Campus de São Carlos

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE
EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE)
EM ESPÉCIES DE *MICROCYSTIS* (CIANOBACTÉRIAS)
NO SISTEMA DE LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO
DO MUNICÍPIO DE SÃO LOURENÇO DA SERRA
(VALE DO RIBEIRA DE IGUAPE) – SP**

Ana Luiza M’Peko

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

**“AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE
GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) EM ESPÉCIES DE
MICROCYSTIS (CIANOBACTÉRIAS) NO SISTEMA DE
LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO DO MUNICÍPIO DE SÃO
LOURENÇO DA SERRA (VALE DO RIBEIRA DE IGUAPE) –
SP”**

Ana Luiza M'Peko

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 02.1.06.03

Ass.: *[Assinatura]*

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Hidráulica e Saneamento

DEDALUS - Acervo - EESC

31100043569

ORIENTADORA: Profa. Assoc. Maria do Carmo Calijuri

São Carlos

Class. TFSE-EESC
Cutt. 13766
Tombo T165/03
Sysno 132.6917

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

M939a M'Peko, Ana Luiza
Avaliação da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) em espécies de *Microcystis* (Cianobactérias) no sistema de lagoas de estabilização do município de São Lourenço da Serra (Vale do Ribeira de Iguape) – SP / Ana Luiza M'Peko. – São Carlos, 2003.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2003.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof^a. Assoc. Maria do Carmo Calijuri.

1. Cianobactérias. 2. *Microcystis* sp. 3. Lagoas de estabilização. 4. PCR-DGGE. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

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

Dissertação defendida e julgada em 31-03-2003 perante a Comissão Julgadora:

Profª. Assoc. **MARIA DO CARMO CALIJURI (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovado.

Profª. Dra. **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Profª. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**
(Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP)

Aprovada

Profª. Associada **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

**“SABER E NÃO FAZER AINDA É
NÃO SABER”**

Confúcio – Kung Fu-tze, China (551
– 479 a.C.). (Citado no Reporter
ECO, TV Cultura, em 08 de setembro
de 2002).

*Dedico este trabalho a Professora
Dra. Celina Foresti (in memoriam)
por tê-lo acreditado antes mesmo de
mim, a minha Mãe e a Deus pela
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri pela idealização e orientação deste trabalho e a minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria Bernadete Varesche, pelo constante acompanhamento.

A todos os funcionários da EESC-USP, em especial a Sá, Pavi e Rose.

A CAPES, pela bolsa concedida desde o início deste projeto.

As equipes das Profas. Maria do Carmo Calijuri, do BIOTACE (Adriana, Patrícia, Anna Paola pela coleta, André pela ajuda no microscópio, ...) e Maria Bernadete Varesche, do LPB (Isabel, Valquíria, Júlia, Edmar, Eduardo, Sávia, ...).

A Profa. Dra. Marli de Fátima Fiori e equipe, por ter permitido trabalhar em seu laboratório em conjunto, no CENA – USP e ao Prof. Dr. Márcio Lambais por ter realizado o DGGE nas dependências de seu Laboratório de Microbiologia Molecular de Solos – ESALQ – USP.

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira da UFSCar, Profa. Dra. Marli de Fatima Fiori e a Dra. Gina Luisa Boemer Debert pelas culturas puras.

Por toda a paciência, conselhos acadêmicos e (grande) acompanhamento da parte laboratorial ao mestre Gunther Brucha, doutorando Eduardo B. Mattos Cattony da EESC e mestranda Adriana Sturion Lorenzi, do CENA.

As minhas eternas amigas de Unesp, Andréa de Almeida Bossi, Raquel Flores, Suzana Ketelhut e Vera Carolina Vaz de Lima.

Ao meu alicerce como ser humano, minha família, em especial minha mãe, Gislaine Furtado, pelo amor e correção gramatical desta dissertação, e minha paixão, minha sobrinha, Isadora Fortes Barbosa. Jean-Claude M'Peko, por tudo.

E a todos os colegas e amigos que de maneira direta ou indireta participaram destes meus anos como mestranda, meu MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 Sistemas de Lagoas de Estabilização	7
3.2 Comunidade Algal nas Lagoas de Estabilização.....	19
3.3 As Cianobactérias	24
3.4 Avaliação da Comunidade de Cianobactérias por Métodos Moleculares.....	30
3.5 Técnicas de Biologia Molecular	34
3.5.1 PCR (Reação de Polimerização em Cadeia)	34
3.5.2 DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)	39
3.6 Limitações dos Métodos de Biologia Molecular	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Área de Estudo.....	45
4.2 Coleta de Amostras das Lagoas.....	48
4.3 Procedimentos para os Exames Microscópicos.....	49

4.4 Culturas utilizadas no estudo.....	50
4.5 Extração de DNA das Amostras Ambientais e das Culturas	51
4.6 Verificação do Resultado da Extração	57
4.7 Técnica de Purificação do DNA.....	58
4.8 Iniciador para PCR.....	59
4.9 Amplificação por PCR.....	61
4.10 Quantificação do produto de PCR para DGGE.....	65
4.11 DGGE.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1 Exame Microscópico Óptico da Amostra	68
5.2 Avaliação dos Métodos de Extração do DNA das Amostras Estudadas	71
5.3 Avaliação do Método de PCR das Amostras Estudadas.....	76
5.4 Avaliação do Método de DGGE das Amostras Estudadas	86
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Principais tipos de tratamentos de águas residuárias realizados no Estado de São Paulo. Fonte: Sistema de Informações de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SIGRH, 2002).....	17
FIGURA 2	Esquema simplificado de uma lagoa facultativa . Fonte: Modificado de VON SPERLING (1996).....	18
FIGURA 3	Dendograma baseado em RFLP de genes de cianobactérias RNAr 16S. Fonte: LYRA <i>et al.</i> (2001).....	27
FIGURA 4	PCR. Esquema de (A) a (G). Fonte: Modificado de WATSON <i>et al.</i> , 1997.....	37
FIGURA 5	Amostras de mesmo comprimento, mas com diferentes seqüências de pares de bases, detectadas pelo método de DGGE.....	41
FIGURA 6	Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante do DGGE da forma helicoidal para a forma de um fragmento parcialmente dissociado.....	41
FIGURA 7	Etapas realizadas neste estudo.....	44
FIGURA 8	Comitê da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul, destaque para o Rio São Lourenço. Fonte: SÃO PAULO, SMA, 1997.....	45
FIGURA 9	Caixa de areia para secagem do resíduo do gradeamento.....	46
FIGURA 10	Lagoa anaeróbia. (outubro 2001).....	46
FIGURA 11	Lagoa facultativa (outubro 2001).....	47
FIGURA 12	Tanque de cloração com chicanas (30°) para os efluentes das lagoas com hipoclorito (outubro de 2001).....	47

FIGURA 13	Saída do hipoclorito no tanque de cloração (outubro 2001).....	47
FIGURA 14	Coleta pela rede de fitoplâncton de 20 µm na lagoa facultativa (março 2002).....	48
FIGURA 15	Retirada da rede de fitoplâncton de 20 µm da lagoa facultativa, com coleta direta (março 2002).....	49
FIGURA 16	Frascos coletados na lagoa facultativa através de rede de fitoplâncton de 20 µm (março 2002).....	49
FIGURA 17	Microscopia óptica de <i>Microcystis aeruginosa</i> (seta azul) e <i>Microcystis flos-aquae</i> (seta vermelha) (1 e 2).....	68
FIGURA 18	Microscopia óptica de <i>Microcystis aeruginosa</i> (seta azul) e <i>Microcystis flos-aquae</i> (seta vermelha) (3, 4, 5, 6, 7 e 8).....	69
FIGURA 19	Microscopia óptica de <i>Microcystis aeruginosa</i> (10) e <i>Microcystis flos-aquae</i> (9 e 11).....	70
FIGURA 20	Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental segundo protocolo de BOLCH <i>et al.</i> (1996) (todas as canaletas)....	72
FIGURA 21	Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental segundo protocolo de TSAI & OLSON (1991).....	72
FIGURA 22	Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental segundo protocolo com TNES (canaletas 1 e 2) e com o protocolo de Proteinase K (canaletas 3 e 4).....	73
FIGURA 23	Gel de agarose 0,8% da extração de DNA de culturas puras e ambiental, segundo protocolo com TNES.....	73
FIGURA 24	Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental através da utilização do Ultra Clean Water DNA kit (canaletas 1 e 2).....	74
FIGURA 25	Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental através da utilização do Fast DNA kit (canaleta 3, seta).....	75
FIGURA 26	Gel de agarose 1,2% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA106F/CYA781R (A+B).....	76
FIGURA 27	Gel de agarose 1,2% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA359F/CYA781R (A+B).....	77
FIGURA 28	Gel de agarose 1,2% com produto de PCR, utilizando conjunto de	

	iniciadores 209F/409R.....	78
FIGURA 29	Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA 359 F/ CYA 781 R (A+B), amostra de cultura pura nas canaletas pares e amostra ambiental nas canaletas ímpares provenientes do CENA (Adriana Sturion Lorenzi).....	79
FIGURA 30	Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA 359 F/ CYA 781 R (A+B) não degenerado e amostra de cultura pura NPJB-1 (<i>Microcystis aeruginosa</i>) com canaletas de 1 a 6 com Taq Polimerase da QbioGene e canaletas de 7 a 12 Taq Platinum da Invitrogen e com gradiente de variação de temperatura de $\pm 10^{\circ}\text{C}$	80
FIGURA 31	Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores não publicado nas canaletas 1 e 2; <i>nested</i> de produto de iniciadores 27F1/1494R, utilizando iniciadores 27F1/409R nas canaletas 3 e 4; <i>nested</i> de produto de iniciadores 27F1/1494R, utilizando iniciadores 209F/409R nas canaletas 5 e 6.....	81
FIGURA 32	Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores 27F1 / 1494 R com a amplificação do fragmento do RNAr 16S.....	82
FIGURA 33	Gel de agarose 1% realizado <i>nested</i> de PCR, utilizando conjunto de iniciadores 27F1/ primer não publicado na canaleta 1, iniciadores 27F1 / 409 R na canaleta 2 e iniciadores CYA 359F / CYA 781R (A+B) com a amostra ambiental.....	83
FIGURA 34	Gel de agarose 1% com <i>nested</i> PCR.....	83
FIGURA 35	Gel de agarose 1% com <i>nested</i> PCR, utilizando-se produto de PCR de 27F1 / 1494R com o conjunto de iniciadores 338FGC e 518R.....	85
FIGURA 36	Gel de poliacrilamida de 8% com gradientes de desnaturação de 15% e 55%, sendo canaleta 1 cultura pura NPJB-1 (<i>Microcystis aeruginosa</i>), canaleta 2 cultura pura NPDC-1 (<i>Microcystis aeruginosa</i>), canaleta 3 cultura pura 339T3 (<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>), canaleta 4 cultura pura SPC702 (<i>Microcystis</i>	

<i>panniformis</i>) e canaleta 5 amostra ambiental.....	87
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Descrição sucinta dos principais sistemas de lagoas de estabilização.....	12
TABELA 2	Análise comparativa dos principais sistemas de lagoas para a remoção da DBO. Balanço de vantagens e desvantagens.....	14
TABELA 3	Dimensões das lagoas anaeróbia e facultativa.....	48
TABELA 4	Identificações das culturas puras utilizadas no estudo.....	50
TABELA 5	Tempos de Corrida e Voltagens Utilizados na Eletroforese em Gel de Agarose.....	58
TABELA 6	Iniciadores utilizados neste estudo.....	60
TABELA 7	Descrição dos reagentes utilizados para PCR com o kit puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads.....	61
TABELA 8	Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.....	61
TABELA 9	Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.....	62
TABELA 10	Descrição dos reagentes utilizados no Termociclador de Gradiente de Temperatura.....	62
TABELA 11	Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.....	63
TABELA 12	Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.....	63
TABELA 13	Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.....	63
TABELA 14	Programação do aparelho com as condições do PCR.....	64
TABELA 15	Combinações dos iniciadores utilizados em PCR e posteriormente	

no primeiro DGGE.....	84
TABELA 16 Dados obtidos com <i>blast</i> para as espécies analisadas neste estudo....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> , albumina bovina
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DGGE:	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> , Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DQO:	Demanda Química de Oxigênio
EDTA:	<i>Ethylene diamine tetra-acetate</i> , etilenodiaminotetraacetato dissódico
kb:	Kilobase, de DNA
MCYST-LR:	Toxina Microcystina, do gênero <i>Microcystis</i>
OD:	Oxigênio Dissolvido
pb:	Pares de bases, de DNA
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação de Polimerização em Cadeia
pH:	Potencial hidrogeniônico
RAPD:	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA:	Ácido ribonucleico
RNAr:	RNA ribossômico
RNA _t :	RNA transportador
SDS:	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecil sulfato de sódio
TE:	Tris – tampão EDTA
TEB:	Tris – ácido bórico – EDTA
UV:	Raio ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

A:	Ampere, unidade de corrente elétrica
°C:	Graus Celsius (escala centígrada)
g:	Grama, unidade de massa
g:	Unidade gravitacional de força, 1 g = a força gravitacional da Terra
M:	Molar, unidade de concentração; moles de soluto por litros de solução
mA:	Miliampere, 1 mA = 10^{-3} A
μg:	Micrograma, 1 μg = 10^{-6} g
mg:	Miligramma, 1 mg = 10^{-3} g
μl:	Microlitro, 1 μl = 10^{-6} L
ml:	Mililitros, 1 ml = 10^{-3} L
mM:	Milimolar, 1 mM = 10^{-3} M
N:	Normal, a solução contendo um peso equivalente do constituinte em questão em 1 litro de solução
ng:	Nanograma, 1 ng = 10^{-9} g
pmol:	Picomole, 1 pmol = 10^{-12} g
rpm:	Rotação por minuto
S:	Unidade de Svedberg, unidade de razão de sedimentação
V:	Volts, unidade de diferença elétrica potencial

RESUMO

M'PEKO, A.L. (2003). *Avaliação da Técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) em Espécies de Microcystis (Cianobactérias) no Sistema de Lagoas de Estabilização do Município de São Lourenço da Serra (Vale do Ribeira de Iguape) – SP.* São Carlos, 2003. p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

As cianobactérias atuam no tratamento de águas residuárias em lagoas de estabilização. Seu estudo torna-se importante tanto pela atuação no referido tratamento como na possível produção de toxinas e seus efeitos nos sistemas aquáticos e saúde da população. Protocolos moleculares para culturas axênicas ou naturais foram testados e adaptados para as amostras analisadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o método molecular de eletroforese em gel de gradiente desnaturante nas espécies de *Microcystis* (cianobactérias) em um sistema de lagoas de estabilização. Foram utilizadas as técnicas de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) do gene RNAr 16S como marcador molecular na análise de cianobactérias no sistema de lagoas de estabilização de São Lourenço da Serra – SP. Este sistema é composto por tratamento primário (caixa de areia), fossa séptica seguida de um sistema australiano (lagoa anaeróbia seguida por uma lagoa facultativa) e na saída do sistema de lagoas um tanque de cloração. Na amostra ambiental realizada na lagoa facultativa obteve-se, através de exame microscópico, o predomínio das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis flos-aquae*. Através da técnica molecular de DGGE foi obtido um padrão de aproximadamente 18 bandas com a amostra ambiental.

Palavras-chave: Cianobactérias, *Microcystis* sp., lagoas de estabilização, PCR-DGGE.

ABSTRACT

M'PEKO, A.L. (2003). *Avaliation of the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) Technique Applied to Microcystis Species (Cyanobacteria) in a System of Stabilization Ponds in the City of São Lourenço da Serra (Vale do Ribeira de Iguape) – SP*. São Carlos, 2003. p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Cyanobacteria are active in wastewater treatment in stabilization ponds. The study of these microorganisms is of a great importance considering their role in the referred wastewater treatments as well as their potential to produce toxins and their effects in aquatic systems and public health. Molecular protocols for pure or natural cultures were tested and adapted for the collected environmental samples. This work had as objective to evaluate the molecular method of denaturing gradient gel electrophoresis in the *Microcystis* species (cyanobacteria) in a system of stabilization ponds. The techniques Polimerase Chain Reaction (PCR) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of the gene 16S rRNA as molecular marker were used in the cyanobacteria analysis in the system of stabilization ponds of São Lourenço da Serra – SP. This system is composed by primary treatment (box of sand), septic tank followed by an Australian system (anaerobic pond proceeded by an facultative pond) and in the exit of the system a chlorine tank. In environmental sample accomplished in the facultative pond it was obtained, as microscopic result, the prevalence of the species *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis flos-aquae*. Through molecular techniques a pattern of approximately 18 bands with these environmental sample was obtained.

Key-words: Cyanobacteria, *Microcystis* sp., stabilization ponds, PCR-DGGE.

1. INTRODUÇÃO

O saneamento básico é de importância fundamental e de primeira necessidade para os cidadãos e para o meio ambiente. Desde o início da época industrializada que os recursos hídricos vêm sofrendo constantes degradações por materiais líquidos, sólidos e gasosos despejados em seus cursos, e, quando não realizada sua biodegradação, ocorre a poluição hídrica, além do agravante de um número populacional cada vez maior gerando resíduos.

Desta maneira, impedir ou minimizar esta poluição hídrica é o desafio constante, realizado através de pesquisas em várias áreas, com ênfase nas ambientais e de saneamento.

O esgoto doméstico que chega até nossos cursos d'água é composto principalmente de proteínas (40% - 60%), carboidratos (25% - 50%), gorduras e óleos (10%), uréia derivada da urina e grande número de traços orgânicos, como os pesticidas, surfactantes, fenóis, não metais, metais, compostos de benzeno e compostos clorados (BITTON, 1994).

Estes materiais não degradados e o excesso de nutrientes carregados para os cursos d'água geram a eutrofização dos mesmos, comprometendo toda a dinâmica populacional destes locais.

O estado dos corpos d'água caracterizado como eutrófico, isto é, com excesso de nutrientes, como o fósforo e o nitrogênio por exemplo, é uma das causas de proliferações acentuadas de cianobactérias, conhecidas como florações ou *blooms*. Dependendo das espécies presentes nestas florações, e da toxicidade das cepas, pode ocorrer uma produção e liberação de toxinas para o meio aquático, as quais podem ser reconhecidas como hepatotoxinas ou neurotoxinas, afetando desta maneira a biota aquática e vindo a causar problemas de saúde na população humana.

Os tipos de tratamento destas águas residuárias podem ser classificados em três métodos predominantes (METCALF & EDDY, 1991):

- Físicos: gradeamento, mistura, floculação, sedimentação, filtração, flotação, transferência de gás;
- Químicos: precipitação, adsorção, desinfecção;
- Biológicos: atividades biológicas. Dentro destas atividades biológicas, temos os processos aeróbios (lodos ativados, lagoas aeradas e digestão aeróbia); os anóxicos (desnitrificação com filme fixo); os anaeróbios (digestores anaeróbios e filtro anaeróbio); os combinados aeróbios, anóxicos e anaeróbios (processos de estágios simples ou múltiplos com material biológico suspenso); e os por lagoas, dividido em lagoas aeróbias, lagoas de maturação, lagoas facultativas e lagoas anaeróbias.

Os sistemas de lagoas de estabilização constituem-se na forma mais simples para o tratamento de esgoto. Na zona aeróbia da lagoa, a matéria orgânica é oxidada por meio de respiração aeróbia, pela presença de oxigênio, o qual é suprido por meio da fotossíntese realizada pelas algas (VON SPERLING, 1996).

A estabilização de poluentes orgânicos na lagoa facultativa faz-se pela ação conjunta de algas e de bactérias, estas provenientes do próprio esgoto. As algas, utilizando-se de sais minerais contidos no esgoto e luz solar, realizam a fotossíntese, produzindo oxigênio que fica dissolvido na água. As bactérias executam a decomposição de poluentes orgânicos, utilizando-se deste oxigênio (GASI, 1988).

As lagoas de estabilização procuram reproduzir os fenômenos observados na natureza sem que, para isso, seja utilizado qualquer tipo de equipamento mecânico. O oxigênio presente na lagoa é introduzido, ou pelo afluente, ou pelo vento, ou através da produção fotossintética realizada pelas algas. Desta maneira, sua concentração deve variar de acordo com as condições climáticas do local, intensidade da luz solar, horas de luminosidade, velocidade dos ventos, direção dos ventos predominantes, dentre outros fatores climáticos (KELLNER & PIRES, 1998).

Locais com elevada radiação solar e baixa nebulosidade são propícios para a implementação de lagoas de estabilização, sendo este tipo de tratamento bastante indicado para as condições brasileiras (VON SPERLING, 1996).

O uso de lagoas de estabilização foi primeiramente constatado na cidade de San Antonio, Estados Unidos da América do Norte, tornando-se uma das primeiras comunidades a utilizar lagoas para a destinação de águas residuárias, sendo sua instalação datada de 1901 (SILVA & MARA, 1979).

Em 1936, a Austrália desenvolveu estudos com lagoas de estabilização e foi pioneira no emprego de lagoas em série, também conhecidas por “lagoas australianas” (CERQUEIRA, 1995).

Costa Rica foi um dos países pioneiros da América Latina na utilização de lagoas de estabilização, entrando em operação uma estação piloto em março de 1960 na cidade de Cañas, Guanacaste, servindo a uma população de 2.500 habitantes (ORTEGA, 1975).

No Brasil, as lagoas de estabilização foram introduzidas na década de 60 pelo Engenheiro Benoit Almeida Victoretti, com a construção do sistema de São José dos Campos – SP (KELLNER & PIRES, 1998).

A lagoa de estabilização é o mais importante processo de tratamento de águas residuárias nos climas tropicais, onde, normalmente, se dispõe de suficiente terreno e onde a temperatura é mais favorável à sua operação. Contudo, seu uso não está restrito somente aos climas tropicais. São usadas em todas as latitudes, como por exemplo, no Alasca. Constituem-se, também, em importante método de tratamento em muitos países industrializados, sendo que, em 1979, aproximadamente um terço de todas as estações de tratamento de águas residuárias nos Estados Unidos da América do Norte eram de lagoas de estabilização (SILVA & MARA, 1979).

Segundo PEARSON (1996), o modelo simplificado biológico fornece para engenheiros construtores explicação adequada da degradação da matéria orgânica em sistema de lagoas de estabilização e a redução observada de DBO e DQO entre os afluentes e efluentes. Todavia, não explica os outros aspectos vitais de tratamento de águas residuárias em lagoas, sobre a eficiência de destruição de patógenos e o mecanismo de remoção de nutrientes. De fato, o processo microbiológico de sistemas de lagoas é bastante complexo, até mais do que o sistema de lodos ativados, e está claro que as algas não são somente provedoras de oxigênio, mas estão diretamente atuantes na remoção de carbono e de nutrientes.

Com a utilização das técnicas de biologia molecular, será possível melhor conhecimento das espécies de cianobactérias presentes em sistemas de lagoas de estabilização. A avaliação do potencial das técnicas moleculares no estudo de espécies naturais torna-se necessária como ferramenta bastante útil.

As cianobactérias apresentam diferentes respostas ecofisiológicas as variáveis ambientais. Quando em cultura, as *Microcystis*, por exemplo, não formam colônias e bainha de mucilagem, possuindo diferenciação morfológica e requerimentos ecológicos quando comparada as que se encontram no ambiente, apresentando desta maneira diferenças quando em cultura e quando no campo.

Segundo MOFFITT *et al.* (2001), as cianobactérias são identificadas de acordo com sua morfologia, mas devido a morfotipos diversos, variáveis e problemas associados com a cultura em laboratório, o uso de técnicas moleculares para sua identificação já é de uso comum.

As cianobactérias são um grupo morfológicamente diverso de organismos, variando desde formas unicelulares a filamentosas, com sua classificação tradicionalmente baseada em caracteres morfológicos, os quais podem variar em diferentes ambientes ou condições de crescimento ou até mesmo serem perdidas durante o cultivo. Apesar de a molécula de RNAr 16S conter regiões com variações, é bem conservada para estudos de identidade de espécies, sendo utilizada em estudos com cianobactérias (LYRA *et al.*, 2001).

Culturas em condições inadequadas acarretam a perda de várias características morfológicas, além da falta de possibilidade de certos organismos de crescerem em laboratório. A falta de identificação das culturas em coleções torna difícil, em vários casos, de se aplicar indicações taxonômicas baseadas em culturas de populações ambientais. Em todos os níveis taxonômicos acima de espécie, a análise de seqüências dos genes que decodificam a pequena subunidade ribossomal do RNA (RNAr 16S) é atualmente a mais promissora ferramenta para a classificação de cianobactérias. Ainda mais, a comparação de análise das seqüências dos genes RNAr 16S providencia um novo meio de investigar as discrepâncias entre as cepas de coleções e de comunidades naturais (NÜBEL, 1997).

Segundo OTSUKA *et al.* (2001), as cianobactérias são descritas com base em características morfológicas e fisiológicas e sob as regras do Código Botânico.

Entretanto, através de dados de seqüências de DNAr 16 S e 5S colocaram este filo dentro de *Bacteria*, o qual, por este motivo, deveria ser classificado de acordo com as regras do Código de Bacteriologia.

Importante se torna frizar que o Código de Bacteriologia leva em consideração a fonte de carbono do microrganismo, mas as cianobactérias são fotossintéticas, não sendo ideal este Código, por não ser o mais eficiente para sua classificação, além dos problemas que ocorrem quando em cultivo, conforme comentado, como mudanças morfológicas.

As técnicas moleculares poderão fornecer respostas sobre se ocorrem ou não diferentes espécies e não somente se ocorrem modificações morfológicas, utilizando-se da região RNAr 16S, por ser este um gene mais conservado. Obtem, desta maneira, resposta mais consistente do que somente com a utilização de métodos tradicionais, através de técnicas de enriquecimento com a realização de culturas puras, os quais não demonstram a realidade ambiental.

A identificação microscópica de cianobactérias necessita de pessoas altamente qualificadas, com anos de treinamento em taxonomia, sendo que a técnica molecular ocorre a identificação de forma mais rápida, através de bancos de dados das espécies seqüenciadas e também de espécies não cultiváveis.

Desta maneira, torna-se importante o estudo de espécies de cianobactérias que se encontram presentes nos sistemas de lagoas de estabilização e que podem, eventualmente, estar sendo despejadas nos corpos d'água, além de maior conhecimento das espécies dominantes que estão atuando neste tipo de tratamento de águas residuárias.

A proposta da presente dissertação foi avaliar as técnicas de extração de DNA de amostras deste sistema, PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) e DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) para analisar a comunidade dominante de cianobactérias de superfície em um sistema de lagoas de estabilização, localizada em São Lourenço da Serra, Estado de São Paulo.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar os métodos moleculares (PCR – *Polymerase Chain Reaction* e DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) utilizando o gene RNAr 16S como marcador molecular em cianobactérias de um sistema de lagoas de estabilização (São Lourenço da Serra – SP).

Objetivos específicos

- Testar protocolos moleculares de extração de DNA de amostras axênicas e ambientais.
- Testar conjunto de iniciadores (*primers*) para cianobactérias, em especial, para *Microcystis* sp em PCR.
- Avaliar a eficiência da técnica de DGGE para as comunidades de cianobactérias em sistemas de lagoas de estabilização.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Sistemas de Lagoas de Estabilização

O tratamento de águas residuárias através de sistemas de lagoas de estabilização é provavelmente o mais antigo meio de tratamento realizado pelo ser humano com este propósito. Participam deste tratamento as comunidades naturais, como as algas, bactérias, fungos, rotíferos e protozoários.

A população de qualquer meio ambiente é controlada pelos fatores físicos, químicos e biológicos. Pelas características inerentes de cada espécie ela irá se adaptar para crescer e executar suas atividades metabólicas. Os fatores físicos importantes que afetam uma população em lagoa de estabilização são temperatura, luz e gravidade específicas. Os químicos estão ligados a nutrição, pH e efeitos tóxicos. Os fatores biológicos, que devem ser considerados, são as inter-relações das espécies (PIPES, JR.; 1961). A remoção de patógenos nas lagoas de oxidação é controlada por uma variedade de fatores, dentre eles temperatura, luz solar, pH, ação dos bacteriófagos, predação por macro-organismos e adsorção (BITTON, 1994).

Segundo SILVA & MARA (1979), podemos definir as lagoas de estabilização como sendo “grandes tanques de pequena profundidade, definidas por diques de terra, e nas quais as águas residuárias brutas são tratadas inteiramente por processos naturais, envolvendo algas e bactérias”.

O tratamento através de lagoas de estabilização tem três principais objetivos (MENDONÇA, 1990):

- Remover a matéria orgânica das águas residuárias que causam a poluição;
- Eliminar os patógenos que representam perigo para a saúde; e
- Utilizar seu efluente para reuso, com outras finalidades, como agricultura, por exemplo.

Vários fatores podem afetar a elaboração de um projeto de lagoas de estabilização, como as características da água residuária e suas flutuações, fatores ambientais, modelos de crescimento algal e suas variações diurna e sazonal, modelos de crescimento de bactérias e suas taxas de decaimento, modelos de transportes hidráulicos, evaporação e infiltração, decantação de sólidos, liquefação, gaseificação, difusão ascendente, acumulação de lodo e transferência de gás na interface (ARCEIVALA, 1986).

A classificação das lagoas de estabilização se dá de acordo com a forma predominante pela qual ocorre a estabilização da matéria orgânica a ser tratada (HESS, 1975a, b, c; ARCEIVALA, 1986; CETESB, 1990; MENDONÇA, 1990, 2000; CURTIS & MARA, 1994; VON SPERLING, 1996; KELLNER & PIRES, 1998). São elas:

- Lagoas Anaeróbias: lagoas de estabilização nas quais ocorre a predominância dos processos de fermentação anaeróbia em uma camada imediatamente abaixo da superfície, onde não há presença de oxigênio dissolvido. Em comparação com as lagoas facultativas ou aeróbias, tem-se uma DBO removida muito maior, em torno de 50 a 80%. A estabilização da matéria orgânica em condições anaeróbias é lenta, devido à baixa taxa de reprodução das bactérias anaeróbias. As lagoas anaeróbias são usualmente profundas, da ordem de 4 a 5 metros. A estabilização anaeróbia da matéria orgânica se desenvolve em duas etapas: a liquefação e formação de ácidos (através das bactérias acidogênicas) e a formação de metano (através das arqueas metanogênicas). As lagoas anaeróbias são dimensionadas para receber cargas orgânicas elevadas, o que impede a existência de oxigênio dissolvido no meio líquido. O tempo de detenção hidráulico nunca é inferior a 3 dias.
- Lagoas Facultativas: lagoas de estabilização onde ocorrem, simultaneamente, processos de fermentação anaeróbia, oxidação aeróbia e reação fotossintética. A uma zona de atividade anaeróbia se sobrepõe uma zona de atividade biológica aeróbia, próxima a superfície. Na zona aeróbia, a matéria orgânica do esgoto se converte em matéria celular, CO₂ e água, pela ação das bactérias, na presença de oxigênio dissolvido. Parte do carbono serve como fonte de energia para os

organismos, e os nutrientes, como fósforo e nitrogênio, formam novas células algais. Estas, ao utilizarem o CO₂ produzido pelas bactérias, ao mesmo tempo, sintetizam a matéria necessária ao seu próprio desenvolvimento e liberam oxigênio quando na presença da energia solar. São do tipo mais usado de lagoas de estabilização. As lagoas facultativas têm profundidades que variam de 1 a 3 metros, com seu tempo de detenção hidráulico próximo a 20 dias. A maioria das lagoas de estabilização que existe no mundo é deste tipo, com variações no grau de aerobicidade e anaerobicidade.

- Lagoas de maturação: lagoas de estabilização usadas como refinamento de tratamento prévio realizado através de lagoas ou de outro processo biológico, onde ocorre uma redução das bactérias, dos sólidos em suspensão e dos nutrientes, como também uma parcela ínfima de DBO, tendo como principal finalidade a redução de coliformes fecais. As lagoas de maturação são mais rasas que as outras lagoas, por este motivo possuem elevado pH e elevada concentração de oxigênio dissolvido. As lagoas de maturação têm profundidades variando de 0,8 a 1,5 metros. Normalmente, considera-se o tempo de detenção hidráulico de 7 dias para seu dimensionamento.
- Lagoas estritamente aeróbias (de alta taxa): lagoas de estabilização onde ocorre um equilíbrio da oxidação e da fotossíntese para garantir condições aeróbias em todo o meio, através da simbiose entre algas e bactérias. As lagoas estritamente aeróbias são raras. Exigem alguma forma de remoção do lodo do fundo, ou de agitação, a fim de mantê-lo em suspensão no meio aeróbio. As lagoas estritamente aeróbias são rasas, variando normalmente de 0,3 a 0,5 metros.
- Lagoas aeradas: lagoas de estabilização providas de equipamentos de aeração, cuja principal finalidade é introduzir oxigênio na massa líquida, substituindo a oxigenação natural através das algas nas outras classes de lagoas. As lagoas aeradas dividem-se em aeróbia com mistura completa, facultativa e com aeração prolongada, tendo profundidades e tempo de detenção hidráulicos variáveis.

Segundo KELLNER & PIRES (1998), alguns autores, como Gloyna e Cubillos, incluem as lagoas aeradas mecanicamente entre as lagoas de estabilização. Mas, conforme se verifica nas definições deste sistema, embora este tipo de lagoa

também promova a estabilização das águas residuárias, ele difere das características básicas das lagoas de estabilização, não reproduzindo os fenômenos observados na natureza.

As lagoas que recebem águas residuárias não tratadas são conhecidas como lagoas de estabilização primárias e aquelas que recebem águas residuárias, primariamente tratadas ou biologicamente tratadas para tratamento posterior são chamadas de lagoas de estabilização secundárias (ARCEIVALA, 1986).

As vantagens e desvantagens do sistema de lagoas de estabilização são citadas abaixo (HESS, 1975a, b, c; SILVA & MARA, 1979; MENDONÇA, 1990; EPA, 1992; CURTIS & MARA, 1994; KELLNER & PIRES, 1998):

Vantagens:

- Podem alcançar qualquer grau de purificação necessário a um baixo custo e com um mínimo de manutenção executada por pessoal não especializado.
- As necessidades de manutenção são mínimas, resumindo-se no corte regular da grama do talude e remoção da espuma da superfície da lagoa.
- A remoção de patógenos é consideravelmente maior do que nos demais processos de tratamento de águas residuárias. Cistos e ovos de parasitas intestinais não são encontrados em efluentes de lagoas de maturação. O meio ambiente de uma lagoa é inóspito ao desenvolvimento de caramujos hospedeiros de vermes parasitos trematóides, como o *Schistosoma* sp. e *Clonorchis sinensis*.
- Mostram-se capazes de suportar bem não só os choques de sobrecargas hidráulicas como das orgânicas. O longo tempo de detenção (20 a 30 dias em lagoas facultativas alimentadas com águas residuárias brutas) assegura a existência de diluição suficiente em relação a curtas sobrecargas.
- Podem tratar uma grande variedade de águas residuárias industriais e agrícolas.
- O alto pH prevalente nas lagoas provoca a precipitação dos metais pesados tóxicos, sob a forma de hidróxidos e a sua remoção, pela acumulação no lodo.
- Permitem que a estrutura de saída da lagoa possa ser projetada de tal modo que o nível da superfície da lagoa possa ser variado; o tempo de detenção e o grau de tratamento podem ser, desta maneira, alterados.

- O método de construção das lagoas se dá de modo que, se no futuro necessitar da área em que as mesmas estão construídas, ela pode ser facilmente recuperada. Tudo de que se necessita é a remoção das estruturas de entrada e saída da lagoa e, caso existam, das placas protetoras ao nível máximo das águas da lagoa e o terreno é, então, nivelado.
- As algas produzidas nas lagoas são fonte potencial de alimentos de alto teor proteico, o que pode ser convenientemente explorado através da criação de peixes.
- Necessitam de pouco ou nenhum componente importado.
- Usam pouca ou nenhuma energia elétrica.
- Disposição requerida do lodo ocorre somente em intervalos de 10 a 20 anos.

Desvantagens:

- Necessitam de áreas muito maiores do que as dos outros processos de tratamento de águas residuárias.
- Uma das principais críticas que se faz em relação às lagoas facultativas é sobre a enorme quantidade de algas presentes nos efluentes de algumas lagoas, dando a estas uma coloração esverdeada.
- Além da possibilidade de se desenvolverem maus odores nas lagoas anaeróbias, elas apresentam outro problema estético que é a formação de espuma na superfície da água.
- Pode ocorrer impacto negativo nas águas subterrâneas se projetos forem instalados de maneira inadequada.

As lagoas de estabilização podem ser constituídas por lagoas facultativas, sistema de lagoas anaeróbias seguidas por lagoas facultativas, lagoas aeradas facultativas e sistema de lagoas aeradas de mistura completa seguidas por lagoas de decantação, conforme Tabela 1 (VON SPERLING, 1996)

Tabela 1 – Descrição sucinta dos principais sistemas de lagoas de estabilização.

Sistemas	Descrição
Lagoas Facultativas	A DBO solúvel e finamente particulada é estabilizada aerobiamente por bactérias dispersas no meio líquido, ao passo que a DBO suspensa tende a sedimentar, sendo estabilizada anaerobiamente por bactérias no fundo da lagoa. O oxigênio requerido pelas bactérias aeróbias é fornecido pelas algas, através da fotossíntese.
Lagoa Anaeróbia – Lagoa Facultativa	A DBO é em torno de 50% estabilizada na lagoa anaeróbia (mais profunda e com menor volume), enquanto a DBO remanescente é removida na lagoa facultativa. O sistema ocupa uma área inferior ao de uma lagoa facultativa única.
Lagoa Aerada Facultativa	Os mecanismos de remoção da DBO são similares aos de uma lagoa facultativa. No entanto, o oxigênio é fornecido por aeradores mecânicos, ao invés de ser através da fotossíntese. Como a lagoa é também facultativa, uma grande parte dos sólidos do esgoto e da biomassa sedimenta, sendo decomposta anaerobiamente No fundo.

(continuação)

Lagoa Aerada de Mistura Completa – Lagoa de Decantação	A energia introduzida por unidade de volume da lagoa é elevada, o que faz com que os sólidos (principalmente a biomassa) permaneçam dispersos no meio líquido, ou em mistura completa. A decorrente maior concentração de bactérias no meio líquido aumenta a eficiência do sistema na remoção da DBO, o que permite que a lagoa tenha um volume inferior ao de uma lagoa aerada facultativa. No entanto, o efluente contém elevados teores de sólidos (bactérias), que necessitam ser removidos antes do lançamento no corpo receptor. A lagoa de decantação a jusante proporciona condições para esta remoção. O lodo da lagoa de decantação deve ser removido em períodos de poucos anos.
Lagoa de Maturação	O objetivo principal da lagoa de maturação é a remoção de patógenos. Nas lagoas de maturação, predominam condições ambientais adversas para os patógenos, como radiação ultra-violeta, elevado pH, elevado OD, temperatura mais baixa que a do corpo humano, falta de nutrientes e predação por outros organismos. As lagoas de maturação constituem um pós-tratamento de processos que objetivem a remoção da DBO, sendo usualmente projetadas como uma série de lagoas ou como uma lagoa única, com divisões por chicanas. A eficiência na remoção de coliformes é bastante elevada.

Fonte: Von Sperling (1996)

As vantagens e desvantagens através de uma análise comparativa dos principais sistemas de lagoas para a remoção da DBO são apresentadas na Tabela 2 (VON SPERLING, 1996).

Tabela 2 - Análise comparativa dos principais sistemas de lagoas para a remoção da DBO. Balanço de vantagens e desvantagens.

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Lagoa Facultativa	<ul style="list-style-type: none"> • Satisfatória eficiência na remoção de DBO • Eficiência na remoção de patógenos • Construção, operação e manutenção simples • Reduzidos custos de implantação e operação • Ausência de equipamentos mecânicos • Requisitos energéticos praticamente nulos • Satisfatória resistência a variações de carga • Remoção de lodo necessária apenas após períodos superiores a 20 anos 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevados requisitos de área • Dificuldade em satisfazer padrões de lançamento bem restritivos • A simplicidade operacional pode trazer o descaso na manutenção (crescimento de vegetação) • Possível necessidade de remoção de algas do efluente para cumprimento de padrões rigorosos • Performance variável com as condições climáticas (temperatura e insolação) • Possibilidade do crescimento de insetos
Sistema de Lagoa Anaeróbia – Lagoa Facultativa	<ul style="list-style-type: none"> • Idem a todos os itens de lagoas facultativas • Requisitos de área inferiores aos das lagoas facultativas únicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Idem a todos os itens de lagoas facultativas • Possibilidade de maus odores na lagoa anaeróbia • Eventual necessidade de elevatórias de recirculação do efluente, para controle de maus odores • Necessidade de um afastamento razoável às residências circunvizinhas

(continuação)

Lagoa Aerada Facultativa	<ul style="list-style-type: none"> • Construção, operação e manutenção relativamente simples • Requisitos de área inferiores aos dos sistemas de lagoas facultativas e anaeróbio-facultativas • Maior independência das condições climáticas que os sistemas de lagoas facultativas e anaeróbio-facultativas • Eficiência na remoção da DBO ligeiramente superior à das lagoas facultativas • Satisfatória resistência a variações de carga • Reduzidas possibilidades de maus odores 	<ul style="list-style-type: none"> • Introdução de equipamentos • Ligeiro aumento no nível de sofisticação • Requisitos de área ainda relativamente elevados • Requisitos de energia relativamente elevados
Sistema de Lagoa Aerada de Mistura Completa – Lagoa de Decantação	<ul style="list-style-type: none"> • Idem a todos os itens de lagoas aeradas facultativas • Menores requisitos de área de todos os sistemas de lagoas 	<ul style="list-style-type: none"> • Idem a todos os itens de lagoas aeradas facultativas (exceção: requisitos de área) • Preenchimento rápido da lagoa de decantação com o lodo (2 a 5 anos) • Necessidade de remoção contínua ou periódica (2 a 5 anos) do lodo

Fonte: Von Sperling (1996)

AZOV & SHELEF (1987) estudaram os efeitos de pH no desempenho de lagoas de estabilização de alta taxa. Experimentos em laboratório indicaram queda na fotossíntese algal em valores elevados de pH quando a concentração de carbono inorgânico total dissolvido no meio foi de 40 mg/l. O pH afetou o crescimento algal em determinadas concentrações quando na forma livre de CO₂. Em várias espécies de algas ocorreu o fenômeno de toxicidade de amônia, quando sua concentração total (NH₄⁺ + NH₃) foi de 5mM, ocorrendo um efeito no pH e respectivamente na fotossíntese algal, mas quando na forma de amônia livre (NH₃) não ocorreram efeitos no pH, mesmo em diferentes concentrações. A grande atividade fotossintética das algas em sistemas de lagoas de alta taxa aumenta os valores de pH que devem afetar

a eficiência destas lagoas, podendo ocorrer uma limitação de carbono em tempos de detenção longos quando o suprimento deste for baixo. A amônia, em altas concentrações em certas águas residuárias, deve causar inibição da fotossíntese algal em pH elevado.

KAYOMBO *et al.* (2000) modelaram variação diurna do oxigênio dissolvido em lagoas de estabilização levando-se em conta a combinação da influência da luz, temperatura e dióxido de carbono, concluindo que a correlação entre os dados observados e os resultados do modelo indicaram que a suposição da formulação matemática é válida para descrever a produção e utilização de oxigênio dissolvido em lagoas.

É somente com um conhecimento total da biologia de lagoas de estabilização, isto é, das várias interações microbianas que ocorrem e da relação entre parâmetros físico-químicos e suas atividades, que será possível (PEARSON, 1996): elaborar um projeto com melhor custo efetivo e uso menor de área; entender melhor as causas de falhas nas lagoas e providenciar solução rápida e efetiva; tornar confiáveis as predições acerca da quantidade de carga orgânica adicional que pode ser despejada em um complexo de lagoas existentes sem risco de falha; reconhecer sintomas simples antes da falha do sistema; e expandir o uso de lagoas para tratamento de efluentes especiais industriais em um futuro próximo.

No Brasil, a primeira lagoa de estabilização foi construída em São José dos Campos, sendo composta por dois sistemas: um exclusivamente aeróbio (sistema americano) e outro com uma lagoa anaeróbia seguida por uma lagoa aeróbia (sistema australiano), entrando em operação em dezembro de 1960. O autor concluiu que esses sistemas de lagoas para tratamento de águas residuárias poderiam ser utilizados também no Brasil, pois os mesmos apresentaram bons resultados para os efluentes finais (VICTORETTI, 1964).

Atualmente, no Estado de São Paulo, a SABESP opera setenta estações de tratamento de águas residuárias compostas por sistemas de lagoas de estabilização (POLISEL, 2001). Segundo KIVAISI (2001), os sistemas mais amplamente utilizados em países em desenvolvimento são as lagoas de estabilização, pelo seu custo baixo de instalação e de manutenção e condições climáticas favoráveis para as lagoas em áreas tropicais.

Dados retirados dos “Relatórios Zero”, efetuados pelos comitês de bacias hidrográficas do Estado de São Paulo (SIGRH, 2002), sobre os principais tipos de tratamento de águas residuárias que são empregados no Estado são mostrados na Figura 1. Como cada Comitê desenvolve seu relatório de maneira autônoma, os dados contidos nos mesmos não são padronizados.

Figura 1 – Principais tipos de tratamentos de águas residuárias realizados no Estado de São Paulo. Fonte: Sistema de Informações de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SIGRH, 2002).

Os dados acima apresentados na Figura 1 mostram que o tratamento mais utilizado no Estado de São Paulo é o de lagoas facultativas.

As porcentagens que cada município do Estado de São Paulo tratou suas águas residuárias com sistemas de lagoas de estabilização nos anos de 1992, 1995 e 1999 estão no Apêndice I (SEADE, 2002).

Nos Estados Unidos da América do Norte, as lagoas facultativas são a forma mais freqüentemente utilizada para tratamento de águas residuárias naquele país, possuindo acima de 5.000 sistemas em operação no ano de 1992 (EPA, 1992).

O tratamento de sistema de lagoas de estabilização facultativo é esquematizado segundo VON SPERLING (1996) na Figura 2.

Figura 2- Esquema simplificado de uma lagoa facultativa. Fonte: Modificado de VON SPERLING (1996).

PEARSON *et al.* (1987a) publicaram procedimento para se avaliar o desempenho de uma lagoa de estabilização. Considera-se a descrição física completa e tipos de amostragem, indicando que a maioria dos padrões deve ser medida em amostras compostas dentro de 24 horas. As amostras devem ser preservadas e armazenadas a uma temperatura de 4°C por no máximo 30 horas (dependendo da análise, por exemplo, para coliformes fecais, o armazenamento é no máximo de 6 horas). A frequência de amostragem deve ser realizada nas estações mais favoráveis e menos favoráveis, isto é, nos meses mais quentes e nos mais frios, semanalmente, durante 5 semanas em cada estação selecionada para amostragem. Medidas de escoamento (tempo de retenção médio hidráulico e cargas orgânicas) devem ser mensuradas. Também devem ser analisadas a temperatura média da lagoa e profundidade do lodo. Algumas considerações especiais, como produção de sulfato e sulfeto e reuso do efluente devem ser levadas em conta.

Novamente PEARSON *et al.* (1987b) comentaram sobre a amostragem em coluna d'água como método rápido e eficiente para determinar a qualidade do efluente e o desempenho das lagoas de estabilização, levando-se em conta que a distribuição vertical das algas na coluna d'água variam com a carga orgânica e

também com a hora do dia. Este método consiste na realização de uma série de amostragens diurnas do efluente e o total da coluna d'água nas lagoas facultativas e de maturação com análises de DQO, sólidos suspensos, coliformes fecais, clorofila e amônia.

Em Israel, estudos com lagoas de estabilização visam não só o tratamento de águas residuárias, mas também a produção algal, a qual é utilizada para vários propósitos, como alimento rico em proteínas para animais, vitaminas, matéria bruta para a extração de pigmentos naturais, dentre outros (SHELEF & AVOZ, 1987).

Quando da construção de um sistema de lagoas de estabilização deve-se levar em conta o sentido predominante dos ventos e localizá-las a pelo menos 500 metros de distância de residências, pois se não forem bem dimensionadas poderão apresentar problemas de odores (CAMPOS *et al.*, 2000).

Os sistemas de lagoas de estabilização são bastante empregados em locais que possuam clima tropical, como o Brasil, com a média da temperatura e da radiação solar favorável para que ocorra a degradação da matéria orgânica proveniente das águas residuárias nessas lagoas. Para países em desenvolvimento, também é favorável sua utilização, por não empregar praticamente nenhum equipamento e tecnologia patenteada de custo elevado. O maior problema que este tipo de sistema apresenta no Brasil é que, por sua facilidade de operação, não ocorre o cuidado necessário em sua manutenção, com o tratamento primário não sendo utilizado de maneira a retirar os sólidos grosseiros, ocorrendo o aparecimento de vegetação e a possível proliferação de insetos.

3.2 Comunidade Algal nas Lagoas de Estabilização

As lagoas de oxidação ou de estabilização são locais rasos, desenhados para permitir o crescimento algáceo no efluente dos esgotos (PELCZAR *et al.*, 1981).

Para termos uma noção da dinâmica de um sistema de lagoas de estabilização, necessitamos de um conhecimento sobre as espécies, ou, pelo menos, os gêneros que estão atuando nestes locais, na estabilização das cargas orgânicas das águas residuárias.

O número de gêneros de algas encontrados nas lagoas de estabilização é pequeno, de maneira geral, pertencendo às classes *Cyanophyceae* (cianobactérias), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Euglenophyceae* (os flagelados pigmentados) e *Bacillariophyceae* (as diatomáceas) DINGES* *apud* KÖNIG (2000).

Segundo GLOYNA (1973), entre as algas mais comumente encontradas em sistemas de lagoas de estabilização estão o gênero *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Euglena* sp., *Oscillatoria* sp. e *Anabaena* sp..

De acordo com BRANCO (1975), as cianobactérias não são muito frequentes em lagoas de estabilização, porém, quando aparecem, tornam-se muito abundantes, como tem ocorrido nas lagoas do Estado de São Paulo com o gênero *Microcystis* sp.. As lagoas no Estado de São Paulo têm apresentado, como predominantes, os seguintes gêneros de algas: *Microcystis* sp., *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp., *Golenkinia* sp., *Micrastinium* sp., *Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp., *Euglena* sp. e *Pyrobotrys* sp..

As clorofíceas conferem à lagoa cor esverdeada predominante. Os principais gêneros deste grupo são as *Chlamydomonas* sp. e *Chlorella* sp.. O primeiro gênero das clorofíceas e também a *Euglena* sp. são normalmente os primeiros a aparecerem na lagoa, tendendo a ser predominantes nos períodos frios. Entre os principais gêneros de cianobactérias presentes nestes sistemas podemos citar a *Oscillatoria* sp., *Phormidium* sp., *Microcystis* sp. e *Anabaena* sp. (VON SPERLING, 1996).

A especialização algal pode ser usada como indicador do tipo de lagoa e da carga superficial de DBO. Em geral, gêneros de algas flagelados, como *Euglena* sp., *Chlamydomonas* sp., *Phacus* sp., *Pyrobotrys* sp. predominam nas lagoas facultativas. Os gêneros de clorofíceas sem mobilidade, como *Microactinium* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. e diatomáceas são dominantes nas lagoas de maturação. Os gêneros de cianobactéria *Oscillatoria* sp. e *Anabaena* sp. se encontram presentes tanto nas lagoas facultativas como nas de maturação. O número de espécies presentes aumenta com o aumento da remoção de matéria orgânica geralmente, existindo somente duas ou três espécies em lagoas facultativas de altas cargas, isto é, acima de 400 kg DBO₅/ha/d em climas quentes, enquanto que acima de quinze espécies podem estar presentes no final de uma lagoa de maturação em série com uma carga superficial de

* DINGES, R. (1962). *Natural Systems for Water Pollution Control*. Van Nostrand Reinhold Company.

somente 20-50 kg DBO₅/ha/d. A população de algas em lagoas de maturação é mais diversa porque a penetração da luz através da coluna d'água destas lagoas é bem melhor do que a de uma lagoa facultativa turbida. No primeiro caso, as algas são mais bem distribuídas ao longo da profundidade da lagoa, a qual é usualmente aeróbia, pelo menos nas horas de sol (PEARSON, 1996).

As clorofíceas indicam boa condição de funcionamento das lagoas. Já as cianobactérias predominam, em geral, em águas que apresentam temperaturas elevadas e onde ocorre grandes concentrações de nitrogênio e fósforo.

A produção ótima de oxigênio para algumas espécies de algas nas lagoas de estabilização é obtida entre 20 e 25°C, com valores superior e inferior, respectivamente, de 37 e 4°C. A partir de temperaturas próximas a 35°C, a atividade fotossintética das algas decresce. As *Chlorophyceae* tendem a diminuir ou desaparecer e as *Euglenophyceae* passam a predominar. Acima dos 35°C, prevalecem as *Cyanophyceae* e particularmente as *Oscillatoria* sp. (MENDONÇA, 2000).

PALMER[†] apud VICTORETTI (1964) catalogou as espécies encontradas em todo o mundo no tocante àquelas que têm como habitat as águas poluídas, compilando acima de 500 espécies de algas conhecidas, selecionando 47 como sendo das mais importantes que proliferam em águas com alta concentração de resíduos orgânicos. De acordo com atualização das espécies segundo ROUND (1983), são 15 as espécies citadas de cianobactérias: *Agmenellum quadriduplicatum*, *Anabaena constricta*, *Anacystis montana* (*Microcystis*), *Arthrospira jenneri*, *Lyngbya digueti*, *Oscillatoria chalybea*, *Oscillatoria chlorina*, *Oscillatoria formosa*, *Oscillatoria lauterbornii*, *Oscillatoria limosa*, *Oscillatoria princeps*, *Oscillatoria pudrita*, *Oscillatoria tenuis*, *Phormidium autumnale* e *Phormidium uncinatum*.

Os fatores que determinam as populações algais nas lagoas de estabilização e a influência das algas na eficiência das lagoas foram analisados em experimentos laboratoriais com as espécies *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Euglena* sp. e *Chlamydomonas* sp.. Como resultado, a presença de floração de *Chlamydomonas* sp. em lagoas anaeróbias não afeta a eficiência do sistema e seu súbito desaparecimento

[†] PALMER, C.M. (1959). *Algae in water supplies*. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Robert Taft Sanitary Engineering Center.

pode ser indicativo do aumento da concentração de sulfeto e, como consequência, podem ocorrer problemas de odores. *Chlamydomonas* sp. nas lagoas facultativas devem indicar sobrecarga de matéria orgânica, reduzindo a concentração de oxigênio dissolvido e a eficiência da lagoa. A redução de penetração da luz beneficia a *Euglena* sp.. Sensibilidade a amônia e sulfeto deve causar a substituição da *Euglena* sp. por formas mais tolerantes, como a *Pyrobotrys* sp. ou mesmo a *Chlorella* sp., embora com pequena concentração de biomassa (pela limitação de luz). A geração de sulfetos inibe seriamente a fotossíntese algal e a produção de oxigênio e é, provavelmente, o maior fator tóxico que afeta a eficiência de lagoas facultativas, com aumentos de cargas orgânicas. As espécies flageladas dominantes em lagoas facultativas são mais sensíveis à amônia do que as não flageladas. É necessário reduzir a carga orgânica, não somente para reduzir a concentração de amônia, mas também pela turbidez, permitindo que as espécies tolerantes à amônia, como a *Chlorella* sp., tenham maior disponibilidade de luz para que possam se desenvolver (PEARSON *et. al.*, 1987c).

KÖNIG *et. al.* (1987) estudaram a toxicidade da amônia no crescimento algal em lagoas de estabilização, demonstrando, conforme comentado acima, a maior tolerância da *Chlorella* sp. à amônia do que a *Euglena* sp..

Segundo ODUM (1977), existem vantagens em ocorrer diversidade de espécies. Quanto mais espécies presentes, tanto maiores as possibilidades de adaptação às condições de mudanças, sejam mudanças em curto ou em longo período, climáticas ou outras quaisquer.

A fórmula empírica da constituição química das algas pode ser expressa como $C_{106}H_{180}O_{45}N_{16}P_1$ ou $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P_1$ e a proporção relativa de C:N:P é em torno de 40:7:1, mas esta proporção nas águas residuárias é de somente 11,4:3,7:1. Desta maneira, o carbono nas águas residuárias é limitante para as algas ou, em outras palavras, quando a DBO é totalmente removida, algum nitrogênio e fósforo ainda permanecem no sistema (ARCEIVALA, 1986). Portanto, caso não tenha tratamento terciário posterior, estes compostos serão lançados nos recursos hídricos.

As lagoas de estabilização devem conter nutrientes para o desenvolvimento dos microrganismos ali presentes. As cianobactérias não sedimentam, mesmo depois de mortas, dificultando, assim, a passagem da luz e interferindo na fotossíntese

realizada pelos outros grupos de algas. Ocorre, desta maneira, a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e um conseqüente abaixamento do valor do pH (KELLNER & PIRES, 1998).

Estudo realizado em Portugal por VASCONCELOS & PEREIRA (2000) em sistema de lagoas de estabilização, com amostragem na lagoa facultativa e de maturação, demonstrou que as cianobactérias presentes neste produziram toxinas. Cianobactérias potencialmente tóxicas são comuns, sendo um sinal claro de eutrofização. As toxinas das cianobactérias podem afetar a vida aquática e terrestre, incluindo os seres humanos se houver contato, ingestão ou uso de água contaminada com cianotoxinas. Os autores observaram que as principais espécies dominantes foram similares nas duas lagoas: *Microcystis aeruginosa* e *Phormidium mougeotti*. O resultado de toxinas do fluxo de saída da lagoa de maturação foi de 3,4 µg MCYST-LR equiv/L e a carga recebida pelo rio Lambo (receptor desse sistema de lagoas) foi de 4,7 g MCYST-LR equiv/dia, levando os autores a concluírem que as concentrações registradas durante este estudo contribuíram para a contaminação da água que foi utilizada para consumo. Provavelmente estas toxinas acumulam-se nos organismos aquáticos e podem ser transferidas ao longo da cadeia trófica.

As cianobactérias lançadas nos recursos hídricos provenientes de lagoas de estabilização afetam a qualidade da água de abastecimento por produzirem odor e sabor (*Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*), por terem influência significativa na coagulação química, decantação e filtração (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcystis*) e algumas serem tóxicas ao ser humano (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Lyngbya*) ou por produzirem subprodutos metabólicos que, na presença de cloro, formam compostos cancerígenos. Problemas adicionais causados pelas cianobactérias na água de abastecimento são: produção de lodo, coloração na água, persistência no sistema de distribuição, corrosão do concreto, corrosão do aço e diminuição da dureza da água (DI BERNARDO, 1995).

É calculado que um total de 25 espécies de cianobactérias sejam produtoras de toxinas. Entre as espécies de água doce destacam-se os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis* e *Oscillatoria*. Estas toxinas podem ter efeito bactericida, contribuindo para a eliminação de patógenos

durante o tempo em que as águas residuárias permanecem dentro das lagoas de estabilização (CEBALLOS, 2000).

A cor das algas das lagoas facultativas é verde escuro, embora as lagoas possam aparecer vermelhas ou rosas se ocorrer sobrecarga orgânica, em função da presença de bactérias anaeróbias púrpuras oxidantes de sulfeto (PEARSON, 1996).

3.3 As Cianobactérias

As cianobactérias, classificadas como oxigênicas fototróficas, contêm clorofila *a* e pigmentos acessórios e estão entre as formas de vida mais antigas na terra. Elas podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosas, com tamanhos variando de menos de 2 µm a 40 µm de diâmetro. Elas podem viver em simbiose com plantas e fungos, nos bentos ou na coluna d'água. Cianobactérias possuem uma distribuição cosmopolita e são comuns em todos os tipos de habitats, incluindo os lagos da Antártica, fontes termais, desertos áridos e solos ácidos tropicais (KAEBERNICK & NEILAN, 2001).

Formam um dos onze maiores filos eubacteria, de acordo com análises convincentes de seqüências de RNAr 16S, RNAr 23S e seqüências de proteínas. Vários nomes já foram usados para estes organismos, como cianobactéria, cianofícea, cianófitas e algas azuis, pois até a microscopia eletrônica e análises bioquímicas mostrarem convincentemente que as cianobactérias são procariontes, estes organismos eram geralmente considerados como algas e foram estudados por botânicos e ficologistas (WILMOTTE, 1994).

O sistema taxonômico, o qual se desenvolveu durante o século 19, foi baseado praticamente inteiro na morfologia e no Código de Nomenclatura de Botânica. Ocorreram publicações no período de 1886-1892, sendo estas consideradas como o ponto de partida de publicações válidas de nomes de várias formas filamentosas. A proposta realizada por Stanier em 1978 para que as cianobactérias fossem colocadas sob as regras do Código de Nomenclaturas Internacional de Bactérias teve a intenção de remover estes organismos da jurisdição do Código de Nomenclaturas Internacional de Botânica, mas estes táxon continua

sendo descrito sob ambas as nomenclaturas (WHITTON & POTTS, 2000). Gera-se, desta maneira, sobreposição de nomenclatura para indivíduos de mesma espécie.

Cronologicamente, a abordagem botânica foi a primeira a ser colocada em prática para a taxonomia das cianobactérias. Como para as outras algas, a taxonomia clássica de cianobactérias é baseada em aspectos morfológicos e sua nomenclatura é regulada pelo Código de Botânica, isto é, cada espécie deve ser descrita em latim e sua referência é uma espécie de herbário. Mas, nos anos 70, Stanier e colegas argumentaram que, se as cianobactérias eram bactérias, sua taxonomia deveria ser tratada de acordo com a nomenclatura do Código Bacteriológico, com suas referências sendo culturas puras ao invés de um herbário. Stanier e colaboradores foram pioneiros no uso de características fisiológicas e genotípicas em culturas axênicas, como composição de bases de DNA e tamanho do genoma (WILMOTTE, 1994).

As cianobactérias apresentam diversidade morfológica considerável. Podem ser unicelulares ou filamentosas e podem ocorrer sozinhas ou em grupos de colônias. Os braços de filamentos podem ser verdadeiros ou falsos. Braços falsos ocorrem quando a divisão de um filamento com bainha forma dois filamentos separados de bainhas e um destes cresce separadamente do outro. Braços verdadeiros ocorrem quando células em um filamento possuem o potencial para se dividirem em mais de um plano. A manutenção de estrutura de colônia em várias destas formas é conseguida pela presença de exopolissacarídeos, tais como mucilagem e/ou bainhas firmes. A presença ou ausência de heterocito é um importante aspecto para separação de gêneros, mas vacúolos gasosos, estruturas que permitem a flutuação, são encontradas em espécies de vários gêneros diferentes (WHITTON & POTTS, 2000).

Diferem na composição de ácidos graxos de todos os outros procariontes, apresentando ácidos graxos não saturados com duas ou mais bandas duplas, enquanto as outras bactérias apresentam quase que exclusivamente ácidos graxos saturados e monosaturados. A fina estrutura da parede celular é similar à das bactérias gram-negativas e peptídio-glicano pode ser detectado em suas paredes. Possuem somente uma forma de clorofila, a clorofila *a*, e todas possuem pigmentos de biliproteínas, as ficobilinas, as quais funcionam como pigmentos acessórios na fotossíntese, como a

ficocianina, de cor azul, responsável pela coloração azulada destas bactérias. A nutrição das cianobactérias é simples, não requerendo vitaminas, e nitrato e amônia sendo utilizados como fonte de carbono (BROCK & MADIGAN, 1988).

Podem realizar fotossíntese oxigênica e fixação de nitrogênio atmosférico através dos heterocistos, tornando, desta maneira, seus requerimentos para crescimento muito simples. Estes organismos são excelentes candidatos para a fixação de nitrogênio, metabólitos secundários e biomassa. Outras particularidades fisiológicas importantes incluem sua resistência a vários metais pesados em ambientes poluídos e sua habilidade de produção de toxinas e vacúolos gasosos (FIORE *et. al.*, 2000).

Parece que a maioria, se não todas, as cianobactérias possuem cópias múltiplas de seus genomas. Mesmo a menor célula e morfologia simples, como a *Synechocystis*, deve conter seis “cromossomas” idênticos. É desconhecido o quanto a característica de tamanhos grandes de genoma ou a maior complexidade morfológica das cianobactérias reflete um grande aumento de informações ou simplesmente um aumento no grau de poliploidia (WHITTON & POTTS, 2000).

A composição de bases de DNA de uma variedade de cianobactérias foi determinada. As formas unicelulares variam de 35 a 71% de GC, uma faixa tão grande que sugere que este grupo contém vários membros com pouca relação entre si. Por outro lado, os valores para as formas heterocísticas variam muito menos, de 39 a 47% de CG (BROCK & MADIGAN, 1988).

Segundo LYRA *et. al.* (2001), cepas de cianobactérias potencialmente tóxicas e não tóxicas foram estudadas para os gêneros *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Nostoc* sp., *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp. (*Oscillatoria agardhii*), *Oscillatoria* sp. e *Synechococcus* sp. através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dos genes amplificados por PCR de RNAr 16S e de seqüenciamento dos genes RNAr 16S. As relações de similaridade baseadas nas seqüências estão distribuídas, conforme Figura 3, com grande similaridade entre *Anabaena* e *Aphanizomenon* (99,9 – 100%), *Microcystis* potencialmente tóxica e não tóxica (94,2 – 99,9%) e *Planktothrix* potencialmente tóxica e não tóxica (99,3 – 100%).

Figura 3 – Dendrograma baseado em RFLP de genes de cianobactérias RNAr 16S.

Fonte: LYRA *et al.* (2001).

Na classificação do Manual Sistemático de Bacteriologia *Bergey*, no Volume II, Seção 19, temos as Bactérias Oxigênicas Fototróficas (BROCK & MADIGAN, 1988), conforme a seguir:

A: Cianobactérias

Família I: Chroococcaceae

Família II: Pleurocapsaceae

Família III: Oscillatoriaceae

Gênero I: *Spirulina*

Gênero II: *Athrospira*

Gênero III: *Oscillatoria*

Gênero IV: *Lyngbya*

Gênero V: *Pseudoanabaena*

Gênero VI: *Starria*

Família IV: Nostocaceae

Gênero I: *Anabaena*

Gênero II: *Aphanizomenon*

Gênero III: *Nodularia*

Gênero IV: *Cylindrospermum*

Gênero V: *Nostoc*

Gênero VI: *Scytonema*

Gênero VII: *Calothrix*

Família V: Stigonemataceae

Gênero I: *Chlorogloeopsis*

Gênero II: *Fischerella*

Gênero III: *Geitleria*

B: Ordem: Prochlorales

Família: Prochloraceae

Gênero: *Prochloron*

Segundo KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1999), na Ordem Chroococcales, temos a Família Microcystaceae Elenkin 1993, com o gênero *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907, com algumas espécies, como *Microcystis natans* Lemmermann ex Skuja 1934, *Microcystis firma* (Kützing) Schmidle 1902, *Microcystis ichthyoblabe* Kützing 1843, *Microcystis smithii* Komárek et Anagnostidis 1995, *Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner 1898, *Microcystis botrys* Teiling 1942, *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère 1974, *Microcystis viridis* (A. Braun in Rabenhorst) Lemmermann 1903, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846, *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondratieva 1968, estas sendo citadas como encontradas na Europa Central.

Segue abaixo a descrição, segundo estes mesmos autores (ob. cit.), de duas destas espécies em função da sua importância nos sistemas de lagoas de estabilização:

- *Microcystis flos-aquae*: formam colônias microscópicas, raramente macroscópicas, irregulares, compactas, mais ou menos esféricas ou irregulares

nos contornos, não lobuladas, com densidade grande de células agregadas, somente raramente com buracos indistintos em colônias antigas, o envoltório de mucilagem não excede a margem do agrupamento de células (ou no máximo em 1 μm), fina, hialina, coloridas. Apresentam células esféricas, com aerótopos (vacúolos gasosos). Não apresentam neurotoxinas, sendo sua ocorrência em águas doces, no plâncton, usualmente junto com outras algas planctônicas e cianobactérias, algumas vezes parte dos florescimentos de cianobactérias, em corpos de água mesotróficos e levemente eutróficos, cosmopolita.

- *Microcystis aeruginosa*: forma colônias mucilaginosas, microscópicas, mais ou menos esféricas, lenticular ou tenuamente alongada, depois macroscópica, irregular, lobulada, distintamente alongada, usualmente alongada, usualmente reticulada com buracos distintos, ou composta de subcolônias, com contornos irregulares e com um grande número de arranjos irregulares e mais ou menos com as células densamente empacotadas. Mucilagem colorida, estruturadas, algumas vezes formando uma margem distinta ao redor das células, mas não muito larga (usualmente de 5-8 μm). Células esféricas, algumas vezes tenuamente alongadas antes da divisão, fracamente azuladas, com vários aerótopos. Espécie bastante polimórfica, ocorrendo em numerosas modificações e mudanças sazonais, apresentando populações e cepas tóxicas. Ocorre em águas doces e salgadas, planctônica em águas eutrofizadas, algumas vezes formando grandes florações, cosmopolita com exceção de regiões polar e subpolar.

Algumas cianobactérias tiveram seus mapas genéticos construídos, como é o caso da cepa unicelular de *Synechocystis* sp. PCC6803 (Pasteur Culture Collection) (KOTANI *et. al.*, 1994, 1995) e a *Anabaena* sp. PCC 7120 (KANEKO, 2001a, 2001b), dentre outros estudos já realizados.

Nas bactérias, existem várias cópias dos genes RNAr espalhadas no genoma e organizadas em operons, isto é, um conjunto de genes estruturais mais suas próprias seqüências regulatórias. Cada operon contém, pelo menos, uma cópia de cada um dos três diferentes genes de RNAr, na ordem 16S, 23S e 5S e um ou mais genes de RNAt (RODRIGUES, 1996), sendo que amplificações e seqüenciamentos de RNAr 16S e 23S são utilizados nas técnicas moleculares para estudos de filogenia, de diversidade molecular e de mapeamento genético.

3.4 Avaliação da Comunidade de Cianobactérias por Métodos Moleculares

Os métodos moleculares nesta revisão de literatura abordarão somente os artigos publicados que se utilizaram de PCR e/ou DGGE e suas aplicações, pois, várias foram as técnicas utilizadas em cianobactérias de culturas ou meio ambientes naturais, como hibridização de DNA-DNA, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), PC-IGS (*Phycocyanin Intergenic Spacer*), gene conservado *rbcL*, STRR (*Short Tandemly Repeated Repetitive Sequences*), dentre outras que não são objeto deste estudo.

Os dados provenientes das análises de seqüências de genes de RNA ribossômicos (RNAr) de vários organismos mostram que o senso comum é um guia falho para a compreensão das relações de parentesco entre organismos. O RNAr 16S é popular entre os especialistas em sistemática molecular, porque essa classe de RNA é encontrada em todos os organismos e as moléculas são suficientemente longas – cerca de 1660 nucleotídeos – para permitir comparações precisas interespecies (WATSON *et.al.*, 1997).

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

De acordo com MUYZER & SMALLA (1998), a aplicação de técnicas de biologia molecular para detectar e identificar microrganismos através de RNAr 16S ou seus genes de codificação é atualmente a mais utilizada para explorar a diversidade microbiana e para analisar a estrutura da comunidade. Os resultados destes estudos têm mostrado a enorme diversidade microbiana e, ao mesmo tempo, as limitações das técnicas de cultura tradicional para obter dados de diversidade.

Nos últimos 10 anos, várias técnicas moleculares foram desenvolvidas no intuito de se estudarem amostras naturais. Estas técnicas podem ajudar a identificar microrganismos sem o isolamento em laboratório e têm revelado a extensão enorme da diversidade microbiana (CASAMAYOR *et al.*, 2000).

Métodos baseados na filogenia molecular como um meio de avaliar a diversidade e distribuição dos procariontes contam com informações sobre sequência de genes que são universalmente conservados, ainda suficientemente diferentes para refletirem as relações evolutivas entre os procariontes. As sequências de nucleotídeos de RNAr têm sido usadas para desenvolver grupos específicos de sondas de oligonucleotídeos (ØVREÅS *et al.*, 1997).

O uso de abordagens moleculares em ecologia microbiana tem revelado enorme diversidade procariótica na qual somente pequena fração tinha sido descoberta previamente por técnicas tradicionais de enriquecimento de culturas. Frequentemente, estes métodos moleculares incluem análises comparativas de segmentos de DNAr 16S amplificados por PCR pelo uso de iniciadores atingindo as sequências conservadas. Tais usos de PCR na análise da diversidade da comunidade são baseados na suposição de que a amplificação por PCR das sequências homólogas, mas não idênticas de DNAr, ocorrem com eficiência. No entanto, alguns artigos sugerem que esta suposição não é sempre cumprida (HANSEN *et al.*, 1998).

Técnicas de impressão digital genética fornecem um padrão ou perfil da diversidade genética da comunidade microbiana. Recentemente, outra técnica genética de impressão digital, a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos de DNA ribossômicos amplificados por PCR, tem sido introduzida na ecologia microbiana (MUYZER & SMALLA, 1998).

A técnica de DGGE tem sido extremamente útil em Ecologia Molecular Microbiana (MYERS *et al.* 1986; LESSA, 1993; MUYZER & SMALLA, 1998; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 1999), tendo inclusive já sido utilizada em biofilmes e lodos ativados de tratamento de águas residuárias (MUYZER *et al.* 1993; CURTIS & CRAINE, 1998; SANTEGOEDS *et al.* 1998; NIELSEN *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000).

Sistemas de classificação para as cianobactérias confiam primariamente em características morfológicas das células e colônias e não necessariamente conduzem à identificação de taxa coerente filogeneticamente. Em todos os níveis taxonômicos sobre espécies, a análise de sequência de genes que codificam para a pequena subunidade ribossômica RNA (RNAr 16S) é, sem dúvida, a mais promissora abordagem para a classificação filogenética de cianobactérias. A análise comparativa

de seqüências de gene RNAr 16S mostra um novo método para investigar a discrepância entre cepas de coleções e comunidades naturais. A obtenção de seqüências de genes de RNAr 16S é independente de cultivos ou condições de crescimento e pode ser recuperada por PCR de pequenas quantidades de DNA extraídos em culturas de laboratórios ou meio ambiente natural (NÜBEL et al, 1997).

NEILAN *et al.* (1994) realizaram uma taxonomia molecular para as cianobactérias formadoras de florações do gênero *Microcystis* e *Anabaena* através de regiões do gene RNA ribossômico 16S. Foram utilizadas culturas de coleções e cepas isoladas do meio ambiente. Os autores optaram pelo gene RNAr 16S, pois, este não é transferido entre espécies. Descrevem um método para seqüenciamento direto dos genes de cianobactérias e concluem que todos os florações de cianobactérias isolados de águas doces são compatíveis com os iniciadores de PCR para regiões conservadas do gene de RNAr 16S.

NEILAN (1996) revisou os protocolos existentes em biologia molecular e os utilizou para detecção e identificação de taxa de cianobactérias formadoras de florações. A análise por PCR foi também comparada com critérios morfológicos.

NÜBEL *et al.* (1997) desenvolveram e testaram conjuntos de iniciadores para amplificações específicas de segmentos de gene RNAr 16S de cianobactérias por PCR. Estes autores (op. cit.) demonstraram o uso específico do PCR em combinação com DGGE para visualizar a diversidade de microrganismos fototróficos em culturas, líquens e complexas comunidades microbianas.

NEILAN *et al.* (1997) analisaram a estrutura primária de genes RNAr 16S de 10 cepas de *Microcystis* sp. para, através das seqüências obtidas, inferir a relação evolucionária de cepas potencialmente tóxicas e não-tóxicas. Estes pesquisadores propuseram, pelos resultados obtidos, mudanças na classificação das cinco espécies do gênero *Microcystis* sp. estudadas.

BELTRAN & NEILAN (2000) estudaram florações de *Anabaena circinalis* pelos problemas causados por neurotoxinas produzidas por esta cianobactéria. Apesar de existir uma segregação na produção de neurotoxinas por esta espécie, sendo as cepas européia e americanas diferentes das australianas, a análise dos genes RNAr 16S demonstrou coerência filogenética neste grupo.

SAKER & NEILAN (2001) investigaram o potencial tóxico da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* através de análises de amplificação por PCR do RNAr 16S e filogenética. Seus dados demonstraram similaridade genética bastante forte entre as sete cepas isoladas neste estudo.

MOFFITT *et al.* (2001) analisaram vinte e uma cepas da cianobactéria filamentosa formadora de florações da ordem *Nostocales*, *Nodularia*, por seqüências da região DNAr 16S. Através de alinhamentos das seqüências de DNAr 16S de espécies potencialmente tóxicas e não-tóxicas desenvolveram iniciadores específicos para esta espécie para serem utilizados no PCR.

Estudos realizados com comunidades microbianas de fontes termais elevadas utilizando PCR e DGGE (FERRIS *et al.* 1996; SANTEGOEDS *et al.*; 1996; FERRIS *et al.*, 1997; FERRIS & WARD, 1997; WARD *et al.*, 1998; NÜBEL *et al.*, 1999), observaram que na comunidade de microrganismos fototróficos estudados foram encontradas cianobactérias.

Os métodos moleculares estão sendo cada vez mais utilizados como ferramenta útil para respostas de comunidades em coletas realizadas no meio ambiente, sem a necessidade de isolamento e realização de culturas dos microrganismos em laboratório. Desta maneira, fornecem informações para um melhor entendimento da dinâmica de comunidades através de uma visão molecular e não somente da taxonomia tradicional.

Várias espécies de bactérias não são passíveis de serem cultivadas em laboratório, desta maneira sua diversidade somente é conhecida através de ferramentas como a biologia molecular.

Na literatura científica, não foram encontrados trabalhos que utilizassem técnicas moleculares, como por exemplo o PCR e DGGE, em amostras ambientais de sistemas de lagoas de estabilização, ressaltando, desta maneira, a importância deste tipo de estudo, por ser ele um trabalho pioneiro nesta área.

3.5 Técnicas de Biologia Molecular

3.5.1 PCR (Reação de Polimerização em Cadeia)

O desenvolvimento da técnica de reação de polimerização em cadeia aumentou muito a eficiência de detecção de polimorfismos em DNA ou RNA, com redução de tempo de execução dos experimentos, do seu custo e da sua complexidade. A concepção inicial da técnica foi de Kary Mullis, um bioquímico que trabalhava com síntese química de oligonucleotídeos em uma firma biotecnológica na Califórnia, Estados Unidos da América, a Cetus Corporation. O que chama a atenção do desenvolvimento desta técnica, em 1985, é que todos os elementos necessários para a sua execução já estavam disponíveis havia muito tempo dentro da área de Biologia Molecular (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001).

O PCR explora certas características do processo de replicação do DNA. A DNA polimerase usa o DNA de fita simples como molde para a síntese de uma nova fita complementar. Esse molde de DNA de fita simples pode ser produzido pelo simples aquecimento do DNA de fita dupla a temperaturas próximas à de ebulição. A DNA polimerase também requer uma pequena porção do DNA de fita dupla para o iniciador (*primer*) da sua síntese. Deste modo, o ponto inicial para a síntese de DNA pode ser determinado pelo fornecimento de um oligonucleotídeo, o *primer*, que é o iniciador, ligando-se ao molde naquele ponto, desta maneira sendo direcionado para sintetizar uma região específica do DNA (WATSON *et al.*, 1997).

Segundo estes mesmos autores (*ob. cit.*), as duas fitas de DNA podem servir como molde para a síntese, desde que seja fornecido um iniciador para cada fita. Para PCR, os iniciadores escolhidos irão demarcar a região do DNA que deve ser amplificada. O resultado final são cópias da sequência de DNA entre os iniciadores utilizados, resultando em uma amplificação de uma região específica do DNA, conforme Figura 4.

(A) o alvo inicial é uma molécula de DNA de fita dupla.

(B) as fitas são separadas pelo aquecimento e depois resfriadas, assim, os iniciadores se unem aos dois sítios de ligação, um em cada fita, demarcando a região alvo.

(C) a *Taq* polimerase sintetiza uma nova fita de DNA, complementar ao molde.

(D) a mistura da reação é aquecida novamente, as fitas de DNA originais e as sintetizadas se separam, e quatro novos sítios de ligação ficam disponíveis para os iniciadores, um em cada uma das duas fitas originais e das duas novas fitas.

(E) a *Taq* polimerase sintetiza novas fitas complementares, mas a extensão das cadeias é limitada, precisamente, à sequência-alvo. As duas novas cadeias sintetizadas se estendem exatamente na região especificada pelos iniciadores.

(F) o processo é repetido e os iniciadores acomplam-se às novas fitas sintetizadas.

(G) a *Taq* polimerase sintetiza as fitas complementares, produzindo dois fragmentos de DNA de fita dupla, que são idênticos ao da sequência alvo. O processo é repetido.

Figura 4 – PCR. Esquema de (A) a (G). Fonte: Modificado de WATSON *et al.*, 1997.

O método de PCR é baseado em três etapas, as quais são repetidas em ciclos, que são: 1º – a desnaturação, que é a separação da fita dupla de DNA, o 2º, o anelamento, que é o pareamento dos iniciadores com as fitas de DNA simples, e o 3º é a extensão, que é a adição de nucleotídeos pela enzima polimerase, para produzir duas cópias da sequência original (FANTINATTI, 2000).

Estas três fases são descritas abaixo, as quais ocorrem em ciclos no PCR (HILLIS *et al.*, 1996):

- Desnaturação: nessa fase, o calor é usado para parar todas as reações enzimáticas e desnaturar o DNA de dupla fita para de fita simples. Usualmente, 94° C é a temperatura utilizada, embora alguns protocolos recentes têm sugerido 92° C. Temperaturas muito baixas ou fase muito curta de desnaturação pode falhar a completa dissociação molecular de alto peso, o DNA genômico. Todavia, embora a *Taq* polimerase seja resistente ao calor de desnaturação, ela não é imune a ele, e a desnaturação excessiva irá reduzir sua atividade enzimática.
- Anelamento: nesta fase, a temperatura é diminuída e então os iniciadores podem ligar-se aos sítios apropriados no DNA alvo. Esta é a fase mais crítica. Anelamento é um processo aleatório que depende criticamente da concentração de iniciadores, na disponibilidade de sítios de anelamentos e na presença de

competição de posições não ideais de anelamento. Como a temperatura é diminuída comparada à fase de desnaturação, iniciadores estão “sacudindo-se” entre a mistura de PCR, dirigidos por movimentos brownianos. Pontes iônicas entre iniciadores de fita simples e alvos de fita simples são constantemente formados e quebrados. Então, moléculas pequenas como os iniciadores têm chances melhores de movimentar-se aleatoriamente dentro exatamente da posição correta para formar pontes iônicas com o sítio alvo de anelamento. Se a temperatura de anelamento é muito alta, quantidade suficiente de iniciadores não é formado, mas se é muito baixa, então sítios múltiplos são usados e vários artefatos de PCR são gerados.

- Extensão: esta fase permite à enzima trabalhar, sintetizando o segmento de DNA alvo. *Taq* polimerase trabalha bem em cerca de 72° C e esta é a temperatura normalmente escolhida para a reação de extensão. Tipicamente, uma extensão de 30 segundos é adequada para produzir em torno de 500 pb.

A técnica de PCR possibilita a obtenção de quantidades muito grandes de fragmentos específicos de DNA, através de amplificação em ciclos. Teoricamente, cada ciclo de síntese duplica a quantidade de DNA-alvo (2^n), mas, na prática, este número é menor, pois não ocorre eficiência de 100% e cada ciclo é estequiometricamente diferente do anterior, pois há alteração na quantidade de substratos e produtos (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001).

A descoberta de que bactérias que habitam as nascentes quentes possuem uma DNA polimerase que atua melhor em altas temperaturas se tornou um grande avanço técnico. Essa bactéria, a *Thermus aquaticus* vive em águas à temperatura de 75° C. Sua DNA polimerase, a *Taq* polimerase é adicionada somente uma vez, no início da reação e permanece ativa durante a série completa de ciclos de amplificação. A *Taq* polimerase, *in vitro*, não tem a capacidade de revisar a sequência sintetizada, e, ao utilizar temperatura e concentração de sal típicas de PCR, esta enzima incorpora um nucleotídeo incorreto para cerca de 2×10^4 nucleotídeos incorporados. Isso não representa um problema sério na análise dos produtos de PCR, pois as moléculas com o mesmo nucleotídeo incorporado erroneamente formarão uma porção muito pequena do número total de moléculas sintetizadas (WATSON *et al.*, 1997). A *Taq* apresenta alta atividade de processamento, cerca de 8000 bases por minuto a 75° C.

Entretanto, sua atividade diminui para 90 bases por minuto a 37° C e 15 bases por minuto a 22° C, não apresentando atividade exonucleástica 3', isto é, unidirecional. Sua meia vida em reação é de 130 minutos a 92,5° C e 40 minutos a 95° C (FANTINATTI, 2000).

Sobre isolamento de DNA e sua purificação, a eletroforese em gel de agarose e mais dados sobre PCR vide Apêndice II.

3.5.2 DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)

Técnicas de impressão digital genética providenciam um padrão ou perfil da diversidade genética em uma comunidade microbiana. Uma das técnicas de impressão digital que tem sido usada na ecologia microbiana, por mais de uma década, é a separação eletroforética em géis de alta resolução de poliacrilamida de baixo peso molecular de moléculas de RNAr (RNAr 5S e RNAt) extraídas de amostras naturais. Recentemente, outra técnica genética de impressão digital, a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos ribossômicos de DNA amplificados por PCR tem sido introduzida na ecologia microbiana. Em um curto período de tempo, este método tem atraído a atenção de microbiologistas ambientais e a técnica agora é usada em vários laboratórios (MUYZER, 1998).

No DGGE fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com seqüências diferentes, podem ser separados. A separação é baseada na mobilidade decrescente eletroforética de uma molécula de DNA fita dupla, parcialmente dissociada em gel de poliacrilamida, contendo um gradiente linear de DNA desnaturante (uma mistura de uréia e formamida). Os fragmentos dissociados de DNA prosseguem em distintos então chamados de domínios de dissociação: extensões de pares de bases com idênticas temperaturas de dissociação. Uma vez que o domínio com a menor temperatura de dissociação alcança sua temperatura de dissociação (T_m) em uma posição particular no gradiente do gel desnaturado, a transição de helicoidal para moléculas parcialmente dissociadas ocorre, e a migração da molécula irá praticamente parar. Variações de seqüências dentro de tais domínios causam uma diferença nas temperaturas de dissociações e moléculas com seqüências diferentes irão parar de migrar em posições diferentes no gel (MUYZER, 1998).

Segundo OLIVEIRA (2000), o funcionamento da técnica de DGGE ocorre quando, à medida que fragmentos de DNA se movem através de géis de poliacrilamida contendo um gradiente de desnaturação, a uréia e a formamida, pequenas regiões denominadas de domínios de desnaturação sofrem uma dissociação das fitas que compõem a dupla hélice, gerando moléculas parcialmente desnaturadas, desta maneira retardando sua mobilidade eletroforética. Estas moléculas de DNA continuam a se mover vagarosamente através das concentrações mais altas de desnaturantes e, desse modo, domínios de desnaturação adicionais sofrem dissociação das fitas. Diferenças no padrão de eletroforese no gel gradiente desnaturante ocorrem através de variações na composição de bases dentro destes domínios, alterando seu comportamento de desnaturação. Através da adição da sequência de DNA rica em GC (GC Clamp), o fragmento inteiro se desnatura como um domínio único e pára de migrar quando encontra seu T_m no gel, enquanto a sequência rica em GC permanece na configuração duplex, impedindo a completa separação das duas fitas da molécula.

Usando DGGE, 50% das variantes das sequências podem ser detectadas em fragmentos de DNA até 500 pb. Esta porcentagem pode ser aumentada para perto de 100% quando anexada a sequência rica em GC, o então chamado GC-Clamp, em um lado do fragmento de DNA. A sequência de guaninas (G) e citosinas (C) é adicionada no final 5' em um dos iniciadores de PCR, co-amplificando e então introduzido dentro dos fragmentos de DNA amplificados. A sequência rica em GC atua como um domínio grande de dissociação, prevenindo as duas fitas de DNA da completa dissociação em fitas únicas. O comprimento do GC-Clamp pode variar entre 30 a 50 nucleotídeos (MUYZER, 1998).

Através das Figuras 5 e 6, temos esquematicamente a técnica de DGGE.

Figura 5 – Amostras de mesmo comprimento, mas com diferentes seqüências de pares de bases, detectadas pelo método de DGGE. Fonte: CATTONY, 2001.

Figura 6 – Dissociação da molécula de DNA no gel desnatante do DGGE da forma helicoidal para a forma de um fragmento parcialmente dissociado. Fonte: CATTONY, 2001.

HILLIS *et al.* (1996) descrevem esta técnica como uma forma especializada de eletroforese, que utiliza géis de poliacrilamida com gradientes de desnaturações (uréia) para detectar diferenças na estabilidade dos produtos de PCR. Os produtos de fita dupla movem-se pelo gel até alcançar a concentração de uréia, onde começa a tornar-se fita simples, no qual o ponto de migração é retardado. Seqüências que diferem por até uma substituição de pares de bases começa a desnaturar em pontos diferentes dentro do gradiente, resultando em mobilidades diferentes na eletroforese completa. Esta técnica é mais eficiente em fragmentos < 600 pb e é acrescentado com um GC-Clamp de 40 pb anexado pela formação de heteroduplex. O GC-Clamp

converte a sequência em um único domínio com respeito a propriedades de desnaturação e segura as fitas desnaturadas juntas para a coloração.

As regiões entre nucleotídeos AT possuem pontes mais fracas do que a do par GC, então regiões ricas em AT tendem a se separar primeiro sob condições de desnaturação, como no DGGE (ROSSITER & CASKEY, 1994).

Para maiores detalhes sobre o método de DGGE, ver BRUCHA (2002).

3.6 Limitações dos Métodos de Biologia Molecular

Como em todas as técnicas existentes, estas apresentam algumas limitações para seu uso ou de seu resultado.

As principais limitações do método de PCR são: (1) ele amplifica somente tamanhos reduzidos de fragmentos (> 10 Kb), (2) ocorre a necessidade do conhecimento prévio de sequências flanqueadoras do DNA alvo, (3) materiais e reagentes contaminados podem produzir resultados falso-positivos, (4) ocorrência da probabilidade de erro na atividade da enzima utilizada, provocando a substituição das bases nitrogenadas.

INNIS & GELFAND (1990) verificaram que protocolo único não será apropriado para todas as situações. Como consequência, cada novo PCR requer otimização, com problemas encontrados como produto não detectado ou pequena quantidade do produto desejado, a presença de bandas não específicas em segundo plano pertencentes à falta de iniciador ou à falta de extensão do iniciador, a formação de dímeros com os iniciadores que competem pela amplificação com o produto desejado e mutações ou heterogeneidade por falta de incorporação.

As principais limitações do método de DGGE são que ocorre somente a separação de fragmentos relativamente pequenos, abaixo de 500 pb, limitando a quantidade de informação de sequência para inferências filogenéticas e posterior sequenciamento; o uso de diferentes regiões do RNAr 16 S e condições diferentes de DGGE devem resultar em diferentes resoluções de separação; co-migração de fragmentos de DNA podem ser problema para recuperação de sequências limpas de bandas individuais; somente populações bacterianas que possuem 1% ou mais do

total da comunidade podem ser detectadas pelo método; o método envolve o uso de substâncias tóxicas.

DGGE requer um equipamento especial de eletroforese porque o gel tem que ser mantido em temperaturas altas. Além disso, a necessidade de sintetizar iniciadores grandes pela adição de GC-Clamp pode tornar o método caro (HAYASHI, 1994).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas seguidas nesta pesquisa estão no esquema da figura 7:

Figura 7 – Etapas realizadas neste estudo.

4.1 Área de Estudo

A lagoa de estabilização utilizada neste estudo para a coleta de amostras situa-se no município de São Lourenço da Serra – SP, inserida no Comitê da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul (CBH-RB, número 14), no Rio São Lourenço, de acordo com Figura 7, no Bairro Paiol do Meio.

Figura 8 – Área abrangida pelo Comitê da Bacia Hidrográfica do Ribeira de Iguape e Litoral Sul, destaque para o Rio São Lourenço. Fonte: SÃO PAULO, SMA, 1997.

Os municípios integrantes desta Bacia Hidrográfica são: Apiaí, Barra do Chapéu, Barra do Turvo, Cajati, Cananéia, Eldorado, Iguape, Ilha Comprida, Iporanga, Itioca, Itapirapã Paulista, Itariri, Jacupiranga, Juquiá, Juitituba, Miracatu, Pariquera-Açu, Pedro de Toledo, Registro, Ribeira, São Lourenço da Serra, Sete Barras e Tapiraí, apresentando uma drenagem de 16.771 km² (SÃO PAULO, SMA, 1997).

Este sistema é composto por caixa de areia, fossa séptica seguida de um sistema australiano, isto é, uma lagoa anaeróbia seguida por uma lagoa facultativa, de acordo com Figuras 9, 10 e 11 e um tanque de cloração com chicanas (30°) para os efluentes das lagoas submetidos ao hipoclorito, de acordo com a Figura 12 e 13. Este sistema foi inaugurado em 22 de fevereiro de 2001 e o início de funcionamento se deu em outubro de 2001, possuindo 111 ligações de esgoto, apresentando uma vazão afluente de 1,3L/s. A secagem dos resíduos do gradeamento é realizada em uma caixa de areia. Todas as fotos aqui apresentadas foram tiradas por Anna Paola Michelano Bubel.

Figura 9 – Caixa de areia para secagem do resíduo do gradeamento (outubro 2001).

Figura 10 – Lagoa anaeróbia (outubro 2001).

Figura 11 – Lagoa facultativa (outubro 2001).

Figura 12 - Tanque de cloração com chicanas (30') para os efluentes das lagoas submetidos ao hipoclorito (outubro 2001).

Figura 13 – Saída do hipoclorito no tanque de cloração (outubro 2001).

As dimensões das lagoas anaeróbias e facultativas são descritas a seguir, segundo dados fornecidos pela Sabesp (Tabela 3):

Tabela 3 – Dimensões das lagoas anaeróbia e facultativa.

	ANAERÓBIA	FACULTATIVA
Dimensões de fundo	(22,40 x 41,50) m	(55,77 x 151,65) m
Dimensões Lâmina Líquida	(42,24 x 58,65) m	(39,30 x 162,62) m
Dimensões Nível Passarela	(44,50 x 60,60) m	(72,12 x 164,91) m
Volume Líquido	7.245,83 m ³	23.613,13 m ³
Tempo Detenção Hidráulica	6,68 dias	21 dias

Fonte: SABESP (2002)

4.2 Coleta de Amostras das Lagoas

A coleta de amostras foi realizada no dia 3 de março de 2002 pela doutoranda Anna Paola Michelano Bubel, da EESC-USP, na lagoa facultativa do sistema de lagoas de estabilização de São Lourenço da Serra – SP. A coleta foi realizada na superfície da lagoa facultativa, através de coleta direta, na rede de fitoplâncton com poros de 20 µm de diâmetro, mas sem a passagem da amostra pela rede, pela grande concentração da mesma, conforme Figuras 14, 15 e 16.

Figura 14 – Coleta pela rede de fitoplâncton de 20 µm na lagoa facultativa (março 2002).

Figura 15 - Retirada da rede de fitoplâncton de 20 μ m da lagoa facultativa, com coleta direta (março 2002).

Figura 16 – Frascos coletados na lagoa facultativa através de rede de fitoplâncton de 20 μ m (março 2002).

4.3 Procedimentos para os Exames Microscópicos

Foram realizadas observações microscópicas da amostra para a determinação morfológica das espécies presentes na coleta ambiental, proveniente da lagoa facultativa do sistema de lagoas de São Lourenço da Serra – SP.

Os exames foram realizados com auxílio de um microscópio marca Olympus, modelo BX-60, com câmara acoplada de captura de imagem Optronics, e sistema analisador de imagem no microcomputador Image-Pro Plus Versão 3.0.01.00.

As lâminas foram preparadas utilizando uma gota da amostra, sem diluição, e visualizadas utilizando luz comum, com aumentos de 200 X para observação da morfologia das colônias e aumento de 1000 X e de 1600 X para observação da morfologia das células.

4.4 Culturas utilizadas no estudo

As culturas puras utilizadas para controles positivos e negativos estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4 – Identificações das culturas puras utilizadas no estudo.

1[†] – *Microcystis* sp.

Amostra BB12; local de coleta: Barra Bonita/SP

2[†] – *Anabaena spiroidis*

Local de coleta: Barra Bonita/SP

3[†] – *Scenedesmus* sp. (microscopicamente provável *quadricauda*)

Amostra BB15; local de coleta Barra Bonita/SP

4[†] – *Golenkimia* sp.

Local de coleta não divulgado.

5[†] – *Ankistrodesmus densus*

Local de coleta não divulgado.

6[†] – *Thalassiosira* sp.

Local de coleta não divulgado.

7[†] – *Cryptomonas tetrapy*

Local de coleta não divulgado.

8[§] – *Microcystis aeruginosa*

Amostra MASG14; local de coleta: Salto Grande/SP

9^{**} – *Microcystis aeruginosa*

Amostra NPJB-1; local de coleta: Lago das Garças/SP

10^{**} – *Microcystis aeruginosa*

Amostra NPDC-1; local de coleta: Município Rio de Janeiro/RJ

[†] Proveniente Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira – UFSCar – Dep. de Botânica.

[§] Proveniente Dra. Gina Luisa Boemer Debert – EESC – USP.

^{**} Proveniente Profa. Dra. Marli de Fatima Fiore – CENA – USP.

11** - *Microcystis panniformis*

Amostra SPC702; local de coleta: Lago das Garças/SP

12** - *Cylindrospermopsis raciborskii*

Amostra 339T3; local de coleta: Represa Bilings/SP

4.5 Extração de DNA das Amostras Ambientais e das Culturas

Foram testados seis protocolos de extração de DNA. São eles o de BOLCH *et al.* (1996), TSAI & OLSON (1991), Extração TNES (MARTINS, 2001), Proteinase K (FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO, 2000), Extração Ultra Clean Water DNA kit (Mobio) e Fast-Prep – Fast DNA kit (BIO 101), conforme descritos a seguir.

Protocolo segundo BOLCH *et al.* (1996), com modificações em negrito:

1. Coletar 1 ml de amostra de cultura ou ambiental e colocá-la em **um microtubo de 1,5 ml**. Centrifugar a **10.000 rpm por 10 minutos**.
2. Lavar os *pellets* em **500 µl** tampão TE (10 mM Tris (Merck), 1 mM EDTA (J.T. Baker), pH 8,0). Centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos.
3. Ressuspender os *pellets* em 400 µL de sacarose/tampão TE (50 mM Tris (Merck), 100 mM EDTA (J.T. Baker), 25% sacarose (J.T. Baker), pH 8,0) e 50 µL de lisozima (100 mg.mL⁻¹ em água ultra pura esterilizada, Amersham Biosciences, código 25009056). A lisozima será adicionada para dar uma concentração final de aproximadamente 10 mg.mL⁻¹.
4. Incubar as amostras a 37° C por 1 hora.
5. Adicionar 75 µL de **2,5%** de dodecil sulfato de sódio (SDS, J.T. Baker) e 5 µL de proteinase K (Amersham Biosciences, código 25003953) e incubar a 60° C por 20 minutos ou até a suspensão celular clarear (acima de 1 hora).
6. O material lisado é extraído duas vezes com Tris tamponado com fenol (**600 µl e 500 µl**, respectivamente, Amersham Biosciences, código US 75829) e centrifugado a **8490 rpm por 10 minutos** em ambas as vezes. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo microtubo a cada adição de fenol.

7. Extrair uma vez com Clorofórmio (Mallinkrodt): Álcool Isoamílico (Mallinkrodt) (24:1 v/v) (**500 µl**). Centrifugar a **8490 rpm por 10 minutos**.
8. Precipitar o DNA por uma hora a -20°C depois da adição de 0,1 volume de 5 M NaCl (Synth) e 2,5 volumes de etanol (Synth) frio 100%.
9. Centrifugar por 20 minutos a 14.000 rpm para formar *pellet* do DNA.
10. Lavar por *overnight* em etanol 70%.
11. Secar em temperatura ambiente e resuspending em 200 µL de **água ultra pura esterilizada**.
12. Diluir as amostras 1:1 com 4 M NaCl (Synth) (**200 µl**) e precipitar com a adição de 2 volumes de etanol frio 100% (800 µl) para remover polisacarídeos e outros inibidores de PCR.
13. Centrifugar a amostra a **14.000 rpm por 10 minutos**.
14. Secar e resuspending em **água ultra pura esterilizada** (50 µl).

Protocolo segundo TSAI & OLSON (1991), com modificações em negrito:

1. Misturar **1,0 ml** de amostra com 2,0 ml de Fosfato de Sódio 0,12M (pH 8,0) em tubo de centrifuga de 15,0 ml. Agitar manualmente por 15 minutos.
2. Centrifugar a amostra a 6.000 Xg por 10 minutos. Remover o sobrenadante e descartar. Lavar o pellet com 2ml de Fosfato de Sódio 0,12M e agitar brevemente. Centrifugar a 6.000Xg por 10 minutos. Remover e descartar o sobrenadante.
3. Resuspending o “pellet” em 2,0 ml de solução de lise (NaCl (Synth) 0,15M, NaEDTA (Mallinckrodt) 0,1M [pH 8,0]) contendo 15,0 mg de lisozima/ml (USB). Incubar em banho-maria a 37°C por 3h, agitando a cada intervalo de 20-30 minutos. Colocar no gelo ao final do banho.
4. Adicionar 2,0 ml de solução tampão lisi (NaCl 0,1M (Synth) - Tris HCl 0,5M (Merck) [pH 8,0] – 1 % de Dodecil Sulfato de Sódio (J.T.Baker)) e misturar bem. **Adicionar 15 µL de Proteinase K (USB) e colocar em banho-maria por, pelo menos, 1 hora a 65°C , até a solução clarear.**
5. Submeter a amostra a três ciclos de congelamento a -80°C (até congelar, por +/- 5-10 minutos) e de descongelamento em banho-maria a 65°C (10 minutos) intercalados. Colocar no gelo ao final dos três ciclos.

6. Após os ciclos de congelamento e descongelamento, adicionar 2,0 ml de Tris-HCl 0,1M (pH 8,0) saturado com Fenol (Amersham Biosciences) e misturar brevemente no “vortex” para se obter uma emulsão.
7. Centrifugar a mistura a 6.000 Xg por 10 minutos.
8. Coletar aproximadamente 3,0 ml do sobrenadante em novo tubo de 15ml e adicionar 1,5 ml de Fenol (Amersham Biosciences) e 1,5 ml de Clorofórmio (Mallinkrodt) - Álcool Isoamílico (Mallinkrodt) (24:1). Agitar brevemente e centrifugar a 6.000Xg por 10 minutos.
9. Transferir 2,5ml do sobrenadante para novo tubo de 15ml.
10. Adicionar 2,5 ml de Clorofórmio (Mallinkrodt) – Álcool Isoamílico (Mallinkrodt) (24:1). Agitar e centrifugar a 6.000Xg por 10 minutos.
11. Transferir 2 ml da camada superior do sobrenadante para um novo tubo 15 ml. Finalmente, precipitar o DNA extraído na fase aquosa (aproximadamente 2,0 ml) com 2,0 ml de Isopropanol (Synth) gelado (-20°C), agitar e incubar a -20°C por 1 hora ou “overnight”.
12. Aliquotar a solução de DNA em “microtubo”, colocando 1 ml em cada “microtubo”.
13. O “pellet” de DNA é obtido por centrifugação da solução a 10.000 Xg a 4°C por 10 minutos.
14. Resuspender o “pellet” em 0,5 ml de etanol (Synth) 75%.
15. Centrifugar a solução a 10.000 Xg por 10 minutos a 4°C. Remover e descartar o sobrenadante.
16. Secar o “pellet” em temperatura ambiente por 15min.
17. Resuspender o “pellet” em 100 µl de tampão TE e agitar no “vortex”. Guardar o DNA em geladeira a 4,0°C.

Protocolo de Extração de DNA com TNES (Tris, NaCl, EDTA, SDS) (Adaptado por Vanderlei Martins – CEIS – UNESP – Rio Claro)

1. Colocar a solução de TNES em gelo durante 5 minutos.
2. Colocar 50 µl de solução em um microtubo de 1,5 ml. Em seguida, adicionar um pequeno fragmento do tecido dentro do tubo e macera-lo com auxílio de uma

ponteira com a ponta previamente fechada em chama, com cuidado, mantendo o microtubo no gelo. Acrescentar mais 550 µl de solução de TNES.

3. Adicionar 3 µl de proteinase K (20 mg/ml) e incubar por 3 horas a 55 °C.
4. Deixar a amostra retornar à temperatura ambiente e acrescentar 3 µl de RNase A (4 mg/ml) (não realizada).
5. Incubar a 37° C por 30 minutos.
6. Deixar a amostra voltar à temperatura ambiente e adicionar 200 µl de NaCl 5 M.
7. Agitar no Vortex por 20 segundos em alta velocidade.
8. Centrifugar a 15000g por 5 minutos.
9. Colocar 600 µl de isopropanol 100% em um novo microtubo de 1,5 ml.
10. Cuidadosamente transferir o sobrenadante com DNA (obtido após item 6) para este microtubo. Descartar o microtubo com o pellet de proteína.
11. Inverter gentilmente 50 vezes o tubo microtubo.
12. Centrifugar a 15000g por 3 minutos.
13. Descartar o sobrenadante com auxílio da bomba de vácuo, adaptando uma ponteira de pipeta automática de 200 µL (cor amarela) à mangueira da bomba ou com uma pipeta automática de 200 µL (não realizada).
14. Inverter o microtubo sobre papel absorvente.
15. Adicionar 600 µl de etanol 70%. Inverter 30 vezes o microtubo.
16. Centrifugar a 15000g por 3 minutos.
17. CUIDADOSAMENTE descartar o etanol na bomba de vácuo sem deslocar o pellet de DNA. Inverter o tubo sobre papel absorvente para secar.
18. Deixar em temperatura ambiente até que o tubo seque completamente. Se disponível, secar em centrífuga de vácuo (Speed Vac centrifuge).
19. Adicionar de 30 a 40 µl de DNA Hydration Solution (tampão TE) ao pellet de DNA.
20. Guardar a 2-8 °C. Nestas condições, o DNA permanece inalterado por mais de um ano.

Protocolo de Extração com Proteinase K e alta temperatura (adaptado por Fundação André Tosello de Young & Blakesley, 1991, Focus, 13:13), com modificações em negrito:

1. **Concentrar a amostra em um pellet de $\pm 0,3$ ml, através de centrifugação.**
2. Ressuspender em 100 μ l da solução de lise (50ng/ μ l de proteinase K dissolvidos em TE, pH 7,5 – 8,0).
3. Colocar os tubos de microcentrífuga em banho-maria a 55°C por 15 minutos.
4. Transferir os tubos para um banho a 80°C por mais 15 minutos.
5. Centrifugar 7 minutos a 12000g e transferir o sobrenadante para outro tubo.
6. Usar 5 a 10 μ l do lisado para cada reação de PCR. Congelar o restante do lisado para reações futuras.

Obs.: O DNA não é estável por muito tempo sob a forma de lisado, pois não houve purificação e pode haver ação degradadora de nucleases.

Protocolo de Extração Ultra Clean Water DNA kit (Mobio)

1. Filtre a água usando os filtros fornecidos. Use o adaptador de filtro fornecido em seu sistema de filtração (o volume depende da carga microbiana de sua amostra de água).
2. Asepticamente remova os filtros, dobre e introduza os filtros de papel no bead tube (tubos de grânulos).
3. Adicione 4 ml de bead solution no tubo Water Bead e coloque no vortex por 30 segundos.
4. Adicione 500 μ l de Solution WD1 em cada tubo Water Bead e coloque no vortex por 30 segundos para misturar. Fixe o Water Bead na horizontal em um bloco de vortex com fita e coloque na velocidade máxima durante 10 minutos.
5. Centrifugue os tubos a 2500 x g por 1 minuto.
6. Transfira o sobrenadante para um tubo de centrífuga limpo de 15 ml (fornecido no kit).

Nota: Espere aproximadamente 3.4 ml de sobrenadante. Adicione 600 μ l de Solução WD2 para sobrenadante. Vortex por 5 segundos. Incube a 4°C por 5 minutos.

7. Centrifugue os tubos por 4 minuto a 2500 x g.

8. Evitando o pelet, transfira o volume inteiro de sobrenadante para outro tubo limpo de 15 ml (fornecido no kit). Você pode esperar aproximadamente 4 ml de volume.
9. Adicione 8 ml de Solução WD3 ao sobrenadante e vortex por 5 segundos.
10. Carregue o sobrenadante sobre 50 ml tubos de giro com filtro e centrifugue a 2500 x g por 2 minutos. Descarte o fluxo que passou pelo filtro.
11. Adicione 3 ml de Solução WD4 e centrifugue por 3 minutos a 2500 x g.
12. Descarte o fluxo que passou pelo filtro.
13. Centrifugue novamente por 5 minutos a 2500 x g.
14. Sendo cuidadoso para não espirrar líquido na cesta do filtro, coloque o tubo de giro com filtro em um novo tubo de 50 ml (fornecido no kit).
15. Adicione 3 ml de Solução WD5 para o centro da membrana de filtro branco.
16. Centrifugue os tubos por 2 minutos a 2500 x g.
17. Descarte o filtro de giro. O DNA no tubo está agora pronto para qualquer aplicação. Nenhuma etapa adicional é requerida. Recomenda-se armazenar o DNA em - 20°C.

Protocolo Fast-Prep – Fast DNA kit (BIO 101), segundo Adriana Sturion Lorenzi, mestranda CENA – USP.

1. Peletizar a amostra a 13000 rpm por 7 minutos até formar um *pellet* de ± 4 mm. Ressuspender em 100 μ l de água ultra pura esterilizada autoclavada. Descartar os grânulos e usar somente a esfera (matriz de lise).
2. Adicionar 1 ml de CLS-Y + Lising Matrix.
3. Colocar no Fast-Prep por 10 segundos na velocidade 4.
4. Centrifugar por 10 minutos em 13000 rpm. Transferir 600 μ l do sobrenadante para um tubo limpo.
5. Adicionar 600 μ l de Binding Matrix, mexer gentilmente e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar por 2 minutos, descartar o sobrenadante. Ressuspender gentilmente o pelet com 500 μ l de SEWS-M. Centrifugar por 2 minutos e descartar o sobrenadante. Centrifugar por 20 segundos e remover o residual líquido.

6. Eluir o DNA da Binding Matrix através de ressuspensão gentil em 100 µl de DES e incubar 2 a 3 minutos. Centrifugar por 4 minutos a 13000 rpm e transferir o sobrenadante para um novo tubo.

4.6 Verificação do Resultado da Extração

O resultado da amplificação foi verificado através de eletroforese em gel de agarose. A agarose utilizada foi a agarose NA da Amersham Biosciences (código 17055402), com a adição de brometo de etídio (solução estoque a 10 mg/ml), com banho neste brometo de etídio por 15 minutos após a corrida eletroforética.

A corrida foi realizada com tampão TEB 1X (solução estoque 5X, 54 g de Tris (Gibco BRL), 27,5 g de ácido bórico (Amersham Biosciences), 20 ml de EDTA (Mallinckrodt) 0,5 M pH 8.0, acrescentando água ultra pura esterilizada para completar 1000 ml), com tampão de amostra (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25%, dissolvidos em TE) na proporção de 5 µl de amostra de DNA para 2 µl de tampão de amostra.

A cuba para eletroforese utilizada foi a GNA 100, da Pharmacia Biotech ligada a um alimentador de força Eletrophoresis – Power Supply EPS 301, da Amersham Pharmacia Biotech na EESC e cuba da Hoefer HE33, ligada a um alimentador de força Eletrophoresis – Power Supply EPS 301, da Amersham Pharmacia no CENA.

Os tempos de corrida e voltagens utilizados são descritas na Tabela 5:

Tabela 5 – Tempos de Corrida e Voltagens Utilizados na Eletroforese em Gel de Agarose

Figura	Voltagem (V)	Amperagem (mA)	Tempo (Minutos)
20	75	100	30
21	75	100	30
22	75	100	30
23	75	100	60
24	80	100	60
25	80	100	60
26	75	100	30
27	75	100	30
28	75	100	30
29	-	-	-
30	80	100	60
31	80	100	60
32	85	100	60
33	80	100	60
34	80	100	60
35	80	100	60

4.7 Técnica de Purificação do DNA

O Kit de Purificação utilizado foi o GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences, código 27960201), com volume máximo de solução de DNA de 100 µl, conforme descrito abaixo:

1. Colocar uma *GFX Column* em um *Collection Tube* para cada purificação a ser realizada.
2. Adicionar 500 µl de *Capture Buffer* no *GFX Column*.
3. Transferir a solução de DNA (até 100 µl) para o *GFX Column*.
4. Misturar, através de pipetagem, a amostra para cima e para baixo de 4 a 6 vezes.

5. Centrifugar em uma microcentrífuga a velocidade total (10.000 a 16.000 Xg) por 30 segundos.
6. Descartar o fluxo completo esvaziando o *Collection Tube*. Colocar o *GFX Column* de volta no *Collection Tube*.
7. Adicionar 500 µl de *Wash Buffer* na coluna. Centrifugar em uma microcentrífuga à velocidade total, por 30 segundos.
8. Descartar o *Collection Tube* e transferir o *GFX Column* para um microtubo.
9. Aplicar 50 µl de tampão de eluição (Tris-HCl pH 8.0 ou tampão TE ou água dd autoclavada) diretamente no topo da matriz de fibra de vidro no *GFX Column*.
10. Incubar a amostra a temperatura ambiente por um minuto.
11. Centrifugar a velocidade total na microcentrífuga por um minuto para recuperar o DNA purificado.

Capture Buffer: solução tamponante contendo acetato e caotrófico.

GFX Columns: colunas MicroSpin embaladas previamente com matriz de fibra de vidro.

Collection Tubes: tubos de microcentrífuga sem tampa de 2 ml.

Wash Buffer: tampão Tris-EDTA (10mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA), adicionado etanol absoluto para uma concentração de 80%.

4.8 Iniciador para PCR

Amplificações por PCR do gene RNAr 16S foram efetuadas com iniciadores segundo NÜBEL *et al.* (1997), NEILAN *et al.* (1997) e Øvreås *et al.* (1997) conforme tabela a seguir:

Tabela 6 – Iniciadores utilizados neste estudo.

Iniciadores segundo NÜBEL <i>et. al.</i> , 1997:	
CYA 106 FGC*	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
CYA 359 FGC*	GGGGAATYTTCCGCAATGGG
CYA 781 R(A)*	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT
CYA 781 R(B)*	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT
Y = C/T	
Iniciadores segundo NEILAN <i>et. al.</i> , 1997:	
27 F1**	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
209 FGC*	ATGTGCCGCGAGGTGAAACCTAAT
409 R*	TTACAA(C/T)CCAA(G/A)(G/A)(G/A)CCTTCCTCCC
1494Rc**	TACGGCTACCTTGTTACGAC
Iniciadores segundo ØVREÅS <i>et al.</i> , 1997:	
BA338fGC***	ACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
BA518R***	ATTACCGCGGCTGCTGG

* Iniciadores da EESC – USP.

** Iniciadores do CENA – USP.

*** Iniciadores da ESALQ – USP.

Em todos os iniciadores Forward da EESC, foram anexadas as seqüências GC-Clamp, conforme a seguir (NÜBEL *et. al.*, 1997):

5'– CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCG GTC CCG CCG CCC CCG CCC G – 3'

Os iniciadores foram adquiridos da Life Technologies do Brasil Ltda./Invitrogen.

4.9 Amplificação por PCR

Foi utilizado o termociclador “Gene Amp. PCR System 2400” da Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.

O PCR foi realizado com o kit puRe *Taq* Ready-To-Go PCR Beads, da Amersham Biosciences, código 27-9559-01, descrito na Tabela 7 e sem o kit, com materiais descritos nas tabelas a seguir (8, 9, 10, 11, 12 e 14):

Tabela 7 – Descrição dos reagentes utilizados para PCR com o kit puRe *Taq* Ready-To-Go PCR Beads.

PuRe <i>Taq</i> DNA polimerase	~ 2,5 unidades
Tris-HCl, pH 9.0	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DNTPs – cada	200 µM
Estabilizantes	não descrito
BSA	não descrito
Iniciadores (20 pmol)	1,0 µL
DNA	1,0 µL
Água ultra pura esterilizada	23,0 µL (para 25 µL de reação)

Tabela 8 – Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.

<i>Buffer</i> 10X PCR	2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM	2,5 µL
DNTPs 10mM	0,5µL
Iniciadores (5 pmol)	1,0 µL
DNA	1,0 µL
<i>Taq</i> Recombinante Invitrogen (5U/µL)	0,2 µL
Água Ultra pura esterilizada	16,3 µL

Tabela 9 – Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.

Reagentes	1ª Reação (canaletas 1 e 2)	2ª Reação (canaletas 3 e 4)	3ª Reação (canaletas 5 e 6)
Buffer 10 X PCR	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µl		1,5 µl
MgCl ₂ 25 mM		3,0 µl	
DNTPs 10 mM	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Iniciadores (5 pmol)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Taq polimerase (5U/ml)	0,3 µl*	0,3 µl**	0,3 µl*
DNA	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Água ultra pura esterilizada autoclavada	16,7 µl	15,7 µl	11,95 µl
BSA (0,01g/ml)			5,0 µl
Triton X-100 (10%)			0,25µl

* Taq Polimerase da Invitrogen

** Taq Polimerase da Q-Biogene

Tabela 10 – Descrição dos reagentes utilizados no Termociclador de Gradiente de Temperatura.

Reagentes	Canaletas de 1 a 6	Canaletas de 7 a 12
Tampão Q-Biogene	2,5 µl	
Tampão PCR Invitrogen		2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	3,0 µl	
Sulfeto de Magnésio		1,5 µl
DNPTs 10 mM	0,5 µl	0,5 µl
Iniciadores (5 pmol)	1,0 µl	1,0 µl
DNA	1,0 µl	1,0 µl
Taq Polimerase Qbiogene	0,3 µl	
Taq Polimerase Platinum		0,3 µl
Água ultra pura esterilizada autoclavada	15,7 µl	12,2 µl
BSA (0,01 g/ml)		5,0 µl

Tabela 11 – Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.

Reagentes	Canaletas de 1 a 6
<i>Buffer</i> 10X PCR	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl
DNPTs 10 mM	0,5 µl
Iniciadores (5 pmol)	1,0 µl
DNA	2,0 µl
Taq Polimerase Invitrogen	0,3 µl
Água Ultra pura esterilizada autoclavada	16,4 µl

Tabela 12 – Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.

Reagentes	Canaletas de 1 a 6
<i>Buffer</i> 10X PCR	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	0,5 µl
DNPTs 10 mM	1,0 µl
Iniciadores (5 pmol)	1,0 µl
Produto de PCR	1,0 µl
Taq Polimerase Invitrogen	0,2 µl
Água Ultra pura esterilizada autoclavada	16,3 µl

Tabela 13– Descrição dos reagentes utilizados para a realização de PCR.

Reagentes	Canaletas de 1 a 6
<i>Buffer</i> 10X PCR	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µl
DNPTs 10 mM	0,5 µl
Iniciadores (5 pmol)	2,5 µl
DNA	1,0 µl
Taq Polimerase Qbiogene	0,2 µl
Água Ultra pura esterilizada autoclavada	15,05 µl

A programação do aparelho de termociclador com as condições do PCR está descrita na tabela 14.

Tabela 14 - Programação do aparelho com as condições do PCR.

Figura	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Ciclos
26	-	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	-	35
27	-	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	-	35
28	-	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	-	35
29	94°C 5 min	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	72°C 7 min	35
30	94°C 5 min	94°C 1 min	60°C 1 min	72°C 1 min	72°C 7 min	35
31	96°C 5 min	94°C 20 Seg	50°C 30 seg	72°C 50 seg	72°C 2 min	30
32	95°C 3 min	94°C 10 Seg	50°C 20 seg	72°C 1 min	72°C 7 min	30
33	96°C 5 min	94°C 20 Seg	50°C 30 seg	72°C 50 seg	72°C 2 min	30
34	95°C 3 min	94°C 10 Seg	50°C 20 seg	72°C 1 min	72°C 7 min	30
35	95°C 5 min	92°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	30

Foi realizado *nested* de PCR, isto é, nesta pesquisa amplificou-se, inicialmente, um fragmento de 1467 pares de bases (fragmento do RNAr 16S) e, após, realizou-se outro PCR com este fragmento servindo de amostra, utilizado para amplificação de 381 pares de bases. É uma amplificação de vários pares de bases que servem depois para uma re-amplificação de menor número de pares de bases, dentro desta mesma região alvo.

4.10 Quantificação do produto de PCR para DGGE

Foi utilizado o sistema Fragment Analysis, dentro do sistema de scanner Fluorimager SI, da Vistra Fluorescente, no laboratório de Microbiologia Molecular dos Solos, ESALQ – USP.

Este sistema utiliza o marcador molecular como padrão para a quantificação de DNA e como corante o SibrGreen. Utilizou-se o marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), sendo que 2000 pb corresponde a 100 ng de DNA, 1200 pb a 60 ng de DNA, 800 pb a 40 ng de DNA, 400 pb a 20 ng de DNA, 200 ng a 10 ng de DNA e 100 pb a 5 ng de DNA.

4.11 DGGE

O sistema DGGE “D CodeTM – Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia), do laboratório de Microbiologia Molecular dos Solos, ESALQ – USP, foi utilizado depois da etapa de PCR exatamente como descrito pelos fabricantes no manual de instruções, conforme a seguir:

1. Montagem das placas.

2. Preparação das soluções 0 % e 100 % de gradiente.

- Para o gel de 8% de acrilamida, com volume final de 25 ml:

	Solução 0 %:	Solução 100 %
Acrilamida 40 %	5 ml	5 ml
TAE 50 X	0,5 ml	0,5 ml
Uréia/Carbamina		10,5 g
Formamida		10 ml
Água Ultra pura esterilizada	19,5 ml	

3. Soluções do gradiente:

- Para gradiente de 15 % a 55 %, com volume final de 18 ml cada placa.

	15 %	55 %
Solução 0 %	15,3 ml	8,1 ml
Solução 100 %	2,7 ml	9,9 ml

4. Adição de soluções de polimerização.

Em cada erlenmayer, adicionar e em seguida pegar com a seringa o persulfato de amônio, 100 µl (0,1 g/ml) e TMED, 10 µl.

5. Aplicar no aparato. Após, colocação do pente. Tempo de polimerização de 1 hora. Depois do tempo previsto para a polimerização do gel retirar o pente.

6. Fazer tampão de corrida, utilizando TAE 50X, 70 ml, e água Ultra pura esterilizada, 6.930 ml.

7. Pré-corrída de 200V até atingir 60°C ($\pm$ 1 hora).

8. Preparação da amostra. Adicionar o Loading Buffer III na mesma proporção da amostra (1 : 1). Aquecer a amostra já misturada ao lading buffer por 5 minutos a 95°C e resfriá-la no gelo antes de aplicar na canaleta. Tempo de corrida de 3 horas com 200 V.

9. Fixação do gel:

- Ácido acético 10 % por 15 minutos em agitação.
- Lavagem com água destilada 3 vezes de 5 minutos cada em agitação.
- Metanol 50 % por 15 minutos em agitação.
- Lavagem com água destilada 3 vezes de 5 minutos cada em agitação.

10. Coloração do gel:

- Vistra-Green diluído em TAE 0,5X – 1:10.000 (30 µl : 300 ml).
- Lavagem em água destilada 1 vez por 5 minutos em agitação.

10. Leitura em scanner.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Exame Microscópico Óptico da Amostra

As amostras ambientais foram examinadas microscopicamente, conforme descrito no item 4.2 (Procedimentos para os Exames Microscópicos), tendo como resultado as Figuras 17, 18 e 19 evidenciando-se as colônias, através de aumento de x 200 e a morfologia, através de aumento de x 1000 e de x 1600. Toda a parte de microscopia foi realizada com luz comum.

Todas as amostras analisadas apresentaram dominância de cianobactérias, através do gênero *Microcystis*, com duas espécies microscopicamente identificadas, a *Microcystis aeruginosa* e a *Microcystis flos-aquae*, segundo KOMÁREK (1999).

Foi visualizado também outras bactérias presentes nestas amostras, mas as mesmas não foram identificadas, por não serem objeto deste estudo.

Figura 17 – Microscopia óptica de *Microcystis aeruginosa* (seta azul) e *Microcystis flos-aquae* (seta vermelha) (1 e 2).

Figura 18 – Microscopia óptica de *Microcystis aeruginosa* (seta azul) e *Microcystis flos-aquae* (seta vermelha) (3, 4, 5, 6, 7 e 8).

Figura 19 – Microscopia óptica de *Microcystis aeruginosa* (10) e *Microcystis flos-aquae* (9 e 11).

Foi sugerida uma nova classificação com espécies de *Microcystis* nas águas japonesas: *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846, *Microcystis ichthyoblabe* Kützing 1843, *Microcystis novacekii* (Komárek) Compère 1974, *Microcystis viridis* (A. Braun) Lemmermann emend Kondratova 1975 e *Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek en Kondratova (1991), sendo distinguida da *Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner 1898, mas em alguns casos, *Microcystis ichthyoblabe* (incluindo *Microcystis flos-aquae*) e *Microcystis novacekii* não são possíveis de serem distinguidas da *Microcystis aeruginosa* (OTSUKA et al., 2001).

Segundo estes autores (op. cit), em todos estes estudos, foi primeiramente o tamanho da célula, forma de colônia e características da bainha de mucilagem

que foram utilizados como critérios e o termo “morfoespécie” foi empregado para classificar as espécies de *Microcystis*. As colônias de *Microcystis* podem facilmente mudar de forma ou desagregar durante uma série de sub-culturas. Desta maneira, torna-se difícil a re-identificação das mesmas. Por este motivo, fizeram um estudo com técnicas moleculares através de hibridização DNA-DNA, utilizando comprimentos de DNAr 16S de seis cepas de *Microcystis*, todas apresentando 1457 pb, entre as posições 33 e 1542, concluindo com uma proposta de unificação de cinco espécies de *Microcystis* sob as regras do Código Bacteriológico (*Microcystis aeruginosa*, *Microcystis ichthyoblabe*, *Microcystis novacekii*, *Microcystis viridis* e *Microcystis wesenbergii*), sendo que a *Microcystis flos-aquae* e a *Microcystis pseudofilamentosa* devem ser vistas como variações morfológicas desta *Microcystis aeruginosa* unificada.

Continuamos, contudo, a utilizar a classificação de KOMÁREK (1999), considerando como duas espécies predominantes encontradas na amostra ambiental, a *Microcystis aeruginosa* e a *Microcystis flos-aquae*.

5.2 Avaliação dos Métodos de Extração do DNA das Amostras Estudadas

Os resultados dos métodos de extração foram observados em géis de agarose, corados com brometo de etídio e vistos com luz U.V.

O protocolo de extração de DNA segundo BOLCH *et al.* (1996) foi aqui realizado, pois o mesmo foi utilizado em cepas de cianobactérias de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena circinalis*.

O protocolo de extração de DNA segundo TSAI E OLSON (1991) foi também realizado, pois o mesmo já foi amplamente utilizado no laboratório de Biologia Molecular da EESC em amostras anaeróbias de reatores, estando já otimizado.

Os protocolos de extração com Proteinase K e TNES foram ensinados em cursos de biologia molecular, na Fundação André Tosello e no CEIS (Unesp), respectivamente e realizados neste estudo.

Os kits de extração de DNA da Mobio e da Bio101 estavam disponíveis no laboratório de Biologia Molecular do CENA, por isso também foram realizados neste estudo.

Os protocolos de BOLCH *et al.* (1996) e TSAI E OLSON (1991) apresentaram bandas como resultado. O Protocolo com TNES apresentou um rastro e com Proteinase K não apresentou bandas. Em todas estas amostras não foram utilizados marcadores moleculares quando da corrida do gel, conforme figuras 20, 21 e 22, comprometendo desta maneira seu resultado. Somente figura 23 com extração de TNES foi utilizado marcador molecular.

Figura 20 – Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental segundo protocolo de Bolch *et al.* (1996) (todas as canaletas).

Figura 21 – Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental segundo protocolo de TSAI & OLSON (1991).

A Figura 21 apresenta, na canaleta 1 um aumento de molaridade do NaCl sem a etapa do freezer – 80°C, canaleta 2 com molaridade do NaCl de acordo com o protocolo e também com a etapa do freezer – 80°C, canaleta 3 com molaridade de NaCl de acordo com protocolo, mas não realizado o congelamento no freezer –

80°C e canaleta 4 com molaridade de NaCl de acordo com o protocolo e a etapa de congelamento no freezer – 80°C realizada.

Figura 22 – Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental segundo protocolo com TNES (canaletas 1 e 2) e com o protocolo de Proteinase K (canaletas 3 e 4).

Figura 23 – Gel de agarose 0,8% da extração de DNA de culturas puras e ambiental, segundo protocolo com TNES.

A Figura 23 apresenta na canaleta 1 e 10 *Golenkimia* sp., canaleta 2 e 11 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 3 e 12 *Scenedesmus* sp., canaleta 4 e 13 *Anabaena* sp., canaleta 5 e 14 *Ankistrodesmus densus*, canaleta 6 e 15

Thalassiosira sp., canaleta 7 e 16 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 8 e 17 *Cryptomonas tetrapy*, canaleta 9 amostra ambiental.

Nesta figura (23), foram utilizados 200mM de NaCl, 200 µl de amostra e 6 µl de proteinase K por microtubo com a extração seguindo o protocolo de TNES. Os marcadores moleculares utilizados nesta figura (Lambda DNA/Hind III Markers, Promega) não se separaram de acordo, dificultando desta maneira a quantificação dos pares de bandas.

Algumas amostras não apresentaram bandas, como as canaletas 3 e 1. Nas canaletas 2, 7, 8, 13 e 17, por exemplo, apresentaram mais de uma banda por amostra. A quantidade de cultura pura disponível para a realização da extração apresentada na Figura 23 não era suficiente e, em alguns casos, pode ter ocorrido contaminação em laboratório destas culturas.

Resultado da extração com o Protocolo de TSAI & OLSON (1991) apresentou bandas. Este protocolo foi desenvolvido para amostras de solos e sedimentos, podendo estar ocorrendo excesso de etapas de lise para amostras de cianobactérias, desnecessárias, além da utilização de fenol e clorofórmio.

Protocolo de extração de DNA com TNES apresentou, em algumas amostras, rastros de bandas não condizentes com DNA, sendo possivelmente polissacarídeos.

Os protocolos realizados com os kits Ultra Clean Water DNA da Mobio com marcador genômico Lambda DNA/Hind III Markers, Promega e Fast DNA da Bio 101 com marcador molecular Low DNA Mass Ladder, da Invitrogen, apresentaram bandas, conforme figuras 24 e 25.

Figura 24 – Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental através

da utilização do Ultra Clean Water DNA kit (canaletas 1 e 2).

Figura 25 – Gel de agarose 1% da extração de DNA da amostra ambiental através da utilização do Fast DNA kit (canaleta 3, seta).

A Figura 25 apresenta nas canaletas 1 e 2 são produto de PCR do DNA da amostra ambiental extraído com o kit Ultra Clean Water DNA, com a canaleta 1 sendo utilizado o conjunto de iniciadores CYA 359F/CYA 781R (A+B) e na canaleta 2 sendo utilizado o conjunto de iniciadores 209F/409R, ambos realizados com o kit Ready to Go da Amersham para PCR, e ambos os resultados apresentando bandas inespecíficas (Marcador molecular Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

Apesar da quantidade ter sido pouca na extração com o kit Ultra Clean Water DNA, a mesma foi utilizada por ter gerado um resultado satisfatório quando da etapa de PCR.

Quando da utilização do kit da Mobio, o DNA da amostra ambiental extraída foi diluído em 3 ml da solução WD5, segundo recomendação do protocolo, ficando, desta maneira, bastante diluído.

5.3 Avaliação do Método de PCR das Amostras Estudadas

Logo após a etapa de extração de DNA da amostra ambiental e das culturas puras foi realizada a amplificação dos fragmentos alvos através da técnica de PCR, testando-se diferentes conjuntos de iniciadores que, segundo a literatura correlata, são específicos para o grupo de cianobactérias.

Três conjuntos de iniciadores foram utilizados com os DNAs extraídos de acordo com o protocolo TNES, conforme figuras 26, 27 e 28, utilizando-se o kit Ready to Go (Amersham), na EESC.

Figura 26 – Gel de agarose 1,2% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA 106 F/ CYA 781 R (A+B).

Na Figura 26 foi utilizado marcador de DNA 100 pb DNA Step Ladder (Promega), sendo canaleta 1 *Golenkimia* sp., canaleta 2 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 3 *Scenedesmus* sp., canaleta 4 *Anabaena* sp., canaleta 5 *Ankistrodesmus densus*, canaleta 6 *Thalassiosira* sp., canaleta 7 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 8 *Cryptomonas tetrapy*, canaleta 9 e 10 amostra ambiental.

Figura 27 – Gel de agarose 1,2% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA 359 F/ CYA 781 R (A+B).

Na Figura 27 foi utilizado o marcador de DNA 100 pb DNA Step Ladder (Promega), sendo canaleta 1 *Golenkimia* sp., canaleta 2 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 3 *Scenedesmus* sp., canaleta 4 *Anabaena* sp., canaleta 5 *Ankistrodesmus densus*, canaleta 6 *Thalassiosira* sp., canaleta 7 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 8 *Cryptomonas tetrapy*, canaleta 9 amostra ambiental.

Nas Figuras 26 e 27, os iniciadores CYA 781 R (A) e CYA 781 R (B) foram utilizados em uma mistura equimolar de ambos, isto é, um conjunto composto de uma mistura 1 : 1 de CYA 781 R (A) e CYA 781 R (B), sendo chamado de CYA 781 R (A+B), conforme descrição da utilização deste conjunto de iniciadores pelos seus autores (NÜBEL *et al.*, 1997).

Os reagentes utilizados nas Figuras 26, 27 e 28 estão descritos na Tabela 8 (Item 4.9, Amplificação por PCR, Material e Métodos).

Figura 28 – Gel de agarose 1,2% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores 209 F/ 409 R.

Na Figura 27 foi utilizado o marcador de DNA 100 pb DNA Step Ladder (Promega), sendo canaleta 1 *Golenkimia* sp., canaleta 2 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 3 *Scenedesmus* sp., canaleta 4 *Anabaena* sp., canaleta 5 *Ankistrodesmus densus*, canaleta 6 *Thalassiosira* sp., canaleta 7 *Microcystis aeruginosa*, canaleta 8 *Cryptomonas tetrapy*, canaleta 9 e 10 amostra ambiental.

De acordo com a figura 26, o conjunto de iniciadores CYA 106 F/ CYA 781 R (A+B) deve amplificar em torno de 675 pares de bases, tendo como resultado a não ocorrência de amplificações específicas (*Golenkimia* sp., *Microcystis aeruginosa* e *Cryptomonas tetrapy* amplificaram bandas inespecíficas).

Já na figura 27, o conjunto de *primers* CYA 359 F/ CYA 781 R (A+B) deve amplificar em torno de 675 pares de bases, tendo como resultado a não ocorrência de amplificações específicas (*Golenkimia* sp., *Microcystis aeruginosa* e *Thalassiosira* sp. amplificaram bandas inespecíficas).

Por último, na figura 28, o conjunto de iniciadores 209 F/ 409 R deve amplificar em torno de 200 pares de bases, tendo como resultado a não ocorrência

de amplificações específicas (*Golenkimia* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* sp., *Thalassiosira* sp., *Microcystis aeruginosa* e *Cryptomonas tetrapy* amplificaram bandas inespecíficas).

Pela não obtenção de bandas específicas de PCR para a realização de DGGE, novos PCRs foram realizados no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) – USP, Piracicaba – SP, em conjunto com a mestranda Adriana Sturion Lorenzi e estagiária Caroline Souza Pamplona da Silva, de acordo com resultados a seguir.

Figura 29 – Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA 359 F/ CYA 781 R (A+B), amostra de cultura pura nas canaletas pares e amostra ambiental nas canaletas ímpares provenientes do CENA (Adriana Sturion Lorenzi).

Na Figura 29, utilizou-se o ciclo de PCR descrito por NÜBEL *et al.* (1997), sendo acrescentando desnaturação inicial e extensão final, de acordo com a Tabela 14. Os reagentes utilizados na Figura 29 estão descritos na Tabela 9 (Item 4.9, Amplificação por PCR, Material e Métodos).

Os resultados das amplificações das três reações não foram adequados para o uso posterior em DGGE, por este motivo, optou-se por testar a temperatura de anelamento da reação.

Figura 30 – Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores CYA 359 F/ CYA 781 R (A+B) não degenerado e amostra de cultura pura NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*) com canaletas de 1 a 6 com Taq Polimerase da QbioGene e canaletas de 7 a 12 Taq Platinum da Invitrogen e com gradiente de variação de temperatura de $\pm 10^{\circ}\text{C}$.

Para a realização de diferentes gradientes de temperatura, optou-se pela utilização do Termociclador Gradient da Brinkmann, com o programa para aquecimento no bloco, aquecimento inicial a 105°C , com ciclo de NÜBEL *et al.* (1997) de acordo com a Tabela 14. Foram testadas seis diferentes temperaturas, com os tubos no termociclador somente em canaletas pares, a $50,3^{\circ}\text{C}$; $53,3^{\circ}\text{C}$; $58,1^{\circ}\text{C}$; $63,5^{\circ}\text{C}$; $68,1^{\circ}\text{C}$; $70,5^{\circ}\text{C}$. As canaletas 3 ($58,1^{\circ}\text{C}$), 4 ($63,5^{\circ}\text{C}$) e 5 ($68,1^{\circ}\text{C}$) foram as que apresentaram bandas definidas, conforme Figura 30. A melhor temperatura de anelamento, segundo este teste, foi de $63,5^{\circ}\text{C}$.

Os reagentes utilizados na Figura 30 estão descritos na Tabela 10 (Item 4.9, Amplificação por PCR, Material e Métodos).

Lorenzi realizou um PCR testando diferentes conjuntos de iniciadores, conforme figura abaixo.

Figura 31 – Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores não publicado nas canaletas 1 e 2; *nested* de produto de iniciadores 27F1/1494R, utilizando iniciadores 27F1/409R nas canaletas 3 e 4; *nested* de produto de iniciadores 27F1/1494R, utilizando iniciadores 209F/409R nas canaletas 5 e 6.

O programa do termociclador foi realizado segundo Cézar Crespim, UFRGS, conforme dados fornecidos por Lorenzi e descritos na Tabela 14. As amostras testadas foram NPJB-1 nas canaletas ímpares e NPDC-1 nas canaletas pares. A amostra da canaleta 3 foi utilizada no primeiro DGGE.

Na amostra ambiental foi realizado o PCR do fragmento RNAr 16S com o conjunto de iniciadores 27F1 / 1494R, com ciclo de PCR conforme tabela 14.

Figura 32 – Gel de agarose 1% com produto de PCR, utilizando conjunto de iniciadores 27F1 / 1494 R com a amplificação do fragmento do RNAr 16S.

A amplificação do fragmento do RNAr 16S foi positiva, sendo que os iniciadores utilizados, 27F1 e 1494 R amplificam em torno de 1467 pares de bases, confirmado pelo marcador de DNA utilizado no gel. Os reagentes utilizados na Figura 32 estão descritos na Tabela 11 (Item 4.9, Amplificação por PCR, Material e Métodos).

Após a realização da amplificação do fragmento do RNAr 16S, foi realizado *nested* com este produto de PCR como amostra a ser re-amplificada, mas com diferentes conjuntos de iniciadores.

Figura 33 – Gel de agarose 1% realizado *nested* de PCR, utilizando conjunto de iniciadores 27F1/ primer não publicado na canaleta 1, iniciadores 27F1 / 409 R na canaleta 2 e iniciadores CYA 359F / CYA 781R (A+B) com a amostra ambiental.

Os resultados obtidos não foram considerados satisfatórios, sendo então realizadas diluições de 50X, 100X, 500X e 1000X do produto do PCR do fragmento do RNAr 16S.

Estas diluições foram então utilizadas em *nested* PCR, utilizando-se os conjuntos de iniciadores 27F1 / 409 R (NEILAN *et al.*, 1997) e CYA359F / CYA 781R (A+B) (NÜBEL *et al.*, 1997).

Figura 34 – Gel de agarose 1% com *nested* PCR.

Na Figura 34, utilizando-se produto de PCR de 27F1 / 1494R diluído 50X (canaleta 1), 100 X (canaleta 2), 500 X (canaleta 3) e 1000 X (canaleta 4) com o conjunto de iniciadores 27F1/409R e diluído 50X (canaleta 5), 100 X (canaleta 6), 500 X (canaleta 7) e 1000 X (canaleta 8) com o conjunto de iniciadores e CYA359F / CYA 781R (A+B). Os reagentes utilizados na Figura 34 estão descritos na Tabela 12 (Item 4.9, Amplificação por PCR, Material e Métodos).

As canaletas 1 e 2 foram misturadas e utilizadas para a realização do primeiro DGGE.

Os iniciadores universais que incluem múltiplos nucleotídeos em posições degeneradas têm sido frequentemente utilizados para estudos com PCR em ecologia molecular microbiana. Porém, tem sido reportado que erros ocorrem em proporções de produtos de regiões alvo em PCR quando utilizados iniciadores degenerados, isto é, regiões alvo em sítos ricos em GC é onde ocorre a amplificação preferencialmente (WATANABE *et al.*, 2001).

O conjunto de iniciadores utilizado para a amplificação no PCR e que foi utilizado no primeiro DGGE possui seu iniciador 409R degenerado, de acordo com sua sequência: TTACAA(C/T)CCAA(G/A)(G/A)(G/A)CCTTCCTCCC, podendo gerar, desta maneira, as seguintes combinações de PCR, conforme tabela 15:

Tabela 15 – Combinações dos iniciadores utilizados em PCR e posteriormente no primeiro DGGE.

Iniciador 27F1 (Neilan *et al.*, 1997): não degenerado

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

Iniciador 409R (Neilan *et al.*, 1997): degenerado

TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC

TTACAACCCAAAGGCCTTCCTCCC

TTACAACCCAAAAGCCTTCCTCCC

TTACAACCCAAAACCTTCCTCCC

TTACAACCCAAGAACCTTCCTCCC
 TTACAACCCAAGGACCTTCCTCCC
 TTACAACCCAAGAGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC
 TTACAATCCAAGGCCTTCCTCCC

Para a realização de um novo DGGE, optou-se pela realização de um *nested* PCR partindo do fragmento de RNAr 16S (iniciadores 27F1 e 1494R) amplificado com os iniciadores para bactéria 338FGC e 518R (± 210 pb) (ØVREÅS *et al.*, 1997), de acordo com a figura 35 abaixo:

Figura 35 – Gel de agarose 1% com *nested* PCR, utilizando-se produto de PCR de 27F1 / 1494R com o conjunto de iniciadores 338FGC e 518R.

Na Figura 35 apresenta a canaleta 1 cultura pura NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*), canaleta 2 cultura pura NPDC-1 (*Microcystis aeruginosa*), canaleta 3 cultura pura 339T3 (*Cylindrospermopsis raciborskii*), canaleta 4 cultura pura

SPC702 (*Microcystis panniformis*), canaleta 5 amostra ambiental e canaleta 6 branco.

A primeira amplificação realizada é considerada específica para cianobactérias, com os iniciadores 27F1 e 1494R, por isso optou-se pela realização de *nested* com os iniciadores 338F e 518R, mesmo não sendo específico para este grupo, pois, teoricamente, só ocorre re-amplificação de cianobactérias.

Os reagentes utilizados na Figura 35 estão descritos na Tabela 13 (Item 4.9, Amplificação por PCR, Material e Métodos) e o ciclo utilizado no PCR na Tabela 14.

A partir deste novo PCR (figura 35) foi realizado o segundo DGGE, conforme dados do item 5.4.

5.4 Avaliação do Método de DGGE das Amostras Estudadas

O DGGE foi realizado de acordo com os itens 4.10 (Quantificação do DNA) e 4.11 (DGGE) do Material e Métodos.

O gel de DGGE realizado utilizaram produtos de PCR *nested* do conjunto de iniciadores 27F1 / 1494R e posterior uso do conjunto de iniciadores 27F1 / 409R, na amostra ambiental e na cultura pura NPDJ-1 (*Microcystis aeruginosa*). Este conjunto de iniciadores foi testado no DGGE, mas não apresentou um resultado satisfatório.

Um novo gel de DGGE foi realizado, utilizando produtos de PCR *nested* do conjunto de iniciadores 27F1 / 1494R e posterior uso do conjunto de iniciadores 338FGC / 518R na amostra ambiental e nas culturas puras NPDJ-1 (*Microcystis aeruginosa*), NPDC-1 (*Microcystis aeruginosa*), 339T3 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) e SPC702 (*Microcystis panniformis*), (figura 36).

Figura 36 – Gel de poliacrilamida de 8% com gradientes de desnaturação de 15% e 55%, sendo canaleta 1 cultura pura NPJB-1 (*Microcystis aeruginosa*), canaleta 2 cultura pura NPDC-1 (*Microcystis aeruginosa*), canaleta 3 cultura pura 339T3 (*Cylindrospermopsis raciborskii*), canaleta 4 cultura pura SPC702 (*Microcystis panniformis*) e canaleta 5 amostra ambiental.

De acordo com a figura acima, temos 4 bandas que ocorrem nas duas culturas puras (NPJB-1 e NPDC-1) e na amostra ambiental, marcadas com seta preta; 3 bandas que ocorrem somente em uma cultura pura (NPJB-1) e na amostra ambiental, marcadas com seta vermelha; e 2 bandas que ocorrem somente em uma cultura pura (NPDC-1) e na amostra ambiental, marcadas com seta azul. A canaleta 3, com amostra ambiental, apresenta pelo menos 9 bandas onde não

ocorre o pareamento com as amostras puras, tendo pelo menos 18 bandas visíveis ao todo.

A quantificação de DNA das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular de Solos – ESALQ – USP, utilizando o sistema Fragment Analysis, através de gel de agarose com 2 µl de marcador molecular como padrão. A cultura pura NPDJ-1 apresentou 57,48 ng de DNA, cultura pura NPDC-1 79,83 ng de DNA, cultura pura 339T3 104,5 ng de DNA, cultura pura SPC702 89,2 ng de DNA e a amostra ambiental 121,22 ng de DNA. Para a corrida do segundo gel de DGGE foram utilizados 500 ng de DNA por amostra em cada canaleta.

Podemos interpretar os géis de DGGE acima apresentados de acordo com quatro possibilidades que estejam ocorrendo com as amostras:

1º – Problemas ocorridos durante a fase de PCR.

Através de iniciadores degenerados, pode ocorrer a amplificação de vários fragmentos com diferentes pares de bases, de acordo com o número de pares de bases degenerados.

Pode ocorrer a formação de moléculas heteroduplex, isto é, moléculas formadas durante o mix de amostra de PCR quando ocorre o anelamento entre produtos similares mas que não são idênticos (FERRIS & WARD, 1997). Heteroduplex é uma molécula híbrida de DNA-DNA formada entre seqüências (presumidamente homólogas). A formação de heteroduplex entre genes alvo e outros fragmentos pode tornar difícil o isolamento de seqüências uniformes. Uma variação súbita na estabilidade do duplex DNA de acordo com sua seqüência nucleotídica pode ser detectada por desnaturação do DNA dupla fita em fita simples em um gel de DGGE. Os heteroduplex, sendo moléculas compostas de fitas de dois diferentes alelos, resultam em mobilidades diferentes durante a eletroforese através de gel de poliacrilamida (HILLIS *et al.*, 1996).

A amplificação seletiva de algumas amostras de misturas de um ou mais alvos resulta na perda de representação do gene abundante no produto final de PCR. Uma das ocorrências de amplificações seletivas é quando a amostra contém baixo G+C, porque genes com alto G+C se dissociam em uma molécula de fita simples com menor eficiência do que amostras com baixo G+C. Desta maneira, amostras com baixo G+C estão sendo superestimadas em uma população de moléculas de fita simples disponíveis para se hibridizarem com os iniciadores (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996).

2º – Ocorrência de sub-espécies e processo evolutivo da espécie.

A definição de populações de DNAr 16S com a diversidade de seqüências limitadas muda com o tempo. Análise de similaridade de seqüências ambientais próximas relatadas de RNAr 16S deve atualmente representar números próximos relatados de populações, mesmo com distinções ecológicas. Um estudo molecular e fisiológico de cepas de culturas de *Prochlorococcus* sp. demonstrou uma diversidade genética e fisiológica de populações de cianobactérias com um índice alto de similaridade nas seqüências de RNAr 16S. A função exercida pelo guilda microbiano no ambiente persiste, mas a identidade das populações microbianas deve mudar com o tempo como uma resposta adaptativa a pressões e de condições flutuantes. Esta pode ser uma possível resposta do por que várias cepas isoladas podem ser obtidas de amostras ambientais e estas mesmas cepas isoladas não alcançarem seqüências predominantes de organismos em um certo período de tempo (CASAMAYOR *et al.*, 2002).

Algumas variações genéticas foram observadas em cepas de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis ichthyoblabe*, de acordo com análises moleculares realizadas pelo método de RAPD e de divergências em alozimas (um alelo de uma enzima). Estudos realizados com alozimas com o gênero *Microcystis* demonstram que algumas espécies são altamente polimórficas em genótipos de alozimas (NISHIHARA *et al.*, 1997).

Cepas do gênero *Microcystis* podem ter padrões diferentes evolutivamente de DNAr 16S e do gene *rbcLX*. Na posição 234, por exemplo, das cepas NIVA-

CYA 118/2, 161/1, 144, dentre outras, possuem uma base T nas seqüências publicadas de DNAr 16S para *Microcystis aeruginosa* NIVA-CYA 43, enquanto outras cepas apresentaram a base C nesta posição. Ocorrem somente 0,005 substituições de nucleotídeos por posição entre as cepas mais divergentes entre os gêneros *Microcystis* e *Planktothrix* (RUDI *et al.*, 1998).

Torna-se evidente que populações de *Microcystis* presentes em florações compõem um mosaico, com indivíduos geneticamente diferentes dentro da mesma população, sendo que cada um, possivelmente, apresenta sua própria tolerância a fatores ambientais e distintos potenciais tóxicos (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003).

3º – Diferentes cópias do gene RNAr 16S.

Estudo realizado com *Paenibacillus polymyxa* demonstrou que, quando utilizadas culturas puras em TGGE de várias cepas de bactérias, resultava números de bandas, indicando sua heterogeneidade. A razão para este fenômeno é a existência de vários cistrons que codificam o RNAr 16S com diferentes seqüências em um único genoma. Quando mais de um gene RNAr 16S de um genoma de eubactéria foi analisado, as seqüências determinadas têm sido idênticas ou diferem uma das outras por menos de 1% das posições de nucleotídeos. Tal grau de heterogeneidade da pequena unidade dos genes RNAr de uma cepa não foi descrita para bactérias, mesmo com estas possuindo múltiplos operons *rrn*. Em sete genes que codificam o RNAr 16S no genoma da *E. coli*, 16 sítios variáveis foram detectados. Além disso, alguns resultados indicam variações na composição do ribossomo, dependendo das condições de crescimento em cultivo e de sua idade. Estes autores concluem o artigo da seguinte maneira: “A interpretação dos dados de seqüências deve ser complicado pela presença de várias moléculas equivalentes com algum grau de evolução individual diferente dentro de um mesmo organismos” (NÜBEL *et al.*, 1996).

CASAMAYOR *et al.* (2000), realizaram um DGGE em lagos sulfurosos, discutindo que várias dificuldades na interpretação dos dados ocorrem, como problemas intrínsecos à cinética de amplificação de PCR, à formação de

heteroduplex e bandas múltiplas no DGGE. A possibilidade que um único organismo possua múltiplos operons de RNAr 16S com diferentes comportamentos de migração no gel de DGGE foi eliminado com a realização de seqüenciamento. O maior problema encontrado parece ter sido a presença de seqüências diferentes em posições iguais ou bem similares na impressão digital.

Parece que a maioria, se não todas, as cianobactérias possuem cópias múltiplas do genoma. Mesmo em células bem pequenas e com formas morfológicas simples, como a *Synechococcus* e a *Synechocystis*, devem conter seis “cromossomos” idênticos (WHITTON & POTTS, 2000).

Existe a possibilidade que diferentes seqüências representem diferentes genes de RNAr 16S dentro da mesma espécie. Algumas culturas puras apresentam seqüências idênticas a algumas amostras ambientais e diferentes seqüências têm demonstrado distribuições desiguais ambientais dentro de uma mesma espécie (WARD & CASTENHOLZ, 2000).

4º – Amplificação não específica de um gênero ou classe.

GARCIA-PICHEL *et al.* (1996) utilizaram a técnica de DGGE na espécie *Microcoleus chthonoplastes* para demonstrar que ela é uma cianobactéria cosmopolita, mas em algumas amostras analisadas ocorreu o aparecimento de várias bandas, provavelmente produtos amplificados por PCR de organismos contaminantes.

Todos os iniciadores utilizados por NÜBEL *et al.* (1997) em estudos com cianobactérias alcançaram algumas seqüências de RNAr 16S de bactérias que não pertencem a este filo. CYA 359F alcança a seqüência de RNAr 16S de um número de bactérias gram-positivas que possuem baixo G+C no DNA genômico (*Heliobacterium* sp., algumas halófitas anaeróbias, *Desulfotomaculum* e *Syntrophomonas*).

Para que as hipóteses de formação de heteroduplex, presença de sub-espécies e diferentes cópias de RNAr 16S fossem avaliadas, seria necessário a realização de seqüenciamento da amostra ambiental e posterior análise em bancos

de dados genômicos. Este teste não foi realizado no presente estudo, não sendo possível, desta maneira, descartar nenhuma das possibilidades acima apresentadas as quais podem ter ocorrido com o DGGE aqui avaliados.

Quanto à especificidade do PCR, este estudo somente utilizou Taq polimerases comuns, as quais aumentam a chance de ocorrência de bandas inespecíficas de PCR. Uma maneira de se evitar este problema é através do uso de Taq polimerases específicas, como a Taq Platinum Hight Fidelity e a Super Taq, as quais não foram utilizadas no PCR para a realização de DGGE. A Taq Platinum foi testada neste experimento (figura 30), não apresentando bandas quando utilizada em PCR com cultura pura.

Para saber sobre homologia das seqüências dos iniciadores utilizados no PCR com as espécies *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis flos-aquae*, foram realizados *blasts* com as seqüências disponíveis no GenBank, utilizando-se o programa do NCBI e Ribosomal Database ProjectII, conforme anexos III (com *Microcystis aeruginosa*), IV (com *Microcystis flos-aquae*), V (com *Synechococcus* sp.) e VI (alvos potenciais dos iniciadores utilizados). Um resumo dos resultados encontrados pode ser visto na tabela 16, abaixo:

Tabela 16 – Dados obtidos com *blast* para as espécies analisadas neste estudo.

Amostra \ Iniciador	27F1	1494R	338F	518R	409R
<i>Microcystis aeruginosa</i> (NEILAN)	100 %	Não	100 %	100 %	Não
<i>Microcystis aeruginosa</i> (TILLET)	Não	Não	100 %	100 %	Não
<i>Microcystis aeruginosa</i> (OTSUKA)	Não	100 %	100 %	100 %	Não
<i>Microcystis flos-aquae</i> (LOPERE)	Não	Não	100 %	Não	Não
<i>Microcystis flos-aquae</i> (TILLET 1)	Não	Não	100 %	100 %	Não
<i>Microcystis flos-aquae</i> (TILLET 2)	Não	Não	100 %	100 %	Não
<i>Synechococcus</i> (CROSBIE)		100 %			
Similaridade com cianobactéria	Sim	Não	Não	Sim	Não

De acordo com a tabela acima, os iniciadores 27F1 e 518R possuem seqüências com similaridade para a amplificação do grupo cianobactéria. O conjunto de iniciadores 27f1 / 1494R, para o fragmento RNAr 16S não apresentou

alinhamento com as seqüências analisadas pelo número alto de pares de bases que o mesmo apresenta. Somente com a amostra de *Microcystis flos-aquae* (LOPERE) que o *nested* realizado com o conjunto de iniciadores 338F / 518r não se alinhou e não apresentou similaridade com cianobactérias. Pelos resultados obtidos, nenhum dos iniciadores utilizados é específico para o grupo de cianobactérias, apesar de ter sido mencionado em artigos que alguns destes conjuntos são específicos para este filo.

O iniciador CYA 359F apresenta uma região degenerada (Y = C/T) e a mistura equimolar dos iniciadores CYA 781 R (A) e CYA 781R (B) apresenta duas bandas diferentes entre si. Desta maneira, apesar dos autores destes iniciadores terem realizado DGGE (NÜBEL *et al.*, 1997), a utilização de iniciadores que amplificam mais de uma seqüência de bandas gera como resultado um padrão de mais de uma banda no método de DGGE, mesmo para uma cultura pura. A utilização destes iniciadores não deve ser empregada em DGGE, pois este método detecta a diferença de até um par de bases nas amostras analisadas, não sendo possível a interpretação de dados com iniciadores degenerados sem um seqüenciamento posterior para a confirmação dos resultados obtidos.

BAKER *et al.* (2002) identificaram microscopicamente em uma floração *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis flos-aquae*, sendo que ambas apresentam diferenças em seqüências de PC-IGS, o que confirma que pelo menos duas espécies estavam presentes nesta floração.

Não se descarta, também, a possibilidade de contaminação das amostras puras quando da etapa de laboratório e da presença de bactérias anexadas na bainha de mucilagem que as espécies de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis flos-aquae* apresentam.

6. CONCLUSÕES

- Métodos moleculares foram possíveis de serem empregados em amostras naturais de sistemas de lagoas de estabilização com o grupo de cianobactérias, inclusive, com espécies de *Microcystis*. Porém, estes métodos precisam ser otimizados de acordo com cada amostra.
- Os protocolos de extração de DNA realizados com e sem os kits prontos disponíveis no mercado apresentaram resultados satisfatórios. O uso do kit foi considerado melhor por diminuir os riscos de erros quando da realização dos reagentes e possíveis contaminações, além de consumirem tempo bem menor para a sua realização. Quando do teste do Protocolo de Bolch *et al.* (1996), foi necessário um dia inteiro de laboratório ocorrendo a manipulação de fenol e clorofórmio, uma etapa de *overnight* e a obtenção do resultado após um período e meio. Quando da utilização do Fast DNA Kit, gasta-se o tempo de meio período.
- marcador molecular 100 pb DNA Step Ladder, da Promega, não mostrou eficiência para o tipo de amostra pesquisada, sendo utilizado o marcador molecular Low DNA Mass Ladder, da Invitrogen, que apresentou melhor resultado para a amostra analisada.
- Não foi possível conseguir resultados positivos com os conjuntos de iniciadores CYA106F / CYA781R (A+B) e CYA359F / CYA781R (A+B) (NÜBEL *et al.*, 1997), que, segundo o artigo, é específico para cianobactérias. O conjunto de iniciadores CYA359F / CYA781R (A+B) não degenerado apresentou resultado positivo quando do teste no termociclador com gradiente de temperatura.

- A utilização do termociclador com gradiente de temperatura apresentou o melhor resultado de T_m para a amostra ambiental estudada de 63,5°C, sendo 3,5°C superior ao recomendado.
- O conjunto de iniciadores para a amplificação do fragmento RNAr 16S (27 F1 / 1494 R) obteve resultados positivos, sem apresentar bandas inespecíficas, sendo indicado para a amostra ambiental pesquisada.
- Os melhores resultados obtidos com a amostra ambiental foram provenientes de um conjunto de iniciadores não publicado, sendo, por este motivo, somente testado e não utilizado no DGGE, aguardando a publicação dos mesmos.
- Os iniciadores degenerados devem ser evitados de serem usados em PCR para o posterior uso pela técnica de DGGE, por ter como resultado mudanças de pares de bandas de acordo com o número de degenerações que o iniciador possui, apesar de ter sido utilizado por NÜBEL *et al.* (1997) em um DGGE e ter apresentado uma única banda com as culturas puras, resultado este não possível de ser reproduzido nesta pesquisa.
- A utilização de Taq polimerase comum, não sendo a Taq polimerase de alta fidelidade, pode apresentar bandas inespecíficas quando utilizada em PCR para posterior uso em DGGE.
- O aparecimento de um padrão com várias bandas nos géis de DGGE em culturas puras indicam que este método não está sendo eficiente com as amostras analisadas, precisando de uma melhor otimização.
- Os conjuntos de iniciadores avaliados não apresentaram especificidade para somente o grupo de cianobactérias segundo Blast realizados, podendo, desta maneira, estar amplificando bactérias não objeto do estudo quando da etapa do PCR.

- Somente através de seqüenciamento posterior das bandas do gel de DGGE podem ser descartadas as hipóteses de formação de heteroduplex no PCR, a ocorrência de sub-espécies nas amostras analisadas, múltiplos genes do RNAr 16S e a confirmação da seqüência de DNA em bancos de dados ribossômicos confrontado com o resultado da amostra analisada microscopicamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERSHAM BIOSCIENCES (2002). *Biodirectory 2002*. Denmark, Stibo Graphic. Catálogo da Amersham Biosciences.
- ARCEIVALA, S.J. (1986). *Wastewater treatment for pollution control*. New Delhi, Tata McGraw-Hill Publishing Company limited. 187 p.
- ARIAS, M.C. & INFANTE-MALACHIAS, M.E. (2001). RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S.R., ed. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto, Editora Holos. Capítulo 14, p. 143-152.
- AZOV, Y.; SHELEF, G. (1987). The effect of pH on the performance of high-rate oxidation ponds. *Water Science & Technology*. v. 19, n. 12, p. 381-383.
- BAKER, J.A.; ENTSCH, B.; NEILAN, B.A.; MCKAY, D.B. (2002). Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacteria bloom by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 68, n. 4, p. 6070-6076, dec.
- BELTRAN, E.C.; NEILAN, B.A. (2000). Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, n. 10, p. 4468-4474, oct.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. (2003). Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. *Harmful Algae*. v. 40, p. 1-10 (in press).
- BITTON, G. (1994). *Wastewater Microbiology*. New York, Wiley-Liss.
- BOLCH, C.J.S.; BLACKBURN, S.I.; NEILAN, B.A.; GREWE, P.M. (1996). Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions. *Journal Phycol.* v. 32, p. 445-451.

- BRANCO, S.M. (1975). Aspectos biológicos: plâncton. In: CETESB, *Lagoas de Estabilização*. São Paulo, Cetesb, 2ª edição. Capítulo 13, p. 187-195.
- BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. (1988). *Biology of microorganisms*. New Jersey, Prentice-Hall.
- BRUCHA, G. (2002). *Avaliação da diversidade microbiana de consórcios anaeróbios enriquecidos a partir de amostras de sedimento lacustre na degradação anaeróbia do tricloroetileno – TCE, empregando-se a técnica de Eletroforese em gel com gradiente desnaturante – DGGE*. São Carlos. 150 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – CRHEA – Universidade de São Paulo.
- CAMPOS, J.R.; REALI, M.A.; DANIEL, L.A. (2000). *Conceitos gerais sobre técnicas de tratamento de águas de abastecimento, esgotos sanitários e desinfecção*. São Carlos. /Relatório técnico EESC-USP/
- CASAMAYOR, E.O.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MUYZER, G.; AMANN, R. (2002). . Microheterogeneity in 16S Ribosomal DNA-Defined bacterial populations from a stratified planktonic environmental is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 68, n. 4, p. 1706-1714, apr.
- CASAMAYOR, E.O.; SCHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MUYZER, G. (2000). Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, n. 2, p. 499-508, feb.
- CATTONY, E.B.M. (2001). *Avaliação da diversidade microbiana e das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar*. São Carlos. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – CRHEA – Universidade de São Paulo.
- CEBALLOS, B.S.O. (2000). Eliminación de microorganismos por medio del tratamiento de las aguas residuales. In: MENDONÇA, S.R. *Sistemas de lagunas de estabilización. Cómo utilizar aguas residuales tratadas en sistemas de regadío*. Colombia, McGraw-Hill. p. 107-137.

- CERQUEIRA, M.B. (1995). *Caracterização limnológica e produtividade primária em lagoas de estabilização em São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil*. São Carlos. 113 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – CRHEA – Universidade de São Paulo.
- CETESB (1990). *Avaliação de desempenho de lagoas de estabilização*. São Paulo, Cetesb. 15 p.
- CURTIS, T.P.; CRAINE, N.G. (1998). The comparison of the diversity of activated sludge plants. *Water Science & Technology*. v. 37, n. 4-5, p. 71-78.
- CURTIS, T.P.; MARA, D.D. (1994). *The effect of sunlight on mechanisms for the die-off of faecal coliform bacteria in waste stabilization ponds*. Leeds, University of Leeds. /Research Monographs in Tropical Public Health Engineering/Research Monograph n. 1.
- DANIELL, E. (1994). PCR in the marketplace. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A., ed. *PCR – The Polymerase Chain Reaction*. Chapter 34, p 421-426.
- DI BERNARDO, L. (1995). *Algas e suas influências na qualidade das águas e nas tecnologias de tratamento*. Rio de Janeiro, ABES, p. 31-36.
- EPA (1992). *Wastewater treatment/disposal for small communities*. Office of Water. Washington, Environmental Protection Agency. EPA/625/R-92/005.
- FANTINATTI, F. (2000). Caracterização molecular de microrganismos isolados – métodos baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction). In: *Métodos moleculares para a avaliação de diversidade microbiana – Curso Fundação André Toselo*. 2º artigo. p. 1-11.
- FERRIS, M.J.; MUYZER, G.; WARD, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 2, p. 340-346, feb.
- FERRIS, M.J.; NOLD, S.C.; REVSBECH, N.P.; WARD, D.M. (1997). Population structure and physiological changes within a hot spring microbial mat community following disturbance. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 63, n. 4, p. 1367-1374, apr.

- FERRIS, M.J.; WARD, D.M. (1997). Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 63, n. 4, p. 1375-1381, apr.
- FIORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (2000). Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. v. 39, p. 159-169.
- GARCÍA-MARTINÉZ, J.; ACINAS, S.G.; ANTÓN, A.I.; RODRÍGUES-VALERA, F. (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*. v. 36, p. 55-64.
- GARCIA-PICHEL, F.; PRUFERT-BEBOUT, L.; MUYZER, G. (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 9, p. 3284-3291, sep.
- GASI, T.M.A. (1988). *Opções para tratamento de esgotos de pequenas comunidades*. São Paulo: CETESB. Série Manuais. p. 12, 14.
- GLOYNA, E.F. (1973). *Estanques de estabilizacion de aguas residuales*. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. 192 p.
- HANSEN, M.C.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. (1998). Biased DNAr 16SPCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS – Microbiology Ecology*. v. 26, p. 141-149.
- HAYASHI, K. (1994). Manipulation of DNA by PCR. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A., ed. *PCR – The Polymerase Chain Reaction*. CHAPTER 1, p. 3-13.
- HELLER, M.J. (1994). Fluorescence detection methods for PCR analysis. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A., ed. *PCR – The Polymerase Chain Reaction*. CHAPTER 11, p. 134-141.
- HESS, M.L. (1975a). Lagoas aeróbias. In: CETESB, *Lagoas de Estabilização*. São Paulo, Cetesb, 2ª edição. Capítulo 5, p. 55-66.
- HESS, M.L. (1975b). Lagoas anaeróbias. In: CETESB, *Lagoas de Estabilização*. São Paulo, Cetesb, 2ª edição. Capítulo 6, p. 67-75.

- HESS, M.L. (1975c). Lagoas facultativas. In: CETESB, *Lagoas de Estabilização*. São Paulo, Cetesb, 2ª edição. Capítulo 7, p. 77-97.
- HILLIS, D.M., MORITZ, C.; MABLE, B.K. (ed). (1996). *Molecular systematics*. E.U.A.: Sinauer Associates, Inc.
- INNIS, M.A. & GELFAND, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J., ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Chapter 1, p. 3-12.
- KAEBERNICK, M. & NEILAN, B.A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS – Microbiology Ecology*. v. 35, p. 1-9.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. (2001a). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research*. v. 8, p. 205-213.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. (2001b). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research Supplement*. v. 8, p. 227-253.
- KAYOMBO, S.; MBWETTE, T.S.A.; MAYO, A.W.; KATIMA, J.H.Y.; JORGENSEN, S.E. (2000). Modelling diurnal variation of dissolved oxygen in waste stabilization ponds. *Ecological Modelling*. v. 127, p. 21-31.
- KELLNER, E. & PIRES, E.C. (1998). *Lagoas de estabilização: projeto e operação*. Rio de Janeiro, ABES. 240 p.

- KIVAISI, A.K. (2001). The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review. *Ecological Engineering*. v. 16, 545-560.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. (1999). *Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales süßwasserflora von Mitteleuropa*. Germany, Ed. Gustav Fischer. p. 222-236.
- KÖNIG, A. (2000). Biología de las lagunas de estabilización: algas. In: MENDONÇA, S.R. *Sistemas de lagunas de estabilización. Cómo utilizar aguas residuales tratadas en sistemas de riego*. Colombia, McGraw-Hill. p. 44-67.
- KÖNIG, A.; PEARSON, H.W.; SILVA, S.A. (1987). Ammonia toxicity to algal growth in waste stabilization ponds. *Water Science & Technology*. v. 19, n. 12, p. 115-122.
- KOTANI, H.; KANEKO, T.; MATSUBAYASHI, T.; SATO, S.; SUGIURA, M.; TABATA, S. (1994). A physical map of the genome of a unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Research*. v. 1, p. 303-307.
- KOTANI, H.; TANAKA, A.; KANEKO, T.; SATO, S.; SUGIURA, M.; TABATA, S. (1995). Assignment of 82 known genes and gene clusters on the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *DNA Research*. v. 2, p. 133-142.
- LESSA, E.P. (1993). Analysis of DNA sequence variation at population level by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. v. 224, p. 419-428.
- LIU, W.; LINNING, K.D.; NAKAMURA, K.; MINO, T.; MATSUO, T.; FORNEY, L.J. (2000). Microbial community changes in biological phosphate-removal systems on altering sludge phosphorus content. *Microbiology*. v. 146, p. 1099-1107.
- LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; GUGGER, M.; VEZIE, C.; SUNDMAN, P.; PAULIN, L.; SIVONEN, K. (2001). Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix*

- genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 513-526.
- MATIOLI, S.R. & PASSOS-BUENO M.R.S. (2001). Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R., ed. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto, Editora Holos. Capítulo 15, p. 153-161.
- MENDONÇA, S.R. (1990). *Lagoas de estabilização e aeradas mecanicamente: novos conceitos*. João Pessoa, Sergio Rolim Mendonça.
- MENDONÇA, S.R. (2000). *Lagunas de estabilización*. In: MENDONÇA, S.R. *Sistemas de lagunas de estabilización. Cómo utilizar aguas residuales tratadas en sistemas de regadío*. Colombia, McGraw-Hill. p. 198-256.
- METCALF & EDDY (1991). *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse*. Singapore, McGraw-Hill. 3rd edition.
- MOFFITT, M.C.; BLACKBURN, S.I.; NEILAN, B.A. (2001). rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 505-512.
- MULLIS, K.B. (1994). PCR and scientific invention: the trial of DuPont vs. Cetus. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A., ed. *PCR – The Polymerase Chain Reaction*. CHAPTER 35, p. 427-441.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology /mini review/. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 73, p. 127-141.
- MUYZER, G; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 59, n. 3, p. 695-700, mar.
- MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. (1986). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. v. 155, p. 501-527.

- NEILAN, B.A. (1996). Detection and identification of cyanobacteria associated with toxic blooms: DNA amplification protocols. *Phycologia*. v. 35, supplement 6, p. 147-155.
- NEILAN, B.A.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. (1994). Towards a molecular taxonomy for the bloom-forming Cyanobacteria. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. v. 45, p. 869-873.
- NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DOT, T.D.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 47, n. 3, p. 693-697, jul.
- NISHIHARA, H.; MIWA, H.; WATANABE, M.; NAGASHIMA, M.; YAGI, O.; TAKAMURA, Y. (1997). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* v. 61, n. 7, p. 1067-1072.
- NIELSEN, A.T.; LIU, W.; FILIPE, C.; GRADY JR., L.; MOLIN, S.; STAHL, D.A. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 3, p. 1251-1258, mar.
- NÜBEL, U.; ENGELN, BERT; FELSKE, A.; SNAIRD, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. v. 178, n. 19, p. 5636-5643, oct.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KÜHL, M.; MUYZER, G. (1999). Quantifying microbial diversity: morphotypes, rRNA 16S genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 2, p. 422-430, fev.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZEN, G. (1997). PCR primers to amplify rRNA 16S genes of cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 63, n. 8, p. 3327-3332, aug.
- ODUM, E.P. (1977). *Ecologia*. 3.ed. São Paulo, Pioneira.

- OLIVEIRA, M.C. & MENCK, C.F.M. (2001). O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida. In: MATIOLI, S.R., ed. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto, Editora Holos. Capítulo 2, p. 15-26.
- OLIVEIRA, V.M. (2000). Métodos moleculares para a caracterização da diversidade microbiana. In: *Métodos moleculares para a avaliação de diversidade microbiana* – Curso Fundação André Toselo. 3º artigo. p. 1-17.
- ORTEGA, C.H. (1975). Instalaciones en America latina. Resultados. In: CETESB, *Lagoas de Estabilização*. São Paulo, Cetesb, 2ª edição. Capítulo 2, p. 7-16.
- OTSUKA, S.; SUDA, S.; SHIBATA, S.; OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M.M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacterial Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 873-879.
- ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 63, n. 9, p. 3367-3373, sept.
- PEARSON, H.W. (1996). The microbiology of waste stabilization ponds and wastewater storage and treatment reservoirs and its impact on design. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO DE ESGOTOS SANITÁRIOS. Anais do Seminário Internacional de tratamento e disposição de esgotos sanitários: tecnologia e perspectivas para o futuro. Brasília, Companhia de Água e Esgotos de Brasília. p. 128-152.
- PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; BARTONE, C.R. (1987a). Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full-scale waste stabilization pond systems. *Water Science & Technology*. v. 21, n. 9, p. 1067-1075.
- PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; KÖNIG, A.; OLIVEIRA, R.; MILLS, S.W.; SMALLMAN, D.J.; SILVA, S.A. (1987b). Water column samplings as a rapid and efficient method of determining effluent quality and the performance of waste stabilization ponds. *Water Science & Technology*. v. 19, n. 12, p. 109-113.

- PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; MILLS, S.W.; SMALLMAN, D.J. (1987). Factors determining algal populations in waste stabilization ponds and the influence of algae on pond performance. *Water Science & Technology*. v. 19, n. 12, p. 131-140.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. (1981). *Microbiologia*. vol. II. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil.
- PIPES JR., W.O. (1961). Basic biology of stabilization ponds. *Water & Sewage Works*. April. p. 131-136.
- PIZZA, F.F. (2000). Princípios de isolamento e purificação de ácidos nucleicos. In: *Métodos moleculares para a avaliação de diversidade microbiana – Curso Fundação André Toselo*. 1º artigo. p. 1-11.
- POLISEL, K.C. (2001) *Estudo de caso: estratificação térmica e eficiência na depuração de esgoto sanitário: estudo comparativo entre reator experimental com aguapé e lagoa de polimento*. EESC, São Carlos, abril.
- RODRIGUES, J.J.S. (1996). Processamento de RNA. In: ZAHA, A., ed. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre, Mercado Aberto. Capítulo 9, p. 201-220.
- ROSSITER, B.J.F. & CASKEY, C.T. (1994). Clinical applications of the polymerase chain reaction. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A., ed. *PCR – The Polymerase Chain Reaction*. CHAPTER 32, p. 395-405.
- RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; JAKOBSEN, K.S. (1998). Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *Journal of Bacteriology*. v. 180, n. 13, p. 3453-3461, jul.
- RUMJANEK, F.D. (2001). *Introdução à biologia molecular*. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural. Compêndios de bioquímica, volume 1. 157 p.
- SABESP. (2002). *Dados referentes ao sistema de lagoas de estabilização de São Lourenço da Serra – SP*. (Comunicação pessoal).
- SAKER, M.L.; NEILAN, B.A. (2001). Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 67, n. 4, p. 1839-1845, apr.

- SANTEGOEDS, C.M.; MUYZER, G.; DE BEER, D. (1998). Biofilm dynamics studied with microsensors and molecular techniques. *Water Science & Technology*. v. 37, n. 4-5, p. 125-129.
- SANTERGOEDS, C.M.; NOLD, S.C.; WARD, D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacterial mat. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 11, p. 3922-3928, nov.
- SÃO PAULO, SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. (1997). *Caracterização das unidades de gerenciamento de recursos hídricos*. São Paulo, SMA.
- SCHRANK, A. (1996). Estrutura dos ácidos nucleicos. In: ZAHA, A., ed. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre, Mercado Aberto. Capítulo 2, p. 36-63.
- SHELEF, G.; AZOV, Y. (1987). High-rate oxidation ponds: the Israeli experience. *Water Science & Technology*. v. 19, n. 12, p. 249-255.
- SIGRH. *Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo*. www.sigrh.sp.gov.br (13 Dez 2001).
- SILVA, S.A. & MARA, D.D. (1979). *Tratamentos biológicos de águas residuárias – lagoas de estabilização*. Rio de Janeiro, ABES.
- SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S.J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. . *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n. 2, p. 625-630, feb.
- TSAI, Y.L. & OLSON, B.H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 57 , p. 1070-1074, april.
- VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA,E. (2001). Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Research*. v. 35, n. 5, p. 1354-1357.
- VICTORETTI, B.A. (1964). *Contribuição ao emprego de lagoas de estabilização como processo para depuração de esgotos domésticos*. São Paulo. 159p. Tese (Livre-docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

- VON SPERLING, M. (1996). *Lagoas de estabilização*. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias, v. 3. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. p. 11, 12, 14 e 19.
- WARD, D.M. & CASTENHOLZ, R.W. (2000). Cyanobacteria in geothermal habitats. In: WHITTON, B.A. & POTTS, M., ed. *The ecology of cyanobacteria*. U.S.A., Kluwer Academic Publishers. Chapter 3, p. 43.
- WARD, D.M.; FERRIS, M.J.; NOLD, S.C.; BATESON, M.M. (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 62, n. 4, p. 1353-1370, dec.
- WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. (1997). O DNA recombinante. Ouro Preto, Editora UFOP.
- WHITTON, B.A. & POTTS, M. (2000). Introduction to the cyanobacteria. In: WHITTON, B.A. & POTTS, M., ed. *The ecology of cyanobacteria*. U.S.A., Kluwer Academic Publishers. Chapter 1, 1-11 p.
- WILMOTTE, A. (1994). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A., ed. *The molecular biology of cyanobacteria*. Netherlands, Kluwer Academic Publishing. Chapter 1, 1-25 p.

APÊNDICE I

Porcentagens dos Municípios do Estado de São Paulo que Tratam suas Águas Residuárias com Sistemas de Lagoas de Estabilização nos Anos de 1992, 1995 e 1999 (SEADE, 2002).

APÊNDICE I

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Adamantina	-	-	-	40,00
Adolfo	-	100,00	100,00	100,00
Aguai	-	-	-	-
Águas da Prata	-	70,00	-	95,00
Águas de Lindóia	-	-	-	-
Águas de Santa Bárbara	-	-	-	-
Águas de São Pedro	-	-	-	-
Agudos	-	-	-	-
Alambari	-	-	-	100,00
Alfredo Marcondes	-	100,00	100,00	90,00
Altair	-	-	-	-
Altinópolis	-	-	-	-
Alto Alegre	-	70,00	81,00	100,00
Alumínio	-	-	-	-
Álvares Florence	88,00	91,00	87,00	100,00
Álvares Machado	-	-	-	-
Álvaro de Carvalho	-	-	-	-
Alvinlândia	-	-	-	-
Americana	-	-	-	-
Américo Brasiliense	-	-	-	-
Américo de Campos	-	-	-	-
Amparo	-	-	-	-
Analândia	-	-	-	-
Andradina	80,00	80,00	80,00	80,00
Angatuba	70,00	94,00	-	100,00
Anhembi	-	-	-	-
Anhumas	-	97,00	100,00	90,00
Aparecida	-	-	-	-
Aparecida d'Oeste	100,00	-	100,00	100,00
Apiáí	-	-	-	-
Araçariguama	-	-	-	-
Araçatuba	30,00	30,00	25,00	30,00
Araçoiaba da Serra	-	-	100,00	100,00
Aramina	100,00	-	-	100,00
Arandu	100,00	100,00	-	100,00
Arapeí	-	-	-	-
Araraquara	-	-	-	-
Araras	-	-	-	-
Arco-Íris	-	-	-	97,00
Arealva	80,00	100,00	95,00	88,00
Areias	-	-	-	-
Arciópolis	-	100,00	100,00	100,00
Ariranha	-	-	-	-
Artur Nogueira	100,00	100,00	100,00	...
Arujá	-	-	-	-
Aspásia	-	-	-	...
Assis	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Atibaia	-	-	-	-
Auriflama	100,00	100,00	100,00	100,00
Avaí	100,00	100,00	100,00	100,00
Avanhandava	-	-	-	-
Avaré	-	-	-	-
Bady Bassitt	40,00	58,00	90,00	-
Balbinos	-	-	-	100,00
Bálsamo	-	-	-	-
Bananal	-	-	60,00	60,00
Barão de Antonina	-	-	-	-
Barbosa	100,00	100,00	100,00	100,00
Bariri	-	-	-	-
Barra Bonita	-	-	-	-
Barra do Chapéu	-	-	-	-
Barra do Turvo	-	-	-	94,00
Barretos	10,00	10,00	30,00	35,00
Barrinha	-	-	-	...
Barueri	-	-	-	-
Bastos	-	-	-	-
Batatais	-	-	-	-
Bauru	-	-	-	...
Bebedouro	-	-	-	-
Bento de Abreu	100,00	100,00	100,00	100,00
Bernardino de Campos	100,00	-	100,00	100,00
Bertioga	-	-	-	-
Bilac	100,00	100,00	100,00	100,00
Birigui	-	-	-	-
Biritiba Mirim	-	-	-	-
Boa Esperança do Sul	-	-	-	-
Bocaina	95,00	100,00	95,00	98,00
Bofete	-	-	-	-
Boituva	-	-	-	-
Bom Jesus dos Perdões	-	-	-	-
Bom Sucesso de Itararé	-	-	-	-
Borá	91,00	100,00	100,00	97,00
Boracéia	-	100,00	100,00	100,00
Borborema	-	-	-	-
Borebi	-	-	90,00	-
Botucatu	-	-	-	-
Bragança Paulista	-	-	-	-
Braúna	100,00	100,00	100,00	100,00
Brejo Alegre	-	-	-	-
Brodowski	-	-	-	-
Brotas	-	99,00	-	-
Buri	-	86,00	100,00	100,00
Buritama	50,00	45,00	-	...
Buritizal	100,00	100,00	100,00	100,00
Cabrália Paulista	-	-	-	...
Cabreúva	80,00	-	85,00	59,00
Caçapava	-	55,00	72,00	45,00

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Cachoeira Paulista	-	-	-	-
Caconde	-	-	-	...
Cafelândia	-	-	-	-
Caiabu	-	-	-	-
Caieiras	-	-	-	-
Caiuá	-	-	-	-
Cajamar	-	-	-	-
Cajati	-	-	-	-
Cajobi	-	-	100,00	100,00
Cajuru	6,00	85,00	100,00	100,00
Campina do Monte Alegre	-	-	100,00	100,00
Campinas	-	1,00	1,00	1,00
Campo Limpo Paulista	-	-	-	-
Campos do Jordão	-	-	-	-
Campos Novos Paulista	-	-	-	-
Cananéia	-	-	-	95,00
Canas	-	-	-	-
Cândido Mota	-	-	100,00	100,00
Cândido Rodrigues	100,00	100,00	100,00	100,00
Canitar	-	-	-	-
Capão Bonito	-	100,00	100,00	100,00
Capela do Alto	-	-	70,00	100,00
Capivari	-	-	-	-
Caraguatatuba	-	-	-	-
Carapicuíba	-	-	-	-
Cardoso	-	-	-	-
Casa Branca	15,00	5,00	5,00	2,00
Cássia dos Coqueiros	-	-	-	-
Castilho	-	80,00	100,00	100,00
Catanduva	-	2,00	5,00	-
Catiguá	-	-	-	-
Cedral	100,00	100,00	100,00	...
Cerqueira Cesar	-	-	85,00	-
Cerquilha	20,00	25,00	25,00	19,00
Cesário Lange	-	-	-	-
Charqueada	50,00	-	75,00	75,00
Chavantes	-	-	-	-
Clementina	100,00	100,00	100,00	100,00
Colina	6,00	-	-	-
Colômbia	-	-	-	-
Conchal	-	-	-	-
Conchas	-	-	-	-
Cordeirópolis	-	-	-	-
Coroados	-	-	-	100,00
Coronel Macedo	100,00	80,00	-	100,00
Corumbataí	-	-	100,00	100,00
Cosmópolis	-	-	-	-
Cosmorama	-	-	-	-
Cotia	-	-	-	-
Cravinhos	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Cristais Paulista	100,00	100,00	100,00	100,00
Cruzália	100,00	-	-	93,00
Cruzeiro	-	-	-	-
Cubatão	10,00	18,00	29,00	-
Cunha	-	-	-	-
Descalvado	-	-	-	-
Diadema	-	-	-	-
Dirce Reis	-	100,00	100,00	100,00
Divinolândia	-	-	-	-
Dobrada	-	-	-	-
Dois Córregos	-	-	-	-
Dolcinópolis	100,00	100,00	100,00	100,00
Dourado	-	-	-	-
Dracena	30,00	35,00	30,00	30,00
Duartina	-	-	-	-
Dumont	-	-	-	-
Echaporã	-	-	-	-
Eldorado	-	-	-	-
Elias Fausto	-	-	-	-
Elisiário	-	100,00	100,00	99,00
Embaúba	-	100,00	100,00	...
Embu	-	-	-	-
Embu-Guaçu	-	-	-	-
Emilianópolis	-	100,00	100,00	97,00
Engenheiro Coelho	-	-	-	...
Espírito Santo do Pinhal	99,00	98,00	100,00	100,00
Espírito Santo do Turvo	-	-	-	-
Estiva Gerbi	-	-	-	-
Estrela do Norte	100,00	100,00	100,00	93,00
Estrela d'Oeste	-	100,00	100,00	100,00
Euclides da Cunha Paulista	-	-	95,00	90,00
Fartura	-	100,00	100,00	100,00
Fernando Prestes	-	-	-	-
Fernandópolis	-	-	-	50,00
Fernão	-	-	-	100,00
Ferraz de Vasconcelos	-	-	-	-
Flora Rica	-	-	-	90,00
Floreal	100,00	100,00	-	100,00
Flórida Paulista	100,00	100,00	100,00	91,00
Florínia	100,00	-	100,00	94,00
Franca	8,00	11,00	10,00	14,00
Francisco Morato	-	-	-	-
Franco da Rocha	-	-	-	-
Gabriel Monteiro	-	-	-	97,00
Gália	90,00	-	100,00	100,00
Garça	-	-	-	-
Gastão Vidigal	-	92,00	100,00	-
Gavião Peixoto	-	-	22,00	20,00
General Salgado	-	-	-	-
Getulina	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Glicério	25,00	20,00	20,00	30,00
Guaíçara	-	-	-	-
Guaimbê	-	-	-	-
Guaíra	100,00	100,00	100,00	100,00
Guapiaçu	-	-	-	-
Guapiara	-	-	-	-
Guará	4,00	-	-	-
Guaraçai	-	-	100,00	100,00
Guaraci	-	-	-	-
Guarani d'Oeste	-	100,00	100,00	100,00
Guarantã	-	-	-	-
Guararapes	65,00	100,00	100,00	-
Guararema	-	-	-	-
Guaratinguetá	-	-	-	-
Guarei	-	-	-	-
Guariba	-	-	-	-
Guarujá	-	-	-	-
Guarulhos	-	-	-	-
Guataparã	-	-	-	-
Guzolândia	-	-	-	100,00
Herculândia	-	-	-	-
Holambra	-	2,00	-	2,00
Hortolândia	-	-	-	-
Iacanga	-	-	-	-
Iacri	100,00	-	100,00	95,00
Iaras	-	-	-	100,00
Ibaté	90,00	100,00	100,00	30,00
Ibirá	100,00	100,00	100,00	100,00
Ibirarema	-	-	-	-
Ibitinga	-	-	-	...
Ibiúna	-	-	43,00	100,00
Icém	-	-	-	100,00
Iepê	-	-	-	-
Igaraçu do Tietê	-	-	-	-
Igarapava	-	-	-	-
Igaratá	-	100,00	100,00	50,00
Iguape	-	-	-	-
Ilha Comprida	-	-	-	-
Ilha Solteira	-	100,00	100,00	100,00
Ilhabela	-	-	-	-
Indaiatuba	-	-	-	-
Indiana	-	-	-	-
Indiaporã	-	100,00	100,00	100,00
Inúbia Paulista	-	-	-	-
Ipaussu	-	-	-	-
Iperó	-	-	-	-
Ipeúna	100,00	-	94,00	75,00
Ipiguá	-	-	-	-
Iporanga	-	-	-	-
Ipuã	-	-	100,00	100,00

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Iracemápolis	-	-	-	100,00
Irapuã	-	-	99,00	100,00
Irapuru	100,00	-	100,00	100,00
Itaberá	-	100,00	100,00	100,00
Itai	-	-	6,00	6,00
Itajobi	-	-	-	-
Itaju	-	-	-	...
Itanhaém	-	-	-	-
Itaóca	-	-	100,00	-
Itapecerica da Serra	-	-	-	-
Itapetininga	-	-	-	-
Itapeva	-	-	-	-
Itapevi	-	-	-	-
Itapira	-	-	100,00	98,00
Itapirapuã Paulista	-	90,00	100,00	100,00
Itápolis	-	-	-	-
Itaporanga	-	77,00	90,00	100,00
Itapuí	-	-	-	-
Itapura	-	-	-	-
Itaquaquecetuba	-	-	-	-
Itararé	-	-	-	-
Itariri	24,00	41,00	50,00	87,00
Itatiba	-	-	-	-
Itatinga	-	-	99,00	100,00
Itirapina	80,00	70,00	70,00	100,00
Itirapuã	100,00	100,00	100,00	100,00
Itobi	-	-	-	-
Itu	-	-	-	-
Itupeva	-	-	-	-
Ituverava	5,00	20,00	-	-
Jaborandi	100,00	100,00	100,00	100,00
Jaboticabal	-	-	-	1,00
Jacareí	-	-	-	-
Jaci	100,00	95,00	85,00	95,00
Jacupiranga	-	-	83,00	90,00
Jaguariúna	-	-	-	-
Jales	-	-	-	-
Jambeiro	-	-	-	-
Jandira	-	-	-	-
Jardinópolis	-	-	-	-
Jarinu	-	100,00	100,00	100,00
Jaú	-	-	-	-
Jeriquara	-	-	100,00	100,00
Joanópolis	-	100,00	-	-
João Ramalho	-	-	100,00	100,00
José Bonifácio	-	-	-	-
Júlio Mesquita	100,00	100,00	100,00	100,00
Jumirim	-	-	-	-
Jundiaí	-	-	-	-
Junqueirópolis	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Juquiá	47,00	47,00	-	91,00
Juquitiba	-	-	-	-
Lagoinha	-	-	-	-
Laranjal Paulista	-	-	-	-
Lavínia	100,00	-	-	75,00
Lavrinhas	-	-	-	-
Leme	-	-	-	-
Lençóis Paulista	-	-	-	-
Limeira	5,00	5,00	5,00	7,00
Lindóia	-	-	-	-
Lins	-	-	100,00	100,00
Lorena	85,00	100,00	90,00	84,00
Lourdes	-	-	100,00	100,00
Louveira	-	-	-	-
Lucélia	100,00	-	100,00	96,00
Lucianópolis	100,00	100,00	100,00	100,00
Luís Antônio	100,00	100,00	100,00	100,00
Luiziânia	-	100,00	100,00	95,00
Lupércio	-	70,00	100,00	100,00
Lutécia	-	-	-	-
Macatuba	100,00	80,00	100,00	100,00
Macaubal	100,00	-	85,00	-
Macedônia	100,00	-	100,00	100,00
Magda	-	100,00	100,00	100,00
Mairinque	-	-	-	...
Mairiporã	50,00	-	-	-
Manduri	-	-	-	-
Marabá Paulista	-	-	100,00	-
Maracá	-	-	-	90,00
Marapoama	-	-	-	-
Mariápolis	-	-	-	-
Marília	-	-	-	-
Marinópolis	100,00	100,00	100,00	100,00
Martinópolis	-	88,00	88,00	88,00
Matão	-	-	-	-
Mauá	-	-	-	-
Mendonça	88,00	88,00	95,00	...
Meridiano	100,00	100,00	40,00	-
Mesópolis	-	-	-	-
Miguelópolis	-	-	-	-
Mineiros do Tietê	-	-	-	-
Mira Estrela	100,00	80,00	100,00	100,00
Miracatu	-	-	-	64,00
Mirandópolis	-	-	-	-
Mirante do Paranapanema	-	-	-	-
Mirassol	20,00	20,00	-	25,00
Mirassolândia	-	-	-	-
Mococa	-	-	2,00	1,00
Mogi das Cruzes	-	-	-	-
Mogi Guaçu	55,00	55,00	57,00	57,00

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Moji Mirim	-	-	2,00	-
Mombuca	98,00	100,00	-	80,00
Monções	100,00	100,00	100,00	100,00
Mongaguá	-	-	-	-
Monte Alegre do Sul	-	-	-	-
Monte Alto	20,00	-	22,00	30,00
Monte Aprazível	95,00	90,00	93,00	94,00
Monte Azul Paulista	-	30,00	30,00	30,00
Monte Castelo	-	-	-	-
Monte Mor	-	-	-	-
Monteiro Lobato	-	-	-	-
Morro Agudo	-	-	-	-
Morungaba	100,00	100,00	100,00	100,00
Motuca		100,00	100,00	-
Murutinga do Sul	98,00	94,00	100,00	100,00
Nantes			-	-
Narandiba	-	-	-	90,00
Natividade da Serra	-	-	-	...
Nazaré Paulista	-	100,00	100,00	-
Neves Paulista	-	100,00	100,00	100,00
Nhandeara	-	100,00	-	100,00
Nipoã	-	100,00	100,00	90,00
Nova Aliança	-	100,00	100,00	...
Nova Campina		-	100,00	100,00
Nova Canaã Paulista		-	-	-
Nova Castilho			-	100,00
Nova Europa	-	-	-	-
Nova Granada	-	100,00	100,00	100,00
Nova Guataporanga	-	-	-	-
Nova Independência	-	-	-	-
Nova Luzitânia	-	100,00	100,00	100,00
Nova Odessa	-	-	-	-
Novais		-	-	-
Novo Horizonte	-	-	-	100,00
Nuporanga	-	-	-	-
Ocaçu	-	-	-	-
Óleo	-	-	-	-
Olímpia	-	-	-	30,00
Onda Verde	100,00	100,00	100,00	100,00
Oriente	-	-	-	-
Orindiúva	100,00	100,00	100,00	100,00
Orlândia	-	-	-	-
Osasco	-	-	-	-
Oscar Bressane	-	-	-	-
Osvaldo Cruz	100,00	100,00	-	93,00
Ourinhos	80,00	-	70,00	70,00
Ouro Verde	-	-	-	93,00
Ouroeste			100,00	-
Pacaembú	-	100,00	100,00	100,00
Palestina	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Palmares Paulista	-	-	-	100,00
Palmeira d'Oeste	100,00	100,00	100,00	100,00
Palmital	-	-	-	-
Panorama	-	-	-	-
Paraguaçu Paulista	-	-	-	-
Paraibuna	-	-	-	-
Paraíso	-	-	-	-
Paranapanema	-	-	90,00	100,00
Paranapuã	100,00	100,00	100,00	100,00
Parapuã	-	-	-	-
Pardinho	100,00	88,00	100,00	100,00
Parquera-Açu	-	-	-	100,00
Parisi	-	-	100,00	100,00
Patrocínio Paulista	-	20,00	-	-
Paulicéia	-	-	-	-
Paulínia	-	-	-	-
Paulistânia	-	-	-	-
Paulo de Faria	-	-	-	100,00
Pederneiras	-	-	-	-
Pedra Bela	-	-	-	-
Pedranópolis	-	-	-	-
Pedregulho	-	100,00	100,00	100,00
Pedreira	-	-	-	-
Pedrinhas Paulista	-	-	-	-
Pedro de Toledo	56,00	89,00	-	-
Penápolis	100,00	100,00	100,00	100,00
Pereira Barreto	100,00	100,00	100,00	100,00
Pereiras	-	71,00	-	91,00
Peruíbe	3,00	100,00	7,00	100,00
Piacatu	-	-	100,00	93,00
Piedade	-	-	-	-
Pilar do Sul	-	-	-	-
Pindamonhangaba	-	77,00	80,00	91,00
Pindorama	-	-	20,00	-
Pinhalzinho	98,00	100,00	100,00	45,00
Piquerobi	-	-	-	-
Piquete	-	-	-	-
Piracaia	-	-	-	-
Piracicaba	5,00	3,00	3,00	-
Piraju	-	-	-	-
Pirajuí	-	-	-	-
Pirangi	-	-	-	-
Pirapora do Bom Jesus	-	-	-	-
Pirapozinho	-	-	-	-
Pirassununga	-	-	-	-
Piratininga	100,00	100,00	100,00	100,00
Pitangueiras	-	-	-	-
Planalto	-	100,00	100,00	93,00
Platina	-	-	-	-
Poá	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Poloni	100,00	100,00	100,00	100,00
Pompéia	-	-	-	-
Pongai	-	-	-	100,00
Pontal	-	-	-	-
Pontalinda	-	-	-	-
Pontes Gestal	100,00	-	100,00	100,00
Populina	-	-	100,00	-
Porangaba	-	-	100,00	-
Porto Feliz	7,00	5,00	5,00	5,00
Porto Ferreira	-	-	-	-
Potim	-	-	-	-
Potirendaba	-	-	-	-
Pracinha	-	-	-	-
Pradópolis	100,00	100,00	100,00	100,00
Praia Grande	-	-	-	-
Pratânia	-	-	-	-
Presidente Alves	-	-	79,00	100,00
Presidente Bernardes	-	-	-	-
Presidente Epitácio	-	-	-	77,00
Presidente Prudente	-	-	-	-
Presidente Venceslau	-	-	-	-
Promissão	40,00	60,00	75,00	100,00
Quadra	-	-	-	-
Quatá	-	-	-	-
Queiroz	-	-	100,00	97,00
Queluz	-	-	-	-
Quintana	-	-	-	-
Rafard	-	-	-	...
Rancharia	95,00	92,00	90,00	92,00
Redenção da Serra	-	-	-	-
Regente Feijó	-	-	-	92,00
Reginópolis	-	-	-	-
Registro	80,00	-	-	98,00
Restinga	-	100,00	100,00	100,00
Ribeira	-	-	-	-
Ribeirão Bonito	-	-	-	-
Ribeirão Branco	-	-	75,00	-
Ribeirão Corrente	90,00	100,00	100,00	100,00
Ribeirão do Sul	-	100,00	100,00	100,00
Ribeirão dos Índios	-	-	-	88,00
Ribeirão Grande	-	-	-	-
Ribeirão Pires	-	-	-	-
Ribeirão Preto	2,00	1,00	-	-
Rifaina	-	-	-	-
Rincão	-	-	-	-
Rinópolis	72,00	-	-	-
Rio Claro	2,00	-	2,00	1,00
Rio das Pedras	-	-	-	-
Rio Grande da Serra	5,00	-	100,00	-
Riolândia	-	-	100,00	100,00

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Riversul	-	100,00	-	100,00
Rosana		100,00	100,00	95,00
Roseira	-	-	71,00	70,00
Rubiácea	100,00	100,00	100,00	100,00
Rubinéia	100,00	100,00	81,00	100,00
Sabino	-	-	100,00	100,00
Sagres	-	-	-	95,00
Sales	-	100,00	100,00	88,00
Sales Oliveira	40,00	100,00	100,00	100,00
Salesópolis	-	100,00	-	100,00
Salmourão	-	-	-	-
Saltinho		96,00	100,00	100,00
Salto	-	-	-	-
Salto de Pirapóra	-	-	-	-
Salto Grande	-	-	-	-
Sandovalina	-	-	-	-
Santa Adélia	-	-	-	-
Santa Albertina	-	100,00	100,00	100,00
Santa Barbara d'Oeste	-	-	-	-
Santa Branca	-	-	-	-
Santa Clara d'Oeste	-	-	-	100,00
Santa Cruz da Conceição	-	-	-	-
Santa Cruz da Esperança			100,00	100,00
Santa Cruz das Palmeiras	-	-	-	-
Santa Cruz do Rio Pardo	-	-	-	-
Santa Ernestina	-	-	-	-
Santa Fé do Sul	-	55,00	45,00	37,00
Santa Gertrudes	-	-	-	-
Santa Isabel	-	-	-	-
Santa Lucia	-	100,00	60,00	70,00
Santa Maria da Serra	-	-	-	-
Santa Mercedes	-	-	-	87,00
Santa Rita do Passa Quatro	-	-	-	-
Santa Rita d'Oeste	-	-	-	-
Santa Rosa do Viterbo	93,00	88,00	88,00	100,00
Santa Saete			-	-
Santana da Ponte Pensa	-	-	-	100,00
Santana de Parnaíba	-	-	-	-
Santo Anastácio	-	60,00	50,00	62,00
Santo André	-	-	-	-
Santo Antonio da Alegria	-	-	-	-
Santo Antonio de Posse	-	-	-	-
Santo Antonio do Aracanguá		100,00	100,00	100,00
Santo Antonio do Jardim	100,00	100,00	90,00	100,00
Santo Antonio do Pinhal	69,00	100,00	60,00	-
Santo Expedito	60,00	45,00	40,00	58,00
Santópolis do Aguapeí	-	-	92,00	-
Santos	-	-	-	-
São Bento do Sapucaí	-	-	-	-
São Bernardo do Campo	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
São Caetano do Sul	-	-	-	-
São Carlos	-	3,00	2,00	2,00
São Francisco	-	-	-	...
São João da Boa Vista	-	-	-	100,00
São João das Duas Pontes	-	100,00	100,00	100,00
São João de Iracema	-	100,00	100,00	100,00
São João do Pau D'Alho	-	-	-	-
São Joaquim da Barra	-	-	-	-
São José da Bela Vista	-	-	-	-
São José do Barreiro	-	-	-	-
São José do Rio Pardo	-	-	-	-
São José do Rio Preto	-	-	-	-
São José dos Campos	1,00	-	-	-
São Lourenço da Serra	-	-	-	-
São Luís do Paraitinga	-	-	-	-
São Manuel	5,00	10,00	10,00	11,00
São Miguel Arcanjo	-	-	82,00	100,00
São Paulo	-	-	-	-
São Pedro	-	-	-	-
São Pedro do Turvo	-	-	-	-
São Roque	-	-	-	-
São Sebastião	-	-	-	-
São Sebastião da Gramma	-	-	-	-
São Simão	-	-	-	-
São Vicente	-	-	-	-
Sarapuá	-	-	-	-
Sarutaiá	100,00	-	-	100,00
Sebastianópolis do Sul	-	-	-	100,00
Serra Azul	-	-	-	-
Serra Negra	-	-	-	-
Serrana	-	-	-	-
Sertãozinho	-	-	-	-
Sete Barras	-	80,00	-	97,00
Severínia	100,00	-	100,00	50,00
Silveiras	-	-	100,00	100,00
Socorro	-	-	-	-
Sorocaba	-	-	-	-
Sud Mennucci	100,00	100,00	100,00	100,00
Sumaré	-	-	-	-
Suzanápolis	-	-	-	-
Suzano	-	-	-	-
Tabapuã	-	-	-	-
Tabatinga	-	-	-	-
Taboão da Serra	-	-	-	-
Taciba	100,00	100,00	100,00	90,00
Taguaí	70,00	-	100,00	100,00
Taiacu	100,00	100,00	100,00	100,00
Taiúva	-	-	-	...
Tambaú	3,00	12,00	8,00	8,00
Tanabi	-	-	-	-

Saneamento/Lagoas de Estabilização (Em %)	1992	1995	1997	1999
Tapiraí	-	-	-	-
Tapiratiba	-	-	-	...
Taquaral			40,00	32,00
Taquaritinga	-	-	-	-
Taquarituba	-	-	-	100,00
Taquarivaí		-	100,00	100,00
Tarabaí	100,00	100,00	100,00	95,00
Tarumã		100,00	100,00	97,00
Tatui	97,00	68,00	99,00	98,00
Taubaté	-	-	-	-
Tejupá	-	-	-	-
Teodoro Sampaio	100,00	69,00	67,00	81,00
Terra Roxa	-	-	-	-
Tietê	-	-	-	-
Timburi	-	-	-	-
Torre de Pedra		-	-	-
Torrinha	-	-	-	-
Trabiju			-	-
Tremembé	-	-	-	-
Três Fronteiras	100,00	100,00	100,00	100,00
Tuiuti		-	-	-
Tupã	-	-	-	2,00
Tupi Paulista	-	-	-	-
Turiúba	100,00	100,00	100,00	100,00
Turmalina	85,00	100,00	100,00	100,00
Ubarana		-	-	100,00
Ubatuba	-	-	-	-
Ubirajara	-	-	85,00	100,00
Uchoa	-	-	-	-
União Paulista	-	-	-	-
Urânia	-	100,00	100,00	-
Uru	-	-	-	-
Urupês	-	-	-	-
Valentim Gentil	100,00	-	100,00	100,00
Valinhos	-	-	-	-
Valparaíso	100,00	100,00	100,00	100,00
Vargem		-	-	-
Vargem Grande do Sul	-	-	-	-
Vargem Grande Paulista	-	-	-	-
Várzea Paulista	-	-	-	-
Vera Cruz	-	-	-	-
Vinhedo	-	-	-	-
Viradouro	-	-	-	60,00
Vista Alegre do Alto	-	-	-	-
Vitória Brasil			-	-
Votorantim	-	-	-	-
Votuporanga	-	-	-	-
Zacarias		-	-	100,00

APÊNDICE II

Isolamento do DNA e sua Purificação

Eletroforese em Gel de Agarose

PCR

APÊNDICE II

1. Isolamento de DNA e sua Purificação

A homogeneização das células possui a finalidade de iniciar e/ou facilitar o processo de lise das células. Pode ser realizada por métodos físicos, que promovem o rompimento da parede e/ou membrana celular através de forças mecânicas, por métodos químicos, através de detergentes e/ou agentes caotrópicos que desestabilizam a membrana celular, rompendo-a e por métodos enzimáticos, que utilizam enzimas capazes de degradar as paredes celulares, como a lisozima, N-acetilmuramidase e líticase (PIZA, 2000).

Segundo esta mesma autora (ob. cit.), a extração de ácidos nucleicos compreende uma série de passos, visando solubilizar o DNA, separando-o dos outros constituintes celulares, como proteínas, lipídios, polissacarídeos e restos de membranas, por meio de centrifugação. Pode ser realizado simultaneamente à desintegração das células, realizando esta etapa na presença de tampão de extração, constituído por alguns componentes básicos, como:

- Substâncias tamponantes: necessárias à manutenção do pH ótimo para a atividade das enzimas que serão utilizadas na extração e para evitar depurinação dos ácidos nucleicos, como os tampões Tris-HCl e fosfato.
- Substâncias osmoticamente ativas: necessárias à manutenção de membranas plasmáticas e organelas intactas, sendo a sacarose o regente mais utilizado com esta finalidade.
- Detergentes: por serem anfipáticos, são capazes de dissolver lipídios da membrana, solubilizar proteínas da membrana e proteínas que recobrem o DNA, dissociar proteínas dos ácidos nucleicos, desnaturar proteínas e, em alguns casos, inibir a ação de nucleases, como o SDS (dodecil sulfato de sódio). São também outros exemplos o sarcosil (lauril sarcosinato de sódio) e o CTAB (brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio).
- Inibidores de nucleases: necessários para que não ocorra a degradação dos ácidos nucleicos durante e após a realização do protocolo de isolamento e purificação do DNA. São compostos capazes de inativar as nucleases (DNase e RNase) por meio de desnaturação, como o fenol, clorofórmio e agentes caotrópicos, ou

simplesmente impedir a atividade das nucleases (DNase) por meio de seqüestro dos co-fatores, como o Mg^{+2} .

- Proteases: desnaturam/quebram as proteínas da membrana e/ou da parede, facilitando a lise celular. Aumentam a eficiência de dissociação das proteínas de ácidos nucleicos quando adicionadas juntamente com o detergente SDS, como a Proteinase K e a Pronase E.

Esta mesma autora (ob. cit.) ensina que, através da solubilização dos ácidos nucleicos, já separados de contaminantes celulares através de centrifugação, é realizada a precipitação para que o DNA extraído possa ser ressuspendido em água Ultra pura esterilizada ou em tampão (TE). Para que seja possível precipitar os ácidos nucleicos, é necessário promover a agregação entre as moléculas desses ácidos, o que geralmente é feito adicionado-se à solução de DNA uma fração de solução de salina e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Este sal é adicionado para resultar na neutralização das cargas negativas dos fosfatos nas moléculas dos ácidos nucleicos, enquanto que o etanol promove a retirada de moléculas de água das hélices, provocando, desta maneira, a compactação do DNA e a sua precipitação mediante centrifugação. Os sais utilizados podem ser:

- Acetato de sódio 0,3M pH 5,5
- Acetato de amônio 2,5M
- Cloreto de lítio 0,8M
- Cloreto de sódio 0,45M (sendo efetivo na remoção de SDS que se mantém solúvel durante a precipitação do DNA).

O etanol é utilizado depois para precipitação dos sais, para que ocorra a retirada destes sais, porque a maioria dos sais é solúvel em EOH 70%, sendo realizado uma lavagem do *pellet* com este produto (ob. cit.).

O fenol é uma molécula que interage com as proteínas, desnaturando-as e permitindo, desta maneira, o isolamento de DNA a partir de misturas complexas, sendo o método de purificação de ácidos nucleicos mais comumente empregado. É realizado adicionando-se 1 volume de fenol para 1 volume de extrato, agitando-se por inversão, centrifugando, tendo como resultado a formação de duas fases, uma aquosa e outra orgânica (do fenol), e entre elas uma interface contendo as proteínas

desnaturadas. O fenol equilibrado em $\text{pH} \geq 8,0$ tem como resultado o DNA na fase aquosa e o RNA na fase orgânica (ob. cit.).

A extração com clorofórmio, assim como o fenol, também age desnaturando as proteínas, aumentando a eficiência da extração dos ácidos nucleicos, possuindo a capacidade de solubilizar lipídio e fenol contaminante da fase aquosa. A mistura normalmente utilizada é de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), sendo que o álcool isoamílico é adicionado ao clorofórmio com a função anti-espumante (ob. cit.).

2. Eletroforese em Gel de Agarose

Normalmente, o substrato mais utilizado para a separação dos fragmentos por eletroforese é a agarose, embora a poliacrilamida também seja bastante utilizada. Esses dois substratos formam uma malha fina, por onde as moléculas de DNA migram de acordo com a carga e o tamanho dos fragmentos, quando uma corrente elétrica é aplicada a esse substrato. Fragmentos menores migram mais facilmente por essa malha do que os fragmentos maiores. A molécula de DNA possui carga negativa quando em pH neutro, por este motivo ela migra em direção ao ânodo durante a corrida de eletroforese. Essa taxa de migração é determinada pelo tamanho dos fragmentos (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001).

A eletroforese separa as moléculas de DNA em função de sua forma compacta. O DNA migra em géis com diferentes velocidades, dependendo do seu tamanho e forma. Moléculas de DNA de um mesmo tamanho migram com diferentes velocidades se estiverem na forma circular relaxada (circular aberta) linear ou supertorcida (circular covalente ligada) (SCHRANK, 1996).

O tipo de substrato eletroforético a ser usado é determinado em função dos tamanhos dos fragmentos que se desejam separar. Um gel de agarose é indicado para separar grandes fragmentos, variando entre 300-20.000 pb (pares de bases). É possível variar a concentração de agarose para uma boa resolução dos fragmentos, de acordo com os objetivos desejados, por exemplo, géis menos concentrados (0,6 a 0,8%) são indicados quando se desejam separar fragmentos grandes com boa resolução, enquanto que géis mais concentrados (1,0 a 2,0%) são indicados quando

se desejam separar fragmentos pequenos (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001).

De acordo com o catálogo da AMERSHAM BIOSCIENCES (2002), esta empresa comercializa quatro tipos de agarose específicos para eletroforese, são elas: a agarose M, agarose IEF, agarose NA e a agarose Prep. A agarose M é utilizada para zona eletroforética, imunoeletroforese, eletroimunoensaio, imunoeletroforese intercalada, imunodifusão, culturas celulares e técnicas de clonagem; a agarose NA e a agarose PREP para eletroforese de ácidos nucléicos; e a agarose IEF para enfoque isoelétrico.

Depois de realizada a corrida eletroforética, meios químicos são utilizados para a visualização dos fragmentos. Quando se tem mais do que 50ng de DNA por banda, o brometo de etídio é o mais indicado, pois este agente se intercala na molécula de DNA e se torna fluorescente quando exposto à luz ultravioleta, com fragmentos maiores apresentando bandas maiores, permitindo, desta maneira, realizar uma correlação direta entre a intensidade da banda e o tamanho do fragmento com a quantidade de DNA. É importante lembrar que o brometo de etídio é um agente mutagênico, por este motivo deve-se sempre trabalhar com luvas e evitar a contaminação de bancadas e cubas (ARIAS & INFANTE-MALACHIAS, 2001), conforme Figura A (SCHRANK, 1996).

Figura A – Efeito do brometo de etídio (seta azul) intercalado no DNA. Fonte: Schranck, 1996.

O brometo de etídio se liga fortemente à dupla hélice de DNA por intercalação, um processo onde a estrutura plana do anel da molécula de brometo se insere entre as bases de DNA. A intercalação do corante entre o DNA causa uma marca no campo fluorescente comparado ao corante somente em solução. A irradiação UV absorvida pelo DNA (260 nm) e/ou a irradiação absorvida pela molécula a 300 nm (transiluminadores) causam uma emissão fluorescente forte em ~ 590 nm. A excitação máxima normal e emissão máxima para o etídio são de 482 nm e 616 nm, respectivamente. O brometo de etídio permite uma detecção entre 1 - 10 ng de DNA por banda em um gel de agarose (HELLER, 1994).

O fragmento alvo, amplificado por PCR, pode ser facilmente visto no gel corado com brometo de etídio, porque a coloração de fundo das seqüências não-alvo é eliminada (WATSON *et al.*, 1997).

3. PCR

A idéia de empregar a enzima DNA polimerase para amplificar o DNA surgiu por volta de 1983, quando K. Mullis a empregou junto com oligonucleotídeos em excesso, DNA molde, para que ocorresse a síntese de uma nova cadeia de DNA. Para que ocorresse amplificação, era preciso que vários ciclos de síntese acontecessem, seguindo a seqüência de separação (desnaturação) das cadeias do DNA molde, para permitir que os iniciadores ou iniciadores pudessem hibridizar-se aos sítios com seqüências complementares. A desnaturação do DNA era induzido por calor. Depois, o resfriamento da solução, para permitir a hibridização dos iniciadores. A partir daí, a reação de síntese da cadeia complementar e a repetição de todo o processo. Atualmente, PCR é uma técnica extremamente versátil, com aplicações que vão desde medicina clínica, forense, biotecnologia, antropologia e a ecologia (RUMJANEK, 2001).

Por calor na dupla fita de DNA as pontes iônicas que seguram as fitas complementares juntas enfraquecem e o DNA funde-se num estado de fita simples. Com o esfriamento, a fita simples de DNA se re-associa, e como resultado calor de desnaturação seguido por esfriamento lento na presença de grande quantidade de oligonucleotídeos se anelando ao alvo (*template*) de DNA aonde este irá demonstrar

similaridade adequada. O PCR usa este processo sintético para copiar uma sequência alvo específica várias vezes (HILLIS *et al.*, 1996).

O material para se dar início a um PCR é o DNA, que contém a sequência a ser amplificada, não sendo necessário isolar esta sequência, pois ela é definida pelos iniciadores utilizados na reação. O DNA necessário para PCR é, frequentemente, o DNA genômico total extraído das células. Os dois iniciadores, que direcionam o ponto de início da síntese de DNA, a DNA polimerase (*Taq* polimerase) e uma mistura dos quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP's) precursores são adicionados ao tubo contendo o DNA (WATSON *et al.*, 1997).

Os iniciadores para PCR são oligonucleotídeos sintéticos de 20 a 30 bases de extensão, os quais podem ser desenhados a partir da comparação de sequências de DNA presentes em bancos de dados. Devem atuar combinadamente e ser relativamente específicos para seus sítios de ligação nas extremidades flanqueadoras do DNA alvo (FANTINATTI, 2000).

O material das reações de PCR são descritos a seguir (HILLIS *et al.*, 1996; INNIS & GELFAND, 1990; MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2001):

- Um PCR realiza-se em volumes pequenos, normalmente de 10 a 100 μ L.
- Resultados melhores são obtidos com 10^3 a 10^4 moléculas originais de DNA.
- Fragmentos amplificados maiores do que 3 a 4 mil pares de bases podem apresentar problemas.
- Os trifosfatos de desoxirribonucleotídeos devem existir, idealmente, na mesma proporção que aquela presente na molécula que será sintetizada, mas na prática, utilizam -se proporções de dATP, dCTP, dGTP e dTTP equimolares. Normalmente, a quantidade de cada um dos nucleotídeos varia entre 50 μ M a 200 μ M (sendo este o máximo possível, na prática, por motivos de solubilidade).
- Soluções estoques de dNTPs devem ser neutralizadas para pH 7,0 e suas concentrações devem ser determinadas espectrofotometricamente. Estoques primários são diluídos a 10 mM, aliquotados e armazenados a -20° C.
- A concentração de sais, normalmente sob a forma de cloreto de potássio ou de sódio a 50 mM, é um fator crítico que deve ser levado em conta quando existem sais de cátions monovalentes na amostra de DNA.

- Importante também é o cloreto de magnésio necessário para a síntese, em torno de 2,5 mM, mas com amostras com muito EDTA ou outro agente que diminui a quantidade efetiva de cátions divalentes, essa concentração pode ser aumentada.
- O cofator Mg^{2+} não é consumido na reação de síntese e é inacessível aos extremos calores do ciclo de amplificação, então a concentração final e inicial são a mesma. Este íon é um importante cofator na catálise enzimática da reação de síntese, então concentrações adequadas aceleram a reação consideravelmente. Contudo, Mg^{2+} também interage com o grupo negativo de fosfato dos dNTPs forte o bastante de modo que Mg^{2+} ionicamente atraído para o grupo PO_4^- é menos disponível para agir como um cofator enzimático. Por esta razão, concentrações de Mg^{2+} precisam ser maiores do que concentrações de dNTPs.
- O pH ideal para PCR é de 7,5, pois a enzima *Taq* polimerase tem seu ótimo nessa faixa. A taxa de erros de incorporação também é dependente do pH, conforme a enzima empregada.
- Uma concentração recomendada de variação de *Taq* DNA polimerase é entre 1 e 2,5 unidades por 100 μ L de reação quando os outros parâmetros forem otimizados. Porém, quando os parâmetros estão otimizados, podem-se testar concentrações de *Taq* polimerase variando de 0,5 a 5 unidades/100 μ L.
- Alguns protocolos empregam proteínas na solução (albumina bovina (BSA), isenta de nucleases, ou gelatina), que adere aos possíveis sítios compatíveis que existam nas paredes do tubo, de tal forma que a polimerase não o faça e deixe de atuar na reação. Vários outros aditivos têm sido propostos para aumentar a reação de PCR, como o NP-40, Twenn-20, Triton X-100, glicerol e DMSO, além da BSA e gelatina. Estes aditivos são supostos que estabilizem a enzima (BSA e gelatina), reduzem problemas com estruturas secundárias (os detergentes) ou favorecem o anelamento preciso.
- A concentração de oligonucleotídeos (iniciadores) é em torno de 1 micromolar para cada um deles. Para um volume de 25 μ L, isso significa a existência de um potencial de síntese de $1,5 \times 10^{13}$ novas cadeias.
- A temperatura de desnaturação, cerca de 94° C, é suficientemente alta para permitir a separação das fitas de DNA e suficientemente baixa para não provocar degradação da enzima. A duração desta fase depende do termociclador utilizado

e dos volumes dos tubos empregados, pois há diferenças da condutividade térmica entre os sistemas. Não há necessidade de que essa fase tenha mais que 1 minuto.

- A temperatura de hibridação do DNA-alvo com o oligonucleotídeo é a mais crítica do PCR, pois esta depende da temperatura de fusão da molécula, que é a temperatura em que 50% das moléculas estão hibridizadas, em um equilíbrio dinâmico. Essa temperatura é conhecida por T_m e deve ser semelhante para os 2 oligonucleotídeos a serem utilizados em uma reação de PCR.
- A temperatura de extensão depende do ótimo da enzima empregada, no caso da *Taq* Polimerase, é de 72° C.
- Controles negativos são muito comuns em PCR, esses geralmente são tubos de reações feitos sem o DNA alvo. Presença de produtos de PCR nestes casos usualmente significa contaminação em um ou mais reagentes.
- Controles positivos são reações cujo funcionamento é garantido tão logo quanto o coquetel básico de PCR é funcional. Usualmente envolvem o uso de DNA genômico conhecido por dar um resultado bom e consistente. Falhas no controle positivo significam falha no coquetel básico.

A Cetus entrou com pedido de patente do PCR, sendo que este pedido foi contestado pela DuPont, através de ação judicial nos Estados Unidos da América. Depois de alguns anos, a Cetus conseguiu ganhar a ação, alegando que o uso de PCR aplicável em escala laboratorial teria sido desenvolvido por Kary B. Mullis, na época funcionário desta indústria. A Cetus entrou com o primeiro pedido de patente em 1987 pelo método de PCR, três patentes para a *Taq* polimerase, patentes para kits e reagentes específicos para PCR e termociclador em 1992, sendo que, depois de ganhar a ação, vendeu seus direitos de patente do PCR para a Hoffmann-La Roche por 300 milhões de dólares e do termociclador, inicialmente, juntou-se a Perkin Elmer. Os primeiros debates realizados sobre PCR foram em 1985 e 1986, através do processo de PCR e suas aplicações para o diagnóstico de anemia falciforme celular, através de conversas com o público e publicações, realizadas por Randy Saiki e Kary Mullis (DANIELL, 1994; MULLIS, 1994). Kary B. Mullis foi agraciado com o Prêmio Nobel de Química por esta descoberta, tão utilizada para tantos tipos de

experimentos, de maneira rápida e com resultados específicos, tanto em áreas como a medicina (HIV, HTLV), como medicina legal (identificação criminal), paternidade, estudos de evolução molecular, doenças genéticas, polimorfismos entre as espécies, dentre outros.

APÊNDICE III

Blast Realizado com Microcystis aeruginosa.

APÊNDICE III

LOCUS	MAU40340	1507 bp	DNA	linear	BCT 15-AUG-1997
DEFINITION	Microcystis aeruginosa PCC7941 16S rRNA gene.				
ACCESSION	U40340				
VERSION	U40340.1 GI:1150969				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Microcystis aeruginosa				
ORGANISM	Microcystis aeruginosa Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Microcystis.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1507)				
AUTHORS	Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T. and Goodman, A.E.				
TITLE	rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis				
JOURNAL	Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (3), 693-697 (1997)				
MEDLINE	97370596				
PUBMED	9226902				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1507)				
AUTHORS	Neilan, B.A.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (08-NOV-1995) Brett A. Neilan, School of Microbiology and Immunology, The University of New South Wales, Sydney, NSW, 2052, Australia				
FEATURES	Location/Qualifiers				
Source	1..1507 /organism="Microcystis aeruginosa" /strain="PCC7941" /db_xref="taxon:1126"				
rRNA	1..1507 /product="16S ribosomal RNA"				
BASE COUNT	372 a	357 c	486 g	292 t	
ORIGIN					
1	t g c t g g a a t t	c g g c t t c g c g	g a t c c g a g c t	c g a g t t t g a t	c c t g g c t c a g
61	g g c g g c g t g c	c t a a c a c a t g	c a a g t c g a a c	g g g a a t c t t c	g g a t t c t a g t
121	t g a g t a a c g c	g t a a g a a t c t	a a c t t c a g g a	c g g g g a c a a c	a g t t g g a a a c
181	a c c c g a t g t g	c g c a a g g t g	a a c c t a a t t	g g c c t g a a g a	a g a g c t t g c g
241	t a g t t g g t g g	g g t a a g g g c c	t a c c a a g g c g	a c g a t c a g t a	g c t g g t c t g a
301	a g c c a c a c t g	g g a c t g a g a c	a c g g c c c a g a	c t c c t a c g g g	a g g c a g c a g t
361	c c g c a a t g g g	c g a a a g c c t g	a c g g a g c a a c	g c c g c g t g a g	g g a g g a a g g t
421	t a a a c c t c t t	t t c t c a a g g a	a g a a g t t c t g	a c g g t a c t t g	a g g a a t c a g c
481	t c c g t g c c a g	c a g c c g c g g t	a a t a c g g g g g	a g g c a a g c g t	t a t c c g g a a t
541	a a a g c g t c c g	c a g g t g g t c a	g c c a a g t c t g	c c g t c a a a t c	a g g t t g c t t a
601	g g c g g t g g a a	a c t g g c a g a c	t a g a g a g c a g	t a g g g g t a g c	a g g a a t t c c c
661	t g a a a t g c g t	a g a g a t t g g g	a a g a a c a t c g	g t g g c g a a a g	c g t c c t a c t g
721	g a c a c t c a g g	g a c g a a a g c t	a g g g g a g c g a	c a g g g a t t a g	a t a c c c c t g t
781	g c a a a c g a t g	g a t a c t a g g c	g t g g c t t g t a	t c g a c c c g a g	c c g t t c c g a a
841	t a a g t a t c c c	g c c t g g g g g g	t a c g c a c g c a	a g t g t g a a a c	t c a a a g g t a t
901	c c g c a c a a g c	g g g g g a g t a t	g t g g t t t a c t	t c g a t g c a a c	g c g a a g a a c c
961	c t t g a c a t g t	c g c g a a c c c t	g g t g a a a g c t	g g g g g t g c c t	t c g g g a g c g c
1021	g g t g c a t t g c	t g t c g t c a g c	t c g t g t c g a g	a a a t g t t g g g	t t a a g t c c c g
1081	a a c c c t c g t t	c t t a g t t g g c	a g c a t t a a g t	t g g g g a c t c t	a a g g a g a c t g
1141	a c c g g a g g a a	g g t g g g g a t g	a c g t c a a g t c	a g c a t g c c c c	t t a c g t c t t g

```

1201 gtactacaat ggtcgggaca aagggcagcg aactcgcgag agccagcgaa tcccagcaaa
1261 cccggcctca gttcagattg caggctgcaa ctgcctgca tgaaggagga atcgctagta
1321 atcgccggtc agcatacggc ggtgaattcg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac
1381 accatggaag ctggtcacgc ccgaagtcac tacctcaacc gcaaggaggg ggatgcctaa
1441 ggcaggggga tgcctaaggc agggctagtg actgggggtga agtcgtaaca aggtaaccct
1501 gcagtct

```

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20 (1 .. 20)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1507 (1 .. 1507)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 37.2 bits (19), Expect = 0.049
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 2 gagtttgatcctggctcag 20
|||||
Sbjct: 32 gagtttgatcctggctcag 50

CPU time: 0.06 user secs. 0.01 sys. secs 0.07 total secs.

Lambda K H

1.33 0.621 1.12

Gapped

Lambda K H
1.33 0.621 1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 20
length of database: 7,887,942,976
effective HSP length: 19
effective length of query: 1
effective length of database: 7,887,942,957
effective search space: 7887942957
effective search space used: 7887942957
T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 16 (31.5 bits)

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1507

[No significant similarity was found](#)

Primer BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)

(CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG
GAGGCAGCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
 x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 60 (1 .. 60)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1507 (1 .. 1507)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.50
 Identities = 20/20 (100%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 41 actcctacgggaggcagcag 60
 |||||
 Sbjct: 330 actcctacgggaggcagcag 349
 CPU time: 0.04 user secs. 0.04 sys. secs 0.08 total
 secs.

Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Gapped
 Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
 Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
 Number of Hits to DB: 1

Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 60
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 22
 effective length of query: 38
 effective length of database: 7,902,326,017
 effective search space: 300288388646
 effective search space used: 300288388646
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 18 (35.3 bits)

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
 x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 17 (1 .. 17)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1507 (1 .. 1507)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 33.4 bits (17), Expect = 0.71
 Identities = 17/17 (100%)
 Strand = Plus / Minus

_____ | _____

Query: 1 attaccgcggctgctgg 17
 |||||
 Sbjct: 503 attaccgcggctgctgg 487
 CPU time: 0.05 user secs. 0.06 sys. secs 0.11 total
 secs.

Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Gapped
 Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
 Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
 Number of Hits to DB: 1
 Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 17
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 16
 effective length of query: 1
 effective length of database: 7,902,326,023
 effective search space: 7902326023
 effective search space used: 7902326023
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 16 (31.5 bits)

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC),
 degenerado, uma das opções.

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 24

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1507
[No significant similarity was found](#)

LOCUS AF139323 1421 bp DNA linear BCT 06-JUN-2001
 DEFINITION Microcystis aeruginosa strain UWOC MR-C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
 ACCESSION AF139323
 VERSION AF139323.1 GI:6572587
 KEYWORDS .
 SOURCE Microcystis aeruginosa
 ORGANISM [Microcystis aeruginosa](#)
 Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Microcystis.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1421)
 AUTHORS Tillett,D., Parker,D.L. and Neilan,B.A.
 TITLE 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
 JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 67 (6), 2810-2818 (2001)
 MEDLINE [21268883](#)
 PUBMED [11375198](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1421)
 AUTHORS Tillett,D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-MAR-1999) Microbiology and Immunology, The University of New South Wales, Botany St, Sydney, NSW 2052, Australia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1421
 /organism="Microcystis aeruginosa"
 /strain="UWOC MR-C"
 /db_xref="taxon:1126"
[rRNA](#) <1..>1421
 /product="16S ribosomal RNA"
 BASE COUNT 360 a 334 c 457 g 270 t
 ORIGIN
 1 acgctggcgg cgtgcctaac acatgcaagt cgaacgggaa tcttcggatt ctagtggcgg
 61 acgggtgagt aacgcgtaag aatctaactt caggacgggg acaacagttg gaaacgactg
 121 ctaatacccg atgtgccgca aggtgaaacc taattggcct gaagaagagc ttgcgtctga
 181 ttagctagtt ggtggggtaa gagcctacca aggcgacgat cagtagctgg tctgagagga
 241 tgagcagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga
 301 attttccgca atgggcgaaa gcctgacgga gcaacgccgc gtgaggaggg aaggtctttg
 361 gattgtaaac ctcttttctc aaggaagaag ttctgacggt acttgaggaa tcagcctcgg
 421 ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac gggggaggca agcgttatcc ggaattattg
 481 ggcgtaaac gtccgcaggt ggtcagccaa gtctgccgtc aaatcagggt gcttaacgac
 541 ctaaaggcgg tggaaactgg cagactagag agcagtaggg gtagcaggaa ttcccagtg
 601 agcgggtgaa tgcgtagaga ttgggaagaa catcggtggc gaaagcgtgc tactgggctg
 661 tatctgacac tcaggacgca aagctagggg agcgaaaggg attagatacc cctgtagtcc
 721 tagccgtaaa cgatggatac taggcgtggc ttgtatcgac ccgagccgtg ccgaagctaa
 781 cgcggttaag atcccgcctg gggagtacgc acgcaagtgt gaaactcaaa ggaattgacg
 841 ggggcccgca caagcggtgg agtatgtggt ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc
 901 aagacttgac atgtcgcgaa ccctggtgaa agctgggggt gccttcggga gcgcgaacac
 961 aggtggtgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
 1021 gcgcaaccct cgttcttagt tgccagcatt aagttgggga ctctaaggag actgccggtg
 1081 acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcagcatg ccccttacgt cttgggcgac

```

1141 acacgtacta caatggctcg gacaaagggc agcgaactcg cgagagccag cgaatcccag
1201 caaaccggc ctcagttcag attgcaggct gcaactcgcc tgcataagg aggaatcgct
1261 agtaatcgcc ggtcagcata cggcggtgaa ttcggtcccg ggccttgat acaccggccg
1321 tcacaccatg gaagctggtc acgcccgaag tcattacctc aaccgcaagg aggggggatgc
1381 ctaaggcagg gctagtgact ggggtgaagt cgtaacaagg t

```

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1361

No significant similarity was found

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1361

No significant similarity was found

Iniciador BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)

(CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG
GAGGCAGCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 60 (1 .. 60)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1361 (1 .. 1361)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.50
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 41 actcctacgggaggcagcag 60
|||||
Sbjct: 215 actcctacgggaggcagcag 234
CPU time: 0.05 user secs. 0.03 sys. secs 0.08 total
secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped		
Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2

Number of Hits to DB: 1
 Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 60
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 22
 effective length of query: 38
 effective length of database: 7,902,326,017
 effective search space: 300288388646
 effective search space used: 300288388646
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 18 (35.3 bits)

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 Lcl|seq_1 Length 17 (1 .. 17)

Sequence 2 Lcl|seq_2 Length 1361 (1 .. 1361)

NOTE:The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 33.4 bits (17), Expect = 0.71
 Identities = 17/17 (100%)
 Strand = Plus / Minus

```
Query: 1   attaccgcggctgctgg 17
          |||||
Sbjct: 388 attaccgcggctgctgg 372
CPU time:   0.06 user secs.      0.03 sys. secs      0.09 total
secs.
```

```
Lambda      K      H
      1.33    0.621  1.12
```

```
Gapped
Lambda      K      H
      1.33    0.621  1.12
```

```
Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 17
length of database: 7,902,326,039
effective HSP length: 16
effective length of query: 1
effective length of database: 7,902,326,023
effective search space: 7902326023
effective search space used: 7902326023
T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 16 (31.5 bits)
```

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC),
degenerado, uma das opções.

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: ☐ Filter ☐ Align

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 24

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1361
No significant similarity was found

LOCUS	AB035549	1457 bp	DNA	linear	BCT 20-JUN-2001
DEFINITION	Microcystis aeruginosa gene for 16S rRNA, partial sequence.				
ACCESSION	AB035549				
VERSION	AB035549.1 GI:7416834				
KEYWORDS	16S ribosomal RNA.				
SOURCE	Microcystis aeruginosa				
ORGANISM	Microcystis aeruginosa Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Microcystis.				
REFERENCE	1 (sites)				
AUTHORS	Otsuka,S., Suda,S., Shibata,S., Oyaizu,H., Matsumoto,S. and Watanabe,M.M.				
TITLE	A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus Microcystis Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code				
JOURNAL	Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51 (Pt 3), 873-879 (2001)				
MEDLINE	21304428				
PUBMED	11411709				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1457)				
AUTHORS	Otsuka,S., Shibata,S. and Watanabe,M.M.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (06-DEC-1999) Shigeto Otsuka, The University of Tokyo, Department of Applied Biological Chemistry; 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan (E-mail:shigeton@mba.nifty.ne.jp, Tel:81-3-5841-5176)				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1457 /organism="Microcystis aeruginosa" /strain="NC7" /db_xref="taxon:1126"				
rRNA	<1..>1457 /product="16S ribosomal RNA"				
BASE COUNT	366 a 344 c 469 g 278 t				
ORIGIN					
1	acgctggcgg	cgtgcctaac	acatgcaagt	cgaacgggaa	tcttcggatt ccagtggcgg
61	acgggtgagt	aacgcgtaag	aatctaactt	caggacgggg	acaacagttg gaaacgactg
121	ctaatacccg	atgtgccgcg	aggtgaaacc	taattggcct	gaagaagagc ttgcgtctga
181	ttagctagtt	ggtggggtaa	aggcctacca	aggcgacgat	cagtagctgg tctgagagga
241	tgagcagcca	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggaggca gcagtgggga
301	attttccgca	atgggcgaaa	gcctgacgga	gcaacgccgc	gtgaggaggg aaggtctttg
361	gattgtaaac	ctcttttctc	aaggaagaag	ttctgacggt	acttgaggaa tcagcctcgg
421	ctaactccgt	gccagcagcc	gcggtaatac	gggggaggca	agcgttatcc ggaattattg
481	ggcgtaaaag	gtccgcaggt	ggtcagccaa	gtctgctgtc	aaatcaggtt gcttaacgac
541	ctaaaggcgg	tggaaactgg	cagactagag	agcagtaggg	gtagcaggaa ttcccagtg
601	agcgggtgaa	tgcgtagaga	ttgggaagaa	catcgggtgc	gaaagcgtgc tactgggctg
661	tatctgacac	tcagggacga	aagctagggg	agcgaaaggg	attagatacc cctgtagtcc
721	tagccgtaaa	cgatggatac	taggcgtggc	ttgtatcgac	ccgagccgtg ccgaagctaa
781	cgcgttaagt	atcccgcctg	gggagtagcg	acgcaagtgt	gaaactcaaa ggaattgacg
841	ggggcccgca	caagcgttgg	agtatgtggt	ttaattcgat	gcaacgcgaa gaaccttacc
901	aagacttgac	atgtcgcgaa	ccctggtgaa	agctgggggt	gccttcggga gcgcgaacac


```

961 aggtggtgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
1021 gcgcaaccct cgttcttagt tgccagcatt aagttgggga ctctaaggag actgccggtg
1081 acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcagcatg ccccttacgt cttgggcgac
1141 acacgtacta caatggtcgg gacaaagggc agcgaactcg cgagagccag cgaatcccag
1201 caaaccggc ctcagttcag attgcaggct gcaactcgcc tgcataaagg aggaatcgct
1261 agtaatcgcc ggtcagcata cggcggtgaa ttctgttccc ggcttcttac acaccgcccg
1321 tcacaccatg gaagctggtc acgcccgaag tcattacctc aaccgcaagg agggggatgc
1381 ctaaggcagg gctagtgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtacc ggaaggtgtg
1441 gctggatcac ctcctta

```

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1457

No significant similarity was found

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20 (1 .. 20)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1457 (1 .. 1457)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr

database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Minus

_____ |
_____ |)

Query: 1 tacggctaccttggttacgac 20
 | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1428 tacggctaccttggttacgac 1409
CPU time: 0.04 user secs. 0.04 sys. secs 0.08 total
secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 20
length of database: 7,902,326,039
effective HSP length: 19
effective length of query: 1
effective length of database: 7,902,326,020
effective search space: 7902326020
effective search space used: 7902326020
T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 16 (31.5 bits)

Iniciador BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)
(CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG
GAGGCAGCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 60 (1 .. 60)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1457 (1 .. 1457)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.50
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 41 actcctacgggagggcagcag 60
|||||
Sbjct: 275 actcctacgggagggcagcag 294
CPU time: 0.05 user secs. 0.05 sys. secs 0.10 total
secs.

Lambda K H
1.33 0.621 1.12

Gapped
 Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
 Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
 Number of Hits to DB: 1
 Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 60
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 22
 effective length of query: 38
 effective length of database: 7,902,326,017
 effective search space: 300288388646
 effective search space used: 300288388646
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 18 (35.3 bits)

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 17 (1 .. 17)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1457 (1 .. 1457)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 33.4 bits (17), Expect = 0.71
Identities = 17/17 (100%)
Strand = Plus / Minus

||
_||

Query: 1 attaccgcggtgctgg 17
|||||
Sbjct: 448 attaccgcggtgctgg 432
CPU time: 0.06 user secs. 0.02 sys. secs 0.08 total
secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 17
length of database: 7,902,326,039
effective HSP length: 16
effective length of query: 1
effective length of database: 7,902,326,023
effective search space: 7902326023
effective search space used: 7902326023
T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 16 (31.5 bits)

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC),
degenerado, uma das opções.

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 **Length** 24

Sequence 2 lcl|seq_2 **Length** 1457

[No significant similarity was found](#)

Site utilizado: NCBI, página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>

APÊNDICE IV

Blast Realizado com *Microcystis flos-aquae*.

APÊNDICE IV

LOCUS	MFL271675	378 bp	rRNA	linear	BCT 26-JUL-2001
DEFINITION	Microcystis flos-aquae partial 16S rRNA gene, strain BMMi14/C.				
ACCESSION	AJ271675				
VERSION	AJ271675.1 GI:11071548				
KEYWORDS	16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.				
SOURCE	Microcystis flos-aquae				
ORGANISM	Microcystis flos-aquae Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Microcystis.				
REFERENCE	1				
AUTHORS	Lepere,C., Wilmotte,A. and Meyer,B.				
TITLE	Molecular diversity of Microcystis strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences				
JOURNAL	Syst. Geogr. Plants 70, 275-283 (2001)				
REFERENCE	2 (bases 1 to 378)				
AUTHORS	Wilmotte,A.M.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (28-JAN-2000) Wilmotte A.M., Dept Plant Biology, University of Liege, B22, Liege /4000, BELGIUM				
REMARK	Revised by author 17-JUL-2000				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..378 /organism="Microcystis flos-aquae" /strain="BMMi14/C" /db_xref="taxon:109615" /country="Germany:Passader See, region of Ploen"				
gene	1..378 /gene="16S rRNA"				
rRNA	<1..378 /gene="16S rRNA" /product="16S ribosomal RNA"				
BASE COUNT	103 a	79 c	121 g	75 t	
ORIGIN	1 acgggaatct tcggattcca gtggcggacg ggtgagtaac gcgtaagaat ctaacttcag 61 gacggggaca acagttggaa acgactgcta ataccgatg tgccgcaagg tgaaacctaa 121 ttggcctgaa gaagagcttg cgtctgatta gctagttggt agggtaaaag cctaccaagg 181 cgacgatcag tagctgtct gagaggatga gcagccacac tgggactgag acacggcca 241 gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt ttccgcaatg ggcgaaagcc tgacggagca 301 acgccgcgtg agggaggaag gtctttgat tgtaaacctc ttttctcaag gaagaagttc 361 tgacggtact tgaggaat				

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 378

No significant similarity was found

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
 x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ Align

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 378

No significant similarity was found

Iniciador BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)

(CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: 1 Mismatch: -2 gap open: 5 gap extension: 2
 x_dropoff: 50 expect: 10.00 wordsize: 11 [Filter](#) ☒ Align

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 60 (1 .. 60)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 378 (1 .. 378)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.50
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 41 actcctacgggaggcagcag 60
 |||||
Sbjct: 242 actcctacgggaggcagcag 261
CPU time: 0.07 user secs. 0.03 sys. secs 0.10 total
secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 60
length of database: 7,902,326,039
effective HSP length: 22
effective length of query: 38
effective length of database: 7,902,326,017
effective search space: 300288388646
effective search space used: 300288388646

T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 18 (35.3 bits)

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 17

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 378
[No significant similarity was found](#)

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC),
degenerado, uma das opções.

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 24

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 378
[No significant similarity was found](#)

LOCUS	AF139329	1421 bp	DNA	linear	BCT 06-JUN-2001
DEFINITION	Microcystis flos-aquae strain UWCC C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	AF139329				
VERSION	AF139329.1 GI:6572593				
KEYWORDS	.				

SOURCE	Microcystis flos-aquae
ORGANISM	Microcystis flos-aquae Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Microcystis.
REFERENCE	1 (bases 1 to 1421)
AUTHORS	Tillett,D., Parker,D.L. and Neilan,B.A.
TITLE	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
JOURNAL	Appl. Environ. Microbiol. 67 (6), 2810-2818 (2001)
MEDLINE	21268883
PUBMED	11375198
REFERENCE	2 (bases 1 to 1421)
AUTHORS	Tillett,D.
TITLE	Direct Submission
JOURNAL	Submitted (30-MAR-1999) Microbiology and Immunology, The University of New South Wales, Botany St, Sydney, NSW 2052, Australia
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1421 /organism="Microcystis flos-aquae" /strain="UWOCC C3" /db_xref="taxon:109615"
rRNA	<1..>1421 /product="16S ribosomal RNA"
BASE COUNT	360 a 334 c 457 g 270 t
ORIGIN	
1	acgctggcgg cgtgcctaac acatgcaagt cgaacgggaa tcttcggatt ctagtggcgg
61	acgggtgagt aacgcgtaag aatctaactt caggacgggg acaacagttg gaaacgactg
121	ctaatacccg atatgccgca gggtgaaacc taattggcct gaagaagagc ttgcgtctga
181	ttagctagtt ggtggggtaa aggcctacca aggcgacgat cagtagctgg tctgagagga
241	tgagcagcca cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga
301	attttccgca atgggcgaaa gcctgacgga gcaacgccgc gtgagggagg aaggtctttg
361	gattgtaaac ctcttttctc aaggaagaag ttctgacggg acttgaggaa tcagcctcgg
421	ctaactcgt gccagcagcc gcggtaatac gggggaggca agcgttatcc ggaattattg
481	ggcgtaaagc gtccgcaggt ggtagccaa gtctgccgtc aaatcaggtt gcttaacgac
541	ctaaaggcgg tggaaactgg cagactagag agcagtaggg gtagcaggaa ttcccagtg
601	agcgggtgaa tgcgtagaga ttgggaagaa catcggtggc gaaagcgtgc tactgggctg
661	tatctgacac tcagggacga aagctagggg agcgaaaggg attagatacc cctgtagtcc
721	tagccgtaaa cgatggatac taggcgtggc ttgtatcgac ccgagccgtg ccgaagctaa
781	cgcgttaagt atcccgcctg gggagtacgc acgcaagtgt gaaactcaaa ggaattgacg
841	ggggcccgca caagcggtag agtatgtggg ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc
901	aagacttgac atgtcgcgaa ccctgggtgaa agctgggggt gccttcggga gcgcgaacac
961	aggtggtgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
1021	gcgcaaccct cgttcttagt tgccagcatt aagttgggga ctctaaggag actgccgggtg
1081	acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcagcatg ccccttacgt cttgggcgac
1141	acacgtacta caatggtcgg gacaaagggc agcgaaactc cgagagccag cgaatcccg
1201	caaaccggc ctcagttcag attgcaggt gcaactcgcc tgcattgaag aggaatcgct
1261	agtaatcgcc ggtcagcata cggcgggtgaa ttcgttcccg ggcttgtac acaccgccc
1321	tcacaccatg gaagctggc acgcccgaag tcattacctc aaccgcaagg agggggatgc
1381	ctaaggcagg gctagtgact ggggtgaagt cgtaacaagg t

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421

[No significant similarity was found](#)

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421

[No significant similarity was found](#)

Iniciador BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)

(CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG
GAGGCAGCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 60 (1 .. 60)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421 (1 .. 1421)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.50
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 41 actcctacgggaggcagcag 60
 |||||
Sbjct: 275 actcctacgggaggcagcag 294
CPU time: 0.03 user secs. 0.03 sys. secs 0.06 total
secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 60
length of database: 7,902,326,039
effective HSP length: 22
effective length of query: 38
effective length of database: 7,902,326,017
effective search space: 300288388646
effective search space used: 300288388646

T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 18 (35.3 bits)

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 17 (1 .. 17)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421 (1 .. 1421)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 33.4 bits (17), Expect = 0.71
Identities = 17/17 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 attaccgcggtgctgg 17
|||||
Sbjct: 448 attaccgcggtgctgg 432

CPU time: 0.06 user secs. 0.05 sys. secs 0.11 total secs.

Lambda K H
1.33 0.621 1.12

Gapped
Lambda K H
1.33 0.621 1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
Number of Hits to DB: 1
Number of Sequences: 0
Number of extensions: 1
Number of successful extensions: 1
Number of sequences better than 10.0: 1
length of query: 17
length of database: 7,902,326,039
effective HSP length: 16
effective length of query: 1
effective length of database: 7,902,326,023
effective search space: 7902326023
effective search space used: 7902326023
T: 0
A: 0
X1: 6 (11.5 bits)
X2: 26 (50.0 bits)
S1: 12 (23.8 bits)
S2: 16 (31.5 bits)

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC),
degenerado, uma das opções.

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 24

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421

[No significant similarity was found](#)

LOCUS	AF139327	1421 bp	DNA	linear	BCT 06-JUN-2001
-------	----------	---------	-----	--------	-----------------

DEFINITION	Microcystis flos-aquae strain UWOC N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.					
ACCESSION	AF139327					
VERSION	AF139327.1 GI:6572591					
KEYWORDS	.					
SOURCE	Microcystis flos-aquae					
ORGANISM	Microcystis flos-aquae Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Microcystis.					
REFERENCE	1 (bases 1 to 1421)					
AUTHORS	Tillett,D., Parker,D.L. and Neilan,B.A.					
TITLE	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					
JOURNAL	Appl. Environ. Microbiol. 67 (6), 2810-2818 (2001)					
MEDLINE	21268883					
PUBMED	11375198					
REFERENCE	2 (bases 1 to 1421)					
AUTHORS	Tillett,D.					
TITLE	Direct Submission					
JOURNAL	Submitted (30-MAR-1999) Microbiology and Immunology, The University of New South Wales, Botany St, Sydney, NSW 2052, Australia					
FEATURES	Location/Qualifiers					
source	1..1421 /organism="Microcystis flos-aquae" /strain="UWOC N" /db_xref="taxon:109615"					
rRNA	<1..>1421 /product="16S ribosomal RNA"					
BASE COUNT	362 a	332 c	456 g	271 t		
ORIGIN						
1	acgctggcgg	cgtgcctaac	acatgcaagt	cgaacgggaa	tcttcggatt	ctagtggcgg
61	acgggtgagt	aacgcgtaag	aatctaactt	caggacgggg	acaacagttg	gaaacgactg
121	ctaatacccg	atgtgccgca	aggtgaaaac	taattggcct	gaagaagagc	ttgcgtctga
181	ttagctagtt	ggtggggtaa	gagcctacca	aggcgacgat	cagtagctgg	tctgagagga
241	tgagcagcca	cactgggact	gagacacggc	ccagactcct	acgggaggca	gcagtgggga
301	attttccgca	atgggcgaaa	gcctgacgga	gcaacgcgcg	gtgagggagg	aaggtctttg
361	gattgtaaac	ctcttttctc	aaggaagaag	ttctgacggt	acttgaggaa	tcagcctcgg
421	ctaactccgt	gccagcagcc	gcggtaatac	gggggaggca	agcgttatcc	ggaattattg
481	ggcgtaaagc	gtccgcaggt	ggtcagccaa	gtctgctgtc	aaatcagggt	gcttaacgac
541	ctaaaggcgg	tggaaactgg	cagactagag	agcagtaggg	gtagcaggaa	ttcccagtg
601	agcggtgaaa	tgcgtagaga	ttgggaagaa	catcggtggc	gaaagcgtgc	tactgggctg
661	tatctgacac	tcagggacga	aagctagggg	agcgaaaggg	attagatacc	cctgtagtcc
721	tagccgtaaa	cgatggatac	taggcgtggc	ttgtatcgac	ccgagccgtg	ccgaagctaa
781	cgcgttaagt	atcccgcctg	gggagtagcg	acgcaagtgt	gaaactcaaa	ggaattgacg
841	ggggcccgcg	caagcgggtg	agtatgtggt	ttaattcgat	gcaacgcgaa	gaaccttacc
901	aagacttgac	atgtcgcgaa	ccctggtgaa	agctaggggt	gccttcggga	gcgcgaacac
961	aggtggtgca	tggctgtcgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgaacga
1021	gcgcaaccct	cgttcttagt	tgccagcatt	aagttgggga	ctctaaggag	actgccgggtg
1081	acaaaccgga	ggaaggtggg	gatgacgtca	agtcagcatg	ccccttacgt	cttgggcgac
1141	acacgtacta	caatggtcgg	gacaaagggc	agcgaactcg	cgagagccag	cgaatcccag
1201	caaaccgggc	ctcagttcag	attgcaggct	gcaactcgcc	tgcataaggg	aggaatcgct
1261	agtaatcgcc	ggtcagcata	cggcggtgaa	ttcgttcccg	ggccttgtag	acaccgcccg
1321	tcacaccatg	gaagctggtc	acgcccgaag	tcattacctc	aaccgcaagg	agggggatgc

1381 ctaaggcagg gctagtact ggggtgaagt cgtaacaagg t

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421

No significant similarity was found

Iniciador 1494Re (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421

No significant similarity was found

Iniciador BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)
 (CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 60 (1 .. 60)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421 (1 .. 1421)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.50

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 41 actcctacgggaggcagcag 60

|||||

Sbjct: 275 actcctacgggaggcagcag 294

CPU time: 0.03 user secs. 0.06 sys. secs 0.09 total secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped		
Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
 Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
 Number of Hits to DB: 1
 Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 60
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 22

effective length of query: 38
 effective length of database: 7,902,326,017
 effective search space: 300288388646
 effective search space used: 300288388646
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 18 (35.3 bits)

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 17 (1 .. 17)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421 (1 .. 1421)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 33.4 bits (17), Expect = 0.71
 Identities = 17/17 (100%)
 Strand = Plus / Minus

Sequence 1:
 Sequence 2:

Query: 1 attaccgcggctgctgg 17
 |||||
 Sbjct: 448 attaccgcggctgctgg 432
 CPU time: 0.07 user secs. 0.04 sys. secs 0.11 total
 secs.

Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Gapped
 Lambda K H
 1.33 0.621 1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
 Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
 Number of Hits to DB: 1
 Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 17
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 16
 effective length of query: 1
 effective length of database: 7,902,326,023
 effective search space: 7902326023
 effective search space used: 7902326023
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 16 (31.5 bits)

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC),
 degenerado, uma das opções.

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
 x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 24

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1421

[No significant similarity was found](#)

Site utilizado: NCBI, página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>

APÊNDICE V

Blast Realizado com Synechococcus sp.

APÊNDICE V

LOCUS	AY151244	1563 bp	DNA	linear	BCT 24-JAN-2003
DEFINITION	Synechococcus sp. MW74D3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.				
ACCESSION	AY151244				
VERSION	AY151244.2 GI:27888234				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Synechococcus sp. MW74D3				
ORGANISM	Synechococcus sp. MW74D3 Bacteria; Cyanobacteria; Chroococcales; Synechococcus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 1563)				
AUTHORS	Crosbie,N.D., Poeckl,M. and Weisse,T.				
TITLE	Evolution and dispersal within the non-marine branch of the picophytoplankton clade				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 1563)				
AUTHORS	Crosbie,N.D., Poeckl,M. and Weisse,T.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (18-SEP-2002) Microbial Ecology, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9, Mondsee, Upper Austria 5310, Austria				
REFERENCE	3 (bases 1 to 1563)				
AUTHORS	Crosbie,N.D., Poeckl,M. and Weisse,T.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (24-JAN-2003) Microbial Ecology, Institute for Limnology, Mondseestrasse 9, Mondsee, Upper Austria 5310, Austria				
REMARK	Sequence update by submitter				
COMMENT	On Jan 24, 2003 this sequence version replaced gi: 24711737 .				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..1563 /organism="Synechococcus sp. MW74D3" /isolate="MW74D3" /db_xref="taxon:210714"				
rRNA	1..1563 /product="16S ribosomal RNA"				
BASE COUNT	389 a	366 c	480 g	326 t	2 others
ORIGIN					
1	ttnacctggc	tcaggatgaa	cgtctggcggc	gtgcttaaca	catgcaagtc gaacgaacct
61	tcgggttagt	ggcggacggg	tgagtaacgc	gtgagaatct	gccctcagga gggggataac
121	ggctggaaac	ggcgccta	accccatatg	ccgagaggtg	aatgaattt cgcctgagga
181	tgagctcgcg	tctgattagc	tagttgggtg	ggtaaaggct	caccaaggca tcgatcagta
241	gctgggtctga	gaggatgatc	agccacactg	ggactgagac	acggcccaga ctctacggg
301	aggcagcagt	ggggaatttt	ccgcaatggg	cgcaagcctg	acggagcaac gccgcgtgag
361	ggatgaaggc	ctctgggctg	taaacctctt	ttatcaagga	agaagatctg acggtacttg
421	atgaataagc	cacggcta	tccgtgccag	cagccgcggg	aatacgggag tggcaagcgt
481	tatccggaat	tattgggcgt	aaagcgtccg	cagggcggtt	tacaagtctg tcgttaaaac
541	gtggagctca	actccatttc	ggcgtatgaa	actgtaagac	tagagtgtgg taggggcaga
601	gggaattccc	ggtgtagcgg	tgaaatgcgt	agatatcggg	agaacacca gtggcggaagg
661	cgctctgctg	ggccataact	gacgctcatg	gacgaaagct	aggggagcga aagggttag
721	ataccctgtg	agtcctagcc	gtaaacgatg	aacactaggt	gtcgggggaa tcgacccct
781	cgggtgctga	kccaacgcgt	taagtgttcc	gcctggggag	tacgcacgca agtgtgaaac
841	tcaaaggaat	tgacgggggg	cccgcacaag	cgggtggagta	tgtggtttta ttcgatgcaa
901	cgcgaagaac	cttaccaggg	tttgacatcc	tgcaatccc	ttggaaactt gggagtgcct
961	tcgggagcgc	agagacaggt	ggtgcatggc	tgtcgtcagc	tcgtgtcgtg agatgttggg


```

1021 ttaagtcccg caacgagcgc aaccacgctc tttagttgcc agcattcagt tgggcactct
1081 agagagaccg ccggtgataa accggaggaa ggtgtggatg acgtcaagtc atcatgcccc
1141 ttacatcctg ggctacacac gtactacaat gctacggaca aagggcagca aactcgcgag
1201 agctagcaaa tcccataaac cgtggctcag ttcagatcgt aggctgcaac tcgcctacgt
1261 gaaggaggaa tcgctagtaa tcgcaggta gcatactgcg gtgaatacgt tcccgggcct
1321 tgtacacacc gcccgtcaca ccatggaagt tggccacgcc cgaagtcgtt actccaaccc
1381 ttgtggagga ggatgccgaa ggtggggctg atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc
1441 cgtaccgga ggtgcggctg gatcacctcc taacagggat acaataacta attgtgatgt
1501 ctgagtaatt tattctcagg ccatgattct gtcattctta aggtcgatcg gtacctcaat
1561 ttg

```

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.4 [Aug-26-2002]

Match: Mismatch: gap open: gap extension:
x_dropoff: expect: wordsize: [Filter](#) ☒ [Align](#)

Sequence 1 lcl|seq_1 Length 20 (1 .. 20)

Sequence 2 lcl|seq_2 Length 1563 (1 .. 1563)

NOTE: The statistics (bitscore and expect value) is calculated based on the size of nr database

NOTE: If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence

Score = 39.1 bits (20), Expect = 0.013
Identities = 20/20 (100%)
Strand = Plus / Minus

_____)
_____))

Query: 1 tacggctaccttggttacgac 20
 |||||
 Sbjct: 1444 tacggctaccttggttacgac 1425
 CPU time: 0.03 user secs. 0.05 sys. secs 0.08 total
 secs.

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Gapped

Lambda	K	H
1.33	0.621	1.12

Matrix: blastn matrix:1 -2
 Gap Penalties: Existence: 5, Extension: 2
 Number of Hits to DB: 1
 Number of Sequences: 0
 Number of extensions: 1
 Number of successful extensions: 1
 Number of sequences better than 10.0: 1
 length of query: 20
 length of database: 7,902,326,039
 effective HSP length: 19
 effective length of query: 1
 effective length of database: 7,902,326,020
 effective search space: 7902326020
 effective search space used: 7902326020
 T: 0
 A: 0
 X1: 6 (11.5 bits)
 X2: 26 (50.0 bits)
 S1: 12 (23.8 bits)
 S2: 16 (31.5 bits)

APÊNDICE VI

Alvos Potenciais dos Iniciadores Utilizados

Apêndice VI

Iniciador 27F1 (NEILAN *et al.*, 1997) (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG).

SEQUENCE_MATCH version 2.7

written by Niels Larsen, niels@cme.msu.edu

Short-ID : raw_27004

Full name : raw_27004, 20 bases, B4C45DAC checksum.

Sequence : 14 unique oligos.

RDP data : Greater than or equal to 1200 Small Subunit bacterial rRNAs with RDP hierarchy

Comments : A minimum of 100 unique oligos required

: A total of 0 sequences were excluded

: 27060 sequences were included in the search

: The screening was based on 7-base oligomers

Date : Thu Feb 6 16:24:06 2003

CPU time : 0.03 seconds

Bacteria(domain)

Cyanobacteria(phylum)

Cyanobacteria(class)

Subsection_1(subsection)

Family_1.1(family)

Cyanothece(genus)

S000000916 1.000 1365 Gloeocapsa sp. KO38CU6;

KO38CU6; AB067575

Proteobacteria(phylum)

Alphaproteobacteria(class)

Rickettsiales(order)

Anaplasmataceae(family)

Wolbachia(genus)

S000013716 1.000 1321 Wolbachia sp.; L02886

Rhodobacterales(order)

Rhodobacteraceae(family)

Ruegeria(genus)

S000108574 1.000 1262 alpha proteobacterium

GMDJE10F1; GMDJE10F1; AY162092

Rhizobiales(order)

Rhizobiaceae(family)

Rhizobium(genus)

S000008688 1.000 1422 Agrobacterium tumefaciens

str. C58 (U. Washington); C58; AE009201

Sinorhizobium(genus)

S000108572 1.000 1287 alpha proteobacterium

PII_GH2.2.D12; PII_GH2.2.D12; AY162064

Brucellaceae(family)

Ochrobactrum(genus)

S000007592 1.000 1181 Solomonas fluorantheni;

DSM IDD 89-130; mp18 HH1, mp19 HH2; X54743

S000010660 1.000 1181 Solomonas fluorantheni;

DSM IDD 89-130; mp18 HH1, mp19 HH2; X54743

S000013714 1.000 1181 Solomonas fluorantheni;

DSM IDD 89-130; mp18 HH1, mp19 HH2; X54743

S000108571 1.000 1282 alpha proteobacterium

PII_GH1.2.A3; PII_GH1.2.A3; AY162058

Bradyrhizobiaceae(family)

Bradyrhizobium(genus)

S000108577 1.000 1280 alpha proteobacterium
 GMD13F11; GMD13F11; AY162113
 unclassified
 S000022879 1.000 1409 Nordella oligomobilis; N21;
 AF370880
 S000108576 1.000 1259 alpha proteobacterium
 GMD21A06; GMD21A06; AY162106
 unclassified
 S000108573 1.000 1286 alpha proteobacterium GMD37A6;
 GMD37A6; AY162077
 Betaproteobacteria(class)
 Burkholderiales(order)
 Burkholderiaceae(family)
 Ralstonia(genus)
 S000108570 1.000 1300 beta proteobacterium
 PII_GH1.2.A10; PII_GH1.2.A10; AY162057
 Oxalobacteraceae(family)
 Herbaspirillum(genus)
 S000108567 1.000 1312 beta proteobacterium
 PI_GH3.1.E3; PI_GH3.1.E3; AY162050
 S000108569 1.000 1316 beta proteobacterium
 PI_GH4.1.G5; PI_GH4.1.G5; AY162054
 Alcaligenaceae(family)
 Bordetella(genus)
 S000108566 1.000 1302 beta proteobacterium
 PI_GH1.1.B4; PI_GH1.1.B4; AY162039
 Comamonadaceae(family)
 Comamonas(genus)
 S000108575 1.000 1322 beta proteobacterium
 GMD21C02; GMD21C02; AY162104
 Gammaproteobacteria(class)
 Xanthomonadales(order)
 Xanthomonadaceae(family)
 Xanthomonas(genus)
 S000014800 1.000 1457 Xanthomonas axonopodis pv.
 citri str. 306; 306; AE012082
 Stenotrophomonas(genus)
 S000108568 1.000 1325 gamma proteobacterium
 PI_GH4.1.G2; PI_GH4.1.G2; AY162052
 Pseudomonadales(order)
 Pseudomonadaceae(family)
 Pseudomonas(genus)
 S000002935 1.000 1468 Pseudomonas lini; CFBP
 5737; AY035996
 S000008697 1.000 1433 Pseudomonas congelans;
 type strain: DSM 14939 = LMG 21466; P 538/23; AJ492828
 S000016150 1.000 1398 Pseudomonas stutzeri;
 pssu2; AJ310484
 Aeromonadales(order)
 Aeromonadaceae(family)
 Aeromonas(genus)
 S000012940 1.000 1428 Aeromonas sp. VKM B-2261;
 VKM B-2261; dcm2; AF430120
 Enterobacteriales(order)
 Enterobacteriaceae(family)
 Shigella(genus)
 S000009863 1.000 1427 uncultured bacterium;
 AJ487021
 Firmicutes(phylum)

Clostridia(class)
 Clostridiales(order)
 Eubacteriaceae(family)
 Eubacterium(genus)
 S000022887 1.000 1442 uncultured rumen bacterium
 3C3d-14; 3C3d-14; AB034068
 Peptococcaceae(family)
 Desulfotomaculum(genus)
 S000019292 1.000 1413 toluene-degrading
 methanogenic consortium bacterium; Eub 1; AF423181
 Mollicutes(class)
 Mycoplasmatales(order)
 Mycoplasmataceae(family)
 Mycoplasma(genus)
 S000005512 1.000 1442 Mycoplasma capricolum;
 X00921
 Bacilli(class)
 Bacillales(order)
 Alicyclobacillaceae(family)
 Alicyclobacillus(genus)
 S000009082 1.000 1432 Alicyclobacillus sp.;
 AX384016
 Staphylococcaceae(family)
 Staphylococcus(genus)
 S000022784 1.000 1467 uncultured Staphylococcus
 sp.; bottae4; AF467425
 S000022884 1.000 1459 uncultured Staphylococcus
 sp.; Gexpansis4; AF467427
 Lactobacillales(order)
 Leuconostocaceae(family)
 Weissella(genus)
 S000016658 1.000 1367 Weissella kandleri; NCDO
 2753; X52570
 Streptococcaceae(family)
 Streptococcus(genus)
 S000094657 1.000 1477 Streptococcus mutans
 UA159; UA159; AE015023
 S000094701 1.000 1422 Streptococcus
 parasanguinis; ChDC OS49; AF543299
 Actinobacteria(phylum)
 Actinobacteria(class)
 Actinobacteridae(subclass)
 Actinomycetales(order)
 Actinomycineae(suborder)
 Actinomycetaceae(family)
 Actinomyces(genus)
 S000094700 1.000 1405 Actinomyces
 viscosus; ChDC OS34; AF543286
 Micrococcineae(suborder)
 Micrococcaceae(family)
 Rothia(genus)
 S000094699 1.000 1404 Rothia dentocariosa;
 ChDC OS32; AF543284
 Microbacteriaceae(family)
 Microbacterium(genus)
 S000014651 1.000 1271 Microbacterium aurum
 (T); IFO 15204T; D21340
 Clavibacter(genus)

S000003729 1.000 1429 Clavibacter
 michiganensis; P 250/01; AJ310416
 Spirochaetes (phylum)
 Spirochaetes (class)
 Spirochaetales (order)
 Leptospiraceae (family)
 Leptonema (genus)
 S000013710 1.000 1426 Leptonema illini; M88719
 unclassified
 S000108578 1.000 1270 planctomycete GMD16E07; GMD16E07;
 AY162118

Iniciador 1494Rc (NEILAN *et al.*, 1997) (TACGGCTACCTTGTTACGAC).

SEQUENCE_MATCH version 2.7

written by Niels Larsen, niels@cme.msu.edu

Short-ID : raw_27035
 Full name : raw_27035, 20 bases, 50F2FADB checksum.
 Sequence : 14 unique oligos.
 RDP data : Greater than or equal to 1200 Small Subunit bacterial
 rRNAs with RDP hierarchy
 Comments : A minimum of 100 unique oligos required
 : A total of 0 sequences were excluded
 : 27060 sequences were included in the search
 : The screening was based on 7-base oligomers
 Date : Thu Feb 6 16:25:17 2003
 CPU time : 0.01 seconds

Bacteria (domain)
 Proteobacteria (phylum)
 Gammaproteobacteria (class)
 Xanthomonadales (order)
 Xanthomonadaceae (family)
 Xanthomonas (genus)
 S000001220 0.357 1437 Xylella fastidiosa; OSL92-
 3; AF159577
 S000006371 0.357 1438 Xylella fastidiosa;
 r116v11; AF159573
 S000008025 0.500 1409 Pseudomonas boreopolis;
 ATCC 33662T; AB021391
 unclassified
 S000000879 0.357 1445 Xylella fastidiosa; PD28-
 5; AF159574
 S000008278 0.357 1443 Xylella fastidiosa; CI.52;
 AF203389
 S000008638 0.429 1439 Xylella fastidiosa;
 PE.PLS; AF203392
 S000011298 0.357 1453 Xylella fastidiosa 9a5c;
 9a5c; AE003861
 S000012661 0.357 1442 Xylella fastidiosa;
 AF224734
 S000016177 0.357 1446 Xylella fastidiosa; PLS2-
 9; AF159579
 S000021679 0.429 1439 Xylella fastidiosa;
 PL.788; ATCC35871; AF203388

AF203390 S000022204 0.357 1443 Xylella fastidiosa; CO.01;
 AF536767 S000096856 0.357 1370 Xylella fastidiosa; CM1;
 Legionellales (order)
 Legionellaceae (family)
 Legionella (genus)
 S000007784 0.357 1357 Legionella sp.;
 Legionella-like amoebal pathogen-3; X60080
 S000011597 0.429 1312 Legionella-like amoebal
 pathogen 9; U44911
 S000016425 0.357 1358 Legionella lyticum; LLAP-
 3; legionella like amoebal pathogen; Z49741
 unclassified
 S000009029 0.429 1428 uncultured gamma
 proteobacterium; Bifciii1; AJ318123
 Firmicutes (phylum)
 Clostridia (class)
 Clostridiales (order)
 Clostridiaceae (family)
 Clostridium (genus)
 S000015172 0.357 1331 uncultured bacterium; p-
 417-o3; AF371742
 unclassified
 S000002699 0.357 1342 Clostridium sticklandii; SR;
 L04167
 Mollicutes (class)
 Mycoplasmatales (order)
 Mycoplasmataceae (family)
 Mycoplasma (genus)
 S000007946 0.357 1193 Mycoplasma hyosynoviae;
 SF9317; AF465776
 S000012556 0.357 1367 Mycoplasma bovis; MC3386;
 AF332753
 S000021424 0.357 1192 Mycoplasma hyosynoviae;
 EU4a; AF465777
 S000095943 0.357 1388 Mycoplasma timone;
 AY050170
 Bacilli (class)
 Bacillales (order)
 Bacillaceae (family)
 Bacillus (genus)
 S000002588 0.500 1439 Caryophanon tenue; type
 strain: DSM 14152; AJ491303
 S000008372 0.500 1455 Caryophanon sp. oral clone
 AW086; AW086; AF385535
 S000011159 0.500 1421 Bacillus silvestris (T);
 HR3-23; AJ006086
 S000011318 0.357 1156 Bacillus sp. FO-092; FO-
 092; AF234863
 unclassified
 S000010009 0.500 1409 Caryophanon tenue; NCDO 2324;
 X70315
 Lactobacillales (order)
 Lactobacillaceae (family)
 Lactobacillus (genus)
 S000000323 0.500 1416 uncultured bacterium;
 60CR; AF349926

PL9006; AF477499	S000001412 0.500	1400	Lactobacillus fermentum;
KLD; AF302116	S000007268 0.500	1453	Lactobacillus fermentum;
KRM; U62624	S000007782 0.500	1415	Lactobacillus fermentum;
(T); M58819	S000011212 0.500	1454	Lactobacillus fermentum
(T); AJ272391	S000014003 0.357	1350	Lactobacillus psittaci
CR-6AS; crev-7; AF349935	S000017836 0.500	1430	Lactobacillus sp. CR-6AS;
KLB12; AF522394	S000085872 0.500	1488	Lactobacillus fermentum;
F53; AF243149	S000090097 0.500	1439	Lactobacillus fermentum;
KC5b; AF243166	S000090532 0.500	1437	Lactobacillus fermentum;
Verrucomicrobia (phylum)			
Verrucomicrobiae (class)			
Verrucomicrobiales (order)			
Opitutaceae (family)			
Opitutus (genus)			
AJ229239	S000018840 0.357	1371	Opitutus terrae; PB90-3;
VeGlc2; X99390	S000020492 0.429	1420	Opitutus sp. VeGlc2;
X99391	S000021036 0.429	1418	Opitutus sp. VeCb1; VeCb1;

Iniciador BA338fGC (ØVREÅS *et al.*, 1997)

(CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGC
AG).

SEQUENCE_MATCH version 2.7

written by Niels Larsen, niels@cme.msu.edu

Short-ID : raw_27047
 Full name : raw_27047, 60 bases, 15D4F507 checksum.
 Sequence : 52 unique oligos.
 RDP data : Greater than or equal to 1200 Small Subunit bacterial
 rRNAs with RDP hierarchy
 Comments : A minimum of 100 unique oligos required
 : A total of 0 sequences were excluded
 : 27060 sequences were included in the search
 : The screening was based on 7-base oligomers
 Date : Thu Feb 6 16:25:58 2003
 CPU time : 0.10 seconds

Bacteria (domain)
 Thermotogae (phylum)
 Thermotogae (class)
 Thermotogales (order)
 Thermotogaceae (family)

LA4; AJ401024	Thermotoga (genus)		
	S000000858	0.558	1351 Thermotoga neapolitana;
AJ401017	S000002447		0.558 1349 Thermotoga maritima; SL7;
	S000003224	0.558	1352 Thermotoga neapolitana;
LA10; AJ401020	S000004022		0.558 1353 Thermotoga sp. RQ2; RQ2;
	S000004446	0.558	1352 Thermotoga sp. RQ7; RQ7;
AJ401023	S000006714		0.558 1358 Thermotoga maritima;
	FJSS3-B.1; AJ401021		
	Thermomicrobia (phylum)		
	Thermomicrobia (class)		
	Thermomicrobiales (order)		
	Thermomicrobiaceae (family)		
	Thermomicrobium (genus)		
	S000002414	0.558	1370 Thermomicrobium roseum
(T); M34115	Firmicutes (phylum)		
	Clostridia (class)		
	Clostridiales (order)		
	unclassified		
	S000090237	0.577	1355 uncultured low G+C Gram-
	positive bacterium clone OPB54; OPB54; AF027087		
	Bacilli (class)		
	Bacillales (order)		
	Bacillaceae (family)		
	Bacillus (genus)		
	S000005182	0.673	1640 Bacillus mojavensis; KL-
198; AY030339	Geobacillus (genus)		
	S000005454	0.558	1331 Bacillus caldovelox;
M77485	Alicyclobacillaceae (family)		
	Sulfobacillus (genus)		
	S000010343	0.615	1347 Sulfobacillus
	yellowstonensis; YTF-1; AY007665		
	S000018323	0.558	1293 Sulfobacillus sp. YTF3;
	YTF3; AF507964		
	S000019449	0.558	1315 Sulfobacillus sp. NC; NC;
	AY121610		
	S000019854	0.577	1275 uncultured thermal soil
	bacterium; YNPFFP5; AF391986		
	S000094698	0.558	1319 Sulfobacillus sp. GG6/1;
	GG6/1; AY140234		
	Actinobacteria (phylum)		
	Actinobacteria (class)		
	Coriobacteridae (subclass)		
	Coriobacteriales (order)		
	Coriobacterineae (suborder)		
	Coriobacteriaceae (family)		
	Collinsella (genus)		
	S000011181	0.596	1315 Coriobacterium sp.
	EKS03; EKS03; AJ245921		
	S000013627	0.558	1297 Coriobacterium
	glomerans; DSM 20642; X79048		
	Olsenella (genus)		

S000016774 0.577 1401 uncultured rumen
bacterium 3C0d-2; 3C0d-2; AB034002
Slackia (genus)
S000002640 0.635 1314 Slackia exigua (T);
ATCC 700122; AF101240
S000011863 0.596 1347 Slackia
heliotrinireducens (T); ATCC 29202; AF101241
Actinobacteridae (subclass)
Bifidobacteriales (order)
Bifidobacteriaceae (family)
Bifidobacterium (genus)
S000007515 0.577 1336 uncultured bacterium;
p-3348-23G2; AF371711
S000008872 0.558 1406 Bifidobacterium
angulatum (T); type strain; D86182
S000011575 0.558 1412 Bifidobacterium
infantis; ATCC15697; D86184
S000017494 0.577 1405 Bifidobacterium boum;
JCM1211; D86190
S000017685 0.577 1288 uncultured bacterium
(human infant) N158-7; N158-7; AF253362
S000017686 0.558 1317 uncultured bacterium
(human infant) S7A; S7A; AF253367
S000018691 0.558 1282 uncultured bacterium
(human infant) L157C; L157C; AF253373
S000018693 0.558 1251 uncultured bacterium
(human infant) D39Ebif; D39Ebif; AF253395
S000019057 0.558 1342 Bifidobacterium
ruminantium; JCM8222; D86197
S000019202 0.596 1254 uncultured
Bifidobacterium sp. 9B; 9B; AF275893
S000019490 0.577 1411 uncultured rumen
bacterium 4C3d-16; 4C3d-16; AB034095
S000020073 0.596 1416 uncultured rumen
bacterium 3C3d-20; 3C3d-20; AB034094
S000104418 0.577 1355 Bifidobacterium sp.
group I-3; AF321295
Spirochaetes (phylum)
Spirochaetes (class)
Spirochaetales (order)
Spirochaetaceae (family)
Spirochaeta (genus)
S000001421 0.558 1414 Spirochaeta sp. Buddy;
Buddy; AF357916
S000017473 0.558 1364 bacterium DCE25; DCE25;
AJ249227
Treponema (genus)
S000004226 0.558 1344 Treponema sp. VI:F:C44;
VI:F:C44; AF056344
S000016105 0.577 1364 Spirochaeta sp.; NL1;
U40791
Bacteroidetes (phylum)
Bacteroidetes (class)
Bacteroidales (order)
Bacteroidaceae (family)
Bacteroides (genus)
S000000696 0.558 1353 uncultured bacterium;
BA017; AF323759
unclassified

S000095019 0.596 1425 uncultured bacterium; G55; AF407707
 S000108453 0.577 1245 uncultured bacterium; S36.50SM;
 AF432626

Iniciador BA518R (ØVREÅS *et al.*, 1997) (ATTACCGCGGCTGCTGG).

SEQUENCE_MATCH version 2.7

written by Niels Larsen, niels@cme.msu.edu

Short-ID : raw_27060
 Full name : raw_27060, 17 bases, 19BD061D checksum.
 Sequence : 11 unique oligos.
 RDP data : Greater than or equal to 1200 Small Subunit bacterial
 rRNAs with RDP hierarchy
 Comments : A minimum of 100 unique oligos required
 : A total of 0 sequences were excluded
 : 27060 sequences were included in the search
 : The screening was based on 7-base oligomers
 Date : Thu Feb 6 16:26:33 2003
 CPU time : 0.01 seconds

Bacteria(domain)

Cyanobacteria(phylum)

Cyanobacteria(class)

unclassified

S000006760 0.364 1272 Halomicronema excentricum str.
 TFEF1; TFEF1; AF320093

S000017621 0.364 1209 uncultured cyanobacterium; OS
 Type B; M62776

S000017863 0.455 1260 Haslea sp.; AF514851

S000019141 0.364 1400 Cuscuta platyloba; AJ401355

S000099098 0.364 1401 Chaetosphaeridium globosum;
 AF494278

S000105379 0.364 1384 Chara sp. CL-2002-2; AF393586

Proteobacteria(phylum)

Gammaproteobacteria(class)

Methylococcales(order)

Methylococcaceae(family)

Methylomicrobium(genus)

S000014099 0.455 1336 Methylobacter sp. HG-1;
 AF495887

Deltaproteobacteria(class)

Desulfurellales(order)

Desulfurellaceae(family)

Desulfurella(genus)

S000007307 0.364 1421 Desulfurella propionica
 (T); U-8 (DSM 10410); Y16942

Desulfovibrionales(order)

Desulfovibrionaceae(family)

Desulfovibrio(genus)

S000000802 0.455 1394 Desulfovibrio
 longreachensis (T); Desulfovibrio longreachii; 16910a; Z24450

S000003696 0.455 1408 Desulfovibrio sp. R2; R2;
 AY059411

AF273083	S000004102	0.455	1441	Desulfovibrio oryzae; DDv;
DSM 644; AF418179	S000006028	0.455	1429	Desulfovibrio vulgaris;
A'; strain A; AF131234	S000015640	0.364	1361	Desulfovibrio sp. 'Bendigo
AF121888	S000020089	0.364	1431	bacterium 2BP-48; 2BP-48;
JG5; AJ295679	S000104265	0.455	1415	Desulfovibrio sp. JG5;
JG1; AJ295678	S000105477	0.455	1390	Desulfovibrio sp. JG1;
Firmicutes (phylum)				
Clostridia (class)				
Clostridiales (order)				
Clostridiaceae (family)				
Clostridium (genus)				
(T); NCFB 2931; X77676	S000000072	0.455	1407	Clostridium algidicarnis
10419 Y-1113; AB020728	S000002229	0.364	1370	Clostridium scindens; JCM
10420 M-18; AB020729	S000011460	0.364	1334	Clostridium scindens; JCM
clone BSV86; BSV86; AJ229230	S000022905	0.364	1343	unidentified eubacterium
bacterium; Rs-B44; AB088959	S000108273	0.455	1252	uncultured Clostridiaceae
Sporobacter (genus)				
(T); SYR; Z49863	S000000835	0.364	1423	Termitobacter aceticus
Lachnospiraceae (family)				
Catonella (genus)				
51271; X87151	S000003483	0.455	1394	Catonella morbi (T); ATCC
Acidaminococcaceae (family)				
Selenomonas (genus)				
bacterium RF4; RF4; AF001737	S000004643	0.364	1325	unidentified rumen
unclassified				
16; AB062773	S000004459	0.545	1292	uncultured bacterium; BCf1-
CK030; CK030; AF287773	S000022908	0.364	1450	Firmicutes sp. oral clone
AJ400270	S000099934	0.455	1400	uncultured bacterium; L11-2;
Mollicutes (class)				
Acholeplasmatales (order)				
Acholeplasmataceae (family)				
Acholeplasma (genus)				
phytoplasma type I; ScYP I-Barb; AF056094	S000020608	0.455	1419	Sugarcane yellows
phytoplasma type I; ScYP I-Afr; AF056095	S000020609	0.455	1377	Sugarcane yellows
Bacilli (class)				
Bacillales (order)				
Bacillaceae (family)				
Bacillus (genus)				
bacterium 5-18; 5-18; AB034719	S000017917	0.364	1402	uncultured compost

Lactobacillales (order)
 Lactobacillaceae (family)
 Pediococcus (genus)
 S000013305 0.364 1460 *Pediococcus acidilactici*;
 E 7; AB018212
 Planctomycetes (phylum)
 Planctomycetacia (class)
 Planctomycetales (order)
 Planctomycetaceae (family)
 Gemmata (genus)
 S000000313 0.455 1346 *Gemmata*-like str. JW9-3f1;
 JW9-3f1; AF239697
 S000010392 0.364 1368 *Gemmata obscuriglobus*;
 Schlesner 633; X81957
 Piirellula (genus)
 S000015878 0.364 1417 uncultured bacterium; SHA-
 87; AJ306767
 Bacteroidetes (phylum)
 Bacteroidetes (class)
 Bacteroidales (order)
 Prevotellaceae (family)
 Prevotella (genus)
 S000014126 0.364 1341 unidentified rumen
 bacterium RFN76; RFN76; AB009224
 WS3 (genus)
 S000018154 0.364 1307 uncultured soil bacterium PBS-II-5;
 PBS-II-5; AJ390441
 S000018619 0.364 1305 uncultured soil bacterium PBS-II-35;
 PBS-II-35; AJ390446
 unclassified
 S000019019 0.636 1215 uncultured bacterium #0319-6A19;
 #0319-6A19; AF234125
 S000019544 0.364 1373 uncultured *Acidobacterium* UA3; UA3;
 AF200699
 S000104204 0.364 1163 uncultured bacterium; FW116; AF523977

Iniciador 409R (NEILAN *et al.*, 1997) (TTACAACCCAAGGGCCTTCCTCCC), degenerado, uma das opções.

SEQUENCE_MATCH version 2.7
 written by Niels Larsen, niels@cme.msu.edu

Short-ID : raw_27068
 Full name : raw_27068, 24 bases, 4898116A checksum.
 Sequence : 18 unique oligos.
 RDP data : Greater than or equal to 1200 Small Subunit bacterial
 rRNAs with RDP hierarchy
 Comments : A minimum of 100 unique oligos required
 : A total of 0 sequences were excluded
 : 27060 sequences were included in the search
 : The screening was based on 7-base oligomers
 Date : Thu Feb 6 16:27:12 2003
 CPU time : 0.01 seconds

Bacteria (domain)

Chloroflexi (phylum)
 Chloroflexi (class)
 Chloroflexales (order)
 Chloroflexaceae (family)
 Chloroflexus (genus)
 S000017580 0.389 1270 uncultured Chloroflexaceae
 bacterium; Witch_10; AF421758
 Proteobacteria (phylum)
 Alphaproteobacteria (class)
 unclassified
 S000017712 0.333 1519 Plantago coronopus; AJ389617
 Gammaproteobacteria (class)
 Acidithiobacillales (order)
 Acidithiobacillaceae (family)
 Acidithiobacillus (genus)
 S000017080 0.444 1373 uncultured
 Acidithiobacillus sp.; V1; AF339743
 S000018105 0.389 1260 Acidithiobacillus
 thiooxidans; KCTC 8929P; AF359940
 Pasteurellales (order)
 Pasteurellaceae (family)
 Pasteurella (genus)
 S000006727 0.389 1337 Pasteurella anatis;
 B96/20; AY038592
 S000006728 0.389 1375 Pasteurella anatis; Hom.3;
 AY038594
 S000010428 0.389 1392 Pasteurella anatis (T);
 M75054
 S000013243 0.389 1396 Pasteurella anatis; F149;
 AF228001
 S000013244 0.389 1397 Pasteurella anatis; F279;
 AF228002
 S000016768 0.389 1387 Salpingitia sp.
 Gerl.3348/80; Gerl.3348/80; AF228005
 S000017247 0.389 1378 Salpingitia sp. 10672/6;
 10672/6; AF228008
 S000017793 0.389 1376 Salpingitia sp. 36961/sv7;
 36961/sv7; AF228011
 S000019733 0.333 1427 Actinobacillus cf.
 salpingitidis CCUG 28018; AF224310
 S000019944 0.389 1385 Salpingitia sp. Gerl.220;
 Gerl.220; AF228006
 S000019945 0.389 1382 Salpingitia sp. 20558;
 20558; AF228010
 S000020478 0.389 1379 Salpingitia sp. CCM 5995;
 CCM 5995; AF228003
 S000020479 0.389 1383 Salpingitia sp. 10672/9;
 10672/9; AF228004
 S000021023 0.389 1380 Salpingitia sp. BJ3453;
 BJ3453; AF228013
 unclassified
 S000022776 0.333 1371 Acidithiobacillus sp. NO-37; NO-
 37; AF376020
 Deltaproteobacteria (class)
 Desulfurellales (order)
 Desulfurellaceae (family)
 Desulfurella (genus)
 S000012934 0.389 1332 uncultured bacterium; B45;
 AF325180

S000016780 0.389 1393 uncultured Desulfurella
 sp.; bacteriap43; AF402982
 Desulfobacterales (order)
 Desulfobacteraceae (family)
 Desulfobacterium (genus)
 S000003285 0.389 1387 uncultured delta
 proteobacterium; SM1H08; AF445705
 S000015527 0.389 1379 uncultured delta
 proteobacterium; SM1G01; AF445695
 Firmicutes (phylum)
 Bacilli (class)
 Bacillales (order)
 Bacillaceae (family)
 Geobacillus (genus)
 S000003066 0.389 1404 Bacillus denitrificans;
 DSM 466; Z26927
 S000004284 0.389 1398 Bacillus
 thermodenitrificans (T); DSM 465; Z26928
 S000005049 0.333 1343 Bacillus sp. Isopa9;
 Isopa9; AF267509
 S000006575 0.389 1409 Bacillus
 stearothermophilus; T10; X57309
 S000008399 0.333 1441 Bacillus thermoleovorans;
 B23; AB034836
 S000009588 0.389 1410 Bacillus caldotenax; DSM
 406; Z26922
 S000010695 0.333 1414 Bacillus
 stearothermophilus; IF012550; AB021196
 S000010944 0.333 1399 Geobacillus subterraneus
 (T); 34 (T); AF276306
 S000011914 0.389 1400 Bacillus caldovelox; DSM
 411; Z26925
 S000013855 0.333 1335 Bacillus kaustophilus (T);
 NCIMB 8547; X60618
 S000021514 0.333 1332 Bacillus caldotenax; DSM
 406; X62180
 S000022468 0.389 1391 Bacillus caldolyticus; DSM
 405; Z26924
 S000094900 0.333 1394 bacterium ODP-193-02; ODP-
 193-02; AB084521
 S000095722 0.333 1431 Bacillus sp. B1; B1;
 AB089207
 S000096730 0.333 1432 Bacillus sp. A3; A3;
 AB089237
 Lactobacillales (order)
 Lactobacillaceae (family)
 Pediococcus (genus)
 S000013305 0.333 1460 Pediococcus acidilactici;
 E 7; AB018212
 Actinobacteria (phylum)
 Actinobacteria (class)
 Actinobacteridae (subclass)
 Actinomycetales (order)
 Micrococcineae (suborder)
 Micrococcaceae (family)
 Kocuria (genus)
 S000008709 0.389 1397 Kocuria polaris;
 CMS76or; AJ278868
<http://rdp.cme.msu.edu>

GLOSSÁRIO

Ácidos nucleicos:	São macromoléculas.
Agarose:	Componente do agar que é usado como agente gelificante numa matriz usada em eletroforese de ácidos nucleicos, extraído de algas.
Amplificação:	Método de produzir grandes quantidades de DNA através da reação de polimerização da cadeia de DNA (PCR)
Ânodo:	Eletrodo com carga positiva que atrai íons carregados negativamente.
Arqueae:	Organismo procarioto que possui diéter de isoprenila glicerol e lipídios tetraéter como constituintes de sua parede celular. Um dos três reinos dos seres vivos. Os outros dois são eubactérias e eucariotos.
Banda:	Forma como se distribui o DNA após a eletroforese.
Cátodo:	Eletrodo com carga negativa que atrai íons carregados positivamente.
Cianobactérias:	São microrganismos procarióticos que têm a capacidade de realizar fotossíntese.
Clorofila:	Pigmento que atua na fotossíntese.
Cosmopolita:	Distribuição geográfica mundial.
Dendograma:	Representação gráfica em forma de ramos e nós onde as entidades são agrupadas de acordo com suas similaridades.
Desnaturação:	Processo de rompimento das forças fracas de ligação entre as cadeias do DNA, o que leva à perda de organização

	estrutural do polímero.
Desoxirribonucleotídeo:	Nucleotídeo cujo açúcar é a desoxirribose.
Desoxirribose:	Açúcar com estrutura semelhante à da ribose, diferindo desta por possuir um hidrogênio no carbono 2' ao invés de uma hidroxila.
DGGE:	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante. Uma forma especializada de eletroforese usando gel de poliacrilamida com gradientes desnaturantes, usado para detectar diferenças na estabilidade dos produtos de PCR.
DNA:	Sigla em inglês do ácido desoxirribonucleico.
DNase:	Enzima que degrada o DNA rompendo a ligação fosfodiéster.
dNTP:	Desoxirribonucleotídeo.
Eletrodo:	Terminal elétrico metálico em contato com uma solução.
Eletroforese:	Técnica pela qual é possível fracionar monômeros e polímeros (ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos) numa matriz sólida, quem em geral é constituída de um gel de agarose, acrilamida, papel ou nitrocelulose. O fracionamento ocorre porque os polímeros possuem carga elétrica e encontram-se numa solução eletrolítica submetida a um campo elétrico polarizado. Migração de substâncias eletricamente carregadas movidas pela ação de um campo elétrico.
Espécie:	1. Grupo de indivíduos que compartilham o mesmo conjunto de características biologicamente relevantes e que não podem ser divididos em outros grupos mais inclusivos pelos mesmos critérios. 2. Grupo de indivíduos que se reproduzem entre si e não o fazem com outros grupos semelhantes. 3. Grupo de indivíduos que compartilham o mesmo destino evolutivo.
Eubacteria;	Organismos procariotos que possui derivados de diacil glicerol como constituintes de sua parede celular.

Enzima:	Em geral uma proteína que catalisa reações bioquímicas específicas.
Eucarioto:	Células possuindo estrutura nuclear definida, delimitada por membrana lipoproteica (carioteca).
Filogenia:	Esquema que representa a relação de parentesco entre as entidades consideradas.
Fluorescência:	Propriedade de uma molécula que consiste na emissão de luz. Quando atingida por luz de um determinado comprimento de onda. A luz emitida tem um comprimento de onda maior que a luz atingida.
Fotossíntese:	Conjunto de reações químicas onde a energia proveniente da luz é utilizada na síntese de moléculas orgânicas a partir de CO_2 e H_2O .
Gel:	Matriz (acrilamida ou agarose) embebida em solução eletrolítica, usada para realizar eletroforese de proteínas e ácidos nucleicos.
Gene:	Unidade hereditária no DNA que contém informação transcrita para o RNA e que é então traduzida numa cadeia polipeptídica.
kb:	Kilobases. Medida de comprimento de ácidos nucleicos que equivale a 1000 nucleotídeos, se em fita simples, ou 1000 pares de nucleotídeos, se em fita dupla.
Lise:	Ruptura de uma célula causada pela degradação da membrana celular ou da parede celular.
Monômero:	Cada uma das estruturas químicas básicas da qual um polímero é formado.
Nucleotídeo:	Molécula composta por uma base nitrogenada, um açúcar e um grupo fosfato. São quatro os nucleotídeos: adenina, guanina, timina e citosina.
Oligonucleotídeo:	Ácido nucleico curto de somente uma cadeia, cujo tamanho pode variar de 5-50 nucleotídeos. Polímero de nucleotídeos de cadeia curta, normalmente produzido em laboratório, de

	fita simples de DNA.
Operon:	Coleção de genes estruturais adjacentes regulados por um operador e um repressor, composto por três elementos: o promotor, ou região promotora, o operador e os genes estruturais.
pb:	Pares de bases. Medida de comprimento de ácidos nucléicos de fita dupla que equivale a 1 par de nucleotídeos.
PCR:	Reação de polimerização em cadeia, método de amplificação de DNA.
Plasmídeo:	DNA circular extracromossomal freqüentemente encontrado em bactérias e que se replica no interior dessas.
Polimerização:	Reação química onde os monômeros são unidos resultando em cadeias mais longas.
Polimorfismo:	A presença numa população de uma ou mais formas de um determinado gene ou de uma seqüência do genoma.
Primers:	Moléculas de oligonucleotídeos que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hibridação com a cadeia molde à qual é complementar.
Procarioto:	Organismos unicelulares que não possuem núcleo delimitado por membrana lipoprotéica.
Proteína:	Polímero constituído de aminoácidos ligados por ligações peptídicas e cuja seqüência é determinada pelos códons do RNAm.
rbcL:	Gene que codifica para uma proteína fotossintetizante.
Ribossomo:	Organela celular constituída de RNA (RNAr) e proteínas, na qual ocorre o processo de tradução ou síntese de proteínas, consistindo de duas subunidades. Cada subunidade é formada por proteínas associadas a moléculas de RNA ribossômico (RNAr).
RNA:	Sigla em inglês do ácido ribonucléico.
RNase:	Enzima, ribonuclease.

RNA _m :	RNA mensageiro, que contém a informação genética para a sequência de aminoácidos.
RNA _r :	RNA ribossômico, que representa 50% da massa dos ribossomos.
RNA _t :	RNA transportador, que identifica e transporta as moléculas de aminoácidos até o ribossomo.
Taq Polimerase:	Uma polimerase termoestável de DNA da espécie <i>Thermus aquaticus</i> , uma bactéria termofílica.
Template:	Ou molde. Uma das cadeias do DNA que funciona como molde para a síntese da cadeia complementar.
Termociclador:	Aparelho que altera ciclicamente a temperatura de soluções. Usado para produzir ciclos de temperaturas controlados requeridos para PCR.