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

**Cianobactérias e cianotoxinas em Áreas Recreacionais do Reservatório de
Salto Grande, Americana – SP**

Andresa Maíra da Fonseca

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

**Piracicaba
2014**

Andresa Maíra da Fonseca
Licenciada em Ciências Biológicas

**Cianobactérias e cianotoxinas em Áreas Recreacionais do Reservatório de Salto Grande,
Americana – SP**

Orientador:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

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

Piracicaba
2014

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

Fonseca, Andresa Máira da
Cianobactérias e cianotoxinas em Áreas Recreacionais do Reservatório de Salto Grande,
Americana – SP / Andresa Máira da Fonseca. - - Piracicaba, 2014.
112 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Cianobactérias 2. Cianotoxinas 3. Reservatórios 4. Filogenia 5. Espectrometria de
massas I. Título

CDD 589.46
F676c

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

Aos meus pais, Ana e Welinton, pelo exemplo de simplicidade, de luta na vida e pelo amor incondicional....

Dedico

“No meio da confusão, encontre a simplicidade.

A partir da discórdia, encontre a harmonia.

No meio da dificuldade reside a oportunidade.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Cada fase da vida vem recheada de boas surpresas e desafios. Agradeço primeiramente a Deus: pelos desafios, pois são eles que nos mantêm fortes e nos permitem evoluir e pelas boas surpresas pois são elas que nos mantêm humanos e com coragem de prosseguir. Nesse percurso, muitas pessoas são dignas de agradecimento.

Agradeço à Professora Dra. Marli de Fátima Fiore pela oportunidade e orientação. À ESALQ e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos e acolhimento. À todos os professores que direta ou indiretamente contribuíram para meu aprendizado durante este período, seja em aulas, palestras ou mesmo escrevendo um ótimo artigo que serviu de inspiração. No que concerne a estas pessoas, um agradecimento especial ao Professor Fernando Andreote, que sempre se mostrou disposto a ajudar, discutir, aprender e ensinar e as professoras Célia Sant'Anna e Andréa Tucci pela acolhida no IBot e toda a ajuda na identificação morfológica e contagem de células. Ao pós-Doc Felipe Dörr pelas análises químicas.

À CAPES um enorme agradecimento pela concessão da bolsa de mestrado e ao CENA por permitir este câmbio de alunos entre si e a ESALQ. Falando em ESALQ, agradeço a primeira pessoa que conheci nesse lugar, a “bunita” Jujuba, que me apoiou durante todo esse período, chorou e riu comigo, uma amizade que espero ser pra vida toda. Aos colegas de laboratório de forma geral, agradeço à todos pela amizade e companheirismo, sem isto o trabalho não teria sido possível. Carol Pamps e Estela, por tantos momentos bons e serem exemplos vivos de que tudo acontece na hora certa. À Janaína pela ajuda com a escrita da dissertação e pelo conhecimento compartilhado. À Mári pelas ótimas tiradas e a Bruna pelas conversas. À Pati, agradeço por “segurar minha mão” nos primeiros passos dentro da Biologia Molecular e pelo companheirismo. À menina Elaine, agradeço por mostrar que a bondade ainda é uma característica possível e por me passar tantos ótimos artigos! À Ana

Paula por ter me “apadrinhado” e salvo meu projeto e pela amizade nessa etapa final. Ao Diego e Marcelo pelo conhecimento gigantesco compartilhado, ensinado, pelos bons momentos nos cafés e nos barzinhos, e ao Marcelo por toda a imensa ajuda com a redação deste documento. Ao Danillo por toda a paciência e dedicação a pesquisa, que serve de inspiração e pelos excelentes momentos de comilança. À guria Karina por alegrar o ambiente com sua presença, pelas discussões teóricas e amizade. À Talita pela simplicidade, simpatia, confiança e pela imensa amizade - somos quase irmãs! À Gaby por compartilhar de tantas aflições e pelo carinho. À Carol Hoff pela gigantesca amizade e por ser alguém em quem se pode confiar, isso não têm preço.

Agradeço também a Ana Carolina e ao Fabrício pela primeira acolhida em Piracicaba e por sempre estarem dispostas a ajudar. Ao Bruno, pela companhia e apoio durante a realização deste estudo.

No quesito familiar, não há palavras para descrever tamanha a gratidão aos meus pais, por terem sempre acreditado em mim e estado comigo nos momentos bons, ruins, decisivos, festivos ou mesmo sem motivo algum. Aos demais familiares pelo apoio, amor e tocida, mesmo sem entenderem o que eu estava fazendo. Também agradeço aos amigos que se mantiveram presentes nessa jornada, seja pela internet, aos finais de semana, ou pelo telefone; um agradecimento especial ao Caio, a Biscoito, a Tati, a Daiane e a Bah.

À todos vocês, meu muito obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Aspectos gerais das cianobactérias	21
2.2 Síntese Não-Ribossômica	24
2.3 Cilindrospermopsina	25
2.4 Saxitoxina	30
2.5 Microcistina	34
2.6 O Reservatório de Salto Grande	38
2.7 Monitoramento de cianobactérias em reservatórios	39
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Coletas	43
4.2 Análises Quantitativas	44
4.3 Análises moleculares	45
4.3.1 Extração de DNA, amplificação de genes-alvo por PCR e sequenciamento	45
4.3.2 Clonagem e transformação dos produtos da PCR	48
4.3.3 Sequenciamento dos genes da CYN, STX e MCY	50
4.3.4 Processamento das amostras e análises filogenéticas	50
4.4 Análises químicas de CYN, STX e MCY	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Coletas e Análises Quantitativas	55
5.2 Análises moleculares e potencial genético para produção de cianotoxinas	60
5.3 Análises Químicas	69
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	95

RESUMO

Cianobactérias e cianotoxinas em Áreas Recreacionais do Reservatório de Salto Grande, Americana – SP

As cianobactérias produzem substâncias tóxicas que são conhecidas como cianotoxinas. Inúmeros casos de intoxicações em humanos e animais têm sido reportados nos mais diversos países. Várias cianobactérias tóxicas são planctônicas e desenvolvem-se em ambientes de água doce formando florações intensas sob condições favoráveis. Florações de cianobactérias têm sido observadas durante todo o ano no reservatório Salto Grande (Americana, SP) que possui intenso uso recreacional, além de servir para abastecimento público de água, pesca e irrigação de culturas. Portanto, avaliar a comunidade de cianobactérias e identificar a presença de genes de cianotoxinas, bem como detectar a produção de toxinas em florações do reservatório de Salto Grande é de fundamental importância para os órgãos de saúde pública para permitir a utilização segura desses corpos d'água. Neste estudo, três amostras de água com florações de cianobactérias foram analisadas, as quais foram coletadas em diferentes períodos, em dois locais com intenso uso recreacional. As investigações sob microscópio óptico das amostras preservadas com solução de lugol identificaram quinze gêneros cianobacterianos, sendo dois deles até então desconhecidos para o local (*Plantothrix* e *Komvophorum*). As contagens de células usando a técnica de Utermöhl realizadas para duas das amostras de água mostraram valores que excedem os recomendados pela Portaria Nº 2914 do Ministério da Saúde, a qual estabelece análises e coletas semanais da água acima de 20.000 células/mL. O potencial genético para produção das toxinas cilindrospermopsina, saxitoxina e microcistina foi avaliado a partir da extração do DNA genômico total das amostras ambientais e observou-se amplificação por PCR dos genes *cyrJ*, *sxtA*, *sxtI*, *mcyE* e *mcyG*. Os produtos da PCR foram sequenciados e as análises filogenéticas das sequências de aminoácidos mostraram que elas se agruparam com sequências homólogas de cianobactérias conhecidas como produtoras das respectivas toxinas. No entanto, as análises químicas de LC-MS/MS das amostras ambientais buscando as três referidas toxinas detectaram a presença somente de microcistina. As variantes de microcistinas encontradas foram as MC-LR e MC-RR. Os resultados deste estudo contribuem para o aumento de informações sobre o reservatório Salto Grande, e mais uma vez alertam para a preocupante situação deste reservatório em relação à saúde pública.

Palavras-chave: Cianobactérias; Cianotoxinas; Reservatórios; Filogenia; Espectrometria de massas

ABSTRACT

Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Areas of the Salto Grande Reservoir, Americana – SP

Cyanobacteria produce toxic substances which are known as cyanotoxins. Numerous cases of poisoning in humans and animals have been reported in several countries. Several toxic cyanobacteria are planktonic and develop in freshwater environments forming intense blooms under favorable conditions. Cyanobacterial blooms have been observed throughout the year in the Salto Grande reservoir (Americana, SP) that has intense recreational use, besides serves to public water supply, fisheries and crop irrigation. Therefore, evaluate cyanobacterial community and identify the presence of cyanotoxin genes as well as assess the production of toxins in blooms from the Salto Grande reservoir is of fundamental importance to public health agencies to allow safe uses of these water bodies. In this study, three water samples with cyanobacterial bloom were analyzed, which were collected at different periods, in two locations with intense recreational use. Investigations under optical microscope of the samples preserved with Lugol's iodine solution identified fifteen cyanobacterial genera, being two of them hitherto unknown to the location (*Plantothrix* and *Komvophorum*). Cell counts using the Utermöhl technique performed for two water samples showed values exceeding those recommended by the Regulation N° 2.914 of the Brazilian Ministry of Health, which establish weekly analyzes and sampling of water above 20,000 cells/mL. The genetic potential for production of the toxins cylindrospermopsin, saxitoxin and microcystin was evaluated using total genomic DNA from the environment samples and it was observed PCR amplification of the genes *cyrJ*, *sxtA*, *sxtI*, *mcyE* and *mcyG*. The PCR products were sequenced and phylogenetic analyses of amino acid sequences showed that they grouped with homologous sequences of known cyanobacterial producers of the respective toxins. However, the chemical analyzes of LC-MS/MS of the environmental samples searching for the three referred toxins detected only the presence of microcystin. The microcystin variants found were MC-LR and MC-RR. The results of this study contribute to the increase of information on the Salto Grande reservoir, and once again warning to the alarming situation of this reservoir related to public health.

Keywords: Cyanobacteria; Cyanotoxins; Reservoirs; Phylogeny; Mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Microscopia óptica mostrando a morfologia de linhagens produtoras de cianotoxinas. A-B) Morfologia dos tricomas, das células vegetativas e dos heterócitos de linhagens de *C. raciborskii* CYP-011K, produtora de CYN; C) Morfologia da linhagem *C. raciborskii* T3, produtora de STX; D) Morfologia da linhagem *M. aeruginosa*, produtora de MCY.....21
- Figura 2 - Estrutura da cilindrospermopsina (CYN) e suas variantes naturais (MAZMOUZ et al., 2010).....27
- Figura 3 - Via biossintética da cilindrospermopsina (adaptado de MIHALI et al., 2008).28
- Figura 4 - Estrutura da molécula de saxitoxina (Adaptado de KELLMANN; NEILAN, 2007)..... 31
- Figura 5 - Via biossintética da saxitoxina (adaptado de KELLMANN; MIHALI; NEILAN et al, 2008).....32
- Figura 6 - Estrutura da MCY. Os aminoácidos (X e Z) e o grupo R1 (em cinza) são variáveis conforme tabela à direita. Os sete aminoácidos que formam a molécula de MCY (heptapeptídeos cíclicos) estão numerados de 1 a 7 (adaptado de TANABE et al.,2009).....36
- Figura 7 - Etapas realizadas na biossíntese do aminoácido Adda e estrutura de domínios prevista para McyG, McyD e McyE. Os círculos representam domínios enzimáticos de PKS e os retângulos, de NRPS. Os triângulos invertidos representam as moléculas finalizadoras, McyJ e McyF. AMT se refere ao domínio de aminotransferase. KS, β -cetoacil sintase; AT, aciltransferase; ACP, proteína carreadora de acila; KR, cetoacil redutase; DH, desidratase; CM, C-metiltransferase; OM, O-metiltransferase; A, adenilação aminoacila; C, condensação; RC, racemase. A região de tiolação no módulo NRPS é ilustrada em preto (Adaptado de TILLET et al., 2000).....37
- Figura 8 - Mapa das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo, com destaque para a Unidade 5, na qual pertence o reservatório cujas amostras foram utilizadas neste estudo. (Disponível em <www.sigrh.sp.gov.br> Acesso em 31 de janeiro de 2013).....39

Figura 9 -	Reservatório de Salto Grande com os Pontos da Coleta referenciados (Disponível em <maps.google.br> Acesso em março de 2013.....	44
Figura 10-	Micrografias das cianobactérias coletadas no Ponto 1 (1ª e 2ª Coletas) do Reservatório de Salto Grande, Americana/SP. A) <i>Microcystis aeruginosa</i> , B) <i>Coelosphaerium</i> , C) Colônia de <i>Microcystis panniformis</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i> (seta) – destaque para a diferença no tamanho das células, D) <i>Dolichospermum</i> , E) <i>Planktothrix agardhii</i> (seta), F) <i>Dolichospermum</i> (seta 1) e <i>Microcystis aeruginosa</i> (seta 2), G) <i>Dolichospermum</i> e H) <i>Microcystis aeruginosa</i>	59
Figura 11-	Micrografias das cianobactérias coletadas no Ponto 2 do Reservatório de Salto Grande, Americana/SP. A) <i>Pseudanabaena mucicola</i> , B) <i>Dolichospermum</i> , C) <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Pseudanabaena mucicola</i> e D) <i>Microcystis panniformis</i>	60
Figura 12 -	Árvore filogenética de sequências de aminoácidos CyrJ. A sequência obtida neste estudo, a partir do DNA obtido no ponto 1 está realçada em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises ML/NJ estão apresentados em cada nó.....	62
Figura 13 -	Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Sxt. O DNA ambiental utilizado neste estudo está em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises ML/NJ estão apresentados em cada nó.(A) SxtA; (B) SxtI.....	64
Figura 14 -	Árvores filogenéticas de sequências de aminoácidos Mcy. O DNA ambiental utilizado neste estudo está em negrito, correspondendo ao número da coleta. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises ML/NJ estão apresentados em cada nó. A) McyE; B) McyG.....	67
Figura 15 –	Cromatogramas de LC-MS/MS para análise de CYN; (A) Padrão de CYN com as transições 416>176 e 416>194; (B) Perfil cromatográfico para amostra do Ponto 2.....	70
Figura 16 –	Cromatogramas de HILIC-FD para análise de STX; (A) MIX de padrões GTX1e4, GTX2e3, dcGTX2e3, NEO, STX e dcSTX; (B) Amostra do Ponto 1 (1ª Coleta); (C) Amostra do Ponto 1 (2ª Coleta); (D) Amostra do Ponto 2.....	71

- Figura 17 – Cromatogramas referentes a Primeira Coleta A) Mix de padrões (MCRR, MCYR, MCLR e MCLA, na ordem de eluição), B) Espectro MS2 da RR, C) Espectro MS2 da MCYR, D) Espectro de MS2 da MCLR, E) Espectro de MS2 da MCLA, F) Cromatograma da Amostra do ponto 1 (1ª coleta) e G) Espectro de MS2 decomposto aos 15,5 minutos (o qual não corresponde a MCLR, nem outra variante).....72/73
- Figura 18 – Cromatogramas de LC-MS para varredura de íons precursores de m/z 135; (A) padrões de MC-RR, MC-YR, MC-LR E MC-LA (na ordem de eluição); (B) e (C) cromatogramas referentes ao Ponto 1 (2ª Coleta); (D) cromatograma para transição 995>135 (MC-LR); (E) cromatograma para transição 520>135 (MC-RR).....74
- Figura 19 – Resultados obtidos para amostra do ponto 2; (A) Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 no intervalo de m/z 450 a 600 (possíveis microcistinas na forma $[M+2H]^{2+}$); (B) Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 no intervalo de m/z 800 a 1400 (possíveis microcistinas na forma $[M+H]^+$); (C) Espectro de massas demonstrando a presença de MC-RR; (D) Espectro de massas demonstrando a presença de MC-LR.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes envolvidos na biossíntese de cilindrospermopsina, saxitoxina e microcistina.....	47
Tabela 2 - Reagentes utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse.....	48
Tabela 3 - Ciclagem das reações de amplificação por PCR dos fragmentos gênicos	48
Tabela 4 – Táxons identificados para o Ponto 1 (1ª e 2ª Coleta) e Ponto 2 e dados da contagem de células para Ponto 1 (2ª Coleta) e Ponto 2.....	56
Tabela 5 - Resultados dos testes de amplificação por PCR para os genes <i>cyrB</i> , <i>cyrJ</i> , <i>sxtA</i> , <i>sxtI</i> , <i>mcyE</i> e <i>mcyG</i> , nas diferentes coletas.....	60
Tabela 6 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos CyrJ obtidos a partir de amostras da primeira coleta, em relação a sequências de linhagens de cianobactérias produtoras e não produtoras de CYN.....	62
Tabela 7 – Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Sxt das coletas no Ponto1 (1ª e 2ª) com sequências homólogas de linhagens produtoras de SXT. (A) SxtA; (B) SxtI.....	65
Tabela 8 – Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Mcy de todas as coletas com sequências homólogas de linhagens produtoras de MCY e possível produtora de microginina. (A) McyE; (B) McyG.....	68
Tabela 9 – Presença de cianotoxinas nas coletas dos Pontos 1 (coleta 1 e 2) e Ponto 2, analisados através da técnica de LC-MS/MS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias são bactérias gram-negativas com uma longa história evolutiva no planeta. Registros fósseis de estromatólitos mostram a presença de organismos com morfologia semelhante à cianobactérias com até 3,5 bilhões de anos atrás na Austrália (SCHOPF, 2007). São também erroneamente chamadas de microalgas e/ou algas, por realizarem fotossíntese oxigênica, e, algas azuis ou cianofíceas, pela presença de ficocianina, um pigmento que, em grande quantidade, dá uma coloração azulada às mesmas (WHITTON; POTTS, 2002).

As cianobactérias têm distribuição cosmopolita, sendo encontradas em ambientes de água doce, mares, desertos, geleiras, entre outros (CASTENHOLZ, 2001). Uma das grandes preocupações, no que concerne à estas bactérias, está relacionada à produção de alguns metabólitos secundários produzidos pelas mesmas, conhecidos como cianotoxinas. Estas podem ter um efeito tóxico para o homem e outros animais, mesmo em pequenas concentrações. Apesar de existirem especulações com relação à função biológica destes metabólitos, ainda nenhuma conclusão foi obtida sobre seu real papel no metabolismo destes organismos. Estas toxinas apresentam diferentes estruturas químicas com efeitos diversos (dermatotóxicos, citotóxicos, hepatotóxicos, neurotóxicos, potencialmente carcinogênico e letal), assim, nas últimas décadas essas moléculas têm sido alvo de muitos estudos. A maioria das cianotoxinas são biossintetizadas por uma via alternativa, a chamada síntese não ribossômica (item 2.2). Este tipo de biossíntese pode utilizar outros substratos além dos aminoácidos na montagem da molécula e é catalisada por complexos multienzimáticos (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013).

A excessiva carga de nutrientes e o aumento de temperatura parecem estar diretamente ligados à taxa de crescimento das cianobactérias em ambientes aquáticos (KOSTEN et al., 2012). Além disso, o pH, a intensidade luminosa, a profundidade do reservatório e a concentração de nitrogênio e fósforo, também são fatores que influenciam a dinâmica das populações de cianobactérias (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006). Em condições ambientais favoráveis pode ocorrer a proliferação exorbitante das cianobactérias, evento conhecido como floração e que fez com que elas se destacassem no cenário de saúde pública mundial. Além do potencial para produção de toxinas, as florações podem acarretar um impacto negativo sobre os corpos d'água por causar a alteração de seu odor e sabor e, conseqüentemente, dos peixes e outros animais. Isso se deve à produção de outros metabólitos, conhecidos como geosmina e MIB (metilisoborneol) (ZAGATTO; ARAGAO; CARVALHO, 1997; BRUNSON; LUTZ; DURBOROW, 1994).

Neste sentido, conhecer as espécies de cianobactérias que cada reservatório de água de abastecimento público possui, bem como seu potencial tóxico, é de fundamental importância para os órgãos de saúde pública e para a tomada de decisões pelos mesmos. Apesar de vários levantamentos já terem sido realizados no Reservatório de Salto Grande, cada estudo nos mostra um dado novo e interessante, o que reafirma a importância da continuidade das pesquisas acadêmicas no cenário brasileiro para a obtenção de dados úteis ao sistema gestor. Este estudo é mais uma contribuição sobre as espécies cianobacterianas presentes neste reservatório e seu potencial tóxico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais das cianobactérias

As cianobactérias apresentam uma distribuição cosmopolita, a qual pode ser atribuída a algumas características morfológicas e fisiológicas relacionadas à sua longa jornada evolutiva. A tolerância a baixas concentrações de oxigênio, a capacidade de alguns grupos utilizarem H_2S como doador de elétrons ao invés da água para a realização da fotossíntese e a tolerância a altos níveis de radiação ultravioleta-B e -C são alguns dos atributos que podem ter favorecido o sucesso adaptativo destes organismos (WHITTON; POTTS, 2002). Pode-se destacar ainda a capacidade de viver com pouca luz, bem como uma cinética efetiva na captação de nutrientes em ambientes onde os mesmos são escassos como fatores que podem ter favorecido o domínio das picocianobactérias (células solitárias e componentes majoritários de fitoplâncton autotrófico) em oceanos oligotróficos (PAERL, 1988) e grandes lagos (STOCKNER; CALLIERI; CRONBERG, 2002).

Cianobactérias podem ser unicelulares ou filamentosas, de vida livre ou coloniais, os filamentos podem ser simples ou conter ramificações. Elas também podem apresentar células diferenciadas como, por exemplo, heterócito (onde ocorre a fixação do nitrogênio) (FIORE; HONDA, 2008) e acineto (célula de resistência), bem como estruturas especializadas (aerótopos, grânulos) em seu conteúdo celular, o que demonstra sua grande plasticidade fenotípica (Figura 1).

Figura 1 - Microscopia óptica mostrando a morfologia de linhagens produtoras de cianotoxinas. A-B) Morfologia dos tricomas, das células vegetativas e dos heterócitos de linhagens de *C. raciborskii* CYP-011K, produtora de CYN; C) Morfologia da linhagem *C. raciborskii* T3, produtora de STX; D) Morfologia da linhagem *M. aeruginosa* SPC777, produtora de MCY

Os aerótopos auxiliam na flutuabilidade da célula em corpos d'água, permitindo sua migração vertical na coluna d'água em direção à luz para realização da fotossíntese (WALSBY, 1994). Algumas cianobactérias planctônicas têm a capacidade de crescer em corpos-d'água com alta turbidez e armazenar fósforo (CHORUS; BARTRAM, 1999), elemento que em altas concentrações beneficia as cianobactérias. Com o aumento da sua concentração, várias espécies do fitoplâncton conseguem se reproduzir e aumentam sua densidade, turvando a água; esse escurecimento faz com que apenas organismos que consigam sobreviver com baixa luz, como é o caso das cianobactérias, tenham sucesso adaptativo (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Quando em condições ótimas de crescimento – temperatura da água entre 15 e 30 °C, ventos de baixa intensidade, pH entre neutro e alcalino e alta concentração de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio – as cianobactérias são visíveis a olho nu, fenômeno conhecido como floração (SAR; FERRARIO; REGUERA, 2002). Segundo Yunes (2008), as florações ocorrem quando o número de células excede 10.000 por mL. As florações apresentam um grande impacto econômico, social e ambiental afetando toda a biota aquática, desde o zooplâncton até peixes e macrófitas. Há relatos da morte de peixes associadas à falta de oxigênio na água após a ocorrência de florações (SEVRIN-REYSSAC; PLETIKOSIC, 1990).

No entanto, a maior preocupação no que diz respeito às cianobactérias em corpos d'água não são as florações em si, mas sim a capacidade que algumas espécies têm de produzir metabólitos secundários tóxicos. Existem estudos que indicam que na mesma floração, pode haver tanto linhagens produtoras de toxinas como não produtoras, sendo que, até o presente momento, não há qualquer informação que explique o porquê deste fato (SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001). Relatos de doenças associadas à presença das florações têm sido registrados na América do Norte e do Sul, África, Austrália, Europa e China (CHORUS; BARTRAM, 1999). No Brasil, o primeiro relato de intoxicação por cianotoxinas data de 1988, quando, ao que tudo indica, cerca de 200 pessoas foram contaminadas por microcistina (MCY) advinda de uma floração de cianobactérias presente na água do reservatório de Itaparica, na Bahia, levando 88 pessoas ao óbito (TEIXEIRA et al., 1993). O segundo caso em território nacional foi relatado em Caruaru, no estado de Pernambuco, onde se registrou a presença de MCY na água utilizada para a lavagem dos aparelhos de hemodiálise do Instituto de Doenças Renais e também a presença de cilindrospermopsina (CYN) no carbono e resinas desses aparelhos. Esta água foi retirada da represa Tabocas, onde havia a presença de floração de cianobactérias. Este triste episódio

resultou na morte de 52 pacientes dos 101 que sofreram intoxicação (CARMICHAEL et al., 2001). Devido a episódios como estes, as pesquisas sobre cianobactérias e suas toxinas aumentaram consideravelmente no mundo todo, gerando um grande número de informações sobre toxicidade, estrutura química e mecanismo de ação das cianotoxinas e métodos analíticos para sua determinação.

Trabalhos discutem a função das toxinas para as cianobactérias. Alguns deles indicam que a presença de *Daphnia* (um predador de cianobactérias) desencadeia a produção de toxinas em florações de *Microcystis* (CARMICHAEL, 1992; DEMOTT; ZHANG; CARMICHAEL, 1991; LUKAC; AEGETER, 1993; SIVONEN et al, 1992; HANAZATO, 1996), o que dá credibilidade à hipótese de que essas toxinas são produzidas como um mecanismo de defesa contra esses predadores. Outros estudos, no entanto, indicam que metabólitos alcalóides, assim como algumas cianotoxinas, podem estar desempenhando um papel alelopático, ou seja, a comunicação entre as células da mesma espécie e consequente inibição do crescimento de outros organismos (GANTAR et al., 2008). Segundo Bar-Yosef e colaboradores (2010), CYN pode ajudar a promover a secreção da enzima fosfatase alcalina (APase) por outros organismos do fitoplâncton (como a alga *Chlamydomonas reinhardtii*) quando o fósforo (P) torna-se um fator de crescimento limitante. Esta enzima pode remover fosfato de várias moléculas e, juntamente com a enzima PstS (do inglês “Phosphate binding protein” – proteína de ligação ao fosfato) disponibilizar o P para a utilização pela cianobactéria. Similarmente, esta mesma função foi sugerida para o dinoflagelado do gênero *Alexandrium*, também produtor da saxitoxina (STX). Os autores verificaram que espécies com menor habilidade de competir em condições limitantes de P são mais tóxicas, o que pode suportar a hipótese de que a produção de STX pode ser uma adaptação que evoluiu para compensar a desvantagem ecológica de ter uma baixa afinidade por nutrientes (FRANGÓPULOS et al., 2004).

Ao que tudo indica, diversas espécies e linhagens cianobacterianas podem produzir muitas variantes de toxinas (CARMICHAEL, 1992; DEMOTT; ZHANG; CARMICHAEL, 1991; LUKAC; AEGETER, 1993; UTKILEN; GJOLME, 1992).

Há grandes grupos de cianotoxinas, dentre os quais, os mais estudados são: MCY, as CYN, as nodularinas, STX e as anatoxinas (ANA). Quanto à toxicidade, há entre as cianotoxinas: hepatotoxinas, ou seja, que afetam o fígado; citotoxinas, que agem em nível celular; neurotoxinas, que afetam o sistema nervoso e dermatotoxinas, que causam extrema irritabilidade e sensibilidade na pele. De acordo com a estrutura química de cada uma, podem

ser classificadas em peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos (CHORUS; BARTRAM, 1999).

2.2 Síntese Não Ribossômica

Algumas cianotoxinas têm estrutura peptídica e são produzidas por um mecanismo enzimático paralelo à síntese proteica conhecido como síntese não ribossômica de peptídeos (CARMICHAEL, 1992; VON DÖHREN et al., 1997). Esse tipo de biossíntese utiliza ampla variedade de substratos, entre eles aminoácidos não proteicos, hidroxíácidos e substâncias policetônicas, motivo pelo qual, em alguns casos, pode-se observar em uma mesma molécula ligações peptídicas, funções cetônicas, insaturações e funções aromáticas (FIORE et al., 2004).

A biossíntese microbiana de peptídeos não ribossomais pode ser catalisada por complexos multienzimáticos conhecidos como peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS, do inglês “non-ribosomal peptide synthetase”), policetídeo sintase (PKS, do inglês “polyketide synthase”) ou uma mistura de ambos, organizadas em unidades funcionais repetidas denominadas de módulos, os quais têm sequências altamente conservadas (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997). Além do mais, sua transcrição e tradução não ocorre pelo “dogma central da biologia”, que preconizava que para cada sequência de DNA, havia uma molécula de RNAm (RNA mensageiro) e, conseqüentemente, uma proteína (CANE; WALSH, 1999). As enzimas NRPS e PKS podem reconhecer cerca de 300 substratos diferentes, em comparação com os 20 aminoácidos a que se restringe a síntese ribossômica de compostos (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011; STRIEKER; TANOVIĆ; MARAHIEL, 2010).

Nas NRPSs, cada módulo é responsável pela incorporação de um aminoácido à molécula em formação. A identidade dos módulos de NRPS e a ordem na qual estão arranjados especificam a sequência de unidades de monômeros que são ativados e incorporados, as reações químicas que ocorrem em cada etapa da formação da nova molécula e o tamanho e função química do produto que será liberado ao final da cadeia de montagem. Os módulos de NRPS são compostos por pelo menos três domínios, sendo dois catalíticos e um que atua como carreador. Os domínios são: (1) um domínio de adenilação (A), que catalisa a ativação de um aminoácido; (2) um domínio carreador de peptidil (PCP), que carrega o cofator fosfopanteteína; e (3) um domínio de condensação (C), que atua na formação da ligação peptídica. Além destes três, domínios adicionais podem fazer parte de módulos NRPS, com funções como, por exemplo, epimerização de aminoácidos ou

finalização da molécula. A mesma estrutura modular das NRPSs é também encontrada nas PKSs, com a diferença de que os módulos de PKS agem sobre ácidos carboxílicos, ativando, unindo e, em alguns casos, modificando os mesmos. Um módulo de PKS chega a ter, no máximo, seis domínios, sendo eles: cetossintase (KS); aciltransferase (AT); cetorredutase (KR); desidratase (DH); enoil-redutase (ER); e proteína carreadora de acila (ACP). Os domínios AT, ACP e KS constituem um módulo mínimo de PKS. A AT é o domínio responsável pela seleção da região do substrato que será estendida ou que dará início à biossíntese da nova molécula. Tal unidade é ligada covalentemente a um carreador de fosfopanteteína do domínio ACP adjacente à AT. O sítio ativo da cisteína do domínio KS é o responsável pela condensação da unidade extensora à cadeia crescente de policetídeo. Os domínios KR, DH e ER conferem adições extras à molécula crescente. Por fim, costuma ser necessário um domínio de tioesterase (TE) para a finalização do processo biossintético e posterior remoção do produto final do complexo de PKS. Isto pode ocorrer por transferência a um aceptor amino ou aminoacila, ou por ciclização da molécula, como é o caso da biossíntese de MCY (MOFFITT; NEILAN, 2003; KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011).

As informações obtidas pela descoberta da via biossintética dessas toxinas têm permitido realizar análises genéticas de vários ambientes, visando o monitoramento da qualidade de água para consumo humano. O entendimento do papel dessas toxinas nos micro-organismos produtores e a regulação ambiental dos genes envolvidos com a sua biossíntese são importantes para o controle dos eventos de florações tóxicas.

2.3 Cilindrospermopsina

A cilindrospermopsina (CYN) e suas variantes estruturais se destacam pela atividade hepatotóxica (RUNNEGAR et al., 1994; 1995; 2002), mas também apresentam atividades citotóxica, neurotóxica (KISS et al., 2002) e grande potencial carcinogênico (HUMPAGE et al., 2000). A molécula de CYN tem natureza zwitteriônica, ou seja, é globalmente neutra em termos de carga elétrica, mas com cargas locais devidos a grupos ionizados (MOREIRA et al., 2012), por este motivo CYN é altamente solúvel em água. A toxicidade de CYN é mediada pela inibição da glutatona da síntese proteica e do citocromo P450 (FROSCIO et al., 2003; RUNNEGAR et al., 1994; 1995; 2002). A glutatona é importante na proteção do núcleo e da mitocôndria contra as espécies reativas do oxigênio, desativa os radicais e ajuda na metabolização dos xenobióticos. Já o citocromo P450 é responsável pela metabolização de uma série de enzimas imunológicas no organismo. Em mamíferos, o envenenamento pode causar danos no fígado, rim, baço, coração e outros órgãos

(TERAO et al., 1994; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005). A capacidade cianobacteriana de produzir CYN é bloqueada quando a temperatura atinge 35 °C, mas a molécula não é destruída (MOREIRA et al., 2012).

Intoxicações por CYN foram relatadas pela primeira vez após um incidente ocorrido em 1979 na Ilha de Palm em Queensland, na Austrália, onde 148 indígenas foram hospitalizados com sintomas de hepatoenterite após a ingestão de água da represa Solomon, que apresentava floração de *Cylindrospermopsis raciborskii* (HAWKINS et al., 1985). Em 1992, a estrutura dessa toxina foi identificada e ela recebeu o nome de cilindrospermopsina (OHTANI; MOORE; RUNNEGAR, 1992). O caso da Ilha de Palm e em Caruaru no Brasil, em 1996, foram os únicos relatos descritos na literatura de intoxicação por CYN (MOREIRA et al., 2012).

Até a presente data, a produção de CYN foi verificada em onze espécies de cianobactérias: *Cylindrospermopsis raciborskii* (HAWKINS et al., 1985), *Umezakia natans* (TERAO et al., 1994), *Aphanizomenon ovalisporum* (BANKER et al., 1997; SHAW et al., 1999), *Raphidiopsis curvata* (LI et al., 2001a), *Aphanizomenon flos-aquae* (PREUßEL et al., 2006), *Anabaena bergii* (SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001), *Lyngbya wollei* (SEIFERT et al., 2007) *Anabaena laponica* (SPOOF et al., 2006), *Oscillatoria* sp. (MAZMOUZ et al., 2010), *Raphidiopsis mediterranea* (MCGREGOR et al., 2011) e possivelmente por *Aphanizomenon gracile* (RÜCKER et al., 2007). Dentre elas, *C. raciborskii* destaca-se por ser a espécie com maior potencial de produção de CYN (BERNARD et al., 2003; CHONUDOMKUL et al., 2004; FASTNER et al., 2003; HAWKINS, et al., 1997; LI et al., 2001b; SAKER; THOMAS; NORTON, 1999; SAKER et al., 2003; WOOD; STIRLING 2003). Embora diferentes gêneros de cianobactérias tenham sido relatados como produtores de CYN, não existem registros de produção dessa toxina por linhagens isoladas no Brasil.

No Brasil, porém, a primeira análise química de uma linhagem de *C. raciborskii* isolada da represa Billings, São Paulo, mostrou que ela produzia análogos da neurotoxina STX (LAGOS et al., 1999) e não CYN (KELLMANN; MILLS; NEILAN, 2006). Outras duas linhagens de *C. raciborskii*, ITEP-018 e CYRF-01, isoladas do reservatório Tabocas, Pernambuco (MOLICA et al., 2002), e do reservatório Funil, Resende, no estado do Rio de Janeiro (FERRÃO-FILHO et al., 2010), respectivamente, também mostraram produção de análogos de STX e não de CYN.

Um registro de plâncton contendo as espécies *Sphaerpermopsis aphanizomenoides* e *C. raciborskii* detectou CYN por meio de ELISA, mas esse resultado não foi confirmado por testes químicos mais precisos (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011). Outro registro de

CYN se referiu à detecção de CYN e MCY em carvão ativado em Caruaru pelo método de ELISA, no incidente que ficou conhecido como “Síndrome de Caruaru” (AZEVEDO et al., 2002). Neste caso, presença de CYN foi confirmada nos filtros de carvão por HPLC (CARMICHAEL et al., 2001).

Recentemente, entretanto, fragmentos de genes envolvidos com a síntese de CYN foram sequenciados em linhagens brasileiras isoladas de ambientes aquáticos (HOFFRISSETI et al., 2013).

Quimicamente, a CYN ($C_{15}H_{21}N_5O_7S$) é um alcaloide que contém uma porção guanidino central funcional e uma hidroximetil uracila ligada a um esqueleto de carbono tricíclico, com massa molecular de 415 Da (OHTANI; MOORE; RUNNEGAR, 1992).

Até o momento, apenas duas variantes estruturais naturais desta toxina foram descritas, além da variante CYN, sendo elas 7-epi-CYN produzida por *Aphanizomenon ovalisporium* ILC-146 e *Oscillatoria* sp. PCC6506 (BANKER et al., 2000; MAZMOUZ et al., 2010) e 7-desoxi-CYN produzida por *C. raciborskii*, *Raphidiopsis curvata* e *Lyngbya wollei* (LI et al., 2001a; 2001b; NORRIS et al., 1999; SEIFERT et al., 2007), sendo que a primeira variável é considerada tão tóxica quanto a CYN (Figura 2).

Variante	R1	R2	Massa molecular
Cilindrospermopsina (7-R)	OH	H	415,42
7-Epi-cilindrospermopsina (7-S)	H	OH	415,42
7-Deoxi-cilindrospermopsina	H	H	399,42

Figura 2 - Estrutura da cilindrospermopsina (CYN) e suas variantes naturais (MAZMOUZ et al., 2010)

Em 2000, foi proposto que o ácido guanidinoacético (ou guanidinoacetato) era o substrato inicial para a enzima PKS e que adições de cinco unidades intactas de acetato na molécula de guanidinoacetato mais reações de C-metilação, sulfotransferência e ciclização completavam a biossíntese da molécula (BURGOYNE et al., 2000). A fonte do grupo amidino na unidade iniciadora é desconhecida, no entanto parece derivar da L-arginina (MOREIRA et al., 2012). Em 2002, três genes, *aoaA* (*cyrA*), *aoaB* (*cyrB*) e *aoaC* (*cyrC*), supostamente envolvidos na biossíntese de CYN, foram identificados em *Aphanizomenon*

ovalisporum, os quais codificavam as enzimas amidinotransferase, NRPS/PKS híbrida e PKS, respectivamente (SHALEV-ALON et al., 2002).

O primeiro passo na formação do esqueleto de CYN envolve a síntese de guanidinoacetato pela transamidinação da glicina (Figura 3). O gene *cyrA* codifica uma amidinotransferase que transfere um grupo guanidino da arginina para a glicina formando guanidinoacetato. Na segunda etapa, uma NRPS/PKS híbrida codificada pelo gene *cyrB* ativa o guanidinoacetato, que é então transferido, via PCP, para o domínio β -cetossintase (KS). O domínio aciltransferase (AT) da CyrB ativa o malonil-CoA e liga-o à proteína carreadora de acila (ACP). Em seguida, no domínio KS, ocorre uma reação de condensação entre o guanidinoacetato ativado e o malonil-CoA. O domínio da metiltransferase (MT) identificado em CyrB realiza a metilação do C-13. A enzima CyrB contém dois módulos de redução, cetorredutase (KR) e desidratase (DH), que combinadas reduzem o grupo ceto a uma hidroxila e eliminam uma molécula de água, o que resulta em uma dupla ligação entre C-13 e C-14. Acontece então um ataque nucleofílico do grupo amidino no N-19 na recém formada ligação dupla, pela reação de adição de Michael, o que leva à ciclização para o fechamento do primeiro anel da CYN, seguindo as regras de Baldwin (BALDWIN et al., 1977). Essa reação é energeticamente favorável, pode ser espontânea e não exigir a catálise enzimática.

Figura 3 - Via biossintética da cilindropermopsina (adaptado de MIHALI et al., 2008)

A terceira etapa da biossíntese da CYN envolve o gene *cyrC*, codificador de uma PKS com domínios KS, AT, KR e ACP. A ação desses domínios resulta na ativação do malonil-CoA pelo domínio AT, sua transferência para o ACP e condensação no domínio KS com o produto da CyrB, o que alonga a cadeia crescente com um acetato. A cadeia alongada é ligada ao ACP da CyrC e o domínio KR reduz o grupo ceto a um grupo hidroxila no C-12. Após a catálise realizada pela enzima CyrC, está a enzima CyrD, uma PKS. A ação desse módulo PKS no produto da CyrC resulta na adição de outro acetato e redução do grupo ceto no C-10 a uma hidroxila e desidratação de uma dupla ligação entre C-9 e C-10. Essa dupla ligação é o sítio de um ataque nucleofílico pelo grupo amidino do N-19 por outra reação de adição de Michael que também segue as regras de Baldwin, resultando no segundo anel da CYN. O intermediário produzido por CyrD na etapa 5 é o substrato para CyrE, uma enzima PKS que catalisa a adição de um acetato e a formação de uma dupla ligação entre C-7 e C-8. Essa dupla ligação é atacada por N-18 via reação de adição de Michael, ocorrendo a terceira ciclização. O gene *cyrF* codifica o último módulo PKS, contendo apenas KS, AT e ACP. A enzima CyrF atua no produto da CyrE e alonga a cadeia pela adição de mais um acetato, deixando o C-4 e C-6 não reduzidos.

A etapa 7 envolve a formação do anel uracila, o qual é essencial para a toxicidade da CYN. Essa etapa consiste de duas enzimas CyrG e CyrH que são mais semelhantes às enzimas da família amido-hidrolases/ureases/di-hidro-orotases, cujos membros catalisam a formação e clivagem de ligações N-C. Essas enzimas transferem um segundo grupo guanidino de uma molécula doadora, tal como a arginina ou ureia, para C-6 e C-4 da CYN, resultando na formação do anel uracila. A primeira reação consiste na formação de uma ligação covalente entre o N do doador guanidino e C-6 da CYN, seguida pela eliminação de água, o que resulta em uma dupla ligação entre C-5 e C-6. A segunda reação catalisa a formação de uma ligação entre o segundo N do doador guanidino e C-4 da CYN, concomitantemente com a quebra da ligação tioéster entre a ACP da CyrF e CYN, causando a liberação da molécula do complexo enzimático. A terceira reação catalisa a clivagem do grupo guanidino de uma molécula doadora desde esta não seja a ureia. A ação de CyrG e CyrH na formação do anel uracila em CYN descreve uma nova via de biossíntese de pirimidina.

A sulfatação da CYN no C-12 é provavelmente realizada pela ação de uma sulfotransferase. O gene *cyrJ* codifica uma proteína que é muito semelhante à 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS) sulfotransferase-dependente. Enzimas similares foram relacionadas com a sulfatação de outras cianotoxinas (KELLMANN et al., 2008). O agrupamento gênico da CYN também codifica uma adenilsulfato quinase (ASK), ou seja,

CyrN. ASKs são enzimas que catalisam a formação de PAPS, que é o doador de sulfato para as sulfotransferases. A CyrJ sulfata a CYN no C-12 enquanto a CyrN cria o conjunto de PAPS requerido para essa reação. A reação final complementar é realizada pela CyrI, a qual supostamente catalisa a hidroxilação de C-7, um resíduo que, juntamente com o anel de uracila, confere a toxicidade da CYN.

O agrupamento gênico da CYN contém ainda o gene *cyrK*. Seu produto se assemelha à enzima MATE (multidrogas e extrusão de substâncias tóxicas), o que indica que pode funcionar como uma proteína transportadora de CYN, devido não só a essa similaridade, mas também pela sua localização central no agrupamento. Outro gene encontrado na extremidade 3' da CYN é o *cyrO*. Ele codifica uma proteína hipotética que apresenta similaridade com as proteínas repetitivas WD, as quais têm diversos papéis regulatórios e de transdução de sinais. CyrO pode ter um papel importante na regulação da transcrição e na ligação do DNA e tem similaridade com proteínas da família AAA, que frequentemente desempenham funções semelhantes às chaperonas e ajudam na montagem, operação ou desmontagem de complexos proteicos. Outras suposições sobre o papel da CyrO são prejudicadas devido à baixa similaridade de sequência com outras proteínas dos bancos de dados.

2.4 Saxitoxinas

A saxitoxina (STX) e suas variantes têm atividade neurotóxica e são também conhecidas por PSP (do inglês “Paralytic Shellfish Poisoning”), por terem sido identificadas como causa do envenenamento em humanos que consumiram mariscos contaminados (LLEWELLYN, 2006). Seu nome deriva do molusco-manteiga da Alasca, *Saxidomus giganteus*, do qual a toxina purificada foi obtida e identificada pela primeira vez (SCHANTZ et al., 1957). Há muito tempo já havia relatos de seu poder de envenenamento, uma vez que ela matava mariscos e causava intoxicação em humanos que alimentavam-se destes animais. Essa toxina tem sua ação deletéria relacionadas a um desbalanço elétrico que causa nos canais de sódio, na bomba de cálcio e sódio, e nos canais de potássio. Segundo Stranghetti (2007), as cargas negativas dos grupos carboxilas nos poros dos canais são bloqueadas pelas cargas positivas dos grupos guanídicos, bloqueando o influxo de Na^+ através do canal. Contaminações por toxinas PSP já foram relatadas em diversos países e representam um sério problema de saúde pública.

A STX é o único produto marinho produzido naturalmente declarado como arma química (TUCKER, 2002) e os primeiros sintomas de intoxicação aparecem cerca de apenas 30 minutos após a ingestão de mariscos contaminados com STX (LLEWELLYN, 2006). A

natureza polar de sua molécula explica sua alta solubilidade em água, baixa solubilidade em alcoóis e insolubilidade em ácidos orgânicos (SCHANTZ et al., 1957).

A produção de saxitoxinas já foi descrita por diferentes organismos como, por exemplo, pelo bivalve *Saxidomus giganteus* (SCHANTZ, et al., 1957), por eucariotos dinoflagelados marinhos dos gêneros *Alexandrium*, mais especificamente das espécies *A. andersoni*, *A. catenella*, *A. excavatum*, *A. fundyense*, *A. minutum*, *A. ostendeldii*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichi*, *Gymnodinium catenatum* e *Pyrodinium bahamense* (LLEWELLYN, 2006; CEMBELLA, 1998; DITTMANN; FEWER.; NEILAN., 2012), e pelas cianobactérias *Anabaena circinalis*, *Anabaena lemmermannii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon gracile*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Lyngbya wollei*, *Planktothrix* sp., *Raphidiopsis brooki* e *Scytonema* sp. (NEILAN et al., 2012; LLEWELLYN, 2006).

No Brasil, segundo Sant'Anna e colaboradores (2008), já ocorreram registros da produção de diferentes variantes de STX por linhagens da espécie *C. raciborskii*, além das espécies *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Raphidiopsis brooki* e *Planktolingbya* cf. *teilingii*.

Quimicamente, as saxitoxinas (STX - $C_{10}H_{17}N_7O_4$) são alcaloides carbamatos de estrutura tricíclica, e foram pela primeira vez descritas estruturalmente em 1975 (SCHANTZ, 1975).

A estrutura química deste alcaloide (Figura 4) consiste em um grupo tetra-hidropurínico e dois agrupamentos guanidínicos. As saxitoxinas podem ser não sulfatadas, como as STX, apresentar um grupamento sulfato (goniautoxinas – GTX) ou dois grupamentos sulfatos (C-toxinas). Após a síntese do esqueleto, pode haver modificações em cinco posições de seus grupos funcionais, gerando mais de 30 análogos de STX (Figura 4). A variante mais tóxica deste grupo é a STX, apresentando DL_{50} intraperitoneal de $10 \mu g \cdot kg^{-1}$ em ratos (CHORUS; BARTRAM, 1999).

Figura 4 - Estrutura da molécula de saxitoxina (Adaptado de KELLMANN; NEILAN, 2007)

Há indícios de que o produto formado após a ação dos quatro domínios da enzima SxtA é 4-amino-3-oxo-guanidinoheptane (chamado pelos autores de A'). Após esta etapa, ocorre a ação da enzima codificada pelo gene *sxtG*, uma amidinotransferase. Esta enzima transfere um grupo amidino proveniente de uma segunda molécula de arginina ao grupo α -amino do intermediário A', assim produzindo 4,7-diguanidino-3-oxoheptane (designado composto B'). Acredita-se que logo após esta etapa seja formado o primeiro heterociclo por uma condensação interna do tipo retro-aldol entre a amina do grupo amidino recém-incorporado e o carbono proveniente do acetato. Esta reação é catalisada pela SxtB, que é semelhante a enzimas do tipo citidina desaminase de gama-proteobactérias. O produto desta condensação é chamado de C'. A transformação do intermediário de STX prossegue com a ação conjunta de SxtD, SxtS e SxtU, resultando na incorporação de uma cadeia lateral composta por uma metil-metionina e sua subsequente hidroxilação. Tal hidroxilação ocorre via epoxidação de uma ligação dupla entre o grupo metílico derivado de SAM e o C-6 da molécula, que foi derivado do acetato nas primeiras etapas da biossíntese desta molécula. Em detalhes: a enzima SxtD (uma esteroide desaturase) introduz uma ponte dupla entre C-1 e C-5 do composto C', resultando em uma mudança 1,2-H entre C-5 e C-6. Este composto recém-formado é chamado de composto D'. A enzima SxtS (dioxigenase dependente de 2-oxoglutarato) catalisa a formação oxidativa dos heterociclos por intermédio de epoxidação da ponte dupla de D' e a abertura do epóxido a um aldeído com simultânea biciclicização. Finalizando esta etapa, a enzima SxtU (álcool-desidrogenase de cadeia curta) reduz o grupo terminal aldeído do precursor D', formando o composto E'. Tendo-se E', observa-se que para a finalização da molécula de STX é necessário ocorrer uma O-carbamoilação de seu grupo hidroxila e uma hidroxilação dupla de C-12. Ao que parece, a enzima SxtI (O-carbamoiltransferase) catalisa a transferência de um grupo carbamoil proveniente de um carbamoilfosfato ao grupo hidroxila livre de E'. Apesar de não ter sido possível inferir a natureza enzimática dos produtos gênicos de SxtJ e SxtK, os autores discorrem que homólogos a estes genes foram frequentemente encontrados adjacentes a genes que codificam O-carbamoiltransferases. Por fim, os genes *sxtH* e *sxtT* codificam uma subunidade terminal de oxigenase de fenil-propionato bacteriano e dioxigenases relacionadas que hidroxilam estruturas químicas em anel. Portanto, acredita-se que as enzimas SxtH e SxtT sejam as responsáveis pela hidroxilação do C-12. A cada ciclo catalítico, os membros do grupo enzimático do qual SxtH e SxtT fazem parte necessitam de uma oxigenase redutase para sua regeneração. Os autores propõem que o agrupamento gênico da STX tenha seu próprio

sistema de transporte de elétrons, constituído pelas enzimas SxtV e SxtW em *C. raciborskii* T3 (KELLMANN et al., 2008).

Uma vez formada a molécula-base da saxitoxina, enzimas codificadas por genes adicionais podem modificá-la, de forma a gerar diferentes análogos de STX. Um destes genes é o *stxX*, que codifica uma cefalosporina hidroxilase. As enzimas SxtF e SxtM (enzimas MATE) estariam envolvidas no transporte da STX para o meio extracelular. A regulação da produção de STX seria feita em nível transcricional, sendo as enzimas SxtY e SxtZ envolvidas em fatores de transcrição (KELLMANN; NEILAN, 2007; KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008).

A correlação entre a presença de cada gene e o análogo de STX produzido pelas diferentes cianobactérias tem sido discutida com o objetivo de confirmar a função estipulada para os genes *sxt* (SOTO-LIEBE et al., 2010; MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011).

2.5. Microcistinas

A microcistina (MCY) e suas mais de 90 variantes têm atividade hepatotóxica. O mecanismo de ação das hepatotoxinas é bastante semelhante para todas as classes, produzindo disfunções hepáticas agudas e crônicas, com hemorragia e morte do animal em poucas horas quando exposto a doses agudas. Além do fígado, a MCY pode causar danos também aos rins, pulmões, timo e coração (Codd et al., 1999). Após a ingestão de MCY, a toxina pode ser transportada do intestino delgado para o fígado por transporte ativo, por intermédio do sistema de transporte de ânions orgânicos do ácido biliar. Dentro dos hepatócitos, as MCY provocam inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A serina/treonina. Em seguida, ocorre desorganização do citoesqueleto das células hepáticas, peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana, fragmentação do DNA, apoptose e necrose. O espaço que anteriormente era ocupado pelas células hepáticas é instantaneamente preenchido por sangue, podendo levar o organismo ao óbito por choque hemorrágico (DITTMANN; WIEGAND, 2006; GOLDBERG et al., 1995; MACKINTOSH et al., 1990; TILLET; PARKER, NEILAN, 2001).

As MCY também podem causar efeitos a longo prazo em exposições crônicas, como a promoção de tumores, tendo sido relatada a incidência de câncer em populações expostas cronicamente a MCY e CYN (UENO et al., 1996; FALCONER; HUMPAGE, 2001). A molécula de MCY foi relatada e isolada pela primeira vez em 1959, por Bishop e colaboradores (BISHOP; ANET; GORHAM, 1959). Sua estrutura foi definitivamente identificada em 1988, por Rinehart e colaboradores (RINEHART et al., 1988).

As MCY são produzidas por diferentes gêneros de cianobactérias (*Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena*) (WELKER; VON DÖHREN, 2006) e são as toxinas mais comumente encontradas em ambientes de água doce, sendo consideradas altamente prejudiciais à saúde pública e à qualidade da água (DITTMANN; WIEGAND, 2006). Linhagens tóxicas da espécie *M. aeruginosa* são as mais comumente encontradas em águas doces eutróficas (KAPLAN et al., 2012), enquanto linhagens tóxicas de *Nostoc* e *Hapalosiphon* foram encontradas em ambientes terrestres (PRINSEP et al., 1992; OKSANEN et al., 2004) e de *Phormidium* em ambiente bêntico (IZAGUIRRE; JUNGBLUT; NEILAN, 2007). Linhagens tóxicas e não tóxicas normalmente ocorrem simultaneamente em florações naturais devido à distribuição esporádica de genes envolvidos na biossíntese de MCY em alguns gêneros (VIA-ORDORIKI et al., 2004).

O grupo de genes *mcy*, os quais são codificados por enzimas do grupo das NRPSs e PKSs, já foram encontrados nos gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Phormidium*, *Chroococcus*, *Fischerella* e *Hapalosiphon* (FIORE et al., 2009; FRISTACHI; SINCLAIR, 2008; NEILAN et al., 2008; PRINSEP et al., 1992; SIVONEN; JONES, 1999). A comparação entre agrupamentos gênicos *mcy*, responsáveis pela produção de MCY nesses gêneros, mostrou que a maioria dos genes está em uma ordem diferente, nem todos eles estão presentes, a identidade entre eles foi baixa e o tamanho de alguns deles também é diferente, indicando a necessidade de caracterizá-los para cada organismo (ROUHIAINEN et al., 2004).

De acordo com Sant'Anna e colaboradores (2008), no Brasil já ocorreram registros da produção de MCY por *Aphanocapsa cumulus*, *Microcystis aeruginosa*, *M. botrys*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. protocystis*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*, *Radhiocystis fernandoi*, *Anabaena circinalis*, *A. crassa*, *A. planctonica*, *Synechocystis aquatilis*, *Planktothrix agardhii* e *P. isothrix*.

As MCY (C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂ - variante LR) são peptídeos cíclicos formados por sete aminoácidos de diferentes massas moleculares. Essas toxinas, as quais têm a estrutura cíclica D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha em comum - no qual X e Z representam L-aminoácidos variáveis (SIVONEN; JONES, 1999; WELKER; VON DOHREN, 2006) (Figura 6) - são caracterizadas de acordo com o arranjo dos aminoácidos na molécula, variação em nível de metilação e hidroxilação, sequência de peptídeos e toxicidade (WELKER; VON DÖHREN, 2006), sendo as variantes estruturais mais conhecidas MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA. D-MeAsp corresponde ao ácido D-eritro-β-metil-aspartico, Mdha à N-

metildehidroalanina e Adda ao ácido dienoico (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienoico (BOTES et al., 1984).

Figura 6 - Estrutura da MCY. Os aminoácidos (X e Z) e o grupo R1 (em cinza) são variáveis conforme tabela à direita. Os sete aminoácidos que formam a molécula de MCY (heptapeptídeos cíclicos) estão numerados de 1 a 7 (adaptado de TANABE et al., 2009)

A biossíntese de microcistinas também é realizada pela via não ribossômica. O primeiro módulo da enzima NRPS está envolvido na ativação e incorporação do aminoácido *N*-terminal, e os demais módulos, na incorporação dos aminoácidos subsequentes. As reações mínimas de NRPS são adenilação, tioesterificação e condensação. As regiões envolvidas nessas reações parciais estão localizadas em três domínios: de adenilação (A), domínio codificador de uma proteína carreadora de peptídeos (PCP) e de condensação (C). Vários outros domínios já foram descritos, como o *N*-metiltransferase (NMT ou M), envolvido em reações de acilação e epimerização (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). A biossíntese de MCY pelas PKSs ocorre pela ação de, no mínimo, três domínios por módulo: aciltransferase (AT), responsável pela ativação e incorporação da unidade extensora; proteína carreadora de acila (ACP) e cetossintase (KS), que captura o agrupamento acila do domínio ACP anterior. Em seguida, o produto é liberado do complexo PKS por meio do domínio de tioesterase (T) (DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001), Figura 7.

Figura 7 - Etapas realizadas na biossíntese do aminoácido Adda e estrutura de domínios prevista para McyG, McyD e McyE. Os círculos representam domínios enzimáticos de PKS e os retângulos, de NRPS. Os triângulos invertidos representam as moléculas finalizadoras, McyJ e McyF. AMT se refere ao domínio de aminotransferase. KS, β -cetoacil sintase; AT, aciltransferase; ACP, proteína carreadora de acila; KR, cetoacil redutase; DH, desidratase; CM, C-metiltransferase; OM, O-metiltransferase; A, adenilação aminoacila; C, condensação; RC, racemase. A região de tioração no módulo NRPS é ilustrada em preto (Adaptado de TILLET et al., 2000)

Análises de bioinformática e de similaridade com enzimas análogas indicaram que a formação do Adda supostamente envolve enzimas codificadas por *mcyD-mcyG* e *mcyJ*. A enzima híbrida NRPS/PKS, McyG, constitui o primeiro passo na biossíntese do Adda, que é o resíduo de aminoácido que confere toxicidade à MCY. A hipótese inicial era de que o módulo NRPS da McyG ativava o fenilacetato. No entanto, posteriormente, a caracterização bioquímica do didomínio A-PCP (Adenilação – proteína carreadora de peptídica), localizado no N-terminal da McyG, revelou que fenilpropanoídeos variados são preferencialmente ativados e ligados na PCP (HICKS et al., 2006). Após a ativação, a unidade iniciadora fenilpropanoide é estendida por várias etapas de alongamento do malonil-CoA e, subsequentemente, modificada pela C-metilação, redução e desidratação, reações catalisadas pelos módulos PKS das enzimas McyD, McyE e McyG. O domínio da aminotransferase do McyE, então, converte então o poliketídeo em um β -aminoácido na etapa final da biossíntese do Adda. O módulo NRPS da segunda enzima híbrida PKS/NRPS, McyE, supõe-se estar envolvido na ativação e condensação da D-Glu com o Adda.

2.6 O Reservatório de Salto Grande

O reservatório de Salto Grande faz parte da bacia hidrográfica do rio Atibaia e pertence ao quinto grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) do Estado de São Paulo (Figura 8), que corresponde a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) número 5, denominada PCJ – Piracicaba, Capivarí e Jundiaí. Este reservatório foi construído entre 1940 e 1949 com o objetivo de gerar energia elétrica para a região (LEITE, 1998). Hoje, além da produção de energia, outras atividades são realizadas neste local, como: irrigação de culturas, recreação e suprimento de água. Sua bacia hidrográfica possui uma área total de 2.770km² (LEITE, 1998). Segundo Zanata e Espíndola (2002), a área específica do reservatório é de 11,5 Km², com perímetro de 64 Km, comprimento máximo de 17 Km e volume de água ao redor de 106 x 10⁶ m³.

A bacia hidrográfica do rio Atibaia apresenta uma grande densidade urbana e rural, o que afeta significativamente a qualidade da sua água. Isto se deve principalmente à entrada de esgoto doméstico das cidades de Paulínia e Campinas, além de outros dejetos sem tratamento das cidades vizinhas (SILVA; JARDIM, 2007) e da contribuição das atividades da agricultura (MARTINS et al., 2011). Estudos têm demonstrado um aumento na concentração de nutrientes nesta bacia, o que comprova um estágio de eutrofização avançado (LEITE, 1998). Carneiro e colaboradores (2012) confirmaram a presença de MCY e microgininas nas águas deste reservatório. Além disso, por apresentar uma concentração elevada de nitrogênio e fosfato e estar em um processo de eutrofização avançado, este reservatório foi um candidato ideal a esta pesquisa.

Unidades Hidrográficas de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHI

Figura 8 - Mapa das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo, com destaque para a Unidade 5, na qual pertence o reservatório cujas amostras foram utilizadas neste estudo. (Disponível em <www.sigrh.sp.gov.br> Acesso em 31 de janeiro de 2013)

2.7 Monitoramento de cianobactérias em reservatórios

De acordo com o Artigo Segundo do capítulo II da Lei Nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997, que institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, são objetivos da Política Nacional de Recursos Hídricos: “(I) assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos; (II) a utilização racional e integrada dos recursos hídricos, incluindo o transporte aquaviário, com vistas ao desenvolvimento sustentável; (III) a prevenção e a defesa contra eventos hidrológicos críticos de origem natural ou decorrentes do uso inadequado dos recursos naturais”.

Nesse sentido, foi criada a portaria MS 518/2004 (Brasil, 2004) que tornou obrigatório o monitoramento de cianobactérias em reservatórios de água doce. Sendo que, esse monitoramento deve ser mensal se o número de cianobactérias por mL de água não ultrapassar 10.000 células, ou seja, se não caracterizar uma floração, e deve ser semanal, se ultrapassar este valor. A portaria também determinou que os órgãos responsáveis pelo monitoramento da qualidade das águas não podem utilizar produtos químicos para o tratamento da água quando a densidade de células ultrapassar 20.000 por mL, pois estes produtos podem lisar as células e liberar as cianotoxinas no meio. Após este valor, devem se iniciar os testes de bioensaio com camundongos, para uma possível detecção de cianotoxinas. Valores máximos de cianotoxinas presentes em águas de abastecimento público foram determinados pela portaria e são eles: 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de microcistina, 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cilindrospermopsina e 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para saxitoxina. Esta portaria foi o primeiro passo para a certificação da água no que diz respeito às cianotoxinas.

Porém, em 12 de dezembro de 2011 o Ministério da Saúde publicou a portaria de número 2914 (BRASIL, 2011), modificando alguns itens da portaria 518. Nessa nova portaria, houve alterações tais como o envio de relatórios das análises dos parâmetros mensais, trimestrais e semestrais. Tais relatórios devem conter informações sobre o controle da qualidade da água, conforme o modelo estabelecido pela referida autoridade e, em relação às cianotoxinas, estabeleceu-se um prazo máximo de 24 (vinte e quatro) meses, contados a partir da data de sua publicação, para que os órgãos e entidades sujeitos à aplicação desta portaria promovessem as adequações necessárias ao seu cumprimento, no que se refere ao monitoramento dos parâmetros de gosto e odor. Além disso, as análises de cianotoxinas passaram para semanais quando o volume de células de cianobactérias exceder 20.000 células·mL⁻¹ e, o mais importante, adequaram-se os valores das concentrações máximas permitidas, incluindo o valor máximo de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CYN, além da correção dos valores de MCY (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e STX (3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivos observar a comunidade de cianobactérias e identificar a presença de genes *cyr*, *mcy* e *stx* em florações de amostras de água do reservatório de Salto Grande, na cidade de Americana. Bem como, avaliar a produção de CYN, MCY e STX. Para tanto, foram utilizadas as seguintes abordagens:

- Extração do DNA genômico, amplificação por PCR dos genes alvos, clonagem dos fragmentos amplificados e transformação para células competentes;
- Sequenciamento dos fragmentos amplificados;
- Comparação das sequências encontradas com agrupamentos gênicos da CYN, MCY e STX de outros isolados já descritos, indicando a função das proteínas e dos domínios
- Detecção e identificação de CYN, MCY e STX e suas respectivas variantes por meio de LC-MS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coletas

As coletas de florações de cianobactérias foram realizadas em dois pontos do Reservatório Salto Grande, localizado na cidade de Americana, estado de São Paulo (SP), Ponto 1 - referente ao condomínio “Iate Club” (S 22°43'191" W 47°16'465") - e Ponto 2 - referente ao local do Projeto “Barco Escola” (S 22°42'304" W 047°16'049") (Figura 9). As coletas foram realizadas no período entre 10 e 11 horas (h) da manhã dos dias 19 de setembro de 2012, 22 de março e 23 de agosto de 2013, nos primeiros 30 cm de profundidade.

Em cada amostragem, um volume de 100 mL foi coletado para a caracterização morfológica e aproximadamente 4 litros de água foram coletados com auxílio de rede fitoplanctônica (malha de 20 μ m), sendo 200 mL para a extração de DNA total e o restante destinado às análises químicas. Para tal, as amostras para análises químicas foram acondicionadas em vidros âmbar e mantidas em câmara fria (aproximadamente 8 °C), até serem enviadas ao Laboratório de Ficotoxinas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (campus de São Paulo), coordenado pelo Prof. Dr. Ernani Pinto. Essas amostras foram liofilizadas e posteriormente submetidas a análises para a determinação da presença de três cianotoxinas: cilindrospermopsina (CYN), microcistina (MCY) e saxitoxina (STX). O pH de cada amostra foi medido ao chegar no laboratório (pHmetro “DigiMed, Dm-22” (Campo Grande, São Paulo, Brasil).

As amostras destinadas às análises moleculares foram acondicionadas em geladeira a temperatura de 4 °C em frascos de vidro âmbar até o momento da extração do DNA genômico total (item 4.3.1), a qual foi realizada em um prazo máximo de 24 horas após a coleta.

A caracterização morfológica e a determinação do número de células, de cada ponto de coleta, foram realizadas a partir de amostras de 100 mL da subsuperfície. Cada 100 mL da amostra utilizada para caracterização morfológica foi suplementada com 1 mL de solução de lugol (1 g de iodo puro, 2 g de iodeto de potássio, 2 mL de ácido acético glacial e água destilada para volume final de 20 mL) e mantida em frascos escuros, para a não degradação da solução (BICUDO; BICUDO, 1970). A contagem do número de células foi realizada utilizando-se a técnica de Utermöhl (1958), em microscópio invertido (invertoscópio) (Leica, modelo DM IRB, Westzlar, Alemanha), em objetiva com aumento de 63 vezes. Essas análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Ficologia, do Instituto de

Botânica, da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo-SP, sob a supervisão da Pesquisadora Dra. Andréa Tucci.

Figura 9 - Reservatório de Salto Grande com os Pontos da Coleta referenciados (Disponível em <maps.google.br> Acesso em março de 2013)

4.2 Análises Quantitativas

A contagem do fitoplâncton total foi realizada em microscópio invertido Zeiss Axiovert 25 em aumento de 630 vezes, de acordo a metodologia descrita por Utermöhl (1958). O tempo de sedimentação das amostras foi de três horas para cada centímetro de altura da câmara, segundo o critério de Lund, Kipling e Lecren (1958). A câmara de sedimentação utilizada possuía 2 mL de volume.

A contagem dos indivíduos foi realizada em transectos verticais e o limite da contagem, ou seja, o número mínimo de campos contados por câmara de sedimentação, foi determinado usando dois critérios: gráfico de estabilização do número de espécies, obtido a partir de espécies novas adicionadas com o número de campos contados e concomitantemente o número de espécies mais abundantes, obtido pela contagem de até 100 indivíduos da espécie mais comum ou 400 indivíduos no total (considerando geração de um erro de 10%). No caso

da floração cianobacteriana ser menos intensa, foi feito a contagem de 100 indivíduos da segunda espécie mais comum.

Para indivíduos unicelulares de cianobactérias, foi feita uma distinção quando estes se encontravam em divisão. Foi considerado um indivíduo somente a partir do momento em que se podia observar a parede celular bem definida dividindo-o da célula que o originou. Do contrário, foi contado como apenas uma célula. Cianobactérias filamentosas foram contadas célula a célula para que sua inclusão na tabela respeitasse a unidade células·mL⁻¹.

Os resultados foram expressos em densidade (células·mL⁻¹ para cianobactérias e/ou organismos·mL⁻¹ para outros representantes do fitoplâncton) e calculados de acordo com a fórmula descrita em Weber (1973).

$$\text{organismos} \cdot \text{mL}^{-1} = (n/sc) \times (1/h) \times (F)$$

onde: n = número de indivíduos efetivamente contados;
 s = área do campo em mm² no aumento de 63 vezes;
 c = número de campos contados;
 h = altura da câmara de sedimentação em mm;
 F = fator de correção para mililitro (10³ mm³·1 mL⁻¹).

4.3 Análises moleculares

4.3.1 Extração de DNA, amplificação de genes-alvo por PCR e sequenciamento

A extração do DNA total foi realizada com o uso do *kit* Power SoilTMDNA (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade e a quantificação dos DNAs extraídos foram verificadas adicionando-se alíquotas de 5 µl dos DNAs extraídos a tampão de carregamento (sacarose 40%, azul de bromofenol 0,25% e água ultra-pura) com SYBR[®] Green I 0,1% (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), seguida de corrida eletroforética em gel de agarose 1%, com o uso de tampão 0,5× TBE (10× TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi realizada em fotodocumentador “Gel Logic 212 Imaging System” (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As alíquotas de DNA foram armazenadas a -20°C até a realização dos procedimentos seguintes.

A presença dos genes alvos envolvidos na biossíntese de CYN, MCY e STX foi verificada por amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os

oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1. As condições de reação e ciclagem estão descritas nas Tabelas 2 e 3. Em algumas reações, as temperaturas de anelamento foram alteradas e otimizadas. As reações de amplificação por PCR foram processadas em termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, Inglaterra). A integridade, tamanho e a quantificação dos fragmentos gênicos obtidos após a reação de PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito anteriormente.

Como controle positivo nos testes de amplificação dos genes *cyrB* e *cyrJ*, foi utilizado DNA genômico da linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* CYP-011K, cedida pela Profa. Sandra M.F.O. Azevedo (Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ) e originalmente isolada pelo Dr. Peter Backer do Lago Julius, Mount Isa, Queensland, Australia. Para os genes envolvidos na via biossintética de microcistina (*mcyE*, *mcyG*), foi utilizado como controle positivo o DNA genômico da linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777, cedida pela professora Dra. Célia Sant'Anna (Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, SP). Como controle positivo para os genes envolvidos na via biossintética de STX (*sxtA* e *sxtI*) foi utilizada a linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* T3, da coleção de culturas de cianobactérias do Laboratório de Ecologia Celular e Molecular de Cianobactérias da Profa. Marli de Fátima Fiore.

Tabela 1- Conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes envolvidos na biossíntese de cilindrospermopsina, saxitoxina e microcistina

Gene	Tamanho esperado (em pb)	Primer	Sequência dos primers utilizados (5'- 3')	Grupo enzimático	Função	Referência
<i>cyrB</i>	478	CPS - F/R	AGTATATGTTGCGGGACTCG CCCGCCAAGACAGAGGGTAG	NRPS/PKS	Ativação do guanidinoacetato	KELLMANN; MILLS; NEILAN, 2006
<i>cyrB</i>	534	M13-M14	GGCAAATTGTGATAGCCACGAGC GATGGAACATCGCTCACTGGTG	NRPS/PKS	Ativação do guanidinoacetato	SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001
<i>cyrJ</i>	730	CyrJ - F/R	ACTTCTCTCCTTTCCCTATC GAGTGAAAATGCGTAGAACTTG	Amidinotransferase	Sulfatação da molécula no C-12	MIHALI, et al., 2008; MAZMOUZ et al., 2010
<i>stxA</i>	200	STXA4-F/R	GGACTCGGCTTGTTGCTTC CCAGACAGCACGCTTCATAA	PKS	Formação de 4-amino-3-oxo-guanidinoheptane	HOFF-RISSETI, 2012
<i>stxI</i>	1669	STXI1-F/R	GCTTACTACCACGATAGTGCTGCCG GGTTCCGCCGCGGACATTA	<i>O</i> -carbamoiltransferase	Transferência de um grupo carbamoil	HOFF-RISSETI, 2012
<i>mcyE</i>	810	mcyE-F/R	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC AATTCTAAAGCCCAAAGACG	PKS/NRPS	Ativação e condensação da D-Glu com o ADDA	RANTALA et al., 2004
<i>mcyG</i>	385	mcyG-F/R	GAAATTGGTGCGGGAAGTGGAG TTTGAGCAACAATGATACTTTGCTG	NRPS/PKS	Formação do ADDA	FEWER et al., 2007

Tabela 2 - Reagentes utilizados nas reações de PCR para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse

Reagentes	Concentração
Tampão PCR 10×	1×
MgCl ₂	3mM
Oligonucleotídeo F (<i>forward</i>)	5 pmol ou 10 pmol
Oligonucleotídeo R (<i>reverse</i>)	5 pmol ou 10 pmol
dNTPs	0,2 mM
DNA molde	10 ng
Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen)	1,5 U
H ₂ O Ultra-pura	*
Volume final = 25 µL	
*quantidade suficiente para completar o volume final da reação para 25 µL	

Tabela 3 - Ciclagem das reações de amplificação por PCR dos fragmentos gênicos

Genes	Ciclagem	T.A.* (°C)
<i>cyrB</i>	94 °C/3 minutos; 30 ciclos de 94 °C/10 segundos; T. A./20 segundos; 72 °C/1 minuto e extensão final de 72 °C/7 minutos	61
<i>cyrJ</i>	94 °C/3 minutos; 30 ciclos de 95 °C/30 segundos; T. A./1 minuto; 72 °C/2 minutos e extensão final de 72°C/10 minutos	55
<i>mcyE</i>	95 °C/3 minutos; 30 ciclos de 94 °C/30 segundos; T.A./30 segundos; 72 °C/1 minuto; extensão final de 72 °C/10 minutos	56
<i>mcyG</i>	95 °C/3 minutos; 30 ciclos de 94 °C/30 segundos; T.A./30 segundos; 72 °C/1 minuto; extensão final de 72 °C/10 minutos	56
<i>stxA</i>	94 °C/5 minutos; 35 ciclos de 94 °C/30 segundos; T.A./30 segundos; 72 °C/30 segundos; extensão final de 72 °C/7 minutos	60
<i>stxI</i>	94 °C/3 minutos; 30 ciclos de 94 °C/10 segundos; T.A./20 segundos; 72 °C/1 minuto; extensão final de 72 °C/7 minutos	55

* T. A. corresponde à temperatura de anelamento, que está na coluna consecutiva.

4.3.2 Clonagem e transformação dos produtos da PCR

A clonagem dos produtos da PCR foi realizada usando o *kit* “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

O vetor contendo o inserto foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB (Luria-Bertani) 2 % segundo recomendações do fabricante (Becton, Dickinson and Company, Maryland, EUA), solidificado com 1,5 % de ágar, contendo ampicilina (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e X-gal (Invitrogen Life Technologies,

Carlsbad, CA, EUA) nas concentrações finais de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As placas foram incubadas por um período de 12 a 16 h em temperatura de 37°C .

As colônias brancas foram escolhidas aleatoriamente a fim de confirmar a presença dos insertos nos clones transformados. Esta confirmação foi realizada por meio de PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13-F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e M13-R (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'), nas seguintes condições: $94^\circ\text{C}/5$ minutos, 30 ciclos $95^\circ\text{C}/20$ segundos, $50^\circ\text{C}/15$ s e $60^\circ\text{C}/1$ min. As reações foram feitas em termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Limited).

Após a confirmação da presença dos insertos por eletroforese em gel de agarose 1 %, o DNA plasmidial dos clones positivos foi extraído pelo método de hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979) (com modificações): um volume de 3 mL de cultura bacteriana foi concentrado por centrifugação a $5000 \times g$ por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se $100 \mu\text{L}$ da solução I (Tris-HCl pH 8,0 25 mM, EDTA 20 mM e glicose $9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após a ressuspensão das células em vórtex foram adicionados $200 \mu\text{L}$ da solução II (NaOH 0,2 N e SDS 1%). Os tubos foram agitados por inversão e incubados em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados $150 \mu\text{L}$ da solução III (acetato de potássio 3 M e ácido acético glacial 11,5 %), e os tubos foram novamente invertidos e incubados em gelo por 7 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a $15.000 \times g$ a 4°C , durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual adicionou-se $270 \mu\text{L}$ de isopropanol a temperatura ambiente. Esses novos tubos foram invertidos e centrifugados a $15.000 \times g$ à temperatura de 4°C , durante 7 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e $250 \mu\text{L}$ de etanol 70 % foram adicionados, sem a necessidade de agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $15.000 \times g$ à temperatura de 4°C , por 2 minutos. Os sobrenadantes finais foram retirados com auxílio de micropipeta. Estes tubos foram mantidos por cerca de 10 minutos em estufa a 37°C , até que o pélete ficasse transparente. Finalmente, este pélete foi ressuspensionado em uma mistura de $2 \mu\text{L}$ de RNase $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $28 \mu\text{L}$ de água ultra-pura e incubado a 37°C por 30 minutos. A integridade e quantificação do DNA plasmidial extraído foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1 % de acordo com o descrito anteriormente.

4.3.3 Sequenciamento dos genes da CYN, STX e MCY

Os produtos de PCR clonados no plasmídeo foram reamplificados por PCR usando o *kit* BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Para a reação de amplificação foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial contendo o inserto e 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores M13-F e M13-R. Após a amplificação dos fragmentos de interesse, foi feita a precipitação dos mesmos conforme instruções do *kit*. Posteriormente, para o sequenciamento dos fragmentos de DNA, as reações precipitadas foram ressuspensas com 10 µL de formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems/Life Technologies) e injetadas no sequenciador capilar ABI PRISM[®] 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technologies), em corrida de aproximadamente 2,5 h. Os dados foram coletados e processados pelo programa ABI PRISM[®] DNA Sequencing Analysis Software versão 3.7 (Applied Biosystems/Life Technologies).

4.3.4 Processamento das amostras e análise filogenética

A montagem dos contigs, bem como, qualidade das sequências geradas foi realizada utilizando o pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON, ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional GNU/Linux. Somente as sequências que continham bases de índice de qualidade maior que 20 foram consideradas. As sequências consenso obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dado público GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, ALTSCHUL et al., 1990). Análises das sequências de aminoácidos também foram realizadas a fim de indicar a função das proteínas e dos domínios acessados. Para tanto, as sequências de nucleotídeos dos genes envolvidos na biossíntese de CYN, MCY e STX foram traduzidas para sequências de aminoácidos usando a ferramenta de tradução disponível no Expasy - Bioinformatics Resource Portal (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). As sequências de aminoácidos obtidas foram alinhadas com sequências similares retiradas do GenBank e usadas para gerar árvores filogenéticas. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando os algoritmos Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) e Maximum-Likelihood (ML) implementados pelo pacote de programas MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011) usando os parâmetros Kimura-2 e Tamura-Nei, respectivamente, como modelo de

evolução de sequência e repetições de 1.000 reamostragens para acessar a confiabilidade dos nós.

4.4 Análises químicas de CYN, STX e MCY

Análises por LC-MS foram realizadas a fim de detectar a presença de CYN, MCY e STX nas amostras ambientais, assim como identificar suas variantes estruturais. As amostras brutas coletadas, contendo células e o meio líquido, foram congeladas e liofilizadas juntamente, com o objetivo de acessar as substâncias presentes também no meio extracelular. Posteriormente, o liofilizado foi ressuspendido em ácido acético 0,05 M e as amostras centrifugadas ($10.000 \times g$, 10 min, 4 °C), e colocadas em tubos apropriados para as análises por LC-MS conforme descritas abaixo. O método de LC-MS mostrou ser o método ideal para a detecção de CYN em amostras onde sua quantidade era mínima e em amostras ambientais complexas (MOREIRA et al., 2012), motivo pelo qual foi escolhido como método de análise para as outras cianotoxinas também.

Análises cromatográficas de CYN foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan), equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo íon trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). Separações foram realizadas em coluna Synergy Hydro ($150 \times 2,0$ mm, 4 μ m; Phenomenex, CA, EUA), sendo a fase móvel A: água; e B: água-acetonitrila (10:90 v/v), ambas contendo 5 mM de formiato de amônio e 0,01% de ácido fórmico. Foi realizado um gradiente linear de 1 a 30% da fase móvel B em 15 min, 30 a 90% de B em 5 min, 90% de B por 2 min, 90 a 1% de B em 1 min e 1% de B por 12 min (tempo total de corrida: 35 min). O espectro de absorção foi obtido na faixa de 200-600 nm. O detector de efluentes foi dividido em 1:4 antes de entrar no espectrômetro de massas usando uma fonte de electrospray, operando em modo positivo a 4 KV. As análises foram realizadas usando o nitrogênio como gás de nebulização (35 psi) e secagem ($5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 300 °C) e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). Uma avaliação inicial das corridas foi feita na faixa de m/z 50 – 800. Adicionalmente, um experimento de monitoramento de reação múltipla (MRM) foi realizado, e as seguintes transições (m/z do íon precursor > íon fragmentado) foram selecionadas: CYN (m/z 416 > 336, m/z 416 > 274 e m/z 416 > 194); e 7-deoxy-CYN (m/z 416 > 320, m/z 416 > 274 e m/z 416 > 194). Considerando que não há padrão para

7-*epi*-CYN disponível, a banda cromatográfica única em 6,7 min para m/z 416 foi considerada como sendo de CYN. Análises quantitativas foram baseadas na curva de calibração construída pelas diluições em série do marcador comercialmente disponível de CYN (Abraxis, Warminster, PA, EUA).

Os análogos STX foram investigados por metodologias analíticas complementares: métodos de oxidação pós-coluna com detecção de fluorescência (HPLC-FD) de acordo com Diener et al. (2006; 2007) e um método baseado em cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas (HILIC-MS), seguindo as recomendações de Soto-Liebe et al. (2010).

No método de oxidação pós-coluna os compostos foram separados também em um cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) equipado com um forno de reação pós-coluna e um detector de fluorescência (RF-10Ax1). As separações foram obtidas com uma coluna de fase reversa Luna C₁₈ (250 × 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha) nas seguintes condições cromatográficas, fase móvel A: 10 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico em água; e B: acetonitrila-água (80:20 v/v) e uma concentração final de 8 mM de formiato de amônio. A vazão de fluxo foi de 0,7 mL·min⁻¹ com o seguinte gradiente linear: 82% de B em 24 min, 70% de B em 11 min, 65% de B em 15 min, retornando para 70% de B em 5 min e 82% de B em 15 min (tempo total de corrida: 70 min). O eluato da coluna foi constantemente oxidado com 10 mM de ácido periódico, 550 mM de hidróxido de amônio em água, em um fluxo de 0,3 mL·min⁻¹, dentro do forno de reação à temperatura de 50°C. Em seguida, o eluato foi acidificado com 0,75 M de ácido nítrico aquoso em um fluxo de 0,3 mL·min⁻¹. A toxina foi identificada pelo detector de fluorescência nos comprimentos de onda 330 nm (excitação) e 395 nm (emissão).

Para as análises com HILIC-MS um cromatógrafo Shimadzu Prominence (Kyoto, Japan) foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo íon trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics) com detector de arranjo de fotodiodos (PDA-M20A) e equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) operando em modo positivo a 5 KV. O argônio foi usado como gás de colisão. A fase móvel A consistiu de 5 mM de formiato de amônio e 2 mM de ácido fórmico em acetonitrila-água (80:20 v/v), e a fase móvel B de 10 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico em água. A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna ZIC-HILIC (250 × 4,6 mm, SeQuant, Haltern, Alemanha). Inicialmente, equilibrou-se a coluna com 80% de A por 20 min. O gradiente linear de eluição foi realizado com 65% de A até 5 min, 60% de

A até 10 min, 55% de A até 20 min, em seguida, realizou-se uma eluição isocrática com 55% de A até 24 min, retornando para 80% de A até 25 min (tempo total de corrida: 45 min). Vazão de fluxo de $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O monitoramento por MRM foi realizado em dois períodos, e as seguintes transições (m/z do íon precursor > íon fragmentado) foram selecionadas, período 1: GTX1/4 (m/z 412 > 332), C3/4 (m/z 412 > 314), GTX2/3, C1/2 e B2 (m/z 396 > 316 e m/z 396 > 298), B1 = GTX5 (m/z 380 > 300 e m/z 380 > 282), dcGTX2/3 (m/z 353 > 273), dcGTX1/4 (m/z 369 > 289); período 2: STX (m/z 300 > 282 e m/z 300 > 204), NEO (m/z 316 > 298 e m/z 316 > 196), dcSTX (m/z 257 > 196 e m/z 257 > 156) e dcNEO (m/z 273 > 255).

Novamente o nitrogênio foi usado como gás de nebulização (35 psi) e secagem ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 300°C), e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). Análises quantitativas foram baseadas na curva de calibração construída por diluições em série dos padrões comerciais das variantes de STX (National Research Council/Institute for Marine Biosciences, Halifax, NS, Canadá).

As análises exploratórias para avaliar os análogos de MCY também foram realizadas por LC-MS. Essas análises foram realizadas no mesmo cromatógrafo líquido equipado com um detector de arranjo de fotodiodos (PDA-M20A) e acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Íon Trap (Esquire HCT, Bruker Daltonics). Separações foram alcançadas em uma coluna Synergi-Fusion RP ($150 \times 2,00 \text{ mm}$, Marca) com um gradiente de eluição de: A- água; e B- água-acetonitrila (10:90 v/v), ambos eluentes contendo 2 mM de formiato de amônio e 0,01% de ácido fórmico. Um gradiente linear foi realizado com 15 a 70% da solução B em 45 min, 90% de B por 2 min, 90 a 15% de B em 1 min (tempo total de corrida: 48 min). A vazão de fluxo foi de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O espectro de absorção para MCY foi obtido na faixa de 235-240 nm. O detector de efluentes foi dividido em 1:4 antes de entrar no espectrômetro de massas usando uma fonte de electrospray (ESI), operando em modo positivo a 4 KV, sendo o argônio o gás de colisão. As análises foram realizadas usando o nitrogênio como gás de nebulização (30 psi) e secagem ($5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 300°C) e o hélio como gás tampão (4×10^{-6} mbar). Os espectros foram obtidos usando o modo de Ultrascan no intervalo de m/z 400 – 2200, e a fragmentação (MS^2) foi em modo automático com amplitude de fragmentação de 0,60 V. Nas análises de microcistina, os seguintes íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ foram selecionados: MC-RR (m/z 1038); MC-LR (m/z 995); MC-YR (m/z 1045); MC-LF (m/z 984); MC-LW (m/z 1023); MC-LA (m/z 910); MC-LL (m/z 952); MC-LF (m/z 986) (DIEHNELT; PETERMAN; BUDDE, 2005; DIEHNELT et al., 2006; RAVEH et al., 2010;

ZIEMERT et al., 2008; FUJII et al., 2002; ISHIDA; NAKAGAWA; MURAKAMI, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coletas e Análises Quantitativas

As observações por microscopia das amostras coletadas no Reservatório de Salto Grande (Ponto 1 - coletas 1 e 2, e Ponto 2), permitiram a identificação de 15 gêneros de cianobactérias, os quais estão listados na Tabela 4. Adicionalmente, foram observados indivíduos de outros filos, tais como: *Cryptomonas marssonii* e *Cryptomonas curvata* (Cryptophyta), *Monoraphidium griffithii* (Chlorophyta) e *Ceratium* sp. (Dinophyta). Ainda, alguns organismos foram identificados apenas em nível de classe ou ordem (Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Crysothricaceae e Volvocales).

Dentre os gêneros de cianobactérias observados, seis são conhecidos por possuírem linhagens produtoras de toxinas, sendo eles: *Microcystis* (WELKER; VON DÖHREN, 2006), *Dolichospermum* (WELKER; VON DÖHREN, 2006; NEILAN et al., 2012; LLEWELLYN, 2006; SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001; MIHALI et al., 2008; SPOOF et al., 2006), *Planktothrix* (WELKER; VON DÖHREN, 2006; (NEILAN et al., 2012; LLEWELLYN, 2006), *Coelosphaerium* (CHORUS; BARTRAM, 1999), *Geitlerinema* (DOGO et al., 2011; RANGEL et al., 2013) e *Oscillatoria* (MAZMOUZ et al., 2010). Ainda, Oliver e Ganf (2000) listaram algumas espécies pertencentes aos gêneros *Dolichospermum*, *Microcystis* e *Oscillatoria* como mais frequentemente encontradas em florações. Espécies destes três gêneros foram encontradas neste estudo, sendo que *Dolichospermum* e *Microcystis* foram encontrados em todas as amostras avaliadas e *Oscillatoria* apenas na coleta realizada no ponto 2. Em um estudo anterior conduzido no mesmo reservatório foram encontrados 26 táxons de cianobactérias (AGUIJARO, 2007), sendo que alguns se repetiram nas coletas deste estudo (*Coelosphaerium evidenter-maginatium*, *Dolichospermum* sp., *Geitlerinema* sp., *Merismopedia* cf. *glauca*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis panniformis*, *Oscillatoria* sp., *Planktothrix agardii*, *Pseudanabaena mucicola* e *Sphaerocavum* sp.). Em seu trabalho, a autora apresenta também dados de dois estudos anteriores ao seu (DEBERDT, 2002; TUCCI; DEBERDT; DEBERDT, 2004), onde há uma relação de todas as espécies já relatadas para este reservatório. Ainda assim, duas espécies inéditas para o local foram identificadas no presente estudo, ou seja, *Planktothrix isothrix* e *Komvophorum* cf. *crassum*.

Tabela 4 – Táxons identificados para o Ponto 1 (1ª e 2ª Coleta) e Ponto 2 e dados da contagem de células para Ponto 1 (2ª Coleta) e Ponto 2

Táxons de cianobactérias	Presença/Nº células		
<i>Coelosphaerium evidenter-magnum</i>	-	-	+899.399
<i>Coelosphaerium</i> sp.	+	-	-
<i>Dolichospermum</i> sp.	+	+181	+16.772
<i>Geitlerinema</i> sp.	-	+1.507	-
<i>Komvophorum</i> cf. <i>crassum</i>	-	+30	-
<i>Merismopedia</i> cf. <i>glaucia</i>	-	+483	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	+8.620	+254.789
<i>Microcystis panniformis</i>	-	-	+156.745
<i>Microcystis</i> sp.	+	-	-
<i>Oscillatoria</i> sp.	-	-	+57
<i>Planktothrix agardii</i>	-	+60	-
<i>Planktothrix isothrix</i>	-	+30	-
<i>Planktothrix</i> sp.	+	-	-
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	-	-	+287
<i>Sphaerocavum</i> sp.	+	-	-
Outros grupos			
Bacillariophyceae	-	+241	+402
<i>Ceratium</i> sp.	-	-	+172
Chlorophyceae	-	-	+57
<i>Cryptomonas curvata</i>	-	+362	57
<i>Cryptomonas marssonii</i>	-	+46.114	+222.107
Crysophyceae	-	-	+57
<i>Monoraphidium griffithii</i>	-	+30	-
Volvocales	-	-	+57
Total		57.658	1.550.960

A primeira amostragem realizada no Ponto 1 (1ª coleta) foi conduzida com o objetivo de se observar quais os gêneros de cianobactérias estavam presentes no reservatório. Representantes dos gêneros de *Planktothrix*, *Dolichospermum*, *Sphaerocavum*, *Coelosphaerium* e *Microcystis* foram encontrados. A presença de floração cianobacteriana nesta área foi visualmente observada, indicada pela existência de uma abundante biomassa verde na superfície da água. A dominância de colônias do gênero *Microcystis* foi constatada por microscopia.

Nas demais amostragens realizadas, uma análise quantitativa do fitoplâncton de dois pontos distintos do reservatório foi realizada por contagem de células, utilizando a técnica de Utermöhl (UTERMÖHL, 1958). Ao se avaliar o fitoplâncton total obtém-se a densidade de células por mililitro de água, o que permite verificar o contingente de cianobactérias no total de indivíduos avaliados. Em alguns casos a determinação exata

da espécie não foi possível, devido às limitações da própria metodologia, como fixação com lugol. Nestes casos, as células foram computadas apenas dentro dos gêneros as quais pertencem, e contadas normalmente. No Ponto 1 (2ª coleta), foi encontrado um total de 57.658 células·mL⁻¹. Destes, somente 10.941 corresponderam a células de cianobactérias, mostrando uma prevalência de outros componentes do fitoplâncton sobre as células de cianobactérias. No Ponto 2, de um total de 1.550.960 células·mL⁻¹, 1.327.707 pertenciam a cianobactérias, mostrando agora a predominância destes indivíduos no ambiente. O número exorbitante de células, principalmente no que concerne a indivíduos unicelulares, como as de *Microcystis* e *Coelosphaerium*, permite afirmar se tratar de uma floração (Figuras 10 e 11). Apesar do número inferior de células encontrado no Ponto 1 (2ª coleta), em ambos os pontos, os valores extrapolaram o limite estabelecido de 10.000 células/mL da Portaria MS 2914 que preconiza uma frequência semanal no monitoramento das cianobactérias pelos órgãos gestores.

Agujaro (2007) em seu trabalho também relata a predominância de cianobactérias sobre outros membros do fitoplâncton nos mesmos dois pontos amostrados do reservatório de Salto Grande. Na Praia dos Namorados, aqui referido como Ponto 2, durante o período de 11 meses em que realizou as coletas, apenas os meses de julho e setembro não tiveram a predominância de cianobactérias; já no Ponto “Iate Clube”, aqui referido como Ponto 1, apenas os meses de maio, junho e setembro. Neste presente estudo, o mês de março - onde foi realizada a segunda coleta do ponto 1 - não apresentou floração intensa, dado este que difere dos encontrados pela autora e que indica que a variação sazonal da comunidade cianobacteriana pode não ser exata, podendo ser influenciada por diversos fatores. Além disso, a autora cita a predominância de uma espécie de *Microcystis* - *M. panniformis* - e da espécie oportunista *Pseudanabaena mucicola* sobre as outras cianobactérias. Neste presente estudo, a espécie cianobacteriana que se destaca em relação ao número de células por mililitro é a *Coelosphaerium evidenter-magnum*, seguida de outras duas espécies de *Microcystis*: *M. aeruginosa* e *M. panniformis*. A respeito de outros membros do fitoplâncton, há um destaque para a espécie de Cryptophyta *Cryptomonas marssonii*, que apresenta uma abundância relativa expressiva, corroborando os resultados também observados por Agujaro (2007). Essa autora verificou em seu estudo que, no período onde não havia predominância de cianobactérias (julho e setembro), no Ponto 2, 49,5% dos membros do fitoplâncton eram Cryptophyta.

Em outro estudo realizado em 2000 neste mesmo reservatório, verificou-se a predominância de cianobactérias, com picos sazonais (SOUZA, 2000). Constatou-se também, assim como Agujaro (2007) e o presente estudo, a presença de espécies oportunistas, como *Pseudanabaena mucicola*, que crescem aderidas a mucilagem de espécies de *Microcystis*.

A atual portaria do Ministério da Saúde de Nº 2914, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, em seu Artigo 40, § 4º preconiza que: “Quando a densidade de cianobactérias exceder 20.000 células/mL, deve-se realizar análise de cianotoxinas na água do manancial, no ponto de captação, com frequência semanal”. Neste estudo, uma das coletas onde a contagem de células foi realizada, houve o extrapolamento desse valor de 20.000/mL. Esses dados reafirmam a importância de se realizar a contagem de células, assim como preconizado pelo ato ordinatório.

Figura 10 - Micrografias das cianobactérias coletadas no Ponto 1 (1ª e 2ª Coletas) do Reservatório de Salto Grande, Americana/SP. A) *Microcystis aeruginosa*, B) *Coelosphaerium*, C) Colônia de *Microcystis panniformis* e *Microcystis aeruginosa* (seta) – destaque para a diferença no tamanho das células, D) *Dolichospermum*, E) *Planktothrix agardhii* (seta) F) *Dolichospermum* (seta 1) e *Microcystis aeruginosa* (seta 2), G) *Dolichospermum* e H) *Microcystis aeruginosa*

Figura 11 - Micrografias das cianobactérias coletadas no Ponto 2 do Reservatório de Salto Grande, Americana/SP. A) *Pseudanabaena mucicola*, B) *Dolichospermum*, C) *Microcystis aeruginosa* e *Pseudanabaena mucicola* e D) *Microcystis panniformis*

5.2 Análises moleculares e potencial genético para produção de cianotoxinas

O potencial genético para produção das toxinas microcistina, cilindrospermopsina e saxitoxina da comunidade cianobacteriana foi verificado por meio de ampliações por PCR dos genes *cyrB* e *cyrJ* (CYN), *sxtA* e *sxtI* (STX) e *mcyE* e *mcyG* (MCY), cujos resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes de amplificação por PCR para os genes *cyrB*, *cyrJ*, *sxtA*, *sxtI*, *mcyE* e *mcyG*, nas diferentes coletas

Locais	Coleta	Microcistina		Cilindrospermopsina		Saxitoxina	
		<i>mcyE</i>	<i>mcyG</i>	<i>cyrB</i>	<i>cyrJ</i>	<i>sxtA</i>	<i>sxtI</i>
Ponto 1	1 ^a	+	+	-	+	-	+
Ponto 1	2 ^a	+	+	-	-	+	-
Ponto 2		+	+	-	-	-	-

(+) amplificação por PCR positiva; (-) não amplificado

O gene *cyrB* (específico para a cianotoxina cilindrospermopsina) não foi detectado em nenhuma das avaliações por PCR. As reações de PCR foram feitas utilizando-se dois conjuntos diferentes de oligonucleotídeos iniciadores específicos, descritos por Kellmann e colaboradores (2006), e por Schembri, Neilan e Saint (2001), na tentativa de detectar o gene e evitar resultados falso-negativos. Yilmaz e Philips (2011) verificaram a presença do gene *cyrB* em 10 amostras das 43 coletadas em 17

lagos e rios da Flórida, nos Estados Unidos. Esses autores utilizaram os iniciadores desenhados por Schembri, Neilan e Saint (2001) que tem como alvo o domínio de adenilação do *cyrB* e observaram que as sequências obtidas foram bem conservadas. Os testes de neutralidade sugeriram que a baixa frequência de variação deste domínio indica a ação de seleção purificadora, o que explicaria os poucos polimorfismos existentes na população. Apesar do resultado negativo para a presença do gene *cyrB* nas amostras avaliadas, este gene já foi detectado no Brasil em amostras ambientais de três reservatórios do Estado de Pernambuco (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2011) e também em duas linhagens de *Cylindrospermopsis raciborskii*, uma isolada da represa Billings (São Bernardo do Campo, SP) e outra do lago Theobaldo (Lajeado, RS) (HOFF-RISSETI et al., 2013). Entretanto, nas amostras do reservatório alvo deste estudo, não foi encontrada a espécie *C. raciborskii* investigada por Hoff-Risseti et al. (2013) e observada na amostra ambiental avaliada por Bittencourt-Oliveira e colaboradores (2011). Estes últimos autores também observaram a espécie *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* em suas amostras, a qual não estava presente nas amostras avaliadas do reservatório de Salto Grande.

Resultado positivo para amplificação do gene *cyrJ* foi obtido por PCR no DNA genômico da coleta no ponto 1 (1ª coleta). Este gene codifica para uma proteína semelhante a uma sulfotransferase, e, segundo Kellmann e colaboradores (2008), realiza uma etapa que é fundamental na toxicidade da molécula de CYN. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho a detectar amplificação positiva para o gene *cyrJ* em amostras ambientais de reservatório de água no Brasil. Hoff-Risseti et al. (2013), ao analisarem linhagens isoladas de *Cylindrospermopsis raciborskii* do Reservatório Billings, conseguiram a amplificação positiva dos genes *cyrA*, *cyrB* e *cyrC* e relatam que não conseguiram amplificar o gene *cyrJ*, mesmo após inúmeras tentativas.

A análise filogenética da sequência de aminoácidos CyrJ (Figura 12), cuja sequência de nucleotídeos foi obtida neste trabalho, mostrou um agrupamento com as sequências do aminoácido CyrJ de linhagens produtoras de CYN, isoladas de ambientes de água doce: as australianas *C. raciborskii* AWT 205 e *C. raciborskii* CS-505 (ambas isoladas da barragem de Solomon), que formam um grupo-irmão com a *Aphanizomenon* sp. 10E6 – isolada do Lago Melangsee (Alemanha) e a linhagem *Raphidiopsis curvata* CHAB1150, cuja única informação disponível é que foi isolada na China. Mais distante, porém em clado relacionado, se encontram as sequências das linhagens *Oscillatoria* sp. PCC6506 de origem desconhecida e da brasileira *C. raciborskii* T3, a qual não é

produtora de CYN, e foi isolada no braço Taquacetuba da Represa Billings, em São Paulo. A sequência da *C. raciborskii* T3, que fica como grupo externo na árvore filogenética, entretanto, codifica uma sulfotransferase putativa (SxtN) envolvida na biossíntese de STX (KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008).

Figura 12 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos CyrJ. A sequência obtida neste estudo, a partir do DNA obtido no ponto 1 está realçada em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises ML/NJ estão apresentados em cada nó

Assim como representado pela árvore filogenética, análises realizadas com a ferramenta Blastp (NCBI) mostram que a sequência de aminoácido CyrJ da amostra analisada apresentou elevada similaridade com sequências de linhagens produtoras de CYN (*C. raciborskii* CS-505, *Aphanizomenon* sp. 10E6 e *R. curvata* CHAB1150). Por outro lado, a similaridade das sequências CyrJ das amostras ambientais brasileiras analisadas neste estudo foi baixa quando comparada com *Oscillatoria* sp. PCC6506 (produtora de CYN) e ainda menor com a linhagem brasileira não-produtora *C. raciborskii* T3 (produtora de STX), mostrando uma maior proximidade com as sequências de linhagens produtoras de CYN, Tabela 6.

Tabela 6 - Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos CyrJ obtidos a partir de amostras da primeira coleta, em relação a sequências de linhagens de cianobactérias produtoras e não produtora de CYN

Linagem	Origem	CyrJ (aa)	1	2	3	4	5	6
1. Ponto 1 (1ª coleta)	Este estudo	169	-					
2. <i>C. raciborskii</i> AWT205	Austrália	259	98	-				
3. <i>C. raciborskii</i> CS505*	Austrália	259	98	100	-			
4. <i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6*	Alemanha	261	95	98	98	-		
5. <i>R. curvata</i> CHAB1150*	China	261	95	98	98	99	-	
6. <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506*	França	261	84	86	86	86	86	-
7. <i>C. raciborskii</i> T3	Brasil	276	32	30	30	31	31	31

(*) Linhagens produtoras de cilindrospermopsina

O resultado positivo para a presença de gene da via biossintética de CYN no reservatório Salto Grande na amostra do Ponto 1 (1ª coleta) sugere que uma cianobactéria desta amostra possuía o gene *cyrJ*. Considerando a análise microscópica dos gêneros existentes nesta amostra (Tabela 4) e os conhecidamente produtores de CYN, pode-se supor que *Dolichospermum* sp. (anteriormente denominada *Anabaena*) seja a que contém esse gene. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que esse gene pertença a outro gênero cianobacteriano e pode representar um remanescente ou um intermediário de outra forma ancestral de um agrupamento de CYN funcional (HOFF-RISSETI et al., 2013). A aquisição e/ou perda de genes de cianotoxinas em cianobactérias ainda não é compreendida e tanto transferências vertical e horizontal foram sugeridos para o agrupamento gênico *cyr* (MAZMOUZ et al., 2010; KELLMANN; MILLS; NEILAN, 2006; JIANG et al., 2012; STUCKEN et al., 2009; STÜKEN; JAKOBSEN, 2010).

Os genes específicos para a cianotoxina STX foram detectados em duas coletas: o gene *sxtA* foi detectado nas avaliações por PCR do DNA genômico obtido na amostragem do ponto 1 (2ª coleta) e o gene *sxtI* foi detectado também no material do ponto 1 (1ª coleta). O gene *sxtA* codifica para a enzima que dá início à biossíntese de STX, sendo semelhante a uma PKS (poliketídio sintase). Na análise filogenética (Figura 13), a sequência de aminoácidos SxtA ficou agrupada com sequências de linhagens brasileiras produtoras de STX, isoladas da Represa Billings: *R. brooki* D9, *C. raciborskii* T3 e *C. raciborskii* CENA302, sugerindo proximidade geográfica. Mais distante, porém em um clado irmão, se encontram as sequências das linhagens também produtoras de STX: *A. flos-aquae* NH-5 – isolada de um pequeno lago em Durham, nos EUA e *D. circinale* AWQC131C (Austrália) e mais distante está *Lyngbya wollei* – isolada do Reservatório de Guntersville, nos Estados Unidos.

O gene *sxtI* codifica uma *O*-carbamoiltransferase (SxtI), responsável pela transferência de um grupo carbamoil para a cadeia lateral do precursor da STX, sendo, portanto, uma das enzimas chaves na biossíntese desta toxina (KELLMANN et al., 2008). Na árvore filogenética, a sequência de aminoácido SxtI, obtida da amplificação do DNA genômico total da amostra do ponto 1 (1ª coleta), fica agrupada com a da linhagem brasileira *C. raciborskii* CENA302. Entretanto, outras duas linhagens brasileiras *R. brooki* D9 e *C. raciborskii* T3 ficaram afiliadas ao clado mais distantemente relacionado, juntamente com sequências originárias de outros países (*A. flos-aquae* NH-5, *D. circinale* AWQC131C e *Lyngbya wollei*). Comparando esta filogenia com a obtida

para a sequência SxtA, pode-se supor uma história evolutiva distante para cada um desses genes.

Figura 13 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos Sxt. O DNA ambiental utilizado neste estudo está em negrito. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises ML/NJ estão apresentados em cada nó.(A) SxtA; (B) SxtI

A ferramenta Blastp foi novamente usada para comparar o percentual de similaridade das sequências de aminoácidos SxtA e SxtI obtidos neste trabalho com sequências homólogas de linhagens produtoras de STX depositadas no GenBank (Tabela 7). A similaridade da sequência SxtA foi alta quando comparada com as outras linhagens: *C. raciborskii* CENA302, *C. raciborskii* T3, *R. brookii* D9, *Aph. flos-aquae* NH-5, *D. circinale* AWQC131C e *Lyngbya wollei*. O mesmo padrão ocorre com a similaridade da sequência SxtI, que também foi alta com todas as linhagens, com exceção de *L. wollei*. Esta última apresentou a menor similaridade com a sequência obtida no ponto 1 (1ª coleta). Este fato pode ser explicado pela variação no agrupamento gênico de STX descrito para a linhagem *L. wollei*, como a inserção de um gene que pode ter causado o truncamento ou a inativação do gene *sxtI* (KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008).

Tabela 7 – Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Sxt das coletas no Ponto 1 (1ª e 2ª) com sequências homólogas de linhagens produtoras de STX. (A) SxtA; (B) SxtI

A								
Linhagem	Origem	SxtA (aa)	1	2	3	4	5	6
1. Ponto 1 (2ª coleta)	Este estudo	53	-					
2. <i>R. brookii</i> D9*	Brasil	1245	98	-				
3. <i>C. raciborskii</i> T3*	Brasil	1245	98	99	-			
4. <i>C. raciborskii</i> CENA302*	Brasil	66	96	98	98	-		
5. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NH-5*	EUA	351	89	95	95	91	-	
6. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC131C*	Austrália	413	89	88	94	88	99	-
7. <i>Lyngbya wollei</i> *	EUA?	1243	85	88	88	88	92	92
B								
Linhagem	Origem	SxtI (aa)	1	2	3	4	5	6
1. Ponto 1 (1ª coleta)	Este estudo	308	-					
2. <i>R. brookii</i> D9*	Brasil	612	99	-				
3. <i>C. raciborskii</i> T3*	Brasil	612	99	100	-			
4. <i>Dolichospermum circinale</i> AWQC131C*	Austrália	612	87	91	91	-		
5. <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NH-5*	EUA	612	89	92	92	97	-	
6. <i>Lyngbya wollei</i> *	EUA?	356	73	81	81	77	79	-
7. <i>C. raciborskii</i> CENA302*	Brasil	301	99	99	99	88	89	73

(*)Linhagens produtoras de saxitoxina

A presença de gene da via biossintética de STX no reservatório de Salto Grande sugere que cianobactéria(s) desse local possui(em) genes *sxtA* e *sxtI*. Considerando a análise microscópica dos gêneros existentes nas amostras (Tabela 4) e os conhecidamente produtores de STX, pode-se supor que a *Dolichospermum* sp. ou a *Planktothrix* sp. (POMATI et al., 2000) contenham esses genes. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que estes genes sejam remanescentes ou intermediários de outra forma ancestral de um agrupamento de STX funcional (HOFF-RISSETI et al., 2013). Além disso, existe ainda a possibilidade da presença desses genes na espécie *Microcystis aeruginosa* (SANT'ANNA et al., 2011).

Em relação aos genes específicos para a toxina MCY, o gene *mcyE*, o qual supõe-se estar envolvido na ativação e condensação da D-Glu com o Adda, e o gene *mcyG*, responsável pelo primeiro passo na biossíntese do Adda, foram detectados em ambos os pontos e todas as coletas. Nas análises filogenéticas (Figura 14 - A), as sequências de McyE obtidas a partir do DNA genômico do ponto 1 (1ª coleta) e ponto 2 ficaram agrupadas com a sequência da linhagem brasileira *M. aeruginosa* RST 9501, produtora de MCY, isolada em uma floração no estuário da Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul. Já a sequência obtida a partir do DNA ambiental do ponto 1 (2ª coleta) ficou agrupada com uma sequência de McyE da linhagem americana produtora de MCY, *M. aeruginosa*, e, como ramo irmão, a linhagem sueca *P. rubescens* NIVA-CYA126/8, isolada do Lago Langsjon, produtora de microcistina e possivelmente

produtora de microginina. Estudo realizado com duas linhagens brasileiras de *Microcystis* isoladas do mesmo reservatório Salto Grande, relatou a produção simultânea de microcistina e microginina (CARNEIRO et al., 2012). Isto já havia sido alertado anteriormente por Rounge e colaboradores (2009) quando descreveram um cluster gênico envolvido na produção de microginina em uma linhagem produtora de microcistina. Este caso nos alerta para o fato de uma linhagem conhecidamente tóxica estar produzindo simultaneamente um potente inibidor de protease e, mais uma vez, mostra a necessidade de conhecermos as cianobactérias presentes em nossos reservatórios.

Já nas análises filogenéticas do McyG (Figura 14 - B), cuja sequência de aminoácidos gerada a partir do DNA ambiental do ponto 1 (1ª coleta), agrupou-se com as sequências das linhagens produtoras de MCY japonesas *M. aeruginosa* NIES-843, isolada do Lago Kasumigaura em 1997 e NIES-102, isolada de água doce na província de Ibaraki (KAWACHI et. al, 2013). As sequências obtidas no ponto 1 (2ª coleta) e ponto 2 ficaram agrupadas com a sequência da linhagem produtora brasileira *M. aeruginosa* SPC777, isolada da Represa Billings (CRESPIM, 2013). Estes dados mostram que há genes da via biossintética produtora de MCY no reservatório de Salto Grande, assim como ocorre a produção da cianotoxina MCY. Estes dados são corroborados pela análise química LC/MS-MS (item 5.3), onde foi detectada a molécula de MCY no ponto 1 (2ª coleta) e ponto 2.

Figura 14 - Árvores filogenéticas de sequências de aminoácidos Mcy. O DNA ambiental utilizado neste estudo está em negrito, correspondendo ao número da coleta. Valores de reamostragem acima de 50% nas análises ML/NJ estão apresentados em cada nó. A) McyE; B) McyG

A similaridade das sequências Mcy das linhagens estudadas foi analisada com a ferramenta Blastp, Tabela 8, e mostram que as diferentes espécies do gênero *Microcystis* apresentaram alta similaridade nas sequências do McyG, sendo mais elevada entre linhagens da mesma espécie, mesmo quando as linhagens foram isoladas de países diferentes. Portanto, estes dados sugerem que as sequências McyG são mais conservadas entre linhagens da mesma espécie. Dessa forma, as sequências McyG das linhagens *P. rubescens* NIVA-CYA126/8 e *Anabaena* sp 90 apresentam baixos valores de similaridade com as de *Microcystis*. Além disso, a *Anabaena* sp. 90 apresenta uma inversão na organização gênica, quando comparada com algumas linhagens de *Microcystis aeruginosa* e *Planktothrix agardhii* (ROUHLAINEN et. al, 2004). Também a linhagem *P. rubescens* NIVA-CYA 126/8, anteriormente descrita como *P. agardhii*,

difere em seu arranjo genético das linhagens de *Microcystis*. Esta linhagem, *P. rubescens* NIVA-CYA 126/8, possui uma ORF a mais que as linhagens de *Microcystis*, designada *mcyT* - que codifica uma tioesterase - e, além disso, tem dois genes a menos (*mcyF* e *mcyI*) e a inversão de outros genes (CHRISTIANSEN et al., 2003).

Tabela 8 – Percentual de similaridade das sequências de aminoácidos Mcy de todas as coletas com sequências homólogas de linhagens produtoras de MCY e possível produtora de microginina. (A) McyE; (B) McyG

A												
Linhagem	Origem	McyG (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Ponto 1 (1ª coleta)	Este estudo	161	-									
2. Ponto1 (2ª coleta)	Este estudo	161	98	-								
3. Ponto 2	Este estudo	161	98	99	-							
4. <i>M. aeruginosa</i> SPC777*	Brasil	2006	98	99	100	-						
5. <i>M. aeruginosa</i> k-139*		2632	99	99	99	99	-					
6. <i>M. aeruginosa</i> PCC7820*	França	2619	99	99	99	99	99	-				
7. <i>M. aeruginosa</i> PCC7806*	França	2631	98	98	99	98	98	99	-			
8. <i>M. viridis</i> NIES 102*	Japão	161	98	98	98	98	99	99	98	-		
9. <i>M. aeruginosa</i> NIES 843*	Japão	2631	98	96	96	96	96	96	96	98	-	
10. <i>Anabaena</i> sp. 90*	Finlândia	2635	75	74	75	71	71	71	71	74	71	-
11. <i>P. agardhii</i> NIVA-CYA 126/8*	Finlândia	2640	78	78	78	74	76	76	76	78	76	75

B														
Linhagem	Origem	McyE (aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Ponto 1 (1ª coleta)	Este estudo	257	-											
2. Ponto1 (2ª coleta)	Este estudo	257	45	-										
3. Ponto 2	Este estudo	257	98	45	-									
4. <i>M. aeruginosa</i> RST 9501*	Brasil	257	99	45	99	-								
5. <i>M. aeruginosa</i> IZANCYA 5*	Portugal	257	98	45	99	99	-							
6. <i>M. viridis</i> NIES 102*	Japão	257	96	45	97	97	97	-						
7. <i>Microcystis</i> sp. GL260735*	França	257	96	45	97	97	97	98	-					
8. <i>M. aeruginosa</i> NPLJ-4*	Brasil	257	96	45	96	97	97	98	98	-				
9. <i>Anabaena</i> sp. 90*	Finlândia	604	35	76	35	35	35	35	35	35	-			
10. <i>M. aeruginosa</i> NIES 843*	Japão	689	83	71	83	83	83	83	25	83	70	-		
11. <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98* #	Noruega	668	83	95	83	83	83	83	83	83	73	64	-	
12. <i>M. aeruginosa</i> *	EUA?	667	83	98	83	83	83	83	83	83	72	63	94	-
13. <i>M. aeruginosa</i> SPC777*	Brasil	2006	45	24	56	39	50	56	56	36	62	64	24	38

(*) produtora de microcistina, (#) possível produtora de microginina

Quanto às sequências de McyE, houve uma maior similaridade entre as sequências obtidas a partir do DNA genômico extraído no ponto 1 (1ª coleta) e ponto 2 com as sequências de linhagens brasileiras, *M. aeruginosa* RST 9501 - isolada no Lago dos Patos, RS - e *M. aeruginosa* NPLJ-4 – isolada na Laguna de Jacarepaguá, no RJ, a portuguesa *M. aeruginosa* IZANCYA 5 – isolada do Lago Mira, a japonesa *M. viridis* NIES 102, isolada em água doce da província de Ibaraki e a francesa *Microcystis* sp. GL260735, isolada do Lago Grand-Lieu.

A sequência do aminoácido McyE obtida a partir do DNA genômico do ponto 1 (2ª coleta) apresentou a mais alta cobertura com a da *Microcystis aeruginosa* isolada dos Estados Unidos.

A detecção de genes de MCY no reservatório Salto Grande foi um indicativo de que cianobactéria(s) presente(s) nesse ambiente aquático estava(m) produzindo essa toxina, o que foi confirmado pelas análises químicas (item 5.3). Considerando a análise microscópica dos gêneros existentes nas amostras (Tabela 4) e os conhecidamente produtores de MCY, pode-se supor que as espécies de *Microcystis* e/ou *Planktothrix* e/ou *Dolichospermum* são as responsáveis pela biossíntese desta toxina.

5.3 Análises Químicas

Quimicamente, as moléculas de CYN e STX não foram detectadas em nenhum dos pontos amostrados (Tabela 9 e Figuras 15 e 16). Como exemplificado na Figura 15 - B, não é possível observar pico cromatográfico no tempo de retenção correspondente ao padrão de CYN (Figura 15 -A, 4,15 min) para amostra coletada no Ponto 2. Resultados semelhantes foram encontrados para as demais amostras coletadas (dados não apresentados). É válido destacar que os dois cromatogramas apresentados na Figura 15 correspondem a transições iônicas distintas: 416>176 e 416>194. O monitoramento de duas transições e sua razão de intensidade é importante para assegurar a especificidade da metodologia, diminuindo assim a possibilidade de falsos positivos. Já nas análises de STX, a cromatografia de interação hidrofílica seguida de oxidação pós-coluna e detecção por fluorescência foi empregada (HILIC-FD). Os resultados para amostras de três coletas distintas são apresentados na Figura 16 - B, C e D. Como demonstrado, nenhum pico cromatográfico expressivo pode ser observado nos tempos de retenção correspondentes aos padrões analíticos (GTX1e4, GTX2e3, dcGTX2e3, NEO, STX e dcSTX; Figura 16 - A).

Tabela 9 – Presença de cianotoxinas nas coletas dos Pontos 1 (coleta 1 e 2) e Ponto 2, analisados através da técnica de LC-MS/MS

	Ponto 1 1ª Coleta	Ponto 1 2ª Coleta	Ponto 2
Data da coleta	19/09/2012	22/03/2013	23/08/2013
pH	7,95	7,67	7,73
Presença de CYN	-	-	-
Presença de STX	-	-	-
Presença de MCY	-	+	+

Figura 15 – Cromatogramas de LC-MS/MS para análise de CYN; (A) Padrão de CYN com as transições 416>176 e 416>194; (B) Perfil cromatográfico para amostra do Ponto 2

Figura 16 – Cromatogramas de HILIC-FD para análise de STX; (A) MIX de padrões GTX1e4, GTX2e3, dcGTX2e3, NEO, STX e dcSTX; (B) Amostra do Ponto 1 (1ª Coleta); (C) Amostra do Ponto 1 (2ª Coleta); (D) Amostra do Ponto 2

Por outro lado, análises cromatográficas revelaram a presença de MCY, especialmente as variantes MC-LR e MC-RR (Figuras 17, 18 e 19). A Figura 17 apresenta os resultados obtidos para a 1ª coleta realizada no Ponto 1. A Figura 17 - A mostra um cromatograma de LC-MS dos padrões analíticos MC-RR, MC-YR, MC-LR e MC-LA, enquanto que a Figura 17 - B, C, D e E mostram espectros de fragmentação (MS/MS) característicos destas moléculas. Já o resultado para a amostra ambiental é demonstrado na Figura 17 - F. Curiosamente, o cromatograma apresenta um pico cromatográfico com tempo de retenção próximo àquele correspondente ao padrão MC-LR. Entretanto, uma segunda análise realizada mostra que o espectro de fragmentação deste composto não corresponde a nenhuma variante de MCY (Figura 17 - G).

Figura 17 – Cromatogramas referentes a Primeira Coleta A) Mix de padrões (MC-RR, MC-YR, MC-LR e MC-LA, na ordem de eluição), B) Espectro MS2 da RR, C) Espectro MS2 da MC-YR, D) Espectro de MS2 da MC-LR, E) Espectro de MS2 da MC-LA, F) Cromatograma da Amostra do ponto 1 (1ª coleta) e G) Espectro de MS2 decomposto aos 15,5 minutos (o qual não corresponde a MC-LR, nem outra variante)

Figura 17 – Cromatogramas referentes a Primeira Coleta A) Mix de padrões (MC-RR, MC-YR, MC-LR e MC-LA, na ordem de eluição), B) Espectro MS2 da RR, C) Espectro MS2 da MC-YR, D) Espectro de MS2 da MC-LR, E) Espectro de MS2 da MC-LA, F) Cromatograma da Amostra do ponto 1 (1^a coleta) e G) Espectro de MS2 decomposto aos 15,5 minutos (o qual não corresponde a MC-LR, nem outra variante)

Na Figura 18 são apresentados os resultados obtidos para a amostra do Ponto 1, porém a 2^a coleta. A Figura 18 - A mostra um cromatograma de LC-MS (varredura de íons precursores) para os padrões analíticos MC-RR, MC-YR e MC-LR. Nesta metodologia de análise é realizada uma varredura de compostos químicos cuja fragmentação (MS/MS) produz íons de m/z 135, um fragmento característico da cadeia lateral do aminoácido exótico Adda. Dessa forma, possíveis microcistinas são

prontamente identificadas em uma matriz complexa. Estes compostos são inicialmente considerados candidatos pois uma segunda análise confirmatória é necessária. Já a Figura 18 - B e C demonstram os cromatogramas obtidos para a amostra ambiental, revelando picos cromatográficos como possíveis microcistinas. Em uma terceira análise, pôde-se confirmar a presença das variantes MC-LR e MC-RR (Figura 18 - D e E), em concentrações de 6,15 ng/mL e 13,5 ng/mL, respectivamente.

Figura 18 – Cromatogramas de LC-MS para varredura de íons precursores de m/z 135; (A) padrões de MC-RR, MC-YR, MC-LR E MC-LA (na ordem de eluição); (B) e (C) cromatogramas referentes ao Ponto 1 (2ª Coleta); (D) cromatograma para transição 995>135 (MC-LR); (E) cromatograma para transição 520>135 (MC-RR)

A Figura 19 apresenta os resultados para a amostra obtida no Ponto 2 (coleta única). Novamente, a varredura de íons precursores de m/z 135 foi empregada. A Figura 19 - A e B mostram cromatogramas com possíveis microcistinas, enquanto que as letras C e D mostram espectros de massas confirmando a presença de MC-RR e MC-LR, respectivamente. Os dados quantitativos revelam concentrações de 275 ng/mL da variante RR e 9,12 ng/mL da variante LR.

Figura 19 – Resultados obtidos para amostra do ponto 2; (A) Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 no intervalo de m/z 450 a 600 (possíveis microcistinas na forma $[M+2H]^{2+}$); (B) Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 no intervalo de m/z 800 a 1400 (possíveis microcistinas na forma $[M+H]^+$); (C) Espectro de massas demonstrando a presença de MC-RR; (D) Espectro de massas demonstrando a presença de MC-LR

Na amostra do ponto 1 (1ª coleta), onde havia uma densa floração, não foi possível detectar MCY, enquanto que na segunda coleta neste ponto, mesmo sem floração evidente, MCY foram encontradas em baixas concentrações (6,15 ng/mL da variante LR e 13,5 ng/mL da variante RR). Já na coleta realizada no ponto 2, onde havia uma floração pouco evidente, MCY foram encontradas em altíssimas concentrações: 275 ng/mL da variante RR e 9,12 ng/mL da variante LR. Este padrão é comumente observado em amostras ambientais, ou seja, MCY não são detectadas em florações extremamente densas, mas nos casos de florações não tão expressivas, as toxinas podem ser detectadas em concentrações significativas (Felipe A. Dörr, comunicação pessoal). Segundo o pesquisador, este fato pode ser observado mesmo empregando-se técnicas distintas de análise, como LC-MS e imunoenaios (ELISA).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que espécies de *Microcystis* dominam o ambiente do reservatório Salto Grande e possivelmente são as principais responsáveis pela produção da hepatotoxina microcistina. As concentrações altas desta toxina encontradas em locais de recreação representam risco para saúde pública e medidas urgentes de restrição a essas áreas necessitam ser implementadas.

A detecção molecular de genes da citotoxina cilindrospernopsina e da neurotoxina saxitoxina indica o possível potencial de produção destas moléculas no ambiente estudado. O fato das análises químicas não terem confirmado a presença dessas toxinas sugere que elas não estavam sendo produzidas ou que estavam presentes em concentrações abaixo do limite de detecção do equipamento. Essas duas toxinas necessitam de estudos mais detalhados no ambiente explorado, bem como as potenciais cianobactérias produtoras, principalmente com relação à sazonalidade.

A ocorrência da espécie *Planktothrix isothrix* e do gênero *Komvophorum* no sistema aquático de Salto Grande é reportada pela primeira vez neste estudo e embora em baixa densidade, pode ser um indicativo do efeito das mudanças climáticas. As implicações desse fato necessitam ser exploradas.

A detecção precoce das espécies de cianobactérias tóxicas pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle das florações, conforme previsto na Portaria MS nº 2914. A avaliação da presença de toxinas é essencial, uma vez que podem causar desastres públicos imensuráveis. Conhecer a qualidade da água do reservatório permite aos órgãos competentes tomar decisões corretamente e a tempo.

REFERÊNCIAS

- AGUIJARO, L.F. **Cianobactérias no Reservatório Salto Grande, Americana, SP:** aspectos ecológicos, moleculares e de saúde pública para águas destinadas à balneabilidade. 2007. 1 v. Tese (Doutorado em Saneamento e Ambiente) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- 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 microcystin during renal dialysis treatment in Caruaru. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181/182, p. 441-446, 2002.
- BALDWIN, J.E.; THOMAS, R.C.; KRUSE, L.I.; SILBERMAN, L. Rules for ring closure: ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 42, n. 24, p. 3846-3852, 1977.
- BANKER, R.; TELTSCH, B.; SUKENIK, A.; CARMELI, S. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 3, p. 387-389, 2000.
- BANKER, R.; CARMELI, S.; HADAS, O.; TELTSCH, B.; PORAT, R.; SUKENIK, A. Identification of cylindrospermopsin *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, New York, v. 33, n. 4, p. 613-616, 1997.
- BAR-YOSEF, Y.; SUKENIK, A.; HADAS, O.; VINER-MOZZINI, Y. KAPLAN, A. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphate in phytoplanktons. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 17, p. 1557-1561, 2010.
- BERNARD, C.; HARVEY, M.; BRIAND, J.F.; BIRE, R.; KRYSS, S.; FONTAINE, J.J. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. **Environmental Toxicology**, New York, v. 18, n. 3, p. 176-186, 2003.
- BICUDO, C.E.M.; BICUDO, R.M.F. In: BICUDO, C.E.M. (Ed.). **Algas de águas continentais brasileiras:** chave ilustrada para identificação de gêneros. São Paulo: EDUSP, 1970. 502 p.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, n. 6, p. 1513-1518, 1979.

BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J.; GORHAM, P.R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 453-471, 1959.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; PICCIN-SANTOS, V.; KUJBIDA, P.; MOURA, A. N. Cylindrospermopsin in water supply reservoirs in Brazil determined by immunochemical and molecular methods. **Journal of Water Resource and Protection**, Herndon, v. 3, p. 349-355, 2011.

BOTES, D.P.; TUINMAN, A.A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D.H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; HAMMOND, S.J. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic heptapeptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1**, London, v. 1, p. 2311-2318, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS n. 518, de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2012

_____. **Portaria MS n. 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 20 jan. 2012.

BRUNSON, M.W.; LUTZ, C.G.; DURBOROW, R.M. **Algae blooms in commercial fish production ponds**. Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center, 1994. 4 p. (Publication, 466.)

BURGOYNE, D.L.; HEMSCHIEDT, T.K.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Biosynthesis of cylindrospermopsin. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 65, n. 1, p. 152-156, 2000.

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

CANE, D.E.; WALSH, C.T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Chemistry & Biology**, v. 6, R319-R325, 1999. Disponível em: <<http://sciencedirect.com/science/journal/10745521>>. Acesso em: 10 dez. 2012

CARMICHAEL, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/>>. Acesso em: 13 mar. 2013.

CARNEIRO, R.L.; DÖRR, F.A.; DÖRR, F.; BORTOLI, S.; DELHERBE, N.; VÁSQUEZ, M.; PINTO, E. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 82, n. 3, p. 692-702, 2012.

CASTENHOLZ, R.W. Phylum BX. Cyanobacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2001. p. 473–487.

CEMBELLA, A.D. Ecophysiological and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D.; HALLEGRAEFF, G.M. **Physiological ecology of harmful algal blooms**. Heidelberg: Springer, 1998.p. 381-403.

CHONUDOMKUL, D.; YONGMANITCHAI, W.; THEERAGOOL, G.; KAWACHI, M.; KASAI, F.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 345–355, 2004.

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

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

CODD, G.A.; BELL, S.G.; KAYA, K.; WARD, C.J.; BEATTIE, K.A.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 34, p. 405-415, 1999.

CRESPIM, E. **Identificação e sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese de microcistinas e saxitoxinas na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* SPC 777**. 2013. 137 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

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

DEMOTT, W.R.; ZHANG, Q-X; CARMICHAEL, W.W. Effect of toxic cianobactéria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod ant three species of *Daphnia*. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 36, p. 1346-1357, 1991.

DIEHNELT, C.W.; PETERMAN, S.M.; BUDDE, W.L. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry and accurate *m/z* measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 622-634, 2005.

DIEHNELT, C.W.; DUGAN, N.R.; PETERMAN, S.M.; BUDDE, W.L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, p. 501-512, 2006.

DIENER, M.; ERLER, K.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, p. 1821-1826, 2007.

DIENER, M.; ERLER, K.; HILLER, S.; CHRISTIAN, B.; LUCKAS, B. Determination of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins in dietary supplements by application of a new HPLC/FD method. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 224, p. 147-151, 2006.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins: occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Molecular Nutrition; Food Research**, Malden, v. 50, p. 7-17, 2006.

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

DITTMANN, E.; FEWER, D.P.; NEILAN, B.A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 2013. DOI: 10.1111/1574-6976.12000.

DOGO, C.R.; BRUNI, F.M.; ELIAS, F.; RANGEL, M.; PANTOJA, P.A.; SANT'ANNA, C.L.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; DE CARVALHO, L.R. Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. **Toxicon**, Oxford, v. 58, p. 464-470, 2011.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FALCONER, I.; HUMPAGE, A.R. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. **Environmental Toxicology**, New York, v. 16, p. 192-195, 2001.

FASTNER, J.; HEINZE, R.; HUMPAGE, A.R.; MISCHKE, U.; EAGLESHAM, G.K.; CHORUS, I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 313-321, 2003.

FERRÃO-FILHO, A.S.; SOARES, M.C.S.; MAGALHÃES, V.F.; AZEVEDO, S.M.F.O. A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test. **Environmental Pollution**, New York, v. 158, n. 6, p. 2084-2093, 2010.

FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. Recurrent adenylation domain replacement in microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183-193, 2007.

FIGUEIREDO, 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. **Micro-organismos e biodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 65-91.

FIGUEIREDO, M.F.; ETCHEGARAY, A.; LORENZI, A.S.; SILVA, C.S.P. Monitoramento de cianobactérias produtoras de toxinas através de métodos moleculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FICOLOGIA, 2005, Salvador. **Formação de ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2004. v. 10, p. 33-56.

FIGUEIREDO, 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.

FRANGÓPULOS, M.; GUISANDE, C.; DeBLAS, E.; MANEIRO, I. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 3 p. 131–139, 2004.

FRISTACHI, A.; SINCLAIR, J.L. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. In: HUDNELL, K.H. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: Springer, 2008. p. 45–103.

FROSCIO, S.M.; HUMPAGE, A.R.; BURCHAM, P.C.; FALCONER, I.R. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 18, n. 4, p. 243–251, 2003.

FUJII, K.; YAHASHI, Y.; NAKANO, T.; IMANISHI, S.; BALDIA, S.F.; HARADA, K. Simultaneous detection and determination of the absolute configuration of thiazole-containing amino acids in a peptide. **Tetrahedron**, Oxford, v. 58, n. 34, p. 6873–6879, 2002.

GANTAR, M.; BERRY, J.P.; THOMAS, S.; WANG, M.; PERES, R.; REIN, K.S. Allelopathic activity among Cyanobacteria and Microalgae isolated from Florida freshwater habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 55-64, 2008.

GOLDBERG, J.; HUANG, H.; KWON, Y.; GRRENGARD, P.; NAIM, A.C.; KURIYAN, J. Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. **Nature**, London, v. 376, p. 745-753, 1995.

- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.
- HANAZATO, T. Toxic cyanobacteria and the zooplankton community. In: WATANABE, M.F.; HARADA, H.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Ed.). **Toxic microcystis**. London: CRC Press, 1996. p. 79-102.
- HAWKINS, P.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; JACKSON, A.R.B.; FALCONER, I.R. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.
- HAWKINS, P.R.; CHANDRASENA, N.R.; JONES, G.J.; HUMPAGE, A.R.; FALCONER, I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 341-346, 1997.
- HICKS, L.M.; MOFFITT, M.C.; BEER, L.L.; MOORE, B.S.; KELLEHER, N.L. Structural characterization of *in vitro* and *in vivo* intermediates on the loading module of microcystin synthetase. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 1, n. 2, p. 93-102, 2006.
- HOFF-RISSETI, C. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. 2012. 171 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- HOFF-RISSETI, C.; DÖRR, F. A.; SCHAKER, P. D. C.; PINTO, E.; FIORE, M.F. Cylindrospermopsin synthetase genes of Brazilian isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Plos One**, São Francisco, v.8, e14657, 2013.
- HUMPAGE, A.R.; FENECH, M.; THOMAS, P.; FALCONER, I.R. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 472, n. 1/2, p. 155-161, 2000.
- ISHIDA, K.; NAKAGAWA, H.; MURAKAMI, M. Microcyclamide, a cytotoxic cyclic hexapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 9, p. 1315- 317, 2000.
- IZAGUIRRE, G.; JUNGBLUT, A.D.; NEILAN, B.A. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR isolated from four reservoirs in southern California. **Water Research**, Oxford, v. 41, p. 492-498, 2007.
- JIANG, Y.; XIAO, P.; YU, G.; SANO, T.; PAN, Q.; LI, R. Molecular basis and phylogenetic implications of deoxycylindrospermopsin biosynthesis in the cyanobacterium *Raphidiopsis curvata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 7, p. 2256-2263, 2012.

KAPLAN, A.; HAREL, M.; KAPLAN-LEVY, R.N.; HADAS, O.; SUKENIK, A.; DITTMANN, E. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p.11, 2012.

KAWACHI, M.; ISHIMOTO, M.; MORI, F.; YUMOTO, K.; SATO, M.; NOËL, M-H. **MCC-NIES list of strains**. 9th ed. Tsukuba: Microbial Culture Collection at National Institute for Environmental Studies, 2013. Disponível em < <http://mcc.nies.go.jp/>>. Acesso em: 19 mar. 2013.

KEHR, J.C.; PICCHI, D.G.; DITTMANN, E. Natural product biosynthesis in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Frankfurt, v. 7, p. 1622-1635, 2011.

KELLMANN, R.; NEILAN, B.A. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis in vitro. **Journal of Phycology**, Malden, v. 43, p. 497-508, 2007.

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, n. 3, p. 267–280, 2006.

_____. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 67, p. 526-538, 2008.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; JEON, Y.J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B.A. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 4044–4053, 2008.

KISS, T.; VEHOVSZKY, A.; HIRIPI, L.; KOVACS, A.; VOROS, L. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. **Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology**, Oxford, v. 131, n. 2, p. 167–176, 2002.

KOSTEN, S.; HUSZAR, V.L.M.; BÉCARES, E.; COSTA, L.S.; VAN DONKS, E.; HANSSON, L.; JEPPESEN, E.; KRUK, C.; LACEROT, G.; MAZZEO, N.; DE MEESTER, L.; MOSS, B.; LÜRLING, M.; NÖGES, T.; ROMO, S.; SCHEFFER, M. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. **Global Change Biology**, Oxford, v. 18, p. 118-126, 2012.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.F.Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1359–1373, 1999.

LEITE, M.A. **Variação espacial e temporal da taxa de sedimentação no reservatório de Salto Grande (Americana, SP) e sua influência nas características limnológicas do sistema**. 1998. 170 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

- LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; LIU, Y.; WATANABE, M.M. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, New York, v. 37, n. 6, p. 1121–1126, 2001a.
- LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; BRITTAIN, S.; EAGLESHAM, G.K.; SHAW, G.R.; MAHAKHANT, A.; NOPARATNARAPORN, N.; YONGMANITCHAI, W.; KAYA, K.; WATANABE M.M. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 973–980, 2001b.
- LLEWELLYN, L.E. Saxitoxin: a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 23, p. 200-222, 2006.
- LUKAC, M.; AEGERTER, R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. **Toxicon**, Oxford, v. 31, p. 293-305, 1993.
- LUND, J.W.G.; KIPLING, C.; LECREN, E.D. The invert microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 11, p. 143-170, 1958.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, 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, p. 187-192, 1990.
- MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 7, p. 2651-2673, 1997.
- MARTINS, D.; MARCHI, S.R.; COSTA, N.V.; CARDOSO, L.A. ; RODRIGUES-COSTA, A. C. Levantamento de plantas aquáticas no Reservatório de Salto Grande, Americana – SP. **Planta Daninha**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 231-236, 2011.
- MAZMOUZ, R.; CHAPUIS-HUGON, F.; MANN, S.; PICHON, V.; MÉJEAN, A.; PLOUX, O. Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 15, p. 4943–4949, 2010.
- MCGREGOR, G.B.; SENDALL, B.C.; HUNT, L.T.; EAGLESHAM, G.K. Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). **Harmful Algae**, Amsterdam. v. 10, n. 4, p. 402–410, 2011.
- MIHALI, T.K.; CARMICHAEL, W.W.; NEILAN, B.A. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 6, n. 2, e14657, 2011.

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.

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

MOLICA, R.; ONODERA, H.; GARCIA, C.; RIVAS, M.; ANDRINOLO, D.; NASCIMENTO, S.; MEGURO, H.; OSHIMA, Y.; AZEVEDO, S.; LAGOS, N. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. **Phycologia**, Odense, v. 41, n. 6, p. 606–611, 2002.

MOREIRA, C.; AZEVEDO, J.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V. Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 114, p. 605–620, 2012.

NEILAN, B.A.; PEARSON, L.A.; MUENCHHOFF, J.; MOFFITT, M.C.; DITTMANN, E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 15, n. 5, p. 1239–1253, 2012.

NEILAN, B.A.; PEARSON, L.A.; MOFFITT, M.C.; MIHALI, K.T.; KAEBERNICK, M.; KELLMANN, R.; POMATI, F. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: HUDNELL, H. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: Springer, 2008. chap. 17, p. 417–452.

NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K.; PIERENS, G.; SHAW, G.R.; SMITH, M.J.; CHISWELL, R.K.; SEAWRIGHT, A.A.; MOORE, M.R. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 163–165, 1999.

OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 114, n. 20, p. 7942–7944, 1992.

OKSANEN, I.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; WAHLSTEN, M.; RIKKINEN, J.; SIVONEN, K. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5756–5763, 2004.

OLIVER R.L.; GANF G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON B.A.; POTTS M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2000. p. 149–194.

PAERL, H.W. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland Waters. **Limnology and Oceanography**, Alberta, v. 33, n. 4, pt. 2, p. 823–843, 1988.

POMATI, F.; SACCHI, S.; ROSSETTI, C.; GIOVANNARDI, S.; ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; NEILAN, B.A. The freshwater cyanobacterium *planktothrix* sp. Fp1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Phycology**, New York, v. 36, n. 3, p. 553 – 562, 2000.

PREÜBEL, K.; STÜKEN, A.; WIEDNER, C.; CHORUS, I.; FASTNER, J. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. **Toxicon**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 156–162, 2006.

PRINSEP, M.R.; CAPLAN, F.R.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L.; HONKANEN, R.E.; BOYNTON, A.L. Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the Stigonematales. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1247-1248, 1992.

RANGEL, M.; BRUNETTI, R.; GARCIA, A.; CAMBUI, C.; CONSERVA, G.; NEVES, A.; SANT'ANNA, C.; CARVALHO, L. Acute effects of three *Geitlerinema* spp. (Cyanobacteria) extracts administrated in mice: symptoms and histopathological aspects. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 12, n. 3, p. 543-553, 2013.

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

RAVEH, A.; MOSHE, S.; EVRON, Z.; FLESCHER, E.; CARMELI, S. Novel thiazole and oxazole containing cyclic hexapeptides from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Tetrahedron**, Oxford, v. 66, p. 2705–2712, 2010.

RINEHART, K.L.; HARADA, K.; NAMIKOSHI, M.; CHEN, C.; HARVIS, C.A.; MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; MULLIGAN, P.E.; BEASLEY, V.R.; DAHLEM, A.M.; CARMICHAEL, W.W. Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 110, n. 25, p. 8557-8558, 1988.

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

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, n. 396, p. 1-11, 2009.

RÜCKER, J.; STÜKEN, A.; NIXDORF, B.; FASTNER, J.; CHORUS, I.; WIEDNER, C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin (CYN) in 2 *Aphanizomenon* dominated lakes of North East Germany. **Toxicon**, Oxford, v. 50, p. 800–809, 2007.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; LU, S.C. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 219–225, 1995.

RUNNEGAR, M.T.; KONG, S.M.; ZHONG, Y.Z.; GE, J.L.; LU, S.C. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 201, n. 1, p. 235–241, 1994.

RUNNEGAR, M.T.; XIE, C.; SNIDER, B.B.; WALLACE, G.A.; WEINREB, S.M.; KUHLENKAMP, J. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. **Toxicological Sciences**, San Diego, v. 67, n. 1, p. 81–87, 2002.

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

SAKER, M.L.; THOMAS, A.D.; NORTON, J.H. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of north Queensland. **Environmental Toxicology**, New York, v. 14, n. 1, p. 179–182, 1999.

SAKER, M.L.; NOGUEIRA, I.C.G.; VASCONCELOS, V.M.; NEILAN, B.A.; EAGLESHAM, G.K.; PEREIRA, P. First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 55, n. 2, p. 243–250, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659p.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 126, p. 251–261, 2008.

SANT'ANNA, C.L.; DE CARVALHO, L.R.; FIORE, M.F.; SILVA-STENICO, M.E.; LORENZI, A.S.; RIOS, F.R.; KONNO, K.; GARCIA, C.; LAGOS, N. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain isolated from São Paulo-Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. **Neurotoxicity Research**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 389–402, 2011.

SAR, E.A.; FERRARIO, M.E.; REGUERA, B. **Floraciones algales nocivas em el cono sur americano**. Madrid: Instituto Espanõl de Oceanografía, 2002. 294 p.

SCHANTZ, E.J.; GHAZAROSSIAN, V.E.; SCHNOES, H.K.; STRONG, F.M.; SPRINGER, J.P.; PEZZANITE, J.O.; CLARDY, J. The structure of saxitoxin. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 97, p. 1238–1239, 1975.

SCHANTZ, E.I.; MOLD, J.D.; STRANGER, D.W.; SHAVEL, J.; REIL, F.J.; BOWDEN, J.P.; LYNCH, J.M.; WYLER, R.S.; RIEGEL, B.; SOMMER, H. Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clam and mussel tissues. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 79, p. 5230–5235, 1957.

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

SCHOPF, J.W.; KUDRYAVTSEV, A.B.; CZAJA, A.D.; TRIPATHI, A.B. Evidence of archean life: stromatolites and microfossils. **Precambrian Research**, Amsterdam, v. 158, p. 141–155, 2007.

SEIFERT, M.; MCGREGOR, G.; EAGLESHAM, G.; WICKRAMASINGHE, W.; SHAW, G. First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 73–80, 2007.

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

SHALEV-ALON, G.; SUKENIK, A.; LIVNAH, O.; SCHWARZ, R.; KAPLAN, A. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, n. 1, p. 87–91, 2002.

SHAW, G.R.; SUKENIK, A.; LIVNE, A.; CHISWELL, R.K.; SMITH, M.J.; SEAWRIGHT, A.A.; NORRIS, R.L.; EAGLESHAM, G.K.; MOORE, M.R. Blooms of the hepatotoxic cyanobacterium, *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) in newly constructed lakes, Queensland, Australia. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 14, p. 167–177, 1999.

SILVA, G.S.; JARDIM, W.F. Aplicação do método da carga máxima total diária (cmttd) para a amônia no Rio Atibaia, região de Campinas/Paulínia – SP. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 160–168, 2007.

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

SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R.; RINEHART, K.L. Isolation and characterization of a variety of microcystins from 7 strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2495–2500, 1992.

SOTO-LIEBE, K.; MURILLO, A.A.; KROCK, B.; STUCKEN, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; TREFAULT, N.; CEMBELLA, A.; VÁSQUEZ, M. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. **Toxicon**, Oxford, v. 56, p. 1350–1361, 2010.

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

SPOOF, L.; BERG, K.A.; RAPALA, J.; LAHTI, K.; LEPISTÖ, L.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MERILUOTO, J. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). **Environmental Toxicology**, New York, v. 21, n. 6, p. 552–560, 2006.

STOCKNER, J.; CALLIERI, C.; CRONBERG, G. Picoplankton and other non-bloom-forming cyanobacteria in lakes. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**: their diversity in time and space. New York: Kluwer Academic, 2002. chap. 7, p. 195–231.

STRANGHETTI, B.G. **Monitoração toxicológica do pescado comercializado nos municípios de São Sebastião e Caraguatatuba, SP**. 2007. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

STRIEKER, M.; TANOVIC', A.; MARAHIEL, M.M. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamic. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 20, p. 234–240, 2010.

STUCKEN, K.; MURILLO, A.A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDÉS, J.J.; MÉNDEZ, M.A.; VÁSQUEZ, M. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32 n. 1, p. 37–48, 2009.

STÜKEN, A.; JAKOBSEN, K.S. The cylindrospermopsin gene cluster of *Aphanizomenon* sp. strain 10E6: organization and recombination. **Microbiology**, Readings, v. 156, p. 2438–2451, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TANABE, Y.; SANO, T.; KASAI, F.; WATANABE, M.M. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, p. 1–14, 2009.

TERAO, K.; OHMORI, S.; IGARASHI, K.; OHTANI, I.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.I.; ITO, E.; WATANABE, M. Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from the blue-green alga *Umezakia natans*. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 833–844, 1994.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.; de CARVALHO, V.L.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of Pan American Health Organization**, Washington, v. 27, p. 244-253, 1993.

TILLET, D., PARKER, D.L., NEILAN, B.A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2810–2818, 2001.

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

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

TUCKER, J.B. A Farewell to germs: the U.S. Renunciation of Biological and Toxin Warfare, 1969–70. **International Security**, Cambridge, v. 27, p. 107-148, 2002.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M.F.; PARK, H.; CHEN, G.; CHEN, G.-C.; YU, S.-Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, Oxford, v 17, p.1317-1321, 1996.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommen der Quantitativen Phytoplankton: methodik. **Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, Stuttgart, v. 9, p. 1-38, 1958.

UTKILEN, H.; GJOLME, N. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 58, p. 1321-1325, 1992.

VIA-ORDORIKI, L.; FASTNER, J.; KURMAYER, R.; HISBERGUES, M.; DITTMANN, E.; KOMAREK, J.; ERHARD, M.; CHORUS, I. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. **Systematic and Applied Microbiology** Stuttgart, v. 27, p. 592–602, 2004.

VON DÖHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J.; ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Reviews**, Easton, v. 29, n. 7, p. 2675-2706, 1997.

WALSBY, A.E. Gas vesicles. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 58, p. 94-14, 1994.

WEBER, C.I. Plankton. In: NATIONAL ENVIRONMENTAL RESEARCH CENTER OFFICE OF RESEARCH AND DEVELOPMENT U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY CINCINNATI. **Biological field and laboratory methods for measuring the quality of surface water and effluents**. Cincinnati, 1973. p. 1-17.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – Nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiological Reviews**, Oxford, v. 30, p. 530-563, 2006.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. New York: Kluwer Academic, 2002. 649 p.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, n. 3, p. 201–218, 2005.

WOOD, S.A.; STIRLING, D.J. First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, Wellington, v. 37, n. 4, p. 821-828, 2003.

YILMAZ, M.; PHILIPS, E.J. Diversity of and selection acting on cylindrospermopsin *cyrB* gene adenylation domain sequences in Florida. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 7, p. 2502-2507, 2011.

YUNES, J.S. **Florações de algas (Cianobactérias) nocivas: homem vítima ou culpado?** 2008. Disponível em: <<http://www.cianobacterias.furg.br>>. Acesso em: 04 mar. 2013.

ZAGATTO, P.A.; ARAGAO, M.A.; CARVALHO, M.C. **Manual de orientação em casos de florações de algas tóxicas: um problema ambiental e de saúde pública**. São Paulo: CETESB, 1997. 47 p. (Série Manuais, 14).

ZANATA, L.H.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Longitudinal processes in Salto Grande Reservoir (Americana, SP, Brazil) and its influence in the formation of compartment system. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 62, n. 2, p. 347-361, 2002.

ZIEMERT, N.; ISHIDA, K.; QUILLARDET, P.; BOUCHIER, C.; HERTWECK, C.; DE MARSAC, N.T.; DITTMANN, A. Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.74, p. 1791–1797, 2008.

ANEXOS

Sequências dos aminoácidos obtidas a partir da sequência dos nucleotídeos dos genes funcionais.

Cyr J

>Ponto 1 (1ª coleta)

KGKDMGFTWTDLDSSQMPHADWRSVIDLLKAPLPEGKSIIDLLKAPLPEGKSIC
YQKHQAYHLIEETMGIEWILPFSNCFLIRQPKEMLLSFRKIVPYFTSEETGWIKLK
RLFDYVHQTSGVIPPVIDAHDLLNDPRRMLSKLCQIVGVEFTETMLSWPPMEVE
LNEKL

>*Cylindrospermopsis raciborskii* AWT205 (ABX60159)

MQEKRIAMWSVPRSLGTVLLQAWSSRPDTVVFDELLSFPYLFIKGKDMGFTWT
DLDSSQMPHADWRSVIDLLKAPLPEGKSIIDLLKAPLPEGKSICYQKHQAYHLIE
ETMGIEWILPFSNCFLIRQPKEMLLSFRKIVPHFTFEETGWIELKRLFDYVHQTSG
VIPPVIDAHDLLNDPRRMLSKLCQVVGVEFTETMLSWPPMEVELNEKLAPWYS
TVASSTHFHSYQNKNESLPLYLVDICKRCDEIYQELYQFRLY

>*Oscillatoria* sp. PCC 6506 (ADI48269)

MQEKRIAMWSVPRSFSGTVLLQAWSSRSDTAVFDEILSFPYLFIKGKDLGFTWAD
LDSSQMPYTDWQYVIERLKAPVPEENLQYIIEELLKAPLPEGKSICYQKHQAYHLI
EEIMGLEWILPFTNCFLIRQPKEMLLSFHKIVPHFTFEETGWIELKRLFDYVHQS
GAIPPVIDAHDLLNDPRRMLSKLCQAVGVEFTEAMLSWPPMEVELNEKLAPWY
STVASSTNFLPYQAKDEPLPLHLVNICERCDEIYQELYQFRLS

>*Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 (EFA70263)

MQEKRIAMWSVPRSLGTVLLQAWSSRPDTVVFDELLSFPYLFIKGKDMGFTWT
DLDSSQMPHADWRSVIDLLKAPLPEGKSIIDLLKAPLPEGKSICYQKHQAYHLIE
ETMGIEWILPFSNCFLIRQPKEMLLSFRKIVPHFTFEETGWIELKRLFDYVHQTSG
VIPPVIDAHDLLNDPRRMLSKLCQVVGVEFTETMLSWPPMEVELNEKLAPWYS
TVASSTHFHSYQNKNESLPLYLVDICKRCDEIYQELYQFRLY

>*Aphanizomenon* sp. 10E6 (ADF88270)

MQEKRIAMWSVPRSLGTVLLQAWSSRPDTVVFDELLSFPYLFIKGKDMGFTWT
DLDSSQMPHADWRSVIDLLKAPLPEGNLRVIDLLKAPLPEGKSICYQKHQAYH
LIEETMGIEWILPFSNCFLIRQPKEMLLSFRKIVPHFTFEETGWIELKRLFDYVHQ
TSGVIPPVIDAHDLLNDPRRMLSKLCQVVGVEFTETMLSWPPMEVELNEKLAP
WYSTVASSTHFRSYQNKNESLPLYLVDICKRCDEIYQELYQFRLY

>*Raphidiopsis curvata* CHAB1150 (AFC35250)

MQEKRIAMWSVPRSLGTVLLQAWSSRPDTVVFDELLSFPYLFIKGKDMGFTWT
DLDSSQMPHADWRSVIDLLKAPLPEGNLRVIDLLKAPLPEGKSICYQKHQAYH
LIEETVGIEWILPFSNCFLIRQPKEMLLSFRKIVPHFTFEETGWIELKRLFDYVHQT
SGVIPPVIDAHDLLNDPRRMLSKLCQVVGVEFTETMLSWPPMEVEL
NEKLAPWYSTVASSTHFRSYQNKNESLPLYLVDICKRCDEIYQELYQFRLC

>*Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (ABI75104)

MKTNKHIAMWACPRSRSTVITRAFENLDGCVVYDEPLEAPNVLMTTYTMSNSR
TLAEEDLKQLILQNNVETDLKKVIEQLTGDLPDGKLSFQKMITGDYRSEFGID
WAKKLTNFFLIRHPQDIIFSFDIAERKTGITEPFTQQNLGMKTLYEVFQQIEVITG

QTPLVIHSDDIKNPPSALKWLCKNLGLAFDEKMLTWKANLEDSNLKYTKLYA
NSASGSSEPWFETLRSTKTFLAYEKKEKKLPARLIPLDESIPYYEKLLQHCHIFE
WSEH

SxtA

>Ponto 1 (2ª coleta)

PAIYEELEEELSKLLGVPDVLVFPVAVTLLQIGILPLLTGNNGVIFGGIAAHRC

>*Raphidiopsis brookii* D9 (WP 009343302)

MLQKINRYTHGFVAVPVILACREKGVFELLADESPLSLNQMVHGLGANS GHFQ
VALRMLES LHWLSRNKELKYS LTAEAAIHNKISEDILQLYNLP IQSYLEGKQGN
LLGRWIERSCQLWNLDNPLMADFLDGLLVIPLLLALHKHNLLADSEDKPLLSSL
SSTVQEELGKLFLHLGWADLTAGRLTITELGRFMGERALNTAIVASYTPMLSRI
HDVLFNGCLSVFQRDASGHERHIDRTLNVIGSGFQHQKYFADLEESILSVFNQLP
LEEQPKYITDMGCGDGTLLKRVWETIQFKSARGKALEQYPLRLIGVDYNEASL
KATTRTLASLPHLVLQGDIGNPEQMVRSL EAHGIHDPENILHIRSFLDHDRLFIPP
QKRNELKERAHLPYQSV CVDDQGELIPPHVMVQSLVEHLERWSQV VNKHGLM
ILEVHC FEPRV VYQFLDKSEN LHFD AFQGFSSQQYLVEAEVFLMSAAQVGLFPKL
ELSKRYPKTFPFTRITLNYFEKRPYKISHAYLS DLPALVDLEV KCW PENLR ASTH
EIRRRLELNPQGNLVLIIEDQIIGAIYSQTITSTEALENVKYAQVPTLHTPQGSVIQ
LLALNILPEFQARGLGNELRDFMLYYCTLKG GIESVVGVT RCRNYVNYSQMPM
MEYLKLHNEQRQLLDPIVG FHVSGGAEIRGIIANYRPEDTDNLGMGILIEYNLRD
SALHSPGDRKGPYINSAIGSLVPKATSATKENKT VADLVKECILKVMGSQRQAA
YAPQQKLLDMGLDSL DLELQTLLEERLGINLSGTFFLQKNTPTAITIYFQNQVV
QEKQSDLAPPVDSANEINTLENNV NQQKIPQVTRV VTEQQGRKVLIDGHWVID
FASCNYLGLDLHPKVKEAIPPALDKWGTHPSWTRLVASPAIYEELEEELSKLLG
VPDVLVFPVAVTLLQIGILPLLTGNNGVIFGDIAAHRCIYEACCLAQHKGAQFIQY
RHNDLNDLAEKLAKYPPEQVKIIVIDGVYSMSADFPDLPAYVHLAKEYNALIY
MDDAHGFGILGENPSSDMPYGYKGNMGVNYFDLRFAEDNIIYVAGLSKAYSSY
AAFLT CGDRRIKTNFRNAWTAIFSGPSPVASLASALAGLQVNRQEGEQLRKQIY
HLTHKLVTQARAIGFEVDNYGYVPIVGVLVGDAQH MIDVCQLLWEYGILITPAI
FPIVPLNKSALRFSITAANTEEEIDQAIKSLKAVWDLLQKRKALPCKQEENILKH

>*Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 (AFQ30795)

TRLVASPAIYEELEEGLSKLLGVPDVLVFPVAVTLLQIGILPLLTGNNGVIFGDIAA
HRCIYEACCL

>*Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (ABI75094)

MLQKINRYTHGFVAVPVILACREKGVFELLADESPLSLNQMVHGLGANS GHFQ
VALRMLES LHWLSRNKELKYS LTAEAAIHNKISEDILQLYNLP IQSYLEGKQGN
LLGRWIERSCQLWNLDNPLMADFLDGLLVIPLLLALHKHNLLADSEDKPLLSSL
SSTVQEELGKLFLHLGWADLTAGRLTITELGRFMGERALNTAIVASYTPMLSRI
HDVLFNGCLSVFQRDASGHERHIDRTLNVIGSGFQHQKYFADLEESILSVFNQLP
LEEQPKYITDMGCGDGTLLKRVWETIQFKSARGKALEQYPLRLIGVDYNEASL
KATTRTLASLPHLVLQGDIGNPEQMVRSL EAHGIHDPENILHIRSFLDHDRLFIPP
QKRNELKERAHLPYQSV CVDDQGELIPPHVMVQSLVEHLERWSQV VNKHGLM
ILEVHC LEPRV VYQFLDKSEN LHFD AFQGFSSQQYLVEAEVFLMSAAQVGLFPKL
ELSKRYPKTFPFTRITLNYFEKRPYKISHAYLS DLPALVDLEV KCW PENLR ASTH
EIRRRLELNPQGNLVLIIEDQIIGAIYSQTITSTEALENVKYAQVPTLHTPQGSVIQ

LLALNILPEFQARGLGNELRDFMLYYCTLKGGIESVVGVTTRCRNYVNYSQMPM
MEYLKLNHNEQRQLLDPIVGFHVSGGAEIRGIIANYRPEDTDNLGMGILIEYNLRD
SALHSPGDRKGPYINSAIGSLVPKATSATKENKTVADLVKECILKVMGSQRQAA
YAPQQKLLDMGLDSLDELLELQTLLEERLGINLSGTFFLQKNTPTAIITYFQNQVV
QEKQSDLAPPVDSANEINTLENNVNNQQKIPQVTRVVTEQQGRKVLIDGHWVID
FASCNYLGLDLHPKVKEAIPALDKWGTHTPSWTRLVASPAIYEEEEEELSKLLG
VPDVLVFPVAVTLLQIGILPLLTGNNGVIFGDIAAHRCIYEACCLAQHKGAQFIQY
RHNDLNDLAEKLAKEYPPEQVKIIVIDGVYSMSADFPDLPAYVHLAKEYNALIY
MDDAHGFGILGENPSSDMPYGYKGNGMVNYFDLRFAEDNIIYVAGLSKAYSSY
AAFLTTCGDRRIKTNFRNAWTAIFSGPSPVASLASALAGLQVNRQEGEQLRKQIY
HLTHKLVTQARAIGFEVDNYGYVPIVGVLVGDAQHMDVCQLLWEYGILITPAI
FPIVPLNKSALRFSITAANTEEEIDQAIKSLKAVWDLQKRKALPCKQEENILKH

>*Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 (ACF94633)

WVIDFASCNYLGLDLHPKVKEAIPPALEKWGVHPSWTRLVASPVIYEEEEEELS
KLLGVDPDVLVFPVAVTLLQIGVLPPLTGSNGVILGDIAAHRCIYEACCLAQQKGSQ
FIQYRHNDLNDLAEKLAKEYPLEQVKIIVIDGVYSMSADFPDLPAYVRLAKEYNA
FIYMDDAHGFGILGENPSSDMPYGYKGNGMVNYFDLQFAEDNIIYVAGLSKAY
SSYAAFLTTCGDRQIKTNFRNAWTAIFSGPSPVASLASALAGLQVNRQEGEQLRK
QIYHLTRKLVLTQARAIGFEVDNYGYVPIVSVLVGDAQHMDVCQLLWEYGILIT
PAIFPIVPLNKSALRFSITAANTEEEI

>*Dolichospermum circinale* AWQC131C (ACF94637)

DLASPVDLANEINTLENNVNNQQKIPQVTRVVTEQQGRKVLIDGHWVIDFASCN
YLGLDLHPKVKEAIPPALEKWGVHPSWTRLVASPVIYEEEEEELSKLLGVDPDVL
VFPVAVTLLQIGVLPPLTGSNGVILGDIAAHRCIYEACCLAQQKGSQFIQYRHNDL
NDLAEKLAKEYPLEQVKIIVIDGVYSMSADFPDLPAYVRLAKEYNAFIYMDDAH
GFGILGENPSSDMPYGYKGNGMVNYFDLQFAEDNIIYVAGLSKAYSSYAAFLT
CGDRQIKTNFRNAWTAIFSGPSPVASLASALAGLQVNRQEGEQLRKQIYHLTRK
LVTQARAIGFEVDNYGYVPIVSVLVGDAQHMDVCRLWEYGILITPAIFPIVPL
NKSALRFSITAANTEEEIDQAIKALEAVWVLLQKEK

>*Lyngbya wollei* (ACG63826)

MLQKINRYTHGLVAVPVILACRKKGLFELLTHESPLSQEQMVKHLGANS GHFQ
VALRMLESLSHWLSRNEYLKYILTSEAAIHNQIPEDVLQLYHLPIESYLQGKQGG
LLEKWIERSQQLWNLDNPLIADFLDGLLLIPLLLTLHKHNLLAESEEKPFSSLSG
TVQEELGKLFIHLGWADIKAGRLTLTELGRFMGERALNTAVVASYTPMLSRİY
DVLFGDCISVFQRNASGHESHIDRTLNVMGSGFQHQKYFADLEESILSVFNQLP
LEEQPKYITDMGCGDGTLLKRVTETIRFKSARGKAIEQYPLRLIGVDYNEASLT
ATTRTLAGLPHLVLQGDIGKPEQMVRSLKAHGIHDPENILQIRSFLDHDPRPFIPP
KKRNEVEERTHLHYQAVCVDGQGELIPPHVMVQSLVEHLERWSQVVTKHGLM
ILEVHCLAPRVVYQFLDKTENLHFDAFQGFSSQYLVESDVFLMSAAEVGLFPKL
ELSKRYPKTFPLTRITLNYFEKRPYRIRHAYLSDLPALVNLEVKVCWPEHLQASA
NEIRRRRIELNPQGNLVLIIEDQIIGAIYSQTITSLEVLENNVKEYEQVPSLHTPKGSVIQ
LLALNILPEFQAQGLGNELRDFMLYYCTLKGGIESVVGVTTRCRNYVNYSQMPM
TEYLKVHNEQRQLVDPIVRFHVSGGAKIRGIIANYRPEDAENFGMGILIEYNLRD
SALHPLGDRQPLYTNSAIISSSVQTLPATSAATKENETVAALVKECFLKVLGSQRQ
AAYAPKQKLLDMGLDSLDELLELQTLLEERLGVSLSRFTFFLQNNPTAIITYFQTY
FQNQVVQEKKSDLASPVDANEINTLENNVNNQQKIPQVTRVVTEQQDRKVLID
GHWVIDFASCNYLGLDLHPKVKEAIPPALEKWGVHPSWTRLVASPAIYEEEEE

LAKLLGVPDVLLFPSLTLLQMGVLPLLTGNNGVIFGDISAHRCIYEACCLAQHK
 GAQFIQYRHNDLNDLAAKLAKYPLEQVKIIAIDGVYSMSADLPDLPAYVRLAK
 QYNALIYIDDAHGFGILGENPSSDMPYGYKGNIVNYFDLRFAEDNIIYVAGLS
 KAYSSYAAFVTCGNSQIKTQFRNAWTAIFSGPSPVASLASAGLQVNRQEGEQ
 LRKQVYYLTHKLVTQARAIGFEVDNYSYVPIVSVLVGDAQHIVDVCQLLWEYG
 ILITPAIFPIVPLNKTALRFSITAANTEEEIDQAIKALEAVWDLQKRKALLCK

SxtI

>Ponto 1 (1ª coleta)

AVLCLHGVGEWATTSVWLGEENKLTTPQWEIDLPHSLGLLYSFTYYTGFKVNS
 GEYKLMGLAPYGEPKYVDQILKHLDDLKEDGTFRLNMDYFNNTVGLTMTNHNK
 FHSMEFGGPPRQAEGKISQRDMDLASSIQKVTEEVILRLARTIKKELGVEYLCLA
 GGVGLNLCVANGRILRESDFKDIWIQPAAGDAGSAVGAALAIWHEYHKKPRTST
 AGDRMKGSYLGPFSFSEAEILQFLNSVNIPYHRCVDNGLMARLAEILDQGNVVG
 WFSGRKEFGPRALGGRSIIIGDSRSPKMQSVMNLKIKYRESFRP

>*Raphidiopsis brookii* D9 (WP 009343296)

MQILGISAYYHDSAAAMVIDGEIVAAAQEERFSRRKHDAGFPTGAITYCLKQVG
 TKLQYIDQIVFYDKPLVKFERLLETYLAYAPKGFGSFITAMPVWLKEKLYLKT
 LKKELALLGECKASQLPPLLFTSHHQAHAHAHAFFPSPFQRAAVLCLDGVGEWA
 TTSVWLGEENKLTTPQWEIDFPHSLGLLYSFTYYTGFKVNSGEYKLMGLAPYG
 EPKYVDQILKHLDDLKEDGTFRLNMDYFNNTVGLTMTNHNKFHSMFEGGPPRQA
 EGKISQRDMDLASSIQKVTEEVILRLARTIKKELGVEYLCLAGGVGLNLCVANGR
 ILRESDFKDIWIQPAAGDAGSAVGAALAIWHEYHKKPRTSTAGDRMKGSYLGP
 SFSEAEILQFLNSVNIPYHRCVDNELMARLAEILDQGNVVGWFSGRMEFGPRAL
 GGRSIIIGDSRSPKMQSVMNLKIKYRESFRPFAPSFLAERVSDYFDLDRPSPYMLL
 VAQVKENLHIPMTQEHELFEGIEKLNVP RSQIPAVTHVDYSARIQTVHKETNPR
 YYELIRHFEARTGCAVLVNTSFNVRGEPIVCTPEDAYRCFMRTEM DYLV MENF
 LLVKSEQPRGNSDES WQKEFELD

>*Lyngbya wollei* (ACZ26229)

MQILGISAYYHDSAAAMVVDGEIVAAAQEERFSRRKHDAGFPTGALAYCLKQ
 AGTKLQDQIVFYDKPLVKFERLLETYLGYAPKGFSFLTAMPVWLKEKLYLKT
 LLLKKELALLGECKTSQLPPLLFTSHHQAHAHAHAFFPSPFERAAVLCLDGVGE
 WATTSVWLGEENQLTPQWEIDFPHSLGLLYSFTYYTGFKVNSGEYKLMGLAPY
 YGEPKYVDQILNHLDDLKEDGTFRLNMDYFNNTVGLTMTNHNKFHSMFEGGLPR
 QAEAKITQREMDLASSIQKVTEEVILRLARTIKKELGAEYHQPRTPTAGDRM
 KGSYLASSFSEAEILQLLNSVNISRPKTFLEDLPGIHLS

>*Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (ABI75099)

MQILGISAYYHDSAAAMVIDGEIVAAAQEERFSRRKHDAGFPTGAITYCLKQVG
 TKLQYIDQIVFYDKPLVKFERLLETYLAYAPKGFGSFITAMPVWLKEKLYLKT
 LKKELALLGECKASQLPPLLFTSHHQAHAHAHAFFPSPFQRAAVLCLDGVGEWA
 TTSVWLGEENKLTTPQWEIDFPHSLGLLYSFTYYTGFKVNSGEYKLMGLAPYG
 EPKYVDQILKHLDDLKEDGTFRLNMDYFNNTVGLTMTNHNKFHSMFEGGPPRQA
 EGKISQRDMDLASSIQKVTEEVILRLARTIKKELGVEYLCLAGGVGLNLCVANGR
 ILRESDFKDIWIQPAAGDAGSAVGAALAIWHEYHKKPRTSTAGDRMKGSYLGP
 SFSEAEILQFLNSVNIPYHRCVDNELMARLAEILDQGNVVGWFSGRMEFGPRAL
 GGRSIIIGDSRSPKMQSVMNLKIKYRESFRPFAPSFLAERVSDYFDLDRPSPYMLL

VAQVKENLHIPMTQEQHELFIEKLNVP RSQIPAVTHVDYSARIQTVHKETNPR
YYELIRHFEARTGCAVLVNTSFNVRGEPIVCTPEDAYRCFMRTEMMDYLV MENF
LLVKSEQPRGNSDESWQKEFELD

>*Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 (ACC69006)

MHILGISAYYHDSAAAMVVDGEIVAAAQEERFSRRKHDASFPIGAIAAYCLKQA
GTKLQHIDQIVFYDKPLVKFERLLETYLAYAPNGFSSFITAMPIWLKEKLYLKT
LKKELALLGECKTSQLPPLLFTSHHQAHAAASAFFPSPFERAAVLCLDGVGEWAT
TSVWMGLGHQLTPQWEIHFP HSLGLLYSAFTYYTGFKVNSGEYKLMGLAPYG
EPKYVDQILNHLDDLKEDGTFRLNMDYFN YTVGLTMTN HKFHNLFGEPPRQAE
GKITQREMDLASSIQKVTEEVLRLAKTVKKELGAEYLCLAGGVALNCVANGR
ILRESDFKDIWIQPAAGDAGGAVGAALAIWHEYHAKPRIPTAGDHMKGSYLGP
SFSEAEILEYLNSANIPYQRLADSELM PRLAEILEQGNVVGWFSGRMEFGPRAL
GSR SIIGDSRSPKMQSVMNLKIKYRESFRPFAPSVLAERVSDYFDLDRPSYMLL
VAPIKENLHIPMTQEQQLFGIEKLNVP RSQIPAVTHVDYSARIQTVHKETNPRY
YELIRHFEARTGCAVLVNTSFNVRGEPIVCTPEDAYRCFMRTEMMDYLV MENFL
VKSEQPQGNSDESWQQEFELD

>*Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 (AFQ30791)

GVGEWATTSVWLGEKNLTPQWEIDFPHSLGLLYSAFTYYTGFKVNSGEYKL
MGLAPYGEPKYVDQILKHLDDLKEDGTFRLNMDYFN YTVGLTMTN HKFHSMF
GGPPRQAEKGISQRDMDLASSIQKVTEEVLRLARTIKKELGVEYLCLAGGVGL
NCVANARILRESDFKDIWIQPAAGDAGSAVGAALAIWHEYHKKPRTSTAGDRM
KGSYLGPSFSEAEILQFLNSVNIPYHRCVDNELMARLAEILDQGNVVGWFSGRM
EFGPRALGGR SIIGDSRSPKMQSVMNLKIKYRESFR

>*Dolichospermum circinale* AWQC131C (ABI75139)

MHILGISAYYHHSAAAMVVDGEIVAAAQEERFSRRKHDASFPIGAIAAYCLKQA
GIKLQHIDQIVFYDKPLVKFERLLETYL AHAPKGFSSFITAMPIWLKEKLYLKTIL
KKELALLEECKTSQLPPLLFTSHHQAHAAASAFFPSPFERAAVLCLDGVGEWATT
SVWMGLGHQLTPQWEIHFP HSLGLLYSAFTYYTGFKVNSGEYKLMGLAPYGP
KYVDQILNHLDDLKEDGTFRLNIDYFN YTVGLTMTN HKFHNLFGEPPRKP EGKI
TQREMDLASSIQKVTEEVLRLAKTVKKELGAEYLCLAGGVALNCVANGRILR
ESDFKDIWIQPAAGDAGGAVGAALAIWHEYHEKPRTPTSGDRMKGSYLGPSFS
EAEILEYLNSANIPYQRLADSELM PRLAEILQGNVVGWFSGRMEFGPRALGSR
SIIGDSRSPKMQSVMNLKIKYRESFRPFAPSVLAERVSDYFDLDRPSYMLLVAP
IKENLHIPMTQEQQLFGIEKLNVP RSQIPAVTHVDYSARIQTVHKETNPRYYEL
IRHFEARTGCAVLVNTSFNVRGEPIVCTPEDAYRCFMRTEMMDYLV MENFLVK
SEQPQGNSDESWQQEFELD

McyG

>Ponto 1 (1ª coleta)

TTQQVLKACNSRQITYTFTDVSPFFLEKARDNLA EFSGLE YKVLDIEKDPKLQG
FCCHSYDLIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLLLLELTQQSSWIDLIFG
VTQGWWRFSYHLRPNHPITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGSVLF

>Ponto 1 (2ª coleta)

TTQQVLKACNSRQITYTFTDVSPFFLEKARDNLAEFFGLEYKVLDIEKDPKLQG
 FCCHSYDLIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGRLLLLLELTQQSSWIDLIFG
 VTQGWWRFSYHLRPNHPIITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGTALF

>Ponto 2

TTQQVLKACNSRQITYTFTDVSPFFLEKARDNLAEFFGLEYKVLDIEKDPKLQG
 FCCHSYDLIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLLLLELTQQSSWIDLIFG
 VTQGWWRFSYHLRPNHPIITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGTALF

>*Microcystis aeruginosa* NIES 843 (YP 001658877)

MSKHSISFGGQLEDNWRTLSEVLETATKHNNHGITYIKNDAAEYFQSYQDLYQ
 DALVILNGLEQKGIGLGHKVILQIAKNHDFIPALWACFLGGIIPVPLTVAPSYDLE
 NSAVKKLENVWKILDNPLILSDSELITEIEKLGTYSHLEGWQVISVNELRKAPSK
 VHQLPILDPQDPALLFTSGSTGMPKGVILTHHNLSMTAGTVAMNHFTQQEVT
 LNWMPLDHVGAIVFLGIMAVDLACHQIHVPMELVLRQPLQWLELIQKHQVSIS
 WSPNFAFSLINQQAELKHASYNLSSMKFLVNAGEQVSVKTIRLFLEILEKHQL
 RERAIKPAFGMTESCSGITWSAGLSKNELTEENSFVSLGKPIPGATIRIVDQENNP
 LPEREIGKLQIQGNSVTKGYNNTELNQEVFQEGWFTTGDLYLFGKELFITGR
 EKQEIIINGVNYFAHELETTIEELEGVKVSYTAFAVFDQSRETDLLITFSPESDQ
 FEHWIKVVRKIRSHLTQKFGIAPAYVIPLERNLVPKTSIGKVQKSKLKKDFEQGL
 FSSRIQEIDQYLAKERQKNQTLPQSENERQIAAVWSEVLQLTSVGLLEDNFFELG
 GHSIHLIRVQNELEKLFNRQLSLAEMFKNPTVATLARCLSEESNTTQVIAQKSRQ
 RAENRTRRHNETHDIAIIGMAGQFPGAKNLTTFWENLKNGIETISFFSEEELQES
 GVSSELFNQPNYVRARPILEQVEYFDSEFFGYTDREAELLDPQQRLLLECSWEC
 LENAGYNPSTYQGSIGIFAGASMNTYLINNCYPNRRGQLDSNDELQPFTLDSTGG
 FQTMVANDKDYLTTTRISYKLNHLGPSVNVQTACSTGLVVVHLACQSLISGESD
 MALAGAASINSPQKIGYLYQEGLIMSPDGHCRAFDAEAKGTIFGSGVGVILLKR
 LSDALADHDHIYAVIKGSAINNDGGQKLGFTAPGGEGQIAAATEALAFAGVDA
 NTISFVEAHGTGTPLGDPIEVDALAKVYQGANEGECALGSVKTNIGHMQIASGI
 AGLIKATLALKYRVIPPTLHFQNPNPQINFSQTPFYINNEAISWTTKQDKDEKLP
 RRAGVNSLGIGGVNAHVILEEAPPIPDNQSKRPYHLLTLSARTEPALKELVSR
 YIDFLESQPEKDMSDVVFTANTGRVHFSNRLALTGYKNSDFIEQLRQFKQLDYQ
 STIHGIADEKRPPKIAFLFTGQGSQYAGMAHQLYQTQPTFRKTLDAGENYYQKL
 TGKSLNVLVADTDPLNQTA YTQPALFLIEVALAQLWHSWGIQPAAILGHSLG
 EYSAACFAGVFDLESGLKLVTHRGNLMGQLPQNQGEMAAIFLDKNSVIEQCQS
 QGKIAIAAINAEQHTVISGEKSVIQLCNHFTNAGVKVRQLKVSHAFHSPLVEP
 MVAEFKTLQEISFSQPQISLVSNLTGEIADDSIMTPQYWLQHLLNTVQFHPGAL
 FLQSLGCDTFIEIGPQPILSGIVQSSLSSEPLTLPSLRSGFSDWQVLLESGLKLYV
 RGAKIDWFSFDQDYHPRRCALPTYPFQKRQHWIPLKTPSATVPQESNLVKMLSE
 KDKNTLMQTLLETGHYSEDEKPTISAIVQQLIKLYYQEKEDFNFAKLLYQVAW
 LPWDLANGKLQNLTPKTDLEVYLEPQLHSSSELMGVSRASFSEMEKLAADFVVK
 ALKDLELFQMNTFLDPDQSFQIAELKQEYKSFWNHLLLEILAKVGILEKQNTLWK
 IVKEPEHSNPDLAVEDLINHYPNAQIELNLFRQVATNLAAIITGKISPLSILFSQDG
 QGGASEFYKNTSSAKILNLGISKTVELLSSYAPSASLRILEIGAGTGATTQQVLK
 ACKSRQITYTFTDVSPFFLEKARDNLAEFSGLEYKVLDIEKAPKLQGFCCCHSYDL
 IIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLLLLELTQQSPWIDLIFGVTQGWWR
 FSDYHLRPNHPIITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGSVLFQQSIIAQSSEIS
 PNTAKNWLIFTDIEPQQNTFALGIQEQLLKKCDSCRIIYQGEKNTQISSSESCLNA
 NQLQQLEEFASNPSPDRIIYLLNSTPKEQPESILLNRCNYLLNLLKAIQTIPNPP

QLFLVTQGAQPFELEQPSLGFQSPLWAMGRVIALENPQLWGGMLDLDPDVDIN
 QNITALLGLTHAHDEDHLVFRKGQGYVARLLPLKSLETTTVKIQTEATYLITG
 GIGHLGLELAEHLVNLGAKHLILTTRRSLPARFLWDSATELAQISEKIRKLEEK
 ASIEVISADVGNFEAMQAIFTQIEKTAYPLRGIFHLAGISGRQAQLKDCTLQDLE
 AVFQAKVKGSWNHQLSLGTQLDYFVLFSSAGAIWGAKEQGLYDTSVSHWLDA
 LAHFRHLQQLPATTLNWALLAGHGIVSQDYEDWLKQIGIREIAPDMALRVMDA
 IMASNQTQVLIADVDWVRFKNIYQFKGEKPLLKNLGLSEIPIKSVQESDSVLHLL
 EDIPLGERREYLLEYVSKQVRIILGIKSMPDSEQGLIEMGIDSLSSIELKNRLEKGL
 EVLLPTSLIFDFPNIRRLVDYLFDRIFGEKVQKTAEKMINFTEVQQEISEDLLILQEL
 TDLEAFLGD

>*Microcystis viridis* NIES 102 (ABW93526)

TTQQVLKACNSRQITYTFTDVSPPFLEKARDNLAEFSGLEYKVLDIEKAPKLQG
 FCCHSYDLIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLLLLELTQQSPWIDLIFG
 VTQGWWRFSYHLRPNHPITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGTALF

>*Microcystis aeruginosa* PCC 7820 (AAX73195)

HSISFGGQLEDNWRTLSEVLETATKHNNHGITYIRNDATYFQSYQDLYQDALV
 ILNGLEQKGIGLGHKVLQIAKNQDFIPALWACFLGGIIPVPLTVAPSYDLENSAV
 KKLENVWKILDNPLILSDSELITEIEKLGTYSHLEGWQVISVNELRKAPSKIEQLP
 ILDPQDAALLLFTSGSTGMPKGVILTHHNLSMTAGTVVMNHFTQQEVTLNWM
 PLDHVGAIVFLGIMAVDLACDQIHVPMELVLRQPLQWLELIQKHQVSISWSPNF
 AFSLINQQAELKHVSYNLSSMKFLVNAGEQVSVKTIRLFLEILEKHQLQERAIAK
 PAFGMTESCSGITWSAGLSKNELTEENSFVSLGKPIPGATIRIVDQENNPLPEREI
 GRLQIQGNSVTKGYNNNELNQEVFQEGWFTTGDLGYLSKGELFITGREKQEI
 NGVNYFAHELETTIEELEGVKVSYTAFAVFDQSRETDLLITFSPSESEQFEQGIK
 VVRKIRSHVTQKFGIAPAYVIPLERNLVPKTSIGKVQKSKLKKDFEQGLFSSRIQ
 EIDQYLAKERQKNQTLPQSENERQIAAVWSEVLQLTSVGLEDNFFELGGHSIHLI
 RVQNELEKLFNRQLSLAEMFKNPTVATLARFLSEESNTNQVIAQKSRQRAENRS
 RRHNETHDIAIIGMTGQFPGAKNLTTFWENLKNGIETISFFSEEELQESGVSELF
 NQPNYVRARPILEQVEYFDSEFFGYTDREAELDPQQRLLLECSWECLNAGYN
 PNTYQGSIGIFAGASMNTYLINNCYPNRGKLDSNDELQPFTLDSMGGFQTMVA
 NDKDYLTTIRISYKLNHGPSVNVQTACSTGLVVVHLACQSLISGESDMALAGA
 ASINSPQKIGYLYQEGLIMSPDGHCFDAEAKGTIFGSGVGVIMLKRLSDALA
 DHDHIYAVIKGSAINNDGGQKLGFAPGGEGQIAAATEALAFAGVDANTISFVE
 AHGTGTLLGDPIEVDALAKVYQGANEGECALGSVKTNIGHMQIASGIAGLIKAT
 LALKYRVIPPTLHFQNPNPQINFSQTPFYINNEAISWTTKQDKSEKLPRRAGVNS
 LGIGGVNAHVILEEAPPIPDNQSQRPHYLLTSLARTELALTELVSRYIDFLESQ
 PEKDLSDVVFTANTGRVHFSNRLALTGYKNSDFIEQLRQFKQLDYESTIYGIVD
 EKRPSKIAFLFTGQGSQYVGMALHQLYQTQPTFRKTL DAGEKYYQKLTGKSLN
 VVFADTDDSLNQTAYTQPALFLIEVALAQLWHSWGIQPAAILGHSLGEYSAACF
 AGVFDLESGLKLVSHRGNLMGQLPQNQGEMAAIFLDKNSVVEHCQSQGIIKIAI
 AAINAEQHTVISGEKNVIQELCNHFTNAGVKVRKLKVSHAFHSPLVEPMVAEF
 KTIQEIISFSQPQISLVSNLTGEIADDSIMTPEYWLQHLLNTVQFHQGALFLQSLG
 CDTFIEIGPQPILSGIIQSSLSSSEPLTLPSLRSGFSDWQVLLESGLKLYVRGAKID
 WFSFDQDYHPRRCALPTYPFQKRQHWIPLKTPSATVPQESNLVKMLSEKDKTN
 LIQTILETGHYSEDEKPTISAIVQQLIKLYYQEKEDFDFAKLLYQVAWLPCDLAN
 GKLENLTSKTDLEVYLEPQLQSSELMGVSLAFSEMEKLAADFVVKALKDLEL
 FQMNTFLDPDQSFIQAGLKQEYKYFWNYVIEILAKVGILEKQNTRWKIVKEPEQ
 YNPDLAVEDLINHYPNAQIELHLFRQVATNLAAIITGKISPLSILFSQDGGQGASE

FYKNTSSAKILNLGISKTVELLLSSYPSPASLRILEIGAGTGATTQQVLKACNSRQ
 ITYTFTDVSPFFLEKARDNLAEFSGLEYKVLDIEKDPKLQGFCCHSYDLIIAANV
 LHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLLLLELTQQSSWIDLIFGVTQGWWRFSYH
 LRPNHPIITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGTALFQQSILAQSSEISPNTAK
 NWLIFTDVEPQQNTFVLGIQEQLLKKCDSCRIIYQGEKNTQISSSESCLNANQLQ
 QLEEFSSNPSPDRIIYLLNIDDKDQPESILLNRCNYLLNLLKAIQKIPNPPQLFLV
 TQGAQPFELEQPSFGFQSPLWAMGRVIALENPQLWGGMLDLDPDVDINQNTA
 LLLGLTHAHDEDHLVFRKGQGYVARLLPLKSLETCTVKIQPEATYELITGGIGHL
 GLELAEHLVNLGAKHLILTTRRSLPVRFLWDSAAELAQISEKIRKLEEKGASIAV
 ISADVGNFEAMQAIPTQIEKTAYPLRGIFHLAGISGRQAQLKDCTLDLEAVFQA
 KVKGSWNHLQSLGSQLDYFVLFSAGAIWGAKEQGLYDTSVSHWLDALAHFR
 HLQGLPATTNLWALLAGHGIVSQDYEDWLKQIGIREIAPDMALRVMDAIMASN
 QTQVLIADVDWVRFKNIYQFKGEKPLLKNLGLSEIPIKSVQESDSVLHLLLEEMPF
 GERREYLLLEYVSKQVRMILGIKSMPDTEQGLIEMGIDSLSSIELKNRLEKRFEVL
 LPTSLVDFPNIRRLVDYLLDRIFGEKVQKTAEEKMINFTEVQQEISEDILILQE

>*Anabaena* sp. 90 (AAO62585)

MTGVTQIDFQESVEEQETLLRQQDNAMLFQDQLEDIWRTLPEVLSDAAKYESQ
 GITYIRSDSQYFQTYKDLYNDALIILDGLYRRGLKLGDKAILQIGRNQDFIPAL
 WACFLGGIIPAPLSIAPNYDIQNAAVKKLENVWQILEKPIILTDCELISKIEKLTTQ
 SHLKELRVVSIDKLRSNQSLNSQLSAHELPHLTPLDPALLLFTSGSTGLPKGVM
 HHRNLLSMSVGTVRMNNFTRQEVTLNWMPLDHVGAIVFLGIMAVDLACHQIH
 VPIELILRQPLKWLGLIQKYQATISWSPNFAFSLINQHTTEELNQSCYDLSSIKFLV
 NAGEQVSVKTIRLFLEILEKHKLDRVIRKPAFGMTESCSGITWSAGLSKDELIEE
 NSFVSLGRPIGATIRIIDQENNILPENEVGRQLIKGPSVTEGYNNPDNLNQEVEFQ
 DGGWFTTGDGLGYLHNGELVITGREKQEIINGINIFYAHEIETAIEELDGVAYSITA
 AFAVFDQNRETDLLVITFNPESSNNLDNAVKKVVRQIRSHLTQKVGIAPAYVIPLA
 AELIPKTSIGKVQKAKLKKDFEQGLFSDRIQAINERYLASDRQKNASLPQSENERQ
 IAAVWCEILQLDSVGIQDNFFELGGNSLHLIRVQNQLEKLFGRQIPLTEIFKNSTV
 ATLAHFLTEESNTTNVIAEKSRKRAENRSRRHQDTHDIAIIGMAGRFPGANNIDS
 FWENLKNGVETISFFSEEELLESQVAPELFQQPNYVKARPILDKVESFDNEFFGY
 TDREAELLDPQQRLLQCSWECLNAGYNPNSEYGAIGMFAGASMNTYFINNC
 YPYRGQLDANDELQPFTLDSMGGFQTMVANDKDYLTTRISYKLNLRGPSVNV
 QTACSTGLVVVHLACQSLLNGESDMALAGAASINSPQKIGYLYQEGLIVSPDGH
 CRAFTAQANGTIFGSGVGVVLLKRLKDALADNDHIYAVIKGSAINNDGGRK
 LGFTAPGGEGQTLVAAEALAFAGVEADTIGFVEAHGTGTLKLDPIEIDALARAY
 STANQGEALGSVKTNIGHMQIASGIVGLIKAALALKHQIIPPTLHFNTPNPQIDF
 SQTPFYVNTAAIPWTAKQEDGKELPRRAGVNSLGIGGVNAHVLEEAPAIIPQS
 NDIKRPHHLLTLSARTEQALVDLAKSYAEFLQNHPPASDISDIVFTANTSRVHFQN
 RLAVTGCQIDDFVTKLHQFGQQNIESVIHAQVDEKQPPKIAFLFTGQGSQYLGM
 ANQLYQTQPTFRRTLDQCETIYQELTGRSLLQVIFANSVALNHTSYTQPALFV
 VEVALAQLWRFWGIEPTAVLGHSLEGEYAAACFAGVFDIESGLKLVVQRANLIG
 GLPAEQGAMAAVFLDETSVRQLCKNQGIKVAIAAINAKQHTVISGEQTHIQQLS
 HFINAGVKVRQLKVSHAFHSPLIAPVCGEFKNTLQEIDFAKPQIPIISNLTGEIAD
 DSIVTPDYWIQHLLHPVQFYQGVVSLESGLGCDSEIGPQPVLLGHIQSSISLSNPLI
 LPSLRSGFSDWEVLLESGLKYVRGANIDWFGLEKDYQPKRCALPTYPFQQRQ
 HWIPLKTQFQTAKESAVVKMLSQKDTNNLIQTLIETGNYSEAEKQTLAIVQQLI
 QLHHQDTGNSNFDNLLYQLEWLPHELLSAKKLENLEIIQTDLGSYLSEQIKSTQFT
 GVSALFSQMEELSANFIVKTLKDLGLWQINTILSPENSLRQAGIKEEYRLLWQH
 CLKILAQTGFLEKQGLGWKIIEPQQSHSDLTVDLIVQYPNASIELTLFKRVAV

NLAAIITGKISPLSILFAQDQGIGVAEFYKNTSWAKVLNLSISKTVELLSSNYSPLE
 EPIRILEIGAGTGATTHQILQACASRQINYTFTDISPFFLETAKDTFAHSFIEYKVL
 DIEKDPEIQGFLPGSYDLIAANVLHSTRDLQGETLPHIRGLLRPGGHLLLLLELTH
 QSRWIDLIFGVTQGWWRFSRDLRSDHPHIAASTWQSILRESGFAQAEFISPDEKI
 GSPLFQQSIIVAQNAEKSSDISGNWLIFTDSETDNLALAIQQQLSKDCGSCAIANL
 ENSSELETRLASSLCWRGIIYLVNGGEGDQYESTLFRCHHLLNLLQAIKKIPHP
 PKLFLVTQGGQPFRLEQPSFVTQSPLWALGRVMGLEEPWGGMIDLCPHADI
 AQNLVALLSGLTNSVTEDHLMFRKGQAYVARLSPLESPTKPVTIQAQATYLIT
 GGIGHLGLQLARHLVDLGAKHLILTTRRQFPLRAEWDSQAEFGIINIKTLEQK
 GATVEVCQADVGDQFQMSRIFTKIQKISDPLRGIFHLAGVSGRKAKLSECTLDDI
 AEVFAQAKVRGSWNHLQSLATQLDYFVLFSTAGAIWGAKEQGLYDTASHFMD
 ALAHLRHLQKLPATSLNWALLAGNGIVSQDYEDWLKQIGMKEIALDKAFAAM
 TAVMESGKTQILLADVDWVRFKNIYQSKGNKPIFEKLGEYQNSVKGIIQQSISTR
 RFLEEIPPGERRQHLEFYIGKQVGTILGNKQIPDTEQGFLMGIDSLLSIELKNRL
 EKGLEVALPASLIFDFPNIRRLVDYLVEQVFSWQVNASVNVVPIQEEVDQDLFL
 QELADLEAFLGNS

>*Microcystis aeruginosa* k-139 (BAB12213)

MSKHSISFGGQLEDNWRTLSEVLETATKHNNHGITYIRNDATYFQSYQDLYQ
 DALVILNGLEQKGKILGHKVILQIAKNQDFIPALWACFLGGIIPVPLTVAPSYDLE
 NSAVKKLENVWKILDNPLILSDSELITEIEKLGTYSHLEGWQVISVNELRKAPSKI
 EQLPILDPQDAALLFTSGSTGMPKGVILTHHNLSMTAGTVVMNHFTQQEVTL
 NWMPLDHVGAIVFLGIMAVDLACDQIHVPMELVLRQPLQWLELIQKHQVSISW
 SPNFAFSLINQQAELKHVSYNLSSMKFLVNAGEQVSVKTIRLFLEILEKHQLQE
 RAIKPAFGMTESCSGITWSAGLSKNELTEENSFVSLGKPIPGATIRIVDQENNPLP
 EREIGRLQIQGNSVTCKGYNNNELNQEVFQEGWFTTGDLGYLSKGELFITGREK
 QEIIINGVNYFAHELETTIEELEGVKVSYTAFAVFDQSRETDLLIITFSPSESEQFE
 QGIKVVRKIRSHVTQKFGIAPA YVIPLERNLVPKTSIGKVQKSKLKKDFEQGLFS
 SRIQEIDQYLAKERQKNQTL PQSENERQIAAVWSEVLQLTSVGLEDNFFELGGH
 SIHLIRVQNELEKLFNRQLSLAEMFKNPTVATLARFLSEESNTNQVIAQKSRQRA
 ENRSRRHNETHDIAIIGMAGQFPGAKNLTTFWENLKNGIETISFFSEEELQESGVS
 SELFNQPNYVRARPILEQVEYFDSEFFGYTDREAELDPQQRLLLECSWECLN
 AGYNPNQTYQGSIGIFAGASMNTYLINNCYPNRGKLDTNDELQPFTLDSMGGFQ
 TMVANDKDYLTTTRISYKLNHLHGPSVNVQTACSTGLVVVHLACQSLISGESDMA
 LAGAASINSPQKIGYLYQEGLIMSPDGHCRADFADAEAKGTIFGSGVGVIMLKRLS
 DALADHDHIYAVIKGSAINNDGGQKLGFAPGGEGQIAAATEALAFAGVDAN
 TISFVEAHGTGTPLGDPIEVDALAKVYQGANEGECVLGSVKTNIGHMQIASGIA
 GLMKATLSLKYKIIPPTLHFQNPNPQINFSQTPFYINNEAISWTTKQDKSEKLPRR
 AGVNSLGIGGVNAHVILEEAPPIPDNQSQRPYHLLTLSARTEPALTELVSRYID
 FLESQPEKDLSDVVFTANTGRVHFSNRLALTGYKNSDFIEQLRQFKHLDYESTIY
 GIVDEKRPSKIAFLFTGQGSQYAGMAHQLYQTQPTFRKTL DAGEKYYQKLTGK
 SLLNVVFADTDDALNQTDYTQPALFLIEVALAQLWHSWGIQPAAILGHSLEGEYS
 AACFAGVFDLESGLKLVS HRGNLMGQLPQNQGEMAAIFLDKNSVIEHCQSQGI
 KIAIAAINAEQHTVISGEKNVIQKLCNHFTNAGVKVRKLKVSHAFHSPLVEPMV
 AEFKTIHQEISFSQPQISLVSNLTGEIADDSIMTPEYWLQHLLNTVQFHQALFLQ
 SLGCDTFIEIGPQPILSGIIQSSLSSEPLTLPSLRSGFSDWQVLLESGLKLYVRGA
 KIDWFSFDQDYHPRRCALPTYPFQKRQHWIPLKTPSATVPQESNLVKMLSEKD
 KTTLMQTILETGHYSEDEKPTISAIVQQLIKLYYQEKEDFDFAKLLYQVAWLPC
 DLANGKLENLTSLKTDLEVYLEPQLQSSSELMGVSLAFSEMEKLAADFVVKALK
 DLELFQMNTFLDPDQSFIAQGLKQEYKYFWNYVIEILAKVGILEKQNTRWKIVK

EPEQSNPDLAVEDLINHYPNAQIELHLFRQVATNLAAIITGKISPLSILFSQDGQG
 GASEFYKNTSSAKILNLGISKTVELLSSYPSPASLRILEIGAGTGATTQQVLKAC
 NSRQITYTFTDVSPPFLEKARDNLAEFSGLEYKVLDIEKDPKLQGFCCHSYDLIIA
 ANVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLLLLELTQQSSWIDLIFGVTQGWWRFS
 DYHLRPNHPIITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGTALFQQSIILAQSLEISPN
 TAKNWLIFTDIEPQQNTFALGIQEQLLKKCDSCRIIYQGEKNTQISSSESCLNANQ
 LQQLEEFASNPSPDRIIYLLNSDGKDQPESILLNRCNYLLNLLKAIQKIPNPPQL
 FLVTQGAQPFELEQPSLGFQSPWLAMGRVIALENPQLWGGMLDLDPDVDINQN
 ITALLLGLTHAHDEDHLVFRKGQGYVARLLPLKSLETCTVKIQPEATYLITGGI
 GHLGLELAEHLVNLGAKHLILTTRRSLPVRFLWDSAAELAQISEKIRKLEEKGA
 SIAVISADVGNFEAMQAIFTQIEKTAAYPLRGIFHLAGISGRQAQLKDCTLQDLEA
 VFQAKVKGSWNHLHQLSLGSQLDYFVLFSSAGAIWGAKEQGLYDTVSHWLDAL
 AHFRHLQGLPATTLNWallAGHGIVSQDYEDWLKQIGIREIAPDMALRVMDAI
 MASNQTQVLIADVDWVRFKNIYEFKGEKPLLKNLGLSEVAIKSVQESDSVLHLL
 EEMPFGERREYLLEYVSKQVRIILGIKSMPTDEQGLIEMGIDSLSSIELKNRLEKR
 LEVLLPTSLVFDFPNIRRLVDYLLDRIFGEKVQKTAEEKKMINFTEVQQEISEDIL
 QELTDLEAFLGD

>*Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (AAF00957)

MSKHSISLGGQLEDNWRTLSEVLETATKHNNHGITYIRNDATEYFQSYQDLYQ
 DALVILNGLEQKGIKLGHKVILQIAKNQDFIPALWACFLGGIIPVPLTVAPSYDLE
 NSAVKKLENVWKILDNPLILSDSELITEIEKLGTYSHLEGWQVISVNELRKAPSKI
 EQLPILDPQDAALLFTSGSTGMPKGVLTHHNLSMTAGTVVMNHFTQQEVTL
 NWMPLDHVGAIVFLGIMAVDLACDQIHVPMELVLRQPLQWLELIQKHQVSISW
 SPNFAFSLINQQAEELKHVSYNLSSMKFLVNAGEQVSVKTIRLFLEILEKHQLQE
 RAIKPAFGMTESCSGITWSAGLSKNELTEENSFVSLGKPIPGATIRIVDQENNPLP
 EREIGRLQIQGNSVTKGYNNNELNQEVFQEGWFTTGDLYLSKLGELFITGREK
 QEIIINGVNYFAHELETTIELEGVKVSYTAAFAVFDQSRETDLLIITFSPESQFE
 QGIKVVRKIRSHVTQKFGIAPA YVIPLERNLVPKTSIGKVQKSKLKKDFEQGLFS
 TRIQEIDQYLAKERQKNQTL PQSENERQIAAVWSEVLQLT SVGLEDNFFELGGH
 SIHLIRVQNELEKLFNRQLSLAEMFKNPTVATLARFLSEESNTNQVIAQKSRQRA
 ENRSRRHNETHDIAIIGMTGQFPQAKNL TTFWENLKNGIETISFFSEEELQESGVS
 SELFNQPNYVRARPILEQVEYFDSEFFGYTDREAELDPQQRLLLECSWECLN
 AGYNPNQTYQGSIGIFAGASMNTYLINNCYPNRGKLDSNDELQPFTLDSMGGFQT
 MVANDKDYL TTRISYKLN LHGPSVNVQTACSTGLVVVHLACQSLISGESDMAL
 AGAASINSPQKIGYLYQ EGLIMSPDGHCRAFDAEAKGTIFGSGVGVIMLKRLSD
 ALADHDHIYAVIKGSAINNDGGQKLGFTAPGGEGQIAAATEALAFAGVDAN
 TISFVEAHGTGTPLGDPIEVDALAKVYQGANEGECALGSVKTNIGHMQIASGIA
 GLIKATLALKYRVIPPTLHFQNPNPQINFSTPFYINNEAISWTTKQDKSEKLPRR
 AGVNSLGIGGVNAHVILEEAPPIPDNQSQRPYHLLTLSARTELALTELVSRYID
 FLESQPEKDLSDVVFTANTGRVHFSNRLALTGYKNSDFIEQLRQFKQLDYESTIY
 GIVDEKRPSKIAFLFTGQGSQYVGMAHQLYQTQPTFRKTL DAGEKYHQKLTGK
 SLLNVVFADTDDSLNQTA YTPALFLIEVALAQLWHSWGIQPAAILGHSLSGEYS
 AACFAGVFDLESGLKLVSHRGNLMGQLPQNQGEMAAIFLDKNSVVEHCQSQGI
 KIAIAAINAEQHTVISGEKNVIQKLCNHFTNAGVKVRQLKVAHAHFSPLVEPMV
 AEFKTIQEI SFSQPQISLVSNLTGEIADDSIMTPEYWLQHLLNTVQFHQ GALFLQ
 SLGCDTFIEIGPQPILSGIIQSSLSSEPLTLPSLRSGFSDWQVLLES LGKLYVRGA
 KIDWFSFDQDYHPRRCALPTYPFQKRQHWISLKTPTSATVPRESNLVKMLSEKDK
 TTLMQTLLETGHYSEDEKPTISAIVQQLIKLYYQEKEDFDFAKLLYQVAWLPCD
 LANGKLENLTSLKTDLEVYLEPQLQSSSELMGVSLAFSEMEKLAADFVVKALKD

LELFQMNTFLDPDQSFQAGLKQEYKSFWNVLEILAKVGILEKQNTRWKIVKE
 PEQSNPDLAVEDLINHYPNAQIELNLFQVATNLAAIITGKISPLSILFSQDGQGG
 ASEFYKNTSSAKILNLGSKTVELLLSSYPASLRILEIGAGTGATTQQVLKACN
 SRQITYTFTDVSPFFLEKARDNLAEFSELEYKVLDIEKDPKLQGFCHSYDLIAA
 NVLHSTANLQEETLPHIQSLLRPGGHLLELTQQSSWIDLIFGVTQGWWRFS
 YHLRPNHPIITASTWESMLLKSGFSQVEFVSPDQKIGTALFQQSIILAQSSEISSNT
 AKNWLIFTDVEPQQNTFALGIQEQLLKKCDSCRIYQGEKNTQISSSESCLNANQ
 LQQLEEFASNPSPDRIIYLLNSDGKDQPEISILLNRCNYLLNLLKAIQKIPNPPQL
 FLVTQGAQPFELEQPSFGFQSPLWAMGRVIALENPQLWGGMLDLDPVDINQN
 ITALLGLTHAHDEDHLVFRKGQGYVARLLPLKSLETCTIKIQPEATYELITGGIG
 HLGLELAEHLVNLGAKHLILTTRRSLPVRFLWDSAAELAQISQKIRKLEEKGASI
 AVTSADVGNFEAMQAIFTQIEETAYPLRGIFHLAGISGRQAQLKDCTLQDLEAV
 FQAKVKGSWNHQLSLGSQLDYFVLFSSAGAIWGAKEQGLYDTVSHWLDALA
 HFRHLQGLPATTNLWALLAGHGIVSQDYEDWLKQIGIREIAPDMALRVMDAIM
 ASNQTQVLIADVDWVRFKNIYQFKGEKPLLKNLGLSEIPINSVQESDSVLHLL
 EEMPFGERREYLLLEYVSKQVRMILGIKSMPDTEQGLIEMGIDSLSSIENRLEKRL
 EVLLPTSLVDFPNIRRLVDYLFDRIFGEKVQKTAEKMINFTEVQQEISEDILQE
 LTDLEAFLGD

>*Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 (CAD29795)

MFKHSISSGGQLKDNWRTLSAVLANAAKYENQGIPYIGNDVTEYFQTYQDLYN
 DALNILDGLDQRGIKLGDKVILQIAKNKDFIPALWACFLGGIIPVPLTVAPHYEL
 ENSAVKKLENVWKILEQPLILSDNELITEIQKLETQSHLKGLQVVSIDYLRSESQ
 SNSQPDKTSKKCYSLPDLTPENQALLFTSGSTGMPKGVMLTHNNLLSMSAGT
 VAMNNFSQQEVTNLNWMPLDHAGAIVFLGIMAVDLACDQIHVPMELILRQPLK
 WLELIQNHQATISWAPNFAFSLINQQSEQLNQSSYNLSSMKFLVNAGEQVSIKTI
 RLFLEILEKHQLPDRAIKPAFGMTESCSGITWSVGLSQDKLTEENIIISLGKPIPGA
 TIRIVDQENNVLPEAEIGRLQIKGKSVTKEYYHNPELNQEVFQDEGWFTTGDLA
 YLLDGELFITGREKQEIINGINYFAHEIETVIEELEGVNVSYTAAAFALFDQIQETD
 LLIIIFPESEHFEQWVKVVRKIRSHLTQKVGIAPAYVIPLETNLVPKTSIGKVQKS
 KLKKDFEQGLFAGRIQEQYLES DRQKNRSLPQSENERQIATVWCEVLQLTSTV
 GLNDNFFELGGHSLHLIRVHNQLEKLFNRQLPIAEMFKNSTVATLARFLSKESN
 STPATQQKSRQRAENRSRRQQETHDIAIIGMAGRFPGANNTTFWENLQNGVET
 ISFFTEEEELLESQVSPELFNQPNYIRARPIIDQVEYFDSEFFGYTNREAELDPQQR
 LFLQSSWECLNAGYNPNYSYQGAIGIFAGASMNTYLINNCYPNRGQLDSNDEL
 QPFTLDSMGGFQTMVANDKDYLTTRISYKLNLRGPSINIQTACSTGLVVHLAC
 QSLINGESDMALAGAASINSPQKIGYLYQEGLILSNDGHCRAFDSSQAQGTIFGSG
 VGVVLLKRLPDALADNDQIYAVIKGSAINNDGGTKLGFTAPGGEGQISVAAEA
 LAFAGVDANTISFIEAHGTGTTLDPIEVDALAKAYGAANQGEALCSGKTNIG
 HMPIASGCGLIKATLALKHQIIPPTLHFQNPNPQIDFSKTPFYINTEAIPWKTKQQ
 NGQELPRRAGVNSLGIGGVNAHIILEEAPTIPQQNQTKRPINLLTISARTPQALK
 DLANSYVEFWENHPESDISDVFTANTGRVHFSNRLAVIGSENSDFITKLRFQ
 QLDQGLIIQGVDEKQPPKIAFLTGQGSQYAGMAHQLYQTQPTFRQTLEQGES
 IYQKLTGKSLEIIFANSDEILTQTSYTQPALFIEVALAQLWQSWGIEPIAILGHS
 LGEYAAACFAGVFDLESGLKLVINRGRLIGQFPDNQGAMAAIFLDQKSQVLEQC
 QNQGIKIAIAAINTDQHTVISGDKKSIQQLCEHFNNTGIKVRQLKVSHAFHSPLIE
 PICEQFKTILQEITFAQPQIPLISNLTEIADDSIITPEYWLQHLLHTVQFHQGVLSL
 QSLGCDTFIEIGPQPILLGIIQSSISSSNPLILPSLRSGFSDWEVLLESGLKLYVRGL
 DIDWFSFNKDYHCSRCSLPTYPFQQSRHWIPLKTQLPTVTQESSLVKMLSNKNT
 KSLMQTLLETGNYSETEKQTVSAIVQQLIQLHHQQTNNFDFENLLYQVKWFPD

NLATQKSENLATIQADLDVYMEKQIQFASLTGVSLAFAEMEKLSVDFIIKALKD
 LELFQLNTLLSPDDSFQAGIKA EYKLLWNHCFKILAETGILEKQDSGWKIINKP
 QQSHPDLTVENLINQYPNALIELTLFQ RVAANLAAILTGKIAPLSILFSQNEKIGA
 AEFYKNTSWAKVLNLSISKAVE LLLSNYSPSEPLRILEIGAGTGATTHQVLNACK
 SDQINYTFTDVSPFFLETARENFTQFPNINYQVLDIEKDPKSQGFSLNSYDLIIAA
 NVLHSTRDLQAETLPHIQSLLRPGGQ LLLLELTHQSKWIDLIFGITQGWWRFS
 DHLRSHHPISASTWQSILLKSGFAQAEFVSPDQKIGSALFQQSIIIAQNPRQASNI
 SENWLIFTDSHPEKDHLPRFIQAQLSKNYGSCTIYQGQNKIKLSQFEYSLNAHQ
 PEQIKAWFAENPSPHRIIYLLNDNHQDQPE SILLNRCHYLLNLLQAIQKIPNSPKL
 FVVTQGGQPFELKQPTFVTQSPLWALGRVISLENPELWGGMIDLDPSADITQNI
 ADLLLGLTHSISEDHLLFRNGQAYLGRLVPSTSPPTKPLTIQAEATYELITGGIGHL
 GLALAGHLVDLGAKHLILTTRRPFPSPSEISTEFAKIMENLRILEQKGVSVVEVCQ
 ADVGDFEQIQAIWAKIEKTAYPLRGVFHLAGVSGRQAQLSECTFADLEIVFQAK
 VRGSWNLHRLSLATKLDYFVLFSSAGAIWGAKAQGLYDAVSNSMDSLALMRH
 LQGLPATTLNWALLAGNGIVSPDYEDWLKQIGMKEIDLDRAFSVMDAIIESNQ
 QILVADVDWVRFKNIYEFQGD KPLLKKLGQSQNIKSVQDSSSTRRLLEDIAPGE
 RREHLFQYIGKQVGMILGIKQMPDPEQGFSEMGIDSLLSIELKNRLEKGLEVTLP
 ASLVDFDPNIRRLVDYLIQQVLGWQVQTIVQTTVDSTEVQQDQVDADLILRELSE
 LEDFLSD

>*Microcystis aeruginosa* SPC777 (ASZQ00000000)

MFKNPTVATLARFLSEESNTNQVIAQKSRQRAENRSRRHNETHDIAIIGMAGQF
 PGAKNLTTFWENLKNGIETISFFSEEELQESGVSSELFNQPNYVRARPILEQVEYF
 DSEFFGYTDREAELDPQQRLLLECSWECLNAGYNPNTYQGSIGIFAGASMNT
 YLINNCYPNRGKLDSDNELQPFTLDSMGGFQTMVANDKDYLTTTRISYKLNLS
 PSVNVQTACSTGLVVVHLACQSLINGESDMALAGAASINSPQKIGYLYQEGLIM
 SPDGHCRAFDAEAKGTIFGSGVGVIMLKRLSDALADHDHIYAVIKGSAINNDGG
 QKLGFAPGGEGQIAAATEALAFAGVDANTISFVEAHGTGTPLGDPPIEVDALAK
 VYQGANEGECALGSVKTNIGHMQIASGIAGLIKATLALKYKIIPPTLHFQNPNPQ
 INFSQTPFYINNEAISWTTKQDKSEKLPRRAGVNSLGIGGVNAHVILEEAPPIIPQ
 DNQSQRPHYLLTSLARTELALTELVSRYIDFLESQPEKDLSDVVFTANTGRVHFS
 NRLALTGYKNSDFIEQLRQFKQLDYESTIYGIVDGRPSKIAFLFTGQGSQYVG
 MAHQLYQTQPTFRKTLDA GEKYQKLTGKSLLNVVFADTDDSLNQTA YTPA
 LFLIEVALAQLWHSWGIQPAAILGHSLSGEYSAACFAGVFDLESGLKLVS HRGNL
 MGQLPQNQGEMAAIFLDKNSVVEHCQSQGIIKIAIAA INAEQHTVISGEKNVIQK
 LCNHFTNAGVKVRKLKVSHAFHSPLVEPMVAEFKILQEISFSQPQISLVSNLTG
 EIADDSIMTPEYWLQHLLNTVQFHQ GALFLQSLGCDTFIEIGPQPILSGIIQSSLS
 SEPLTLPSLRSGFSDWQVLLES LGKLYVRGAKIDWFSFDQDYHPRRCALPTYPF
 QKRQHWISLKTPTSATVPRESNLVKMLSEKDKTTLMQTLLETGHYSEDEKPTISA
 IVQQLIKLYYQEKEDFDFAKLLYQVAWLPCDLANGKLENLTSLKTDLEVYLEP
 QLQSSSELMGVSLAFSEMEKLAADFVVKALKDLELFQMNTFLDPDQSFQAGLK
 QEYKYFWNYVIEILAKVGILEKQNTLWKIVKEPEQSNPDLAVEDLINHYPNAQI
 ELHLFRQVATNLAAIITGKISPLSILFSQDGQGGASEFYKNTSSAKILNLGISK TVE
 LLFSSYPPSASLRILEIGAGTGATTQQVLKACNSRQITYTFTDVSPFFLEKARDNL
 AEFFGLEYKVL DIEKDPKLQGFCHSYDLIIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLR
 PGGHLLLELTQQSSWIDLIFGV TQGWWRFS DYHLRPNHPITASTWESMLLKS
 GFSQVEFVSPDQKIGTALFQQSIIAQSSEISPNLTKNWLIFTDVEPQQNTFVLGIQ
 EQLLKKCDSCRIIYQGEKNTQISSSESCLNANQLQQLEEFASNPSPDRIIYLLNS
 DGKDQPE SILLNRCNYLLNLLKAIQKIPNPPQLFLVTQGAQPFKLEQPSFGFQSPL
 WAMGRVIALENPQLWGGMLDLDPDVDINQNITALLGLTHAHDEDHLVFRKG

QGYVARLLPLKSLETCTVKIQPEATYELITGGIGHLGLELAEHLVNLGAKHLILT
 RRLPVRFLWDSAAELAQISEKIRKLEEKGASIAVISADVGNFEAMQAIFTQIEK
 TAYPLRGIFHLAGISGRQAQLKDCTLQDLEAVFQAKVKGSWNHQLSLGSQLD
 YFVLFSSAGAIWGAKEQGLYDTVSHWLDALAHFRHLQGLPATALNWALLAGN
 GIVSQDYEDWLKQIGIREIAPDTALRVMDAIMASNQTQVLIADVDWVRFKNIYE
 FKGEKPLLKNLGLSEVAIKSVQESDSVLHLLLEEMPFGERREYLLEYVSKQVRIL
 GIKSMPDTEQGLIEMGIDSLSSIELKNRLEKRLEVLLPTSLVFDFPNIRRLVDYLL
 DRIFGEKVQKTAEEKMINFTEVQQEISEDLLQELTDLEAFLGD

McyE

>Ponto 1 (1ª coleta)

ALASGYHNQPEMTQEKFKPRFLDETCTLFRTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
 KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPIQVNNQTQLSAYCQTEKTLEIAEIREF
 LAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHGKLDLHSLRQLRETGKYLVNSNYVAPRNL
 LESNLVSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
 VPTVAGLATLISQTQDNYQEPIAAIPPQKSYPM SHGQR

>Ponto 1 (2ª coleta)

IPLLFYTIIGNFIAAYLNQELSKINQAQLQSKADYDYALTHVRTHAESIAFFRGEK
 EEQNIIQRRFQEVINDTKNKNINWEKGNEIFSRGYRSVIQFFPFLVLGPLYIKGEID
 YGVEQASLASFMFASALGELITEFGTSGRFSSYVERLNEFSNALETVTKQAE NV
 STITTIEENHFAFEHVTLETPDYEKVIVEDLSLTVQKGEGLLIVGPSGRGKSSLLR
 AIAGLWNAGTGRLVRPPLEEILFLPQRPYIILGT

>Ponto 2

ALASGYHNQPEMTQEKFKPSFLDETCTLFRTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
 KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPIQVNNQTQLSAYCQTEKTLEIAEIREF
 LAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHGKLDLHSLRQLRETGKYLVNSNYVAPRDH
 LESNLVSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
 VPTVAGLATLISQTQYNYQEPISAIPPQKSYPM SHGQR

>*Microcystis* sp. RST 9501 (AGD94581)

ALASGYHNQPEMTQEKFKPSFLDETCTLFRTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
 KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPIQVNNQTQLSAYCQTEKTLEIAEIREF
 LAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHGKLDLHSLRQLRETGKYLVNSNYVAPRNL
 LESNLVSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
 VPTVAGLATLISQTQDNYQEPIAAIPPQKSYPM SHGQR

>*Microcystis* sp. IZANCYA5 (AAR85535)

ALASGYHNQPEMTQEKFKPSFLDETCTLFRTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
 KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPIQVNNQTQLSAYCQTEKTLEIAEIREF
 LAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHGKLDLHSLRQLRETGKYLVNSNYVAPRNL
 LESNLVSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
 VPTIAGLATLISQTQYNYQEPISAIPPQKSYPM SHGQR

>*Microcystis* *viridis* NIES-102 (AAR85537)

ALASGYHNQPEMTQEKFKPSFLDETCTLFRTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
 KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPVQVNNQTQLSAYCQTDKTLEIAEIRE
 FLAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHGKLDLHSLRELKETSLSLVNSNYVAPRNL

LESNL VSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
VPTVAGLATLISQTQYNYQEPISAIPPQKSYPM SHGQR

>*Microcystis* sp. GL260735 (AAR85533)

ALASGYHNQPEMTQEKFPSFLDETCTLFRGTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPVQVNNQTQLSAYCQTDKLEIAEIRE
LLAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHKGKLDLHSLRELRETGKSLVNSNYVAPRNY
LESNL VSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
VPTVAGLATLISQTQYNYQEPISAIPPQKSYPM SHGQR

>*Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 (AGD94580)

ALASGYHNQPEMTQEKFPSFLDETCTLFRGTGDLGKQTAPGIIEFMGRKDNQV
KVNGYRIDPGEIEYQLTRYAPIERAIVLPVQVNNQTQLSAYCQTDKLEIAEIRE
FLAKFLPVYMIPSYFIFLKQFPLTRHKGKLDLHSLRELRETGKSLVTSNYVAPRNY
LESNL VSIWEKILSKHPIGIFDNFFEIGGHSLLLSRVVTRVHKELNVSVKLADFFK
VPTIAGLATLISQTQYNYQEPISAAIPPQKSYPM SHGQR

>*Planktothrix prolifica* NIVA-CYA 98 (CAQ48262)

MTTQAASSPNALASFNQFLRDVKAIAQPYWYPTVSNKRSFSEVIRSWGMLSLLI
FLIVGLVGVTAFNSFVNRRLLIDVIIQEKDASQFASTLIVYAIGLICVTLLAGFTKDI
RKKIALDWYQWLNTQILEKYFSNRAYYKINFQSDIDNPDQRLAQEIEPIATNAIS
FSATFLEKSLEMLTFLAVVWSISRQIAIPLLFYTIIGNFIAAYLNQELSKINQEQL
SKADYNYALTHVRTHAESIAFFRGEKEELNIIQRRFKEVVNDTKNKNWEKGNE
IFSRGYRSVIQFFPFLVLGPLYIKGEIDYGQVEQASLASFMFASALGELITEFGTS
GRFSSYVERLNEFSNALETVTQPDNTNTITTIEENHFAFEHVTLETPNYEQVIV
EDLSLTVEKGEGLLIVGPSGRGKSSLLRAIAGLWNAGTGRLVRPPLEIILFLPQR
PYIILGTLREQLLYPLTNREMSNTELQEVLLQVNLQNVLNRVDDFDSEKPWENI
LSLGEQQRLAFARLLVNPPSFTILDEATSALDLTNEGILYEQLKTRNTTFISVGHR
ESLFNYHQWVLELSADSSWQLLTVQDYRLKKAREMFTDAPNNNSTPNITINNE
SEPETIHPPEGFSHQEMKLLTDLSLSSIRSKASRGNVITAKDGFTYRYDKNPQILK
WLKTSP

>*Microcystis aeruginosa* NIES-843 (YP 001661020)

MSAKVPQDRSTTNIISDVSKFWHSVKLIAAPYWYPTESGGRTFADVMKAWAM
LILLIGAILGVVGLNANFSFVSNYLVVDVILEKNDFDKFVRTLVVFAVGLLFVTLL
VGLLKFLRKRIALDWYAWLNDWILNKYLHNRAYYRINFKSDIDNPDQRLSQEI
EPITSKALSFFAVALENVLDMITFLVILWSISSSVAILVWVTILGNVIAIYFNQAL
NKITQEELELKANYNYALTHIRNHAESIAFFEGENQELNIIQRRFNKLLDSAKRKI
DWERGTEIFSRGYQAAIQVFTFVILGPLYINSEGISFGQVGQAACLAANLFATALA
ELISEFGTSAQFSSYVERLSQFSQALEEVIKQPENLSTIKTIEENQFSFEDVTLQTP
DYEQVIVENLSLSVQPGQGLLIVGPSGRGKSSLLRAIAGLWNAGTGRLVRPPLE
EVLFLPQRPYIILGTLREQLLYPNRNQETNEIKLREVLQEVNLQNLNVRVNSFDT
EEPWENILSLGEQQRLAFARVLITRPSFTILDEATSALDLNNEENLYRQLQKTHT
TFISVGHRSLFNYHQWVLELSSNSHWQLLTVVEYRRQKVKEIINISVDNSQDR
LEDLPNQETEVNPKINSAGEPPPESTTTILTEVEEGLSHAQMKELSDYSLSSIRS
KASQGKSITGKDGLTYRYDKDPKILKWLRV

>*Microcystis aeruginosa* (WP 002774017)

MTTQTASSANALASFNQFLRDVKAIAQPYWYPTVSNKRSFSDVIRSWGMLSLLI
FLIVGLVAVTAFNSFVNRRLLIDVIIQEKDASQFASTLTVYAIGLICVTLLAGFTKD

IRKKIALDWYQWLNTQIVEKYFSNRAYYKINFQSDIDNPDQRLAQEIEPIATNAI
SFSATFLEKSLEMLTFLAVVWSISRQIAIPLLFYTIIGNFIAAYLNQELSKINQAQL
QSKADYNYALTHVRTHAESIAFFRGEKEEQNIIQRRFQEVINDTKNKNWEKGN
EIFSRGYRSVIQFFPFLVLGPLYIKGEIDYGQVEQASLASFMFASALGELITEFGTS
GRFSSYVERLNEFSNALETVTKQADNASTITTIEENHFAFEHVTLETPDYEKVIV
EDLSLTVQKGEGLLIVGPSGRGKSSLLRAIAGLWNAGTGRLVRPPLEEILFLPQR
PYIILGTLREQLLYPLTNREMSNTELQAVLQQVNLQNVLNRVDDFDSEKWPENI
LSLGEQQRLAFARLLVNPSFTILDEATSALDLTNEGILYEQLQTRKTTFISVGHR
ESLFNYHQWVLELSADSSWELLSVQDYRLKKAREMFTNAPSNNISITPDITIDNG
SEPEIVYSLEGFSHQEMKLLTDLSSLRSKASRGKVITAKDGFTYLYDKNPQILK
WLRT

>*Anabaena* sp. 90 (YP 006996372)

MPTQVVQAQPITNAFSDFTQFLAGVKAIAAPYWYPTKQGERAFSDVIRSWGML
ILLILLIALVGMNAFSSFVNRYLVDTLIQEKDYSKFINTLSVNIVVLVFVTLVLVGF
SKFVRKQIALDWYNWLNHYHILDKYLSNRAYYKINFKADIDNPDQRLSQEIEPVT
TKALNFSATLLEKVLEMGTFFIIILSISQQIAVILLAYTIIGNFIAIYLNQELTKINQE
ELVFKADYNYSLTHVRNHAESIAFFQGEQELNIIAKRFNHLFKNTQQRKIGWER
GTDIFSRGYQSIIQIFPFLVLAPLYIRGEIDFGQLGQAALASNMFAIAMGELISEFG
TYGQFSSYVKRLTEFSNALEAVTKKPEENVSTIKTVEENHIAFDHVTLTQTPDYEQ
VIVEELSLSVKAGEGLLIVGPSGRGKSSLLRAIAGLWNAGTGRLVRPPLEEVLFL
PQRPYIILGTLREQLLYPSTNRQIPDAELKDILQQVNLQNLRSVDNFDTEVPWE
NILSLGEQQRLAFARLLVTHPSFTILDEATSALDLKNEGNLYQQQLQERKTTFISV
GHRESLFNYHQWVLELSQNSSWQLLTVQDYRRQKTTEIATTSSSLTLIKNNA

>*Microcystis aeruginosa* SPC777

MFKNPTVATLARFLSEESNTNQVIAQKSQRQRAENRSRRHNETHDIAIIGMAGQF
PGAKNLTTFWENLKNGIETISFFSEELQESGVSSSELFNQPNYVRARPILEQVEYF
DSEFFGYTDREAELLDPPQQRLLLECSWECLNAGYNPNTYQGSIGIFAGASMNT
YLINNCYPNRGKLDSDNDELQPFTLDSMGGFQTMVANDKDYLTTTRISYKLNLS
PSVNVQTACSTGLVVVHLACQSLINGESDMALAGAASINSPQKIGYLYQEGLIM
SPDGHCRAFDAEAKGTIFGSGVGVIMLKRLSDALADHDHIYAVIKGSAINNDGG
QKLGFTAPGGEGQIAAATEALAFAGVDANTISFVEAHGTGTPLGDPPIEVDALAK
VYQGANEGECALGSVKTNIGHMQIASGIAGLIKATLALKYKIIPPTLHFQNPNPQ
INFSQTPFYINNEAISWTTKQDKSEKLPRRAGVNSLGIGGVNAHVILEEAPPIIPQ
DNQSQRPHYLLTLSARTELALTELVSRYIDFLESQPEKDLSDVVFTANTGRVHFS
NRLALTGYKNSDFIEQLRQFKQLDYESTIYGIVDGRPSKIAFLFTGQGSQYVG
MAHQLYQTQPTFRKTLDAKEKYYQKLTGKSLLNVVFADTDDSLNQTAYTQPA
LFLIEVALAQLWHSWGIQPAAILGHSLEGEYSAAACFAGVFDLESGLKLVSHRGNL
MGQLPQNQGEMAAIFLDKNSVVEHCQSQGIKIAIAAINAEQHTVISGEKNVIQK
LCNHFTNAGVKVRKLKVSHAFHSPLVEPMVAEFKTLQEISFSQPQISLVSNLTG
EIADDSIMTPEYWLQHLLNTVQFHQALFLQSLGCDTFIEIGPQPILSGIQQSSLSS
SEPLTLPSLRSGFSDWQVLLESGLKLYVRGAKIDWFSFDQDYHPRRCALPTYPF
QKRQHWISLKTPTSATVPRESNLVKMLSEKDKTTLMQTLLETGHYSEDEKPTISA
IVQQLIKLYYQEKEDFDFAKLLYQVAWLPCDLANGKLENLTSLKTDLEVYLEP
QLQSSELMGVSLAFSEMEKLAADFVVKALKDLELFQMNTFLDPDQSFQAGLK
QEYKYFWNYVIEILAKVGILEKQNTLWKIVKEPEQSNPDLAVEDLINHYPNAQI
ELHLFRQVATNLAAIITGKISPLSILFSQDGQGGASEFYKNTSSAKILNLGISKTV
LLFSSYPPSASLRILEIGAGTGATTQQVLKACNSRQITYTFTDVSPPFFLEKARDNL
AEFFGLEKVDIEKDPKLQGFCHSYDLIAANVLHSTANLQEETLPHIQSLLR

PGGHLLLLLELTQQSSWIDLIFGVTQGWWRFSDYHLRPNHPITASTWESMLLKS
GFSQVEFVSPDQKIGTALFQQSIILAQSSSEISPNLTKNWLIFTDVEPQQNTFVLGIQ
EQLLKKCDSCRIIYQGEKNTQISSSESCLNANQLQQLEEFASNPSPDRIIYLLNS
DGKDQPESILLNRCNYLLNLLKAIQKIPNPPQLFLVTQGAQPFKLEQPSFGFQSPL
WAMGRVIALENPQLWGGMLDLDPVDINQNITALLGLTHAHDEDHLVFRKG
QGYVARLLPLKSLETKTVKIQPEATYELITGGIGHLGLELAEHLVNLGAKHLILT
RRSLPVRFLWDSAAELAQISEKIRKLEEKGASIAVISADVGNFEAMQAIFTQIEK
TAYPLRGIFHLAGISGRQAQLKDCTLQDLEAVFQAKVKGSWNLHQLSLGSQLD
YFVLFSSAGAIWGAKEQGLYDTVSHWLDALAHFRHLQGLPATALNWALLAGN
GIVSQDYEDWLKQIGIREIAPDTALRVMDAIMASNQTQVLIADVDWVRFKNIYE
FKGEKPLLKNLGLSEVAIKSVQESDSVLHLEEMPFGERRREYLLEYVSKQVRIL
GIKSMPDTEQGLIEMGIDSLSSIENRLEKRLEVLLPTSLVFDFPNIRRLVDYLL
DRIFGEKVQKTAEEKMINFTEVQQEISEDILQELTDLEAFLGD