença do inserto nestas bactérias foi realizada através de uma reação de PCR de colônia, utilizando os iniciadores para o vetor M13F e M13R. O tamanho dos fragmentos amplificados foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item 2.3.2.

2.3.5.4 Extração do DNA plasmidial

As placas de cultura foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 6 minutos a temperatura de 20 °C, posteriormente o meio de cultura foi descartado e observada a presença de precipitado, em seguida foram adicionados 240 µL de solução I (2,3 mL de glicose 50 mM; 1,3 mL de Tris-HCl 25 mM pH 7,4; 1,0 mL de EDTA 10 mM pH 8,0 e água ultrapura esterilizada para um volume final de 50 mL) em cada cavidade e as placas foram vedadas com adesivo para placas e vortexadas por 2 minutos para a ressuspensão das células. As placas foram novamente centrifugadas a $4.000 \times g$ por 6 minutos a temperatura de 20 °C e o sobrenadante descartado. Em cada cavidade da placa foram adicionados 80 µL de solução I que foram novamente vedadas com adesivo e vortexadas por 2 minutos. Depois disso, 60 µL de cada suspensão de células foram transferidas para placas de polipropileno com 96 cavidades de fundo U contendo 1,0 µL de RNase (20 mg mL^{-1}) em cada cavidade, e posteriormente foram adicionados 60 µL de solução II (1 mL de NaOH 4 M, 2 mL de SDS 10% e água ultrapura esterilizada para um volume final de 20 mL). As placas foram vedadas com adesivo e o volume foi misturado por inversão, sendo incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois as placas foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 1 minuto a temperatura de 20 °C e 60 µL de solução III gelada (15 mL de KOAc 5 M, 2,87 mL de ácido acético glacial e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 mL) foram adicionados. As placas foram então vedadas com adesivo e o volume misturado por inversão, sendo novamente incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois disso, os adesivos foram removidos e as placas foram incubadas em estufa a 90 °C por 30 minutos. Decorrido este período as placas foram acondicionadas em gelo por 10

minutos e posteriormente centrifugadas a $4.000 \times g$ por 10 minutos a temperatura de 20 °C. O volume foi transferido para uma placa com filtro (Millipore PVDF 0,02 μm) acoplada a uma placa de polipropileno com 96 cavidades de fundo V e centrifugadas a $4.000 \times g$ por 4 minutos a 20 °C. Depois disso a placa com filtro foi removida e descartada e 90 μL de isopropanol foram adicionados ao DNA filtrado. As placas foram vedadas com adesivo e centrifugadas a $4.000 \times g$ por 45 minutos a temperatura de 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% gelado. As placas foram então centrifugadas a $4.000 \times g$ por 5 minutos a temperatura de 20 °C. O sobrenadante foi descartado e as placas foram invertidas sobre papel absorvente e centrifugadas a $900 \times g$ por 1 minuto a temperatura de 20 °C. O DNA foi seco por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, 40 μL de água ultrapura esterilizada foram utilizados para ressuspender o DNA, após o qual as placas foram armazenadas a -20 °C. A eficiência da extração visualizada e a quantificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% como descrito no item 2.3.2.

2.3.5.5 Sequenciamento das bibliotecas genômicas

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se de 30 a 100 ng de plasmídeo, dependendo da quantificação previamente realizada. Foi adicionada a cada reação: 10 pmol do iniciador do vetor T7, 1 μL de DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), 2 μL de tampão (Tris HCl 200 mM pH 9,0 e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mM) e água ultrapura esterilizada para um volume final de 10 μL . O ciclo utilizado para a amplificação foi de: 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos de desnaturação, 50 °C por 15 segundos de anelamento e 60 °C por 1 minuto de extensão. Para a precipitação do produto foram adicionados 2 μL de solução acetato de sódio 3M pH 9,0 EDTA 0,5 M pH 8,0 - (1:1). Em seguida essa mistura foi vortexada e 60 μL de etanol 100% foram adicionados. A mistura foi novamente vortexada e centrifugada a $4.000 \times g$ por 45 minutos, a temperatura ambiente. Depois disso, todo o conteúdo das placas foi descartado e 200 μL de etanol 70% foram adicionados. Uma nova centrifugação ocorreu a $4.000 \times g$ por 10 minutos, a temperatura ambiente e novamente o conteúdo das placas foi descartado.

Posteriormente, as placas foram centrifugadas invertidas sobre papel absorvente a $900 \times g$ por 30 segundos a temperatura ambiente, então foram secas a 40°C por 10 minutos em termociclador. Após a secagem as amostras foram ressuspensas em 10 μL de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e aplicadas no Sequenciador ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.3.5.5.1 Análises das sequências e geração de UTOs

As sequências de nucleotídeos obtidas foram trimadas no programa Geneious Pro 4.7.5 (Biomatters Ltd., New Zealand) para remoção daquelas que continham bases de baixa qualidade (<20) e também fragmentos do vetor, e alinhadas no programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007). Os arquivos gerados foram convertidos para o formato “.dist” utilizando-se o programa DNADIST, o qual fornece uma matriz de similaridade. O parâmetro de distância evolutiva foi avaliado utilizando-se o modelo de Jukes-Cantor (1969), no qual se assume, entre outras hipóteses, que cada substituição de nucleotídeos do DNA possui a mesma probabilidade de ocorrência e que os sítios do DNA são independentes. O programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), que recebe a matriz gerada, a qual contém as sequências de DNA das amostras ambientais, foi utilizado para agrupar as sequências válidas com no mínimo 97% de similaridade em UTOs (unidades taxonômicas operacionais). Através do programa J-Libshuff (SCHLOSS; LARGET; HANDELSMAN, 2004), o qual realiza uma análise par a par entre as bibliotecas, foi possível avaliar se uma população é estatisticamente igual ou diferente da outra. A análise dos dados gera um valor p , onde $p < 0,05$ significa que as bibliotecas diferem estatisticamente umas das outras.

2.3.5.5.2 Curvas de rarefação, índice de riqueza e índice de diversidade

As curvas de rarefação para cada biblioteca foram geradas pela análise das UTOs geradas pelo programa DOTUR. Os números de UTOs e de sequências de cada UTO foram computados para o cálculo dos índices de diversidade (Shannon), que

consiste em um estimador de máxima verossimilhança e para a estimativa de riqueza de espécies pelo método não-paramétrico Chao 1 (CHAO, 1984).

2.3.5.5.3 Análise filogenética

As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados público GenBank, do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando-se a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST). Para a análise filogenética, um clone representante de cada UTO foi selecionado e suas sequências foram alinhadas juntamente com as retiradas do Gen Bank, utilizando-se o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O ajuste das extremidades foi realizado para que todas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas. A árvore filogenética foi construída pelo o programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) utilizando-se o método de distância “Neighbor Joining” ou agrupamento de vizinhos (SAITOU; NEI, 1987) e a matriz de distância Kimura-2 parameter utilizando uma reamostragem de 1000 vezes (FELSENSTEIN, 1985).

2.3.6 Amplificação por PCR de genes codificadores de toxinas

Seis genes que codificam para cianotoxinas foram investigados através da utilização da técnica de PCR. As toxinas avaliadas foram: aeruginosina, anatoxina, cianopeptolina, cilindrospermopsina, microcistina e saxitoxina.

Todas as reações foram realizadas em solução contendo tampão para Taq polimerase 1 X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), 1,0 U Taq DNA Polymerase, cada iniciador numa concentração final de 0,25 µM, 200 µM de cada dNTP numa concentração de 10 mM, MgCl₂ a 3 mM, 10 ng de DNA e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. Porém, os oligonucleotídeos e os ciclos utilizados para a amplificação foram diferentes para cada toxina.

Aeruginosina: O fragmento-alvo foi a região intergênica de aproximadamente 991 pb e os oligonucleotídeos utilizados foram aerA_F (5'-GATAGCACCCAGAACGGAAGC-3') e aerB_R (5'-CGTTAAACGGATGGTTAGAGC-3')

(CADEL-SIX *et al.*, 2008). O ciclo de amplificação utilizado foi de: 2 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos de desnaturação, 50 °C por 45 segundos de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C.

Anatoxina: O fragmento-alvo foi o gene *anaC* (~421 pb) e os oligonucleotídeos utilizados foram ALM_F (5'-CTGGGGGCACAATTATTTACTCTCACCTG-3') e ALM_R (5'-ACGCAAAGCTCACCCACCTCACCTCTAACT-3') (MÉJEAN *et al.*, 2009). O ciclo de amplificação utilizado foi de: 4 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos de desnaturação, 45 °C por 20 segundos de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C.

Cianopeptolina: O fragmento-alvo foi a região intergênica de aproximadamente 585 pb e os oligonucleotídeos utilizados foram mcnC_F (5'-TAAGGATAATTTCTTTGAATTGGGAG-3') e mcnE_R (5'-AATAATCTCTAAATCAACAGC-3') (CADEL-SIX *et al.*, 2008). O ciclo de amplificação utilizado foi de: 2 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos de desnaturação, 50 °C por 45 segundos de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C.

Cilindrospermopsina: Os fragmentos-alvo foram os genes *amt* (~1105 pb) e *cyrJ* (~780 pb) e os oligonucleotídeos utilizados foram respectivamente, CYLATF (5'-ATTGTAAATAGCTGGAATGAGTGG-3') e CYLATR (5'-TTAGGGAAGTAATCTTCACAG-3') (KELLMANN; MILLS; NEILAN, 2006) e cynsulfF (5'-CTTCTCTCCTTTCCCTAT-3') e cylnamR (5'-GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG-3') (MIHALI *et al.*, 2008). O ciclo de amplificação utilizado foi de: 3 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 10 segundos de desnaturação, 50 °C por 20 segundos de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C.

Microcistina: O fragmento-alvo foi o gene *mcyE* (~810 pb) e os oligonucleotídeos utilizados foram mcyE_F2 (5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3') e mcyE_R4 (5'-AATTCTAAAGCCCAAAGACG-3') (RANTALA *et al.*, 2004). O ciclo de amplificação utilizado foi de: 3 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, 30 ciclos de 94

°C por 30 segundos de desnaturação, 56 °C por 30 segundos de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 10 minutos de extensão final a 72 °C.

Saxitoxina: O fragmento-alvo foi o gene *sxtI* (~923 pb) e os oligonucleotídeos utilizados foram OCT-F (5'-TGCCGTTTTGTGCTTAGATG-3') e OCT-R (5'-GGACGGAAGGACTCACGATA-3') (CRESPIM; FIORE, não publicado). O ciclo de amplificação utilizado foi de: 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos de desnaturação, 61 °C por 1 minuto de anelamento, 72 °C por 1 minuto de extensão e 7 minutos de extensão final a 72 °C.

Para checar a presença de bandas correspondentes ao tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Green I (1:1000) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e utilizando-se como padrão de tamanho e massa molecular o marcador “100 pb DNA Ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida o gel foi visualizado e documentado em luz UV em fotodocumentador (Kodak Gel Logic 212 Imaging System, Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA).

2.3.7 Análises químicas

2.3.7.1 Extração de cianotoxinas

As amostras foram centrifugadas a $9.000 \times g$ por 5 minutos a 22 °C. As células foram extraídas em 5 mL de metanol, com adição de pérolas de vidro (ϕ 3 mm) e agitadas em vórtex por 1 minuto. Posteriormente as amostras foram concentradas a $9.000 \times g$ por 5 minutos e os sobrenadantes foram armazenados em freezer a -20 °C para análises posteriores.

2.3.7.2 Purificação de cianopeptídeos

Os extratos obtidos foram secos em estufa a 55° C. Posteriormente foram ressuspendidos em 2 mL de água MilliQ. O extrato foi submetido à fracionamento em metanol (20 a 100%) em coluna pré empacotada de sílica derivatizada com grupos

octadecilsilino C_{18} (figura 13). As frações de metanol 40-60% e 70% foram evaporadas e os extratos analisados por espectrometria de massas.

Figura 13 - Processo de extração de cianopeptídeos. A) Amostra ambiental; B) Rompimento celular com metanol; C) Extrato metanólico; D) Coluna C_{18} para purificação de cianopeptídeos; E) Extratos das frações coletadas da coluna C_{18} (20, 60, 70 e 100% metanol)

2.3.7.3 Espectrometria de massas

As frações obtidas em coluna C_{18} foram submetidas à análise em LC-MS (Agilent 6410 MS controlado pelo programa Agilent MassHunter) pertencente ao Laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP, utilizando inserção direta em modo MRM permitindo a identificação dos cianopeptídeos. A voltagem do cone foi de 50 V e detector em modo positivo. A varredura dos íons foi de 100 a 1.700 Da. A energia de colisão utilizada foi de 60 eV. As frações contendo os metabólitos foram diluídas em uma mistura de metanol:água:ácido fórmico (50:50:0,1%). Os espectros obtidos foram comparados com os existentes na biblioteca virtual de espectros do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP, visando identificar os cianopeptídeos presentes nas amostras e comparar com os compostos de estruturas já conhecidas (como por exemplo, algumas cianotoxinas ou outro tipo de substância conhecida).

2.3.8 Ensaaios com cnidários

Os testes de toxicidade foram realizados individualmente com os extratos das amostras ambientais, extraídas em 5 mL de metanol. Para o rompimento das células foram adicionadas pérolas de vidro de 3 mm ϕ . Essa suspensão foi agitada em vórtex por 1 minuto (potência máxima) e centrifugada a $9.000 \times g$ por 2 minutos para a obtenção do sobrenadante. Este foi evaporado e mantido em geladeira.

O método utilizado para o teste com *Hydra attenuata* foi o de Trottier et al. (1997). Em placas de poliestireno com 12 cavidades de capacidade para 4 mL cada foram adicionados 4 mL de meio de manutenção para *H. attenuata* (CaCl_2 , N-tris metil 1-2 aminoetanossulfônico – Tampão TES) (MESSIAS, 2008) e extrato seco da extração das amostras de água das lagoas ressuspendido com o mesmo meio de manutenção, diluído nas concentrações 100, 75, 50 e 25%. Três organismos saudáveis e sem broto foram adicionados nas placas (3 repetições $\times$ 4 concentrações). No controle negativo foi utilizado somente o meio de manutenção. A duração do teste foi de 96 horas, com observações realizadas com o auxílio de uma lupa (Leica, modelo zoom 2000), a cada 24 horas de exposição. Os efeitos avaliados foram mortalidade e efeitos sub-letais (danos morfológicos), como por exemplo: formação de bulbos nas extremidades dos tentáculos, encurtamento dos tentáculos, perda dos tentáculos e morte. As análises estatísticas foram realizadas com o programa JSPEAR, conforme procedimento do Laboratório de Ecotoxicologia, CENA-USP, para a determinação da CE_{50} . O cálculo dos valores de CE_{50} foram calculados baseando-se no aparecimento de quaisquer danos morfológicos citados acima.

2.4 Resultados e Discussão

Três lagoas (Limeira, ESALQ1 e ESALQ2) ainda não haviam sido avaliadas quanto à ocorrência de florações de cianobactérias e apenas a Lagoa do Taquaral já havia sido avaliada nos estudos de Matsumura-Tundisi, Hino e Rocha, 1986 e Borges, 1998. Porém, nestes estudos não foram utilizadas técnicas moleculares, análises químicas ou testes ecotoxicológicos, como no presente estudo.

2.4.1 Extração de DNA de cianobactérias das amostras ambientais de água e amplificação do gene RNAr 16S

As extrações do DNA de cianobactérias presentes nas quatro lagoas foram realizadas com sucesso através da utilização do kit MO BIO Powersoil DNA Isolation. A boa qualidade dos DNAs extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR do gene RNAr 16S com aproximadamente 1.500 pb, utilizando-se o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F1 e 1494Rc (NEILAN et al., 1997).

2.4.2 Análise da biodiversidade de cianobactérias por meio de DGGE

A partir dos produtos gerados da reação de RNAr 16S, novas amplificações foram realizadas utilizando os iniciadores CYA359F e CYA781abR. Os produtos resultantes das reações de PCR obtidos com ambos os conjuntos de iniciadores citados acima mostraram bandas no gel de agarose com tamanhos esperados (fragmentos de aproximadamente 450 pb).

A variabilidade dos amplicons resultantes foi avaliada através da realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). O padrão de bandas entre as diferentes amostras ambientais de água pareceu não apresentar grandes variações entre si e mostrou a predominância de poucas UTOs em todas as amostras, o que sugere que nessas localizações algumas espécies são predominantes sobre as outras (figura 14). A lagoa de Limeira, a Lagoa do Taquaral e a lagoa ESALQ2 apresentaram quase o mesmo padrão de bandas. Apenas a lagoa ESALQ1 pareceu diferir um pouco mais. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que em florações de cianobactérias a diversidade de espécies é baixa, sendo que sempre ocorre a predominância de uma ou poucas espécies (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). No estudo de Lorzenzi (2004), onde foram estudadas cianobactérias presentes nas represas Billings e Guarapiranga, ambas localizadas no estado de São Paulo, o padrão de bandas do DGGE entre as diferentes amostras também pareceu não apresentar grandes variações entre si.

Figura 14 - Perfil de bandas de DGGE para as amostras ambientais. T – Lagoa do Taquaral, L – lagoa de Limeira, E1 – lagoa ESALQ1, E2 – lagoa ESALQ2 e M – marcador

A técnica de DGGE consiste na separação dos fragmentos de DNA em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes (uréia e formamida). As moléculas de DNA com o mesmo tamanho, mas com sequências diferentes de nucleotídeos, apresentam comportamento eletroforético distinto quando expostas ao gradiente dos agentes desnaturantes (MUYZER et al., 1999). Portanto, esta técnica é uma ferramenta bastante útil na realização de estudos ecológicos com microrganismos (ROSEMBAUM; RIESNER, 1987). Porém, a técnica apresenta algumas limitações quando utilizada nestes estudos, uma vez que pode ocorrer a amplificação preferencial de algumas populações dentro de uma comunidade microbiana complexa durante a PCR, de modo que as bandas observadas na DGGE representem apenas as espécies mas abundantes na amostra (VETRIANI et al., 1999). Outra limitação é que amplicons de baixa abundância podem não ser detectados, principalmente quando a espécie representa menos de 1% da população total (MUYZER et al., 1999).

2.4.3 Análise da biodiversidade de cianobactérias por meio da construção de bibliotecas genômicas

A composição da população de cianobactérias das lagoas foi avaliada pela construção de uma biblioteca genômica do gene RNAr 16S. Após o sequenciamento realizado com os DNAs plasmidiais, as sequências foram analisadas no programa BioEdit e somente aquelas com boa qualidade foram selecionadas para os testes posteriores. Estas sequências foram comparadas com o banco de dados do GenBank utilizando-se a ferramenta BLASTn.

Desta forma, 233 clones foram utilizados nas análises, distribuídos da seguinte maneira: 57 clones da lagoa de Limeira, 60 clones da Lagoa do Taquaral, 59 clones da lagoa ESALQ1 e 57 clones da lagoa ESALQ2. Um total de 9 gêneros de cianobactérias foi observado nas amostras das lagoas, sendo que a Lagoa do Taquaral apresentou apenas o gênero *Microcystis*, a lagoa de Limeira apresentou 3 diferentes gêneros (*Brasilonema*, *Microcystis* e *Pseudanabaena*), seguida da lagoa ESALQ2 com 4 diferentes gêneros (*Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Pseudanabaena*) e a lagoa ESALQ1 com a maior quantidade de gêneros diferentes (*Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Limnococcus*, *Synechococcus* e *Woronichinia*) (tabela 1). Todas as lagoas apresentaram a ocorrência de cianobactérias não cultivadas (tabela 1). O índice de cobertura estimada (ICE) foi superior a 81% para todos os casos, sendo que a lagoa ESALQ2 apresentou uma cobertura de 95% (tabela 1). Sendo assim, é possível considerar que os ambientes em questão foram bem representados, uma vez que o índice de cobertura foi alto em todos os casos.

Tabela 1 - Distribuição de gêneros, número de clones, número de UTOs e cobertura estimada para as bibliotecas genômicas do gene rRNA 16S obtidas das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo

	Limeira	Taquaral	ESALQ 1	ESALQ 2
Não cultivável	4	11	35	3
<i>Cylindrospermopsis</i>			5	
<i>Woronichinia</i>			4	
<i>Synechococcus</i>			13	
<i>Limnococcus</i>			1	
<i>Microcystis</i>	46	49		51
<i>Brasilonema</i>	3			
<i>Pseudanabaena</i>	4			1
<i>Anabaena</i>			1	1
<i>Nostoc</i>				1
Clones	57	60	59	57
UTOs	20	21	29	22
ICE	0,825	0,817	0,814	0,947

Entre os gêneros encontrados nas lagoas estão: *Anabaena*, *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis*, *Limnococcus*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus* e *Woronichinia*. A distribuição destes gêneros entre as quatro lagoas está ilustrada na figura 15.

Figura 15 - Distribuição dos gêneros de cianobactérias entre as quatro lagoas

Dos 9 gêneros encontrados, 3 pertencem à ordem Chroococcales, 4 pertencem à ordem Nostocales, 1 pertence à ordem Pseudanabaenales e 1 pertence à ordem Synechococcales, de acordo com a classificação de Hoffmann, Komárek e Kaštovsky (2005) (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos gêneros encontrados nas lagoas dentro das ordens segundo o sistema de classificação de Hoffmann, Komárek e Kaštovsky, 2005

Gênero/Ordem	Chroococcales	Nostocales	Pseudanabaenales	Synechococcales
<i>Anabaena</i>		X		
<i>Brasilonema</i>		X		
<i>Cylindrospermopsis</i>		X		
<i>Limnococcus</i>	X			
<i>Microcystis</i>	X			
<i>Nostoc</i>		X		
<i>Pseudanabaena</i>			X	
<i>Synechococcus</i>				X
<i>Woronichinia</i>	X			

As ordens Chroococcales e Nostocales se destacam na produção de cianotoxinas, e a antibiose por citotoxicidade é encontrada principalmente em representantes da ordem Nostocales (BURJA et al., 2001). Segundo Sant'Anna e colaboradores (2008), as cianobactérias tóxicas brasileiras são representadas por 32 espécies, sendo 12 da ordem Chroococcales, 10 da ordem Oscillatoriales e 10 da ordem Nostocales. No mesmo estudo, os autores colocam que os gêneros *Microcystis* e *Anabaena* são os que possuem o maior número de espécies tóxicas relatadas no Brasil e as cianobactérias tóxicas mais difundidas, ocorrendo em diversas partes tanto da região tropical quanto subtropical do Brasil são *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Segundo os estudos de Funari e Testai (2008) e Jaiswal, Singh e Prassana (2008), espécies do gênero *Microcystis* já foram relatadas como produtoras de anatoxina-a e microcistina; espécies do gênero *Cylindrospermopsis* como produtoras de cilindrospermopsina e saxitoxina; do gênero *Anabaena* como produtoras de anatoxina-a, anatoxina-a(s), cilindrospermopsina, microcistina e saxitoxina; do gênero *Nostoc* como produtoras de microcistina e do gênero *Woronichinia* como produtoras de microcistina.

Neste estudo, a lagoa ESALQ2 apresentou 89% das sequências obtidas com similaridade com *Microcystis*, e o mesmo ocorreu com a Lagoa do Taquaral, que apresentou 82% de *Microcystis* e com a lagoa de Limeira, que apresentou 81% de *Microcystis*. Este fato demonstrou que no período analisado (setembro/2010), provavelmente estavam ocorrendo florações de *Microcystis* em 3 lagoas localizadas em

diferentes cidades dentro do Estado de São Paulo. A lagoa ESALQ1 apresentou 59% de espécies não cultiváveis, seguido de 22% de *Synechococcus*, 8% de *Cylindrospermopsis* e mais uma porcentagem menor de outras espécies (figura 16). Dentre as espécies de *Microcystis* encontradas nas quatro lagoas encontram-se: *M. aeruginosa*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis* e *M. wesenbergii*, sendo que *M. aeruginosa* é a grande maioria nas Lagoas do Taquaral, Limeira e ESALQ2. Matsumura-Tundisi, Hino e Rocha, 1986 e Borges, 1998 também encontraram a presença de cianobactérias do gênero *Microcystis* ao avaliarem a Lagoa do Taquaral. Estes fatos demonstram que há mais de 20 anos esta lagoa apresenta florações de cianobactérias deste gênero.

Figura 16 - Porcentagem dos gêneros encontrados na lagoa de Limeira, Lagoa do Taquaral, lagoa ESALQ1 e lagoa ESALQ2

Foram observados, no período que compreendeu entre os dias 18 a 24 de setembro de 2010, valores irregulares de precipitação pluvial nas localidades do Estado de São Paulo (IAC, 2010).

Um estudo realizado por Costa e colaboradores (2009) em seis reservatórios do Rio Grande do Norte entre setembro/2002 a março/2004, abrangendo períodos de estiagem e chuva, mostrou que a comunidade fitoplanctônica destes reservatórios foi dominada por cianobactérias, apresentando baixa riqueza de espécies e alta biomassa. O fitoplâncton foi representado basicamente por espécies de *Microcystis* nos períodos de chuva e por espécies de *Cylindrospermopsis* e *Planktotrix* nos períodos de estiagem. A coexistência dessas espécies formando permanente floração com alternância de *Microcystis* spp. e *Cylindrospermopsis raciborskii* também foi registrada em um lago urbano eutrófico no estudo de Crossetti e Bicudo (2008).

No sentido de conhecer a dinâmica temporal e espacial das cianobactérias, a CEDAE (Companhia Estadual de Águas e Esgotos) monitora mensalmente as águas dos afluentes do Rio Guandu, responsável pelo abastecimento de cerca de 12 milhões de pessoas, incluindo 85% dos habitantes da região metropolitana, conforme a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Nos meses de agosto e setembro de 2006 e abril e maio de 2007, Costa; Barbosa e Consoli (2007) avaliaram as águas dos afluentes do Rio Guandu (RJ) e concluíram que o incremento ou declínio da densidade de cianobactérias está relacionado principalmente à disponibilidade de nutrientes, fósforo e nitrogênio total e que há uma tendência de formações de florações destes microrganismos na Lagoa Guandu durante a estiagem, provavelmente por causa da concentração de nutrientes neste ecossistema.

2.4.3.1 Índices de riqueza e de diversidade e curvas de rarefação

Neste estudo, a riqueza das espécies foi avaliada pelo estimador não paramétrico Chao1. A biblioteca construída para a lagoa ESALQ1 foi a que apresentou o maior índice de riqueza e a Lagoa do Taquaral apresentou o menor índice, uma vez que a lagoa ESALQ1 apresentou 5 gêneros diferentes de cianobactérias e mais uma grande quantidade de cianobactérias não cultivadas e a Lagoa do Taquaral apresentou

apenas o gênero *Microcystis* e uma pequena quantidade de cianobactérias não cultivadas (figura 17). As medidas de riqueza estimam o número de espécies presentes na comunidade, sem considerar sua estrutura de abundância (MARTINS; SANTOS, 1999). O estimador Chao1 é baseado em abundância, entretanto utiliza a relação entre o número de “singletons” (UTOs com somente uma sequência) e “doubletons” (UTOs formadas com duas sequências) para as estimativas de riqueza (COLWELL, 1997). De acordo com Chao (1984), são estas UTOs que servem para estimar o número de espécies faltantes.

Figura 17 - Comparação do índice de riqueza (Chao1) entre as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S obtidas das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo

Diversidade refere-se à variedade de espécies em uma determinada comunidade, habitat ou região. Neste estudo, a diversidade das espécies foi avaliada pelo índice de Shannon. A biblioteca construída para a lagoa ESALQ1 foi a que apresentou o maior índice de diversidade e a Lagoa do Taquaral apresentou os menores índices (figura 18). Este índice tem sido o mais utilizado no Brasil (DURIGAN, 2009) e leva em consideração o número de espécies e a homogeneidade da comunidade, portanto o índice aumenta tanto pelo maior número de espécies únicas quanto pela menor homogeneidade de espécies no local amostrado (equitabilidade)

(ZHANG; KI; QIAN, 2008). A diversidade pode ser maior ou menor, dependendo da riqueza de espécies e da proporção entre elas (DURIGAN, 2009).

Figura 18 - Comparação do índice de diversidade (Shannon) entre as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S obtidas das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo

Estes resultados podem ser explicados devido às diferenças entre florações de *Microcystis* e de *Cylindrospermopsis*. Quando ocorre uma floração de espécies de *Microcystis*, suas colônias com mucilagem proporcionam um alto grau de sombreamento para as demais espécies fitoplanctônicas coexistentes, dificultando o desenvolvimento das mesmas. Sendo assim, a diversidade e riqueza diminuem significativamente (RAMÍREZ, 1996). Já as florações de espécies de *Cylindrospermopsis*, as quais possuem tricomas finos e alongados, não promovem tal sombreamento, permitindo a coexistência de outras espécies fitoplanctônicas (TUCCI; SANT'ANNA, 2003). Sendo assim, provavelmente nas lagoas de Limeira, ESALQ2 e do Taquaral estavam ocorrendo florações de *Microcystis* e na lagoa ESALQ1 de *Cylindrospermopsis*.

Porém, para confirmar se uma determinada amostra é realmente mais rica e/ou mais diversa que outra, seriam necessários mais detalhes, como, por exemplo, coletas realizadas em diversos pontos das lagoas e durante longos períodos de tempo. Os resultados deste estudo condizem apenas com um determinado momento

(setembro/2010) em um determinado espaço, ou seja, foi realizada uma amostragem pontual e momentânea de comunidades.

As curvas de rarefação são curvas médias, baseadas em simulações com os dados obtidos, que permitem a comparação de amostras, mesmo que com intensidades amostrais diferentes (MARTINS; SANTOS, 1999). Neste estudo, a rarefação calculada para as bibliotecas permitiu visualizar que as curvas se encontram próximas de atingir a assíntota para todas as amostras, fato que indica que a chance de se encontrar uma UTO nova é pequena, principalmente para as lagoas ESALQ2 e Limeira (figura 19).

Figura 19 - Curvas de rarefação de cobertura das sequências de cianobactérias obtidas para as bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S das quatro lagoas localizadas no Estado de São Paulo

2.4.3.2 Comparação entre as bibliotecas genômicas e análises das UTOs

A diversidade beta refere-se à diferença na composição de espécies entre locais (FORNEY; ZHOU; BROWN, 2004). Esta foi analisada através da comparação das bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S, utilizando-se a ferramenta estatística β -Libshuff. Quando as sequências de todas as bibliotecas foram agrupadas, um total de 55 UTOs foi obtido, sendo 29 UTOs de sequência única (singletons).

A comparação entre as bibliotecas genômicas mostrou que as lagoas diferem estatisticamente uma das outras, com exceção da Lagoa do Taquaral com a lagoa ESALQ2 que apresentaram valor p de 0,4914 (tabela 3). Este fato se comprova devido a ambas apresentarem mais do que 80% de sua população de cianobactérias sendo do gênero *Microcystis*. O J-Libshuff é um bom teste de sobreposição de bibliotecas, uma vez que possibilita a verificação de diferenças estatísticas por comparações recíprocas pareadas entre as bibliotecas (ZHANG; KI; QIAN, 2008).

Tabela 3 - Valores de p para comparação múltipla entre bibliotecas genômicas do gene RNAr 16S das populações de cianobactérias de quatro lagoas do Estado de São Paulo (distância evolutiva 0,03)

	ESALQ2	Limeira	ESALQ1	Taquaral
ESALQ2	-	0,0232	0,0000	0,4914*
Limeira	0,0000	-	0,0000	0,0316
ESALQ1	0,0000	0,0000	-	0,0000
Taquaral	0,0000	0,0000	0,0000	-

* não difere estatisticamente

Nenhuma UTO foi observada em comum para todas as lagoas. A UTO 1 é a mais abundante em número de sequências, apresentando 50 sequências, sendo 21 sequências da lagoa ESALQ2, 21 da lagoa de Limeira e 17 da Lagoa do Taquaral. As UTOs 2, 3 e 8 também apresentam somente sequências destas 3 lagoas, porém em menores quantidades. Nove UTOs (4, 6, 9, 11, 13, 14, 17, 18 e 26) foram observadas apenas na lagoa ESALQ1; três UTOs foram observadas apenas na Lagoa do Taquaral (12, 19 e 20); quatro UTOs foram observadas apenas na lagoa de Limeira (16, 21, 23 e 24) e apenas uma UTO foi observada apenas na lagoa ESALQ2. As UTOs 5, 15 e 22 apresentam sequências das lagoas de Limeira e ESALQ2. A UTO 7 apresenta sequências da Lagoa do Taquaral e em menor quantidade da lagoa ESALQ1 e a UTO 10 apresenta sequências da Lagoa do Taquaral e da lagoa ESALQ2. Ainda foram observadas 29 UTOs de apenas uma sequência, as quais não foram inseridas na figura 22. Destas, a lagoa ESALQ1 apresentou 13 UTOs, a Lagoa do Taquaral apresentou 6 UTOs, a lagoa ESALQ2 também apresentou 6 UTOs e a lagoa de Limeira apresentou 4 UTOs (figura 20).

Figura 20 - Número de sequências de cada biblioteca genômica dentro de cada UTO

2.4.3.3 Análise filogenética

Das 33 UTOs selecionadas para a construção da árvore filogenética, 25 apresentaram similaridade maior ou igual a 95% com as sequências obtidas pelo banco de dados GenBank, indicando que estas sequências provavelmente são do mesmo gênero. Oito sequências apresentaram uma similaridade menor do que 95% quando comparadas com as sequências do GenBank, indicando que são gêneros diferentes, porém próximos filogeneticamente, pois se agruparam com as outras sequências.

Das UTOs utilizadas para a construção da árvore filogenética, 24 se agruparam com gêneros representantes da ordem Chroococcales (*Microcystis smithii*, *Microcystis aeruginosa*, *Woronichinia naegeliana*, *Gloeocapsa* sp. e *Limnococcus limneticus*); 6 se agruparam com gêneros representantes da ordem Nostocales (*Brasilonema roberti-lammi*, *Brasilonema octagenarum*, *Brasilonema terrestre*, *Nostoc* sp., *Nostoc linckia*, *Cylindrospermopsis curvispora* e *Cylindrospermopsis raciborskii*); 2 se agruparam com o gênero representante da ordem Synechococcales (*Synechococcus* sp.); e 1 se agrupou com o gênero representante da ordem Pseudanabaenales (*Pseudanabaena* sp.) (figura 21). O gênero *Microcystis* foi o que apresentou o maior número de UTOs

agrupadas, demonstrando mais uma vez que este gênero foi predominante na maioria das lagoas analisadas. O mesmo ocorreu no estudo de Lorenzi (2004), que analisou a diversidade de cianobactérias presentes em represas do Estado de São Paulo e ao avaliar as relações filogenéticas entre o gene RNAr 16S das cianobactérias obtidas das represas com aquelas obtidas de banco de dados observou que a grande maioria se agrupou com o gênero *Microcystis*, também obtendo sequências que se agruparam com os gêneros *Cylindrospermopsis* e *Synechococcus*, como no presente estudo.

As UTOs com sequências similares a cianobactérias não cultiváveis se agruparam apenas com sequências de organismos representantes da ordem Chroococcales, indicando que alguns organismos desta ordem existentes em lagoas ainda não foram descritos e permanecem desconhecidos. Rigonato (2010) analisou a diversidade de cianobactérias na filosfera de árvores em manguezais do Estado de São Paulo e também encontrou organismos não cultiváveis na ordem Chroococcales.

A árvore filogenética do estudo de Komárková e colaboradores (2010) apresenta grande similaridade com a árvore obtida neste estudo, uma vez que apresenta membros representantes das ordens Chroococcales, Nostocales e Synechococcales praticamente nas mesmas posições. O primeiro clado foi representado pelo gênero *Microcystis*, o segundo pelo gênero *Eucapsis*, o terceiro pelos gêneros *Synechocystis*, *Woronochinia* e *Snowella*, o quarto pelo gênero *Chroococcus*, o quinto pelo gênero *Limnococcus*, o sexto pelos gêneros *Nostoc*, *Nodularia* e *Anabaena*, o sétimo pelo gênero *Acaryochloris* e o último clado pelos gêneros *Synechococcus*, *Prochlorococcus* e *Cyanobium*.

Segundo Komárek (2010), para que duas linhagens sejam classificadas dentro de um mesmo gênero, deve haver entre suas sequências um percentual de similaridade maior ou igual a 95%, uma vez que o sequenciamento do gene RNAr 16S é considerado atualmente o método molecular padrão na determinação de gêneros de cianobactérias.

Figura 21 - Árvore filogenética obtida pelo método de “Neighbor-Joining” (Kimura 2-parameter) de seqüências do gene RNAr 16S de clones de cianobactérias presentes em florações de lagoas do Estado de São Paulo. Os valores de reamostragem maiores que 50 se encontram nos nós da árvore. Em negrito se encontram clones representantes das UTOs obtidas neste estudo

Os gêneros mais encontrados através da construção da árvore filogenética foram *Cylindrospermopsis* e *Microcystis*. Os representantes do primeiro gênero pertencem ao Domínio Bacteria, Filo Cyanobacteria, Sub-classe Nostocophycideae, Ordem Nostocales, Família Nostocaceae, Gênero *Cylindrospermopsis* e foi estabelecido por Seenayya e Raju (1972). Todas as espécies de *Cylindrospermopsis* são encontradas no plâncton de água doce de reservatórios eutrofizados em regiões tropicais, subtropicais ou temperadas, onde podem formar florações. A maioria das populações deste gênero produzem cianotoxinas (KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ, 2003).

Algumas características morfológicas deste gênero são: tricomas flutuantes, solitários, irregularmente enrolados, com espessa bainha mucilaginosa, cilíndricos; heterócitos desenvolvidos a partir de uma célula terminal, geralmente cilíndricos; acinetos geralmente ligados aos heterócitos, fortemente curvados; células cilíndricas com vesículas gasosas (WATANABE, 1995). Possuem habilidades para se adaptar à baixa intensidade luminosa, sendo capazes de coexistir com gêneros 'flutuantes' como *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Microcystis*, formando florações em maiores profundidades (PAERL, 2008).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii* foi realizado por Palmer (1969) no Lago Paranoá em Brasília. Na década de 80 surgiram estudos da ocorrência desta espécie em outras regiões do Brasil. Sant'Anna e colaboradores (1988) relataram a ocorrência desta espécie na represa de Serraria, SP e Torgan; Garcia (1989) na Lagoa dos Patos, RS. A grande expansão na distribuição de *C. raciborskii* começou na década de 90, com o aumento da eutrofização nos ambientes aquáticos em diversas regiões do Brasil (SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000). A alta competitividade dos membros da espécie de *C. raciborskii* em ambientes eutrofizados e sua capacidade de formar florações, incluindo a produção de toxinas, tem feito desta espécie uma das mais estudadas cianobactérias tanto do ponto de vista ecológico como de saúde pública (TUCCI; SANT'ANNA, 2003).

Os representantes do segundo gênero pertencem ao Domínio Bacteria, Filo Cyanobacteria, Sub-classe Oscillatorioophycideae, Ordem Chroococcales, Família Microcystaceae, Gênero *Microcystis*. Formam colônias micro ou macroscópicas, possuem livre flutuação, são esféricas, ovais, lobuladas, ou alongadas; às vezes são

compostas por sub-colônias geralmente dispostas em células de comum mucilagem; possuem aerótopos. A divisão celular ocorre por fissão binária em três planos perpendiculares (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1999).

As cianobactérias do gênero *Microcystis*, pelo fato de possuírem densa mucilagem, frequentemente formam florações superficiais. Estas apresentam alta tolerância à elevada luminosidade em função da aclimação por aumento na produção de carotenóides, pigmentos fotoprotetores (PAERL; TUCKER; BLAND, 1983). As densas florações de colônias de *Microcystis* proporcionam grande sombreamento para as demais espécies fitoplanctônicas, dificultando seu desenvolvimento e reduzindo a competição. Deste modo, há diminuição significativa da riqueza e da diversidade (TUCCI; SANT'ANNA, 2003). A taxa de crescimento de *Microcystis* possui relação direta com a temperatura, ou seja, maior crescimento com aumento da temperatura. Portanto, *Microcystis* é forte competidora em temperaturas elevadas, assim como as demais cianobactérias (JÖHNK et al., 2008).

Este gênero é capaz de produzir as cianotoxinas anatoxina-a e microcistina e os cianopeptídeos aeruginosina e cianopeptolina, como já descrito anteriormente neste estudo. Deste modo, é possível relacionar o aparecimento destes peptídeos através da amplificação de genes e das análises em LC-MS/MS, nas lagoas ESALQ2, Limeira e do Taquaral, uma vez que estas 3 lagoas apresentaram alta porcentagem deste gênero. Estes resultados serão apresentados no tópico a seguir.

2.4.4 Amplificação por PCR de genes codificadores de toxinas

Através da amplificação por PCR dos genes codificadores de toxinas foi possível verificar a presença de bandas correspondentes a dois cianopeptídeos, que são aeruginosina (Limeira, Taquaral e ESALQ2) e cianopeptolina (Limeira e ESALQ2) e duas cianotoxinas, que são microcistina (Limeira, Taquaral e ESALQ2) e saxitoxina (ESALQ1) (tabela 4), verificadas em gel de agarose (figura 22).

Tabela 4 - Detecção de cianopeptídeos e cianotoxinas através de amplificação de genes codificadores de toxinas e posterior eletroforese em gel de agarose

	Limeira	Taquaral	ESALQ1	ESALQ2
Aeruginosina	+	+	-	+
Anatoxina	-	-	-	-
Cianopeptolina	+	-	-	+
Cilindrospermopsina	-	-	-	-
Microcistina	+	+	-	+
Saxitoxina	-	-	+	-

2.4.5 Espectrometria de massas

Através das análises realizadas em LC-MS/MS foi possível confirmar a presença de aeruginosina nas amostras das lagoas ESALQ2, de Limeira e do Taquaral; e de cianopeptolina e microcistina na amostra da lagoa de Limeira (tabela 5). As cianotoxinas anatoxina, saxitoxina e cilindrospermopsina não foram encontradas em nenhuma das amostras. Vários fatores podem ser responsáveis pelo fato de se obter uma amplificação positiva de algum gene codificador de cianopeptídeos pela PCR e não detectar estes através da espectrometria de massas. Por exemplo, o cianopeptídeo pode não ter sido extraído utilizando-se a metodologia adequada; a biomassa pode não ter sido suficiente para que ocorresse sua detecção; as condições do espectrômetro de massas não eram ideais para a detecção daquele cianopeptídeo; o gene não estava sendo expresso (SILVA-STENICO et al., 2011).

Tabela 5 - Cianopeptídeos encontrados nas amostras das lagoas ESALQ2, lagoa de Limeira e Lagoa do Taquaral, através de análises realizadas em LC-MS/MS

Amostra	Extrato (MeOH)	m/z	Cianopeptídeo	Referência
ESALQ2	Bruto	601	aeruginosina	Este estudo
	Bruto	635	aeruginosina	Este estudo
	Bruto	669	aeruginosina	Este estudo
Limeira	C ₁₈ 70%	561	aeruginosina	Este estudo
	C ₁₈ 40-60%	593	aeruginosina 592	Welker 2007
	C ₁₈ 70%	593	aeruginosina 592	Welker 2007
	C ₁₈ 70%	505	cianopectolina	Este estudo
	C ₁₈ 70%	959	cianopectolina 958	Czarnecki 2006
	Bruto	969	cianopectolina	Este estudo
	C ₁₈ 70%	973	cianopectolina 972	Welker 2004
	C ₁₈ 70%	987	micropetin A (cianopectolina)	Okino1993
	C ₁₈ 40-60%	981	microcistina-LR	Sivonen 1992 Welker 2002
	C ₁₈ 40-60%	995	microcistina-LR	Welker 2002
Taquaral	C ₁₈ 70%	601	aeruginosina	Este estudo
	C ₁₈ 70%	633	aeruginosina	Este estudo

As cianobactérias produzem muitos compostos bioativos, sendo estes tóxicos ou não tóxicos (NAMIKOSHI; RINEHART, 1996), como exemplo o gênero *Microcystis* pode sintetizar tanto microcistina como outros peptídeos.

Vários gêneros de cianobactérias produzem metabólitos secundários tóxicos, entre eles as hepatotoxinas microcistinas (SILVA-STENICO et al., 2009). A isoforma mais comum da microcistina é a microcistina-LR, caracterizada pela presença de uma leucina (L) e uma arginina (R) como L-aminoácidos nas posições 2 e 4 (CARMICHAEL et al., 1988) e é considerada a mais potente hepatotoxina (FUNARI; TESTAI, 2008).

A microcistina-LR foi identificada na amostra da Lagoa de Limeira pela análise em LC-MS/MS, sendo duas variantes, *m/z* 981 e 995 (figuras 22 e 23). A fragmentação das toxinas foi realizada e confirmada pela presença do íon *m/z* 135, correspondente ao grupamento Adda, responsável pela toxicidade na molécula da microcistina. A microcistina-LR *m/z* 981 já foi reportada com diversas variações na composição de aminoácidos, como por exemplo, Dha-Leu (LAWTON; EDWARDS, 2001; MAYUMI et al., 2006; ROUNGE et al., 2009), D-Asp-Leu (CZARNECKI et al., 2006; LAWTON; EDWARDS, 2001; MAYUMI et al., 2006), DMAdda-Leu (KAASALAINEN et al., 2009; LAWTON; EDWARDS, 2001), Asp-Dhb (ZWEIGENBAUM et al., 2000). A fragmentação

da hepatotoxina encontrada na amostra de Limeira com m/z 981 indica ser uma Asp³-microcistina-LR devido à presença dos íons m/z 70, 86, 135, 213 e 375, correspondendo a Arg, Leu (íon imônio), Adda, Glu+Mdha+H, Adda+Glu+Mdha, respectivamente (WELKER et al., 2002).

Figura 22 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ frações 40-60% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 981 fragmentado, correspondente a uma variante de microcistina-LR (Asp³)

Figura 23 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ frações 40-60% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 995 fragmentado, correspondente a uma microcistina-LR

Outras substâncias, tais como aeruginosina e cianopeptolina (inibidores de protease) também foram detectadas. As aeruginosinas possuem vários níveis de atividade inibitória contra serina proteases. Este tipo de estrutura e características funcionais são responsáveis pela afinidade da aeruginosina com o sítio catalítico da tripsina, trombina e outras serina proteases envolvidas na coagulação do sangue. Já foi relatada a produção de aeruginosinas pelas espécies dos gêneros *Microcystis* e *Planktothrix*, sendo que nas amostras avaliadas foram encontradas sequências predominantemente com similaridade à *Microcystis*.

Juntamente com as microcistinas, as cianopeptolinas parecem ser os peptídeos mais comumente produzidos pelo gênero *Microcystis*. No estudo de Welker e colaboradores (2006), a produção de cianopeptolinas foi detectada em 60% das colônias isoladas de *Microcystis*. Ainda foi reportada a produção de cianopeptolina para espécies dos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Nostoc*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* (WELKER; VON DÖHREN, 2006), sendo que foram encontradas sequências de *Anabaena*, *Microcystis* e *Nostoc* nas amostras ESALQ2 e *Microcystis* nas lagoas de Limeria e Taquaral.

Nos espectros de fragmentação das aeruginosinas todos eles apresentaram um sinal intenso do íon m/z 140, o Choi-imônio (2-carboxiperhidroindol), o qual é um indicativo de aeruginosa. Na fragmentação de duas aeruginosinas, m/z 561 e 593 aparecem os íons m/z 309, 291 e 266, indicativos da sequência Choi-Argininal. Fragmentos associados com Hpla (ácido láctico hidroxifenil) apresentam aumento de massa correspondente ao nível de cloração na molécula: aeruginosina m/z 561, 593 e 601 sem cloro, íon m/z 250 (Hpla-Leu-Choi-Argal) (figuras 24, 25, 26 e 27); aeruginosina m/z 601, 635 e 669 monoclorada, íon m/z 284 (C/H pla-Leu-Choi-Argal) (figuras 28, 29 e 30); aeruginosina m/z 633 diclorada, íon m/z 318 (C_2/H pla-Leu-Choi-Argal) (figura 31).

Figura 24 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 561 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina

Figura 25 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ frações 40-60% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 593 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina

Figura 26 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 593 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina

Figura 27 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C₁₈ fração 70% MeOH da amostra da Lagoa do Taquaral. A seta no espectro apresenta o íon m/z 601 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina

Figura 28 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa ESALQ2. A seta no espectro apresenta o íon m/z 601 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina clorada

Figura 29 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa ESALQ2. A seta no espectro apresenta o íon m/z 635 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina clorada

Figura 30 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa ESALQ2. A seta no espectro apresenta o íon m/z 669 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina clorada

Figura 31 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da Lagoa do Taquaral. A seta no espectro apresenta o íon m/z 633 fragmentado, correspondente a uma aeruginosina diclorada

Nos espectros de fragmentação das cianopeptolinas todos eles apresentaram um sinal intenso do íon m/z 150, a MTyr íon imônio, indicativo de cianopeptolina. A ocorrência do fragmento m/z 115 (Ahp) também sustenta a identificação de

cianopeptolinas (figuras 32, 33, 34, 35 e 36). Fragmentos com massa de 127 e 198 Da aparecem quando há cloração de Tyr (WELKER; VON DÖHREN, 2006), o que não ocorreu em nenhuma das amostras.

Figura 32 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 505 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina

Figura 33 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 959 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina

Figura 34 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 969 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina

Figura 35 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 973 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina

Figura 36 - Espectro de massas ESI em modo positivo de extrato metanólico eluído em coluna C_{18} fração 70% MeOH da amostra da lagoa de Limeira. A seta no espectro apresenta o íon m/z 987 fragmentado, correspondente a uma cianopeptolina

Em termos de aplicação clínica, Radau, Schermuly e Fritsche (2003) reportam a ação de aeruginosinas implicadas em tratamentos como trombose venosa e arterial, derrame, estreitamento dos vasos sanguíneos e enfartes do miocárdio. Para a indústria farmacêutica, a descoberta de novos inibidores de proteases vem sendo de grande importância. As cianopeptolinas de origem cianobacteriana podem ser aplicadas no tratamento de asma e infecções virais (SINGH et al., 2011). Embora estas substâncias sejam compostas de subunidades semelhantes, o isolamento de novas moléculas sempre ocorre pela descoberta de aminoácidos desconhecidos.

2.4.6 Ensaios ecotoxicológicos

Nos testes com *H. attenuata* foram calculados a CE_{50} , concentração que causa efeitos sub-letais a 50% dos organismos-testes, após 96 horas de exposição dos organismos aos extratos metanólicos das 4 lagoas estudadas, e a CL_{50} , concentração que causa morte a 50% dos organismos-testes, após 96 horas de exposição dos organismos aos extratos metanólicos das 4 lagoas estudadas.

As alterações morfológicas causadas no organismo *H. attenuata* pela exposição ao extrato metanólico da lagoa ESALQ1 foram efeitos sub-letais (tabela 6) como

formação de bulbo nos tentáculos, encurtamento dos tentáculos e perda dos tentáculos e morte (figura 37). Tanto a CE_{50} quanto a CL_{50} calculadas através do programa JSPEAR foram de 0,30 mg/L.

Tabela 6 - Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo *H. attenuata* após exposição às cianotoxinas do extrato da lagoa ESALQ1

Concentrações (mg/L)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1,00	9B	9C	9T	9M
0,75	9B	2B 7C	8C 1T	3T 6M
0,50	9N	7N 2B	9B	4B 5C
0,25	9N	9N	8N 1B	6N 3B
0,00 (controle)	9N	9N	9N	9N

N – Organismos normal, B – formação de bulbo nos tentáculos, C – encurtamento dos tentáculos, T – perda dos tentáculos, M – morte

As alterações morfológicas causadas no organismo *H. attenuata* pela exposição às cianotoxinas da lagoa ESALQ2 foram apenas efeitos sub-letais (formação de bulbo nos tentáculos e encurtamento dos tentáculos) (tabela 7). Como não ocorreu morte dos organismos durante o ensaio com as cianotoxinas da lagoa ESALQ2, não foi possível calcular a CL_{50} e concluiu-se então que esta não foi tóxica para o organismo *H. attenuata*. A CE_{50} calculada através do programa JSPEAR foi de 0,61 mg/L.

Tabela 7 - Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo *H. attenuata* após exposição às cianotoxinas do extrato da lagoa ESALQ2

Concentrações (mg/L)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1,00	9N	6N 3B	9B	2B 7C
0,75	9N	8N 1B	5N 4B	9B
0,50	9N	9N	9N	9N
0,25	9N	9N	9N	9N
0,00 (controle)	9N	9N	9N	9N

N – Organismos normal, B – formação de bulbo nos tentáculos, C – encurtamento dos tentáculos, T – perda dos tentáculos, M – morte

As alterações morfológicas causadas no organismo *H. attenuata* pela exposição às cianotoxinas da lagoa de Limeira foram efeitos sub-letais (formação de bulbo nos tentáculos, encurtamento dos tentáculos e perda dos tentáculos) e morte (tabela 8).

Tanto a CE_{50} quanto a CL_{50} calculadas através do programa JSPEAR foram de 0,30 mg/L.

Tabela 8 - Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo *H. attenuata* após exposição às cianotoxinas do extrato da lagoa de Limeira

Concentrações (mg/L)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1,00	9B	9C	9T	9M
0,75	9B	9C	9T	9M
0,50	9B	7B 2C	9C	6C 3T
0,25	9N	7N 2B	7N 2B	6N 3B
0,00 (controle)	9N	9N	9N	9N

N – Organismos normal, B – formação de bulbo nos tentáculos, C – encurtamento dos tentáculos, T – perda dos tentáculos, M – morte

As alterações morfológicas causadas no organismo *H. attenuata* pela exposição às cianotoxinas da Lagoa do Taquaral foram efeitos sub-letais (formação de bulbo nos tentáculos, encurtamento dos tentáculos e perda dos tentáculos) e morte (tabela 9). Tanto a CE_{50} quanto a CL_{50} calculadas através do programa JSPEAR foram de 0,33 mg/L.

Tabela 9 - Alterações morfológicas apresentadas pelo organismo *H. attenuata* após exposição às cianotoxinas do extrato da Lagoa do Taquaral

Concentrações (mg/L)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
1,00	9B	9C	9T	9M
0,75	9B	7B 2C	9C	7C 2T
0,50	6N 3B	6N 3B	3N 6B	1N 8B
0,25	9N	8N 1B	8N 1B	7N 2B
0,00 (controle)	9N	9N	9N	9N

N – Organismos normal, B – formação de bulbo nos tentáculos, C – encurtamento dos tentáculos, T – perda dos tentáculos, M – morte

Massaro (2011) avaliou a toxicidade de cianotoxinas e de amostras ambientais de água e sedimento aos organismos *H. viridissima* e *H. salmacidis*. Nos testes de toxicidade aguda realizados com as amostras de água e sedimento de reservatórios, todos os organismos encontraram-se normais após as 96 horas do ensaio, indicando que estas amostras não foram tóxicas a estes organismos. Nos testes de toxicidade aguda utilizando-se extratos da linhagem tóxica *M. aeruginosa* NPLJ-4, os organismos

das duas espécies apresentaram apenas efeitos sub-letais (tentáculos com bulbos e tentáculos encurtados), sendo que os mesmos diminuíram no decorrer das 96 horas, concluindo-se que estes organismos não foram tão sensíveis à microcistina presente nos extratos da linhagem NPLJ-4.

Fonte: Environment Canada.

Figura 37 - Alterações morfológicas que podem ser causadas em *H. attenuata* após um ensaio ecotoxicológico. A) Organismo normal; B) Organismo com formação de bulbos nos tentáculos; C) Organismo com encurtamento dos tentáculos; D) Organismo com perda dos tentáculos; E) Morte do organismo

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apenas a Lagoa do Taquaral em Campinas/SP já havia sido estudada quanto à ocorrência de florações de cianobactérias. As lagoas de Limeira, ESALQ1 (entre o Prédio da Química e o Prédio Central) e ESALQ2 (em frente ao Prédio da Agricultura) foram primeiramente analisadas neste estudo.

As cianobactérias estavam presentes em todas as amostras de água coletadas nas lagoas ESALQ1, ESALQ2, Limeira e Lagoa do Taquaral. Nos quatro pontos coletados em cada lagoa as comunidades encontradas diferiram entre si provavelmente por alterações climatológicas e/ou nutricionais. As análises moleculares identificaram a presença de nove diferentes gêneros de cianobactérias nas quatro lagoas, que foram *Anabaena*, *Brasilonema*, *Cylindrospermopsis*, *Limnococcus*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Pseudanabaena*, *Synechococcus* e *Woronichinia*. Três lagoas (Taquaral, Limeira e ESALQ2) apresentaram mais do que 80% da população pertencente ao gênero *Microcystis*, indicando que em três cidades diferentes (Campinas, Limeira e Piracicaba) provavelmente estavam ocorrendo florações de cianobactérias deste gênero.

Florações de cianobactérias em corpos d'água frequentemente produzem uma grande diversidade de metabólitos tóxicos e não-tóxicos. As substâncias tóxicas mais abundantes nestas florações são as microcistinas e as não tóxicas pertencem geralmente ao grupo de peptídeos da classe de inibidores de proteases, como aeruginosina e cianopeptolina. Na busca por cianopeptídeos, foi examinado o extrato de florações de quatro corpos d'água e o extrato dessas amostras apresentou a microcistina-LR e diversas variantes de aeruginosinas e cianopeptolinas, as quais podem apresentar diferentes atividades biológicas.

Oito diferentes cianopeptídeos foram encontrados neste estudo, sendo seis aeruginosinas (m/z 561, 601, 633, 635, 669) e duas cianopeptolinas (m/z 505 e 969) relatadas pela primeira vez na literatura. Os inibidores de proteases tem potencial uso em farmacologia e biotecnologia, sendo candidatos líderes na busca de novos fármacos.

Estudos mais aprofundados são necessários em reservatórios de abastecimento de água e para uso recreacional para detectar a presença de cianobactérias e suas toxinas nestes ambientes. Ainda não se sabe os efeitos toxicológicos dos inibidores de proteases, sendo até já relatados como toxinas e uma vez presentes em águas de abastecimento público, poderão prejudicar a saúde de animais e humanos.

Através das metodologias empregadas no presente estudo, foi possível obter resultados que contribuirão para um melhor conhecimento sobre a ecologia das cianobactérias acessadas nas quatro lagoas e também sobre as cianotoxinas presentes. Porém, mais estudos necessitam ser realizados a fim de chamar a atenção dos órgãos competentes.

REFERÊNCIAS

- ACINAS, S.G.; HAVERKAMP, T.H.A.; HUISMAN, J.; STAL, L.J. Phenotypic and genetic diversification of *Pseudanabaena* spp. (cyanobacteria). **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 31-46, 2009.
- AMANN, R.L.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 555-565, 2000.
- ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ARDREY, R.E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. Huddersfield: Wiley, 2003. 277 p.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, Hyderabad, v. 2, p. 69-92, 2009.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Clare, v. 181-182, p. 441-446, 2002.
- BARRIOS-LLERENA, M.E.; BURJA, A.M.; WRIGHT, P.C. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 34, p. 443-456, 2007.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p. 157-164, 2003.
- BLANK, C.E.; SÁNCHEZ-BARACALDO, P. Timing of morphological and ecological innovations on the cyanobacteria – a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. **Geobiology**, Malden, v. 8, p. 1-23, 2010.
- BORGES, J.T. **Avaliação do estado trófico e sanitário e a adsorção de fósforo no sedimento da Lagoa do Taquaral - Campinas - SP**. 1998. 120 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento) - Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília, 2003. 56 p.

BROWN, M.V.; SCHWALBACH, M.S.; HEWSON, I.; FUHRMAN, J.A. Coupling 16S-ITS rDNA clone libraries and automated ribosomal intergenic spacer analysis to show marine microbial diversity: development and application to a time series. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 7, n. 9, p. 1466-1479, 2005.

BOURKE, A.T.C.; HAWES, R.B.; NEILSON, A.; STALLMAN, N.D. Na outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. **Toxicon**, Oxford, v. 21, p. 45-48, 1983.

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

BUSTILLOS, O.V.; SASSINE, A.; MARCH, R. A. **Espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo: Editora Scortecci, 2003. 162 p.

CADEL-SIX, S.; DAUGA, C.; CASTETS, A.M.; RIPPKA, R.; BOUCHIER, C.; MARSAC, N.T.; WELKER, M. Halogenase genes in nonribosomal peptide synthetase gene clusters of *Microcystis* (Cyanobacteria): sporadic distribution and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 2031-2041, 2008.

CAIRNS, J. Environmental monitoring for the preservation of global biodiversity: The role in sustainable use of the planet. **International Journal of Sustainable Development and World Ecology**, Philadelphia, v. 9, n. 2, p.135-150, 2002.

CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: Rima Editora, 2006. 118 p.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 207, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W.W.; ESCHEDOR, J.T.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E. Toxicity and partial structure for a hepatotoxic peptide produced by *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2757-2763, 1988.

CASTILLO, G.C.; VILA, I.C.; NIELD, E. Ecotoxicity of metals and wastewater using multitrophic bioassays. **Environmental Toxicology**, Malden, v. 15, n. 5, p. 370-375, 2000.

CHAO, A. Nonparametric Estimation of the number of the classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Malden, v. 11, p. 265-270, 1984.

CHENEY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 34, p. 121-128, 2000.

CLEMENTINO, M.M.; FERNANDES, C.C.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; POLYCARPO, C.R.; MARTINS, O.B. Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 103, p. 141-151, 2007.

COLWELL, R.K. **EstimateS**: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 5. User's Guide and application. 1997. Disponível em: <<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>>. Acesso em: 24 mar. 2011.

COSTA, I.S.; BARBOSA, T.R.; CONSOLI, M.A.F. Distribuição espacial e temporal de cianobactérias nos afluentes do sistema Guandu - Cedae/RJ. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu-MG. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 2007.

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

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M. de; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.

CROSSETTI, L.O.; BICUDO, C.E.M. Adaptations in phytoplankton life strategies to composed change in a shallow urban tropical eutrophic reservoir, Garças Reservoir, over 8 years. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 614, p. 91-105, 2008.

CZARNECKI, O.; HENNING, M.; LIPPERT, I.; WELKER, M. Identification of peptide metabolites of Microcystis (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). **Environmental Microbiology**, Malden, v. 8, p. 77-87, 2006.

CYBIS, L.F.; BENDATI, M.M.; MAIZONAVE, C.R.M.; WERNER, V.R.; DOMINGUES, C.D. **Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público**: caso da represa Lomba do Sabão e lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro: ABES, 2006. 64 p.

DeLONG, E.F.; PACE, N.A. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 470-478, 2001.

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

DURIGAN, G. Estrutura e diversidade de florestas tropicais. In: MARTINS, S.V. (Org.). **Ecologia de Florestas Tropicais do Brasil**. Viçosa: Editora UFV, 2009. p. 185-215.

DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 163, p. 113-186, 2000.

ERSMARK, K.; DEL VALLE, J.R.; HANESSIAN, S. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. **Angewandte Chemie International Edition**, Malden, v. 47, p. 1202-1223, 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: Na approach using the bootstrap. **Evolution**, Malden, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERNANDES, V.O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L.B.; SOUZA, B.D. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 247-258, 2009.

FERRÃO FILHO, A.S. Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 272-312, 2009.

IORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por Cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e biodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: AgroLivros, 2008. p. 65-91.

IORE, M.F.; GENUÁRIO, D.B.; SILVA, C.S.P.; SHISHIDO, T.K.; MORAES, L.A.B.; CANTÚSIO NETO, R.; SILVA-STENICO, M.E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus Fischerella. **Toxicon**, Oxford, v. 53, p. 754-761, 2009.

IORE, M.F.; ALVARENGA, D.O.; SILVA-STENICO, M. E. Genética de cianotoxinas. **Microbiologia in Foco**, São Paulo, v. 12, 2011.

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

FORNEY, L.J.; ZHOU, X.; BROWN, C.J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 210-220, 2004.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 38, n. 2, p. 97-125, 2008.

GEHRINGER, M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 557, p. 1-8, 2004.

GESNER-APTER, S.; CARMELI, S. Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Tetrahedron**, Oxford, v. 64, p. 6628-6634, 2008.

HIRSCHBERG, J.; CHAMOVITZ, D. Carotenoids in cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 559-579.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies**, Stuttgart, v. 177, p. 95-115, 2005.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. **Boletim semanal**. Campinas, 2010. Disponível em: <<http://www.ciiagro.sp.gov.br/FullBoletim.html>>. Acesso em: 15 out. 2010.

ISHIDA, K.; WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; CADEL-SIX, S.; BOUCHIER, C.; DITTMANN, E.; HERTWECK, C.; MARSAC, N.T. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 2017-2026, 2009.

JAISWAL, P.; SINGH, R.K.; PRASANNA, R. Cyanobacterial bioactive molecules – an overview of their toxic properties. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, p. 701-717, 2008.

JAKOBI, C.; RINEHART, K.L.; NEUBER, R.; MEZ, K.; WECKESSER, J. Cyanopeptolin SS, a disulphated depsipeptide from a water bloom: structural elucidation and biological activities. **Phycologia**, Lawrence, v. 35, p. 111-116, 1996.

JESUS, E.C. **Bacterial diversity in soils from different land use systems of the western Brazilian Amazon**. 2008. 155p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

JÖHNK, K.D.; HUISMAN, J.; SHARPLES, J.; SOMMEIJER, B.; VISSER, P.M.; STROOM, J.M. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. **Global Change Biology**, Malden, v. 14, p. 495-512, 2008.

- KAASALAINEN, U.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Microcystin production in the tripartite cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, p. 695-702, 2009.
- KELLMANN, R.; MILLS, T.; NEILAN, B.A. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 62, p. 267-280, 2006.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 4 – Nostocales. **Archiv für Hydrobiologie**, Stuttgart, v. 56, p. 247–345, 1989.
- _____. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1999. v. 19/1, p. 548.
- KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus *Cylindrospermopsis* (Nostocales). **Czech Phycology**, Olomouc, v. 3, n. 1, p. 30, 2003.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 2. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B.; Krienitz, L.; Gärtner, G.; Schagerl, M. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Munich: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1-759.
- KOMÁREK, J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 639, p. 245-259, 2010.
- KOMÁRKOVÁ, J.; JEZBEROVÁ, J.; KOMÁREK, O.; ZAPOMELOVÁ, E. Variability of *Chroococcus* (Cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationships. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 639, p. 69-83, 2010.
- KOPP, R.E.; KIRSCHVINK, J.L.; HILBURN, I.A.; NASH, C.Z. The Paleoproterozoic snowball earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, n. 32, p. 11131-11136, 2005.
- KUIPFER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J. Human health aspects. In: Chorus, I.; Bartrem, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health. Consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p. 114-153.
- LANE, D.L.; PACE, B.; OISEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LAWTON, L.A.; EDWARDS, C. Purification of microcystins. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 912, p. 191-209, 2001.

LIMA, A.M.L.P. Nosso Parque faz 80 anos. **Revista da ADEALQ**, Piracicaba, v. 10, n. 6, p. 20-22, 1987.

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 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MACKINTOSH, C.; BEATTI, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 264, n. 2, p. 187-192, 1990.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2651–2674, 1997.

MARTIN, C.; OBERER, L.; INO, T.; KÖNIG, W.A.; BUSCH, M.; WECKESSER, J. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 46, p. 1550-1556, 1993.

MARTINS, F.R.; SANTOS, F.A.M. Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade. **Revista Holos**, Campinas, v. 1, p. 236-267, 1999.

MARTINS JÚNIOR, H.A. **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem com ionização por electrospray (LC-ESI/MS/MS)**. 2005. 112 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2005.

MASSARO, F.C. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria Hydrozoa)**. 2006. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

_____. **Estudos ecológicos e ecotoxicológicos de espécies nativas de *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa)**. 2011. 502 p. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; HINO, K.; ROCHA, O. Características limnológicas da Lagoa do Taquaral (Campinas S.P.) - um ambiente hipereutrófico. **Ciência e Cultura**, v. 38, n. 3, p. 420-425, 1986.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J.S.; CODD, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 59, n. 3, p. 361-376, 1999.

MAYUMI, T; KATO, H; IMANISHI, S; KAWASAKI, Y.; HASEGAWA, M.; HARADA, K. Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 59, p. 710-719, 2006.

MÉJEAN, A.; MANN, S.; MALDINEY, T.; VASSILIADIS, G.; LEQUIN, O.; LOUX, O. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 131, n. 22, p. 7512-7513, 2009.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. de. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1998. 488 p.

MENDES, L.W. **Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP**. 2009. 143 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MESSIAS, T.G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na Bacia do Corumbataí**. 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

METCALF, J.S.; CODD, G.A. **Cyanobacterial toxins in the water environment**. Marlow: Foundation for Water Research, 2004. 36 p.

MIHALI, T.K.; KELLMANN, R.; MUENCHHOFF, J.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. Characterization of the Gene Cluster Responsible for Cylindrospermopsin Biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 716-722, 2008.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

MORACCI, L.F.S. **Resíduos de agrotóxicos em lodo de estação de tratamento de água: validação de metodologia analítica utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)**. 2008. 122 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

MURAKAMI, M.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; OKINO, T.; YAMAGUCHI, K. Aeruginosin 298-A, a thrombin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 35, p. 3129-3132, 1994.

MUYZER, G.; de WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Prolifing of complex microbial populations by denaturing gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek – International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 317-322, 1999.

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

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

NICKLISCH, A.; SHATWELL, T.; KÖLLER, J. Analysis and modeling of the interactive effects of temperature and light on phytoplankton growth and relevance for the spring bloom. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 75-91, 2008.

NIE, X.; WANG, G. Total synthesis of aeruginosin 298-A analogs containing ring oxygenated variants of 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole. **Tetrahedron**, Oxford, v. 64, p. 5784-5793, 2008.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 3327-3332, 1997.

OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 34, p. 501-504, 1993.

OLIVEIRA, M.M.; SILVA FILHO, M.V.; BASTOS, J.C.; NEVES, M.H.C.B. Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, Campos dos Goytacazes, v. 4, n. 1, p. 57-80, 2010.

OVREAS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Malden, v. 3, p. 236-251, 2000.

PAERL, H.W. Nuisance phytoplankton blooms in costal, estuarine and inland waters. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 33, n. 4, p. 823-847, 1988.

_____. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In: HUDNELL, H.K. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: Springer, 2008. v. 619, p. 217-238.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**, Washington, v. 320, p. 57, 2008.

PAERL, H.W.; TUCKER, J.; BLAND, P.T. Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 28, p. 847- 857, 1983.

PALMER, C.M. **Report on the algae in relation to water quality of Paranoa Lake: relatório de consultoria**. Brasília: WHO; Pan American Health Organization, 1969.

PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C; TOMÁS, V.; MARTÍN, J.; High-performance liquid chromatographic assay of phosphate and organophosphorus pesticides using a post-column photochemical reaction and fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 540, p. 383-391, 2005.

RADAU, G.; SCHERMULY, S.; FRITSCHÉ, A. New cyanopeptide-derived low molecular weight inhibitors of trypsin-like serine proteases. **Archive der Pharmazie**, Weinheim, v. 336, p. 300-309, 2003.

RAMÍREZ, J.J.R. **Variações espacial vertical e nictemeral da estrutura da comunidade fitoplantônica e variáveis ambientais em quatro dias de amostragens de diferentes épocas do ano no Lago das Garças, São Paulo**. 1996. 300 p. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: Taylor and Francis, 1985. 665 p.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 167-177, 2000.

RANTALA, A.; FEWER, D.P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VALTOMAA, J.; BÖRNER, T.; SIVONEN, K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, n. 2, p. 568-573, 2004.

RIGONATO, J. **Diversidade de cianobactérias em manguezais do Estado de São Paulo**. 2010. 107 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ROSEMBAUM, V.; RIESNER, D. Temperature-gradient gel electrophoresis; thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. **Biophysical Chemistry**, v. 26, p. 235-246, 1987.

ROUNGE, T.B; ROHRLACK, T.; NEDERBRAGT, A.J.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. A genome-wide analysis of nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrix rubescens* strain. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 396, 2009.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 351 p.

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

SANT'ANNA, C.L., XAVIER, M.B.; SORMUS, L.. Estudo qualitativo do fitoplâncton da represa de Serraria, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 48, p. 83-102, 1988.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F.; CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. **Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2006. 58 p.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. de. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 126, n.1, p. 251-265, 2008.

SCHEMBRI, M.A.; NEILAN, B.A.; SAINT, C.P. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, Malden, v. 16, p. 413-421, 2001.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5485-5492, 2004.

SEENAYA, G.; RAJU, S.N. On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under genus *Anabaenopsis*. In: DESIKACHARY, T.V. **Taxonomy and biology of blue-green algae**. Chennai: University of Madras, Centre for Advanced Study in Botany, 1972. p. 52-57.

SILVA, D.F.; SILVA, D.F.; SOUSA, F.A.S. Degradação ambiental, ocupação irregular e manejo sustentável no complexo estuarino-lagunar Mundaú/Manguaba, Estado de Alagoas (AL). **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 3, p. 152-170, 2008.

SILVA-STENICO, M.E.; CANTÚSIO NETO, R.; ALVES, I.R.; MORAES, L.A.B.; SHISHIDO, T.K.; FIORE, M.F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, p. 535-542, 2009.

SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, Jena, v. 166, p. 161-175, 2011.

SINGH, R.K.; TIWARI, S.P.; RAI, A.K.; MOHAPATRA, T.M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, p. 1-22, 2011.

SIQUEIRA, D.B.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v. 3, n. 1, p. 109-127, 2005.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. 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. 41-111.

SIVONEN, K.; SKULBERG, O.M.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; RINEHART, K.L. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. **Toxicon**, Oxford, v. 30, p. 1465-1471, 1992.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; CODD, G.A.; SKULBERG, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: FALCONER, I.R. (Ed.). **Algal toxins in seafood and drinking water**. London: Academic Press, 1993. p. 145-164.

SOARES, R.M. Toxicologia de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 259-271, 2009.

SOTERO-SANTOS, R.B.; CARVALHO, E.G.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; ROCHA, O. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 7, p. 590-598, 2008.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

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.

TINGRE, S.G.; RUBIN, E.M. Metagenomics: DNA sequecing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, p. 805-814, 2005.

TORGAN, L.C.; GARCIA, M. Novas ocorrências (Cyanophyta e Chlorophyta) para a ficoflora planctônica do Rio Grande do Sul. **Hoehnea**, São Paulo, v. 16, p. 57-64, 1989.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology and Waters Quality**, New Jersey, v. 12, p. 265-271, 1997.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C.L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, p. 97-112, 2003.

VETRIANI, C.; JANNASCH, H.W.; MACGREGOR, B.J.; STAHL, D.A.; REYSENBACH, A.L. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4375-4384, 1999.

WANG, J.; SALATA, J.J.; BENNETT, P.B. Saxitoxin Is a Gating Modifier of hERG K⁺ channels. **The Journal of General Physiology**, New York, v. 121, p. 583–598, 2003.

WATANABE, M. Studies on planktonic blue-green algae 5. A new species of *Cylindrospermopsis* (Nostocaceae) from Japan. **National Science Museum**, Tokyo, v. 21, n. 2, p. 45-48, 1995.

WATANABE, M.F.; OISHI, S. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1342-1344, 1985.

WELKER, M.; ERHARD, M. Consistency between chemotyping of single filaments of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) by MALDI-TOF and the peptide patterns of strains determined by HPLC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Malden, v. 48, p. 1062-1068, 2007.

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

WELKER, M.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. **Environmental Toxicology**, Malden, v. 17, p. 367-374, 2002.

WELKER, M.; MARSÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L.; VON DÖHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, New York, v. 27, p. 2090-2103, 2006.

WELKER, M.; BRUNKE, M.; PREUSSEL, K.; LIPPERT, I.; VON DÖHREN, H. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single colony mass spectrometry. **Microbiology SGM**, Berks, v. 150, p. 1785-1796, 2004.

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

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima Editora, 2006. 464 p.

ZHANG, W.; KI, J.S.; QIAN, P.Y. Microbial diversity in polluted harbor sediments I: Bacterial community assessment based on four clone libraries of 16S rDNA. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 76, p. 668-681, 2008.

ZWEIGENBAUM, J.A.; HENION, J.D.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A.; POON, G.K. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 23, p. 723-733, 2000.

ANEXO

Comparação das sequências obtidas através da construção de bibliotecas genômicas de 4 lagoas do Estado de São Paulo àquelas depositadas no banco de dados GenBank

(continua)

Amostra	Organismos mais próximos no GenBank	N. acesso	Cobertura (%)	Identidade (%)
ESALQ1-1	Uncultured cyanobacterium	FN646732	85	97
ESALQ1-2	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	GQ859604	81	99
ESALQ1-3	Uncultured cyanobacterium	GU323640	85	94
ESALQ1-4	Uncultured cyanobacterium	FN646732	81	92
ESALQ1-5	Uncultured cyanobacterium	FN646732	83	98
ESALQ1-6	Uncultured cyanobacterium	FN646732	83	100
ESALQ1-7	<i>Woronichinia naegeliana</i>	AJ781043	83	95
ESALQ1-8	Uncultured cyanobacterium	FJ204852	84	97
ESALQ1-9	Uncultured cyanobacterium	FN646732	85	98
ESALQ1-10	<i>Synechococcus</i> sp.	GQ130155	83	98
ESALQ1-11	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	GQ859604	84	99
ESALQ1-12	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	GQ859604	82	99
ESALQ1-13	<i>Synechococcus</i> sp.	GQ130155	84	96
ESALQ1-14	<i>Woronichinia naegeliana</i>	AJ781043	81	98
ESALQ1-15	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	84	97
ESALQ1-16	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448062	84	98
ESALQ1-17	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	84	99
ESALQ1-18	Uncultured cyanobacterium	FN646732	82	99
ESALQ1-19	Uncultured cyanobacterium	GQ422943	84	97
ESALQ1-20	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	79	98
ESALQ1-21	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	85	97
ESALQ1-22	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	79	79
ESALQ1-23	<i>Limnococcus limneticus</i>	GQ375048	83	99
ESALQ1-24	Uncultured cyanobacterium	GQ422943	84	97
ESALQ1-25	Uncultured cyanobacterium	FN646732	82	98
ESALQ1-26	Uncultured cyanobacterium	FN646732	74	99
ESALQ1-27	<i>Synechococcus</i> sp.	GQ130155	83	99
ESALQ1-28	Uncultured cyanobacterium	FN646732	82	98
ESALQ1-29	Uncultured cyanobacterium	DQ398202	70	99
ESALQ1-30	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	82	91
ESALQ1-31	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	GQ859604	80	91
ESALQ1-32	Uncultured cyanobacterium	FJ204852	81	98
ESALQ1-33	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	82	97
ESALQ1-34	<i>Anabaena aphanizomenoides</i>	FJ830569	83	96
ESALQ1-35	Uncultured cyanobacterium	DQ398329	76	97
ESALQ1-36	Uncultured cyanobacterium	FN646732	78	96
ESALQ1-37	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	83	98
ESALQ1-38	<i>Synechococcus</i> sp.	GQ130155	82	96
ESALQ1-39	<i>Synechocystis</i> sp.	FM177504	83	93
ESALQ1-40	Uncultured cyanobacterium	GQ422943	75	98
ESALQ1-41	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	81	96
ESALQ1-42	<i>Woronichinia naegeliana</i>	AJ781043	82	97
ESALQ1-43	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	82	99
ESALQ1-44	Uncultured cyanobacterium	GQ422943	81	97
ESALQ1-45	Uncultured cyanobacterium	FN646732	75	98
ESALQ1-46	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	73	85
ESALQ1-47	<i>Synechococcus</i> sp.	AF448066	81	98

Comparação das sequências obtidas através da construção de bibliotecas genômicas de 4 lagoas do Estado de São Paulo àquelas depositadas no banco de dados GenBank

Amostra	Organismos mais próximos no GenBank	N. acesso	Cobertura (%)	(continuação)
				Identidade (%)
ESALQ1-48	<i>Cylindrospermopsis curvispora</i>	GQ859604	83	99
ESALQ1-49	Uncultured cyanobacterium	FJ204852	82	97
ESALQ1-50	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	78	96
ESALQ1-51	Uncultured cyanobacterium	FJ204852	73	92
ESALQ1-54	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	78	88
ESALQ1-55	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	81	95
ESALQ1-56	<i>Woronichinia naegeliana</i>	DQ264221	69	96
ESALQ1-57	Uncultured cyanobacterium	FJ774055	81	97
ESALQ1-58	Uncultured Plectonema sp.	GU074273	81	98
ESALQ1-59	Uncultured cyanobacterium	FN646732	79	97
ESALQ2-1	<i>Pseudanabaena</i> sp.	FM877958	26	97
ESALQ2-2	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	80	99
ESALQ2-3	Uncultured cyanobacterium	AY942895	81	92
ESALQ2-4	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
ESALQ2-5	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	99
ESALQ2-6	<i>Microcystis viridis</i>	HM854735	83	98
ESALQ2-7	<i>Anabaena</i> sp.	GU186905	81	98
ESALQ2-8	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	98
ESALQ2-9	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	99
ESALQ2-10	<i>Microcystis viridis</i>	HM854734	81	98
ESALQ2-11	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
ESALQ2-12	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	84	99
ESALQ2-13	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
ESALQ2-14	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	100
ESALQ2-15	Uncultured cyanobacterium	AY942895	84	99
ESALQ2-16	<i>Microcystis</i> sp.	EU015868	82	84
ESALQ2-17	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
ESALQ2-18	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
ESALQ2-19	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
ESALQ2-20	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99
ESALQ2-21	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	77	94
ESALQ2-22	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	85	100
ESALQ2-23	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
ESALQ2-24	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	100
ESALQ2-25	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	100
ESALQ2-26	Uncultured cyanobacterium	AY942895	82	99
ESALQ2-27	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	84	99
ESALQ2-28	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	80	100
ESALQ2-29	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
ESALQ2-30	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
ESALQ2-31	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	68	98
ESALQ2-32	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	79	99
ESALQ2-33	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	80	99
ESALQ2-34	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	80	100
ESALQ2-35	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	79	98
ESALQ2-36	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	79	95
ESALQ2-37	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	80	99
ESALQ2-38	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	99
ESALQ2-39	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
ESALQ2-40	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	79	95

Comparação das sequências obtidas através da construção de bibliotecas genômicas de 4 lagoas do Estado de São Paulo àquelas depositadas no banco de dados GenBank

Amostra	Organismos mais próximos no GenBank	N. acesso	Cobertura (%)	(continuação)
				Identidade (%)
ESALQ2-41	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	100
ESALQ2-42	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	100
ESALQ2-43	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	80	99
ESALQ2-44	<i>Microcystis wesenbergii</i>	AJ271679	79	98
ESALQ2-45	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
ESALQ2-46	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	100
ESALQ2-47	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
ESALQ2-48	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	99
ESALQ2-49	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	100
ESALQ2-50	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	99
ESALQ2-51	<i>Nostoc linckia</i>	AB325907	78	82
ESALQ2-52	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
ESALQ2-53	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
ESALQ2-54	<i>Microcystis</i> sp.	EF634466	78	87
ESALQ2-55	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	80	99
ESALQ2-56	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
ESALQ2-57	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	100
Limeira 1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	100
Limeira 2	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	FJ828428	77	86
Limeira 3	<i>Brasilonema roberti</i>	GQ443308	84	98
Limeira 4	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 5	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	100
Limeira 6	<i>Pseudanabaena mucicola</i>	GQ859644	26	95
Limeira 7	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 8	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	98
Limeira 9	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 10	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99
Limeira 11	<i>Brasilonema roberti</i>	GQ443308	84	98
Limeira 12	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	DQ531900	82	99
Limeira 13	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	100
Limeira 14	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 15	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
Limeira 16	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99
Limeira 17	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	97
Limeira 18	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99
Limeira 19	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	98
Limeira 20	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 21	<i>Pseudanabaena</i> sp.	AM259268	83	99
Limeira 22	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
Limeira 23	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	98
Limeira 24	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 25	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	98
Limeira 26	<i>Pseudanabaena</i> sp.	AM259268	79	99
Limeira 27	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
Limeira 28	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	79	98
Limeira 29	<i>Microcystis wesenbergii</i>	AJ271679	81	100
Limeira 30	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	GQ848178	82	99
Limeira 31	<i>Brasilonema roberti-lammi</i>	GQ443308	83	98
Limeira 32	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
Limeira 33	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99

Comparação das sequências obtidas através da construção de bibliotecas genômicas de 4 lagoas do Estado de São Paulo àquelas depositadas no banco de dados GenBank

Amostra	Organismos mais próximos no GenBank	N. acesso	Cobertura (%)	(continuação)
				Identidade (%)
Limeira 34	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
Limeira 35	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	75	95
Limeira 36	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 37	<i>Microcystis panniformis</i>	EU541974	67	91
Limeira 38	<i>Pseudanabaena</i> sp.	FM877958	57	97
Limeira 39	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	79	98
Limeira 40	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	80	98
Limeira 41	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
Limeira 42	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	79	100
Limeira 43	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	78	100
Limeira 44	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	100
Limeira 45	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	100
Limeira 46	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 47	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	97
Limeira 48	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 49	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 50	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99
Limeira 51	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	75	94
Limeira 52	<i>Microcystis wesenbergii</i>	AJ271679	79	97
Limeira 53	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Limeira 54	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	FJ828428	68	86
Limeira 55	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
Limeira 56	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
Limeira 57	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	81	99
Taquaral 1	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496080	84	99
Taquaral 2	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
Taquaral 3	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99
Taquaral 4	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	AY711661	80	95
Taquaral 5	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	AY942896	82	98
Taquaral 6	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	84	100
Taquaral 7	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	78	92
Taquaral 8	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	84	95
Taquaral 9	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	84	98
Taquaral 10	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	85	99
Taquaral 11	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	84	100
Taquaral 12	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496079	84	95
Taquaral 13	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	85	99
Taquaral 14	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	HQ386609	83	99
Taquaral 15	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	100
Taquaral 16	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	84	95
Taquaral 17	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	100
Taquaral 18	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	100
Taquaral 19	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496080	84	98
Taquaral 20	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	84	100
Taquaral 21	<i>Microcystis aeruginosa</i>	EF121241	87	95
Taquaral 22	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	99
Taquaral 23	<i>Uncultured cyanobacterium</i>	HQ386609	83	99
Taquaral 24	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496080	81	98
Taquaral 25	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	84	100
Taquaral 26	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	84	99

Comparação das sequências obtidas através da construção de bibliotecas genômicas de 4 lagoas do Estado de São Paulo àquelas depositadas no banco de dados GenBank

Amostra	Organismos mais próximos no GenBank	N. acesso	Cobertura (%)	(conclusão)
				Identidade (%)
Taquaral 27	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	98
Taquaral 28	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	78	98
Taquaral 29	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	82	99
Taquaral 30	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	83	100
Taquaral 31	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	84	94
Taquaral 32	Uncultured cyanobacterium	HQ386610	83	98
Taquaral 33	Uncultured cyanobacterium	HQ386610	83	93
Taquaral 34	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	91
Taquaral 35	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
Taquaral 36	<i>Microcystis smithii</i>	GQ496080	83	99
Taquaral 37	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	74	97
Taquaral 38	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	96
Taquaral 39	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	80	97
Taquaral 40	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
Taquaral 41	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
Taquaral 42	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	52	100
Taquaral 43	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	98
Taquaral 44	Uncultured cyanobacterium	GQ848178	83	99
Taquaral 45	Uncultured cyanobacterium	GQ848178	82	99
Taquaral 46	Uncultured cyanobacterium	HQ386610	81	96
Taquaral 47	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	80	97
Taquaral 48	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	99
Taquaral 49	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	98
Taquaral 50	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	80	99
Taquaral 51	Uncultured cyanobacterium	HQ386610	82	99
Taquaral 52	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	78	99
Taquaral 53	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	83	99
Taquaral 54	Uncultured cyanobacterium	HQ386610	81	99
Taquaral 55	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	98
Taquaral 56	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	82	99
Taquaral 57	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	80	99
Taquaral 58	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	99
Taquaral 59	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854736	75	88
Taquaral 60	<i>Microcystis aeruginosa</i>	HM854730	81	99