
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

DETECÇÃO MOLECULAR QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS HEPATOTÓXICAS
ATRAVÉS DE PCR COMPETITIVA

SELMA GOUVÊA DE BARROS

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do *campus*
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Vegetal).

MARÇO - 2010

SELMA GOUVÊA DE BARROS

**DETECÇÃO MOLECULAR QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS
HEPATOTÓXICAS ATRAVÉS DE PCR COMPETITIVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do *campus* de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

RIO CLARO

2010.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO defendida em 26/03/2010

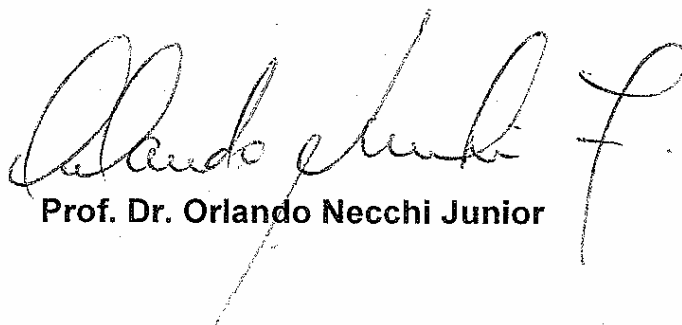
**"DETECÇÃO MOLECULAR QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS
HÉPATOTÓXICAS ATRAVÉS DE PCR COMPETITIVA"**

SELMA GOUVÊA DE BARROS

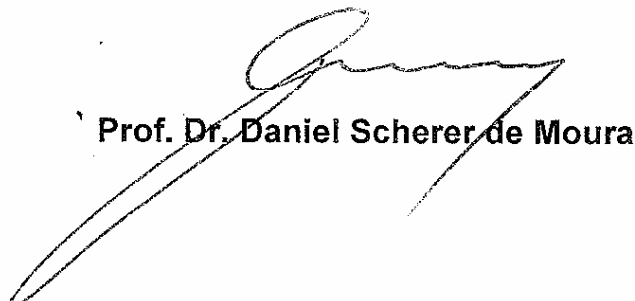
COMISSÃO EXAMINADORA:



Profa. Dra. Maria do Carmo Bittencourt de Oliveira



Prof. Dr. Orlando Necchi Junior



Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura

*À minha mãe Gilda e ao meu pai Andraci, meus portos seguros, por
todo amor, incentivo, dedicação e apoio,
dedico.*

*Às minhas queridas irmãs-amigas Séfora e Miriam pelo apoio e
torcida e à avó Jovelina Alves Feitosa, meu exemplo de vida, por
sua garra e sabedoria,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra Maria do Carmo Bittencourt-Oliveira – Madô, pela orientação e esforços dispensados à minha formação acadêmica desde a Iniciação Científica e pela oportunidade a mim conferida de crescimento profissional e pessoal.

À Prof. Dra Ariadne do Nascimento Moura, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias, professor associado ao Departamento de Ciências Exatas, ESALQ/USP, pelo auxílio na utilização de softwares e análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli do Departamento de Entomologia e Acarologia, pela orientação nos procedimentos de clonagem e disponibilização de seu laboratório e materiais.

À amiga Gabriela “Óxen-t” Salvador, pela valiosa ajuda nos protocolos de clonagem.

À Valentina Fátima de Martin do Centro de Biotecnologia Agrícola, LCB, ESALQ/USP, pelo auxílio no seqüenciamento.

Ao doutorando João Felipe Nebó Carlos de Oliveira, pelo auxílio no desenho dos primers.

Aos queridos amigos Bruna “Bati” Buch, pelo companheirismo e amizade, com a qual aprendi muito; Viviane “Lolly” pelas longas conversas, conselhos, risadas, cuja alegria sempre me contagiou; Talita Caroline Hereman, pela amizade e apoio; Juliana Antunes Galvão, pelo carinho e força; Paula da Silva Kujbida, pelos sábios conselhos; Érika Cavalcante Silva, pela amizade e apoio; Fabrício “Lama” Saglietti Meira Barros, Paulo “K-juru” Jaoude, Bina e Danilo Mamede.

Às meninas da República “Saia Daki” – Tradição desde 2008: Aline “Inmetro”, Priscila “C/pota”, Marcela “Morãguet”, Paula “Martini” e Talita “Sábado”, por todas as alegrias e anseios divididos.

Aos amigos do “laboratório do lado”, Laboratório de Bioquímica, LCB, ESALQ/USP, em especial Luis “Cometa” Lucatti e Juliana “Medley” pelos momentos de descontração e cafés.

À Jean “Ripa” Carvalho pelos conselhos, apoio, torcida e carinho.

À Patrícia Yamamoto Costa Caldeira pelo incentivo e amizade, pessoa singular que me ajudou muito na fase de escrita da dissertação em Sorocaba-SP.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, onde este trabalho foi desenvolvido.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências, Biologia Vegetal do Instituto de Biociências, UNESP, campus Rio Claro.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida.

*“É o tempo da travessia,
E se não ousarmos fazê-la
Teremos ficado para sempre
à margem de nós mesmos.”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Florações de cianobactérias tóxicas são atualmente um problema mundial devido a produção de toxinas. A microcistina é uma hepatotoxina comumente encontrada em corpos d'água e é produzida principalmente pelo gênero *Microcystis*. Recentemente a identificação, clonagem e seqüenciamento do agrupamento de genes responsáveis pela codificação da sintetase de microcistina (MS) tornaram possível a abordagem molecular na detecção de populações tóxicas baseada na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A técnica de PCR tornou-se viável e útil pelo fato do agrupamento de genes da sintetase de microcistina estar presente apenas em organismos tóxicos e pela ausência de diferenças morfológicas entre aqueles tóxicos e não tóxicos. Este estudo objetivou desenvolver e avaliar a técnica de PCR competitiva para quantificação de células de *Microcystis* tóxicas e não tóxicas utilizando os genes *cpcBA* e *mcyB* envolvidos respectivamente, na formação da ficocianina e biossíntese da MS. Testou-se a hipótese de que a PCR competitiva pode ser utilizada como metodologia de quantificação de células tóxicas e não tóxicas de *Microcystis* em substituição a contagem direta de células por microscopia óptica para atender a Portaria do Ministério da Saúde 518/2004. Para obtenção de DNA competidores foram realizadas amplificações seqüenciais de "células DNA equivalente" das linhagens tóxica (BCCUSP18) e não tóxica (BCCUSP03) de *Microcystis* spp. utilizando *primers* descritos na literatura, bem como aqueles desenhados para este estudo. Avaliaram-se os DNA competidores amplificando-os com células DNA equivalente das linhagens. Após determinada a quantidade mais próxima de DNA competidores para quantificar $2,0 \times 10^4$ células, realizou-se a PCR competitiva com células DNA equivalente de uma amostra ambiental (reservatório de Duas Unas, PE). O *cpcBA* competidor construído quantificou $1,45 \times 10^4$ células ($R^2 = 0,989$) da linhagem tóxica (BCCUSP18) e $2,14 \times 10^4$ células ($R^2 = 0,968$) da não tóxica (BCCUSP03). Estes dados revelaram que foram necessários 3,3 vezes mais *cpcBA* competidor na amplificação de células não tóxicas para quantificar o mesmo número de células. Em análise conjunta com ambas as linhagens, o *cpcBA* competidor quantificou $1,84 \times 10^4$ células ($R^2 = 0,895$). Já para o *mcyB* competidor na BCCUSP18 foram quantificadas $1,54 \times 10^4$ células ($R^2 = 0,950$). Contudo, a estimativa do número de células na quantificação de *Microcystis* spp. da

amostra ambiental foi superestimado em 186 e 83 vezes utilizando *mcyB* e o *cpcBA* competidor, respectivamente. A metodologia foi desenvolvida com êxito uma vez que DNA competidores foram construídos e co-amplificados com DNA alvo. A utilização da PCR competitiva para atender a Portaria MS 518/2004 em substituição a contagem direta de células mostrou-se inadequada. Apesar disso, a PCR competitiva apresentou reprodutibilidade nos resultados e potencial de utilização como uma alternativa menos onerosa em pesquisas que necessitem de resultados quantitativos relativizados.

PALAVRAS CHAVES: Cianobactéria. *Microcystis*. PCR competitiva. *mcyB*. *cpcBA*.

ABSTRACT

Blooms of microcystin-producing cyanobacteria are a problem worldwide. Microcystin is a liver hepatotoxin commonly found in bodies of water and is produced mainly by the genus *Microcystis*. The recent identification, cloning and sequencing of the genes responsible for coding microcystin synthetase (MS) has allowed a molecular approach to the detection of microcystin-producing populations based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Considering the lack of morphological differences between microcystin-producing and non-microcystin-producing organisms, PCR is viable and useful, as the cluster of microcystin synthetase genes is found in only microcystin-producing organisms. The aim of the present study was to develop and assess an competitive PCR method for the quantification of toxic and non-toxic *Microcystis* cells using the *cpcBA* and *mcyB* genes, which are respectively involved in the formation of phycocyanin and biosynthesis of MS. The hypothesis was that competitive PCR could be used as a quantification method for toxic and non-toxic *Microcystis* cells, replacing the direct cell count under an optical microscope, while fulfilling Brazilian Ministry of Health Ordinance 518/2004. For the acquisition of competitor DNA, sequences amplifications were carried out of the “cell DNA equivalent” of microcystin-producing (BCCUSP18) and non-microcystin-producing (BCCUSP03) strains of *Microcystis* spp. using primers described in the literature as well as others designed for the present study. Competitor DNA was assessed by amplifying “cells DNA equivalent” of the strains. After determining the quantity closest to the competitor DNA for quantifying 2.0×10^4 cells, competitive PCR was carried out with “cells DNA equivalent” from an environmental sample (Duas Unas Reservoir, PE, Brazil). The constructed competitor *cpcBA* quantified 1.45×10^4 cells ($R^2 = 0.989$) of the microcystin-producing strain (BCCUSP18) and 2.14×10^4 cells ($R^2 = 0.968$) of the non-microcystin-producing strain (BCCUSP03). These data reveal that 3.3-fold more of the competitor *cpcBA* was needed in the amplification of the non-toxic cells for quantifying the same number of cells. In a joint analysis with both strains, the *cpcBA* competitor quantified 1.84×10^4 cells ($R^2 = 0.895$). The competitor *mcyB* quantified 1.54×10^4 cells of BCCUSP18 ($R^2 = 0.950$). However, the number of cells in the quantification of *Microcystis* spp. from the environmental sample was overestimated 186-fold and 83-fold using competitor *mcyB*

and *cpcBA*, respectively. The method was successfully developed, as competitive DNA was constructed and co-amplified with the target DNA. The use of competitive PCR for complying with Ordinance 518/2004 instead of a direct cell count proved inadequate. However, competitive PCR demonstrated reproducibility in the results and potential use as a less cumbersome alternative in studies that require relativized quantitative results.

KEY WORDS: Cyanobacteria. *Microcystis*. competitive PCR. *mcyB*. *cpcBA*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo proposto para a biossíntese de microstina-LR mostrando a organização do conjunto de genes <i>mcyA-J</i> e a microcistina.....	pg.08
Figura 2. Etapas da construção do DNA competidor.....	pg.15
Figura 3. Géis de agarose corado com brometo de etídio mostrando as etapas de obtenção de DNA competidor a partir de amplificações sequenciais	pg.25
Figura 4. Géis de agarose corados com brometo de etídeo mostrando resultado das avaliações de DNA competidores para quantificação de $2,0 \times 10^4$ C.D.E.....	pg.26
Figura 5. Representações gráficas mostrando as médias e desvios padrões das densidades ópticas dos produtos amplificados de cada quantidade de DNA competidor avaliado.....	pg.27
Figura 6. Esquema demonstrativo da obtenção dos dados de D.O. das amplificações através do programa Kodak Digital Science 1D 3.6.....	pg.28
Figura 7. Géis de agarose corado com brometo de etídeo mostrando resultado de ensaio de PCR competitiva com linhagens.....	pg.32
Figura 8. Representações gráficas de PCR competitiva obtidas através de dados de densidade óptica das bandas no gel de agarose resultante das amplificações dos ensaios com linhagens mensuradas pelo programa Kodak Digital Science 1D 3.6..	pg.33
Figura 9. Géis de agarose corados com brometo de etídeo mostrando resultado dos ensaios de PCR competitiva com amostra ambiental do reservatório de Duas Unas, PE.....	pg.34

Figura 10. Representações gráficas obtidas através de dados de densidade óptica das bandas no gel de agarose resultante dos ensaios de PCR competitiva com amostra ambiental mensuradas pelo programa Kodak Digital Science 1D 3.6.....pg.35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* e condições das reações utilizadas para a construção do DNA competidor.....pg. 20

Tabela 2. Análise quantitativa de linhagens e amostra ambiental utilizando PCR competitiva.....pg. 36

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 AS CIANOBACTÉRIAS	3
2.2 A MICROCISTINA	4
2.3 GENES DA SINTETASE DA MICROCISTINA	6
2.4 PCR COMPETITIVA	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	12
3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DE CÉLULAS	12
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA	12
3.4 CONSTRUÇÃO DO DNA COMPETIDOR	14
3.4.1 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	14
3.4.2 PCR SEQUÊNCIAIS	14
3.4.3 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA COMPETIDOR	16
3.5 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO	16
3.6 PCR COMPETITIVA	17
3.6.1 AVALIAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA COMPETIDORES (<i>cpcBA</i> E <i>mcyB</i> COMPETIDOR)	17
3.6.2 PCR COMPETITIVA COM LINHAGENS	18
3.6.3 PCR COMPETITIVA COM AMOSTRA AMBIENTAL	18
4. RESULTADOS	21
4.1 OBTENÇÃO DE DNA COMPETIDORES PARA A REGIÃO GÊNICA <i>cpcBA</i> E PARA O GENE <i>mcyB</i>	21
4.1.1 SEQUÊNCIA DO <i>cpcBA</i> COMPETIDOR	22
4.1.2 SEQUÊNCIA DO <i>mcyB</i> COMPETIDOR	23
4.2 AVALIAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE DNA COMPETIDORES (<i>cpcBA</i> E <i>mcyB</i> COMPETIDOR)	23
4.3 PCR COMPETITIVA	29
4.3.1 LINHAGENS	29
4.3.2 AMOSTRA AMBIENTAL	30
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

Em ecossistemas brasileiros de água doce, as florações de cianobactérias tornam-se cada vez mais freqüentes, desencadeando inúmeras conseqüências danosas à Saúde Pública e ao ambiente. Um dos maiores problemas está no fato destes organismos produzirem toxinas cujos efeitos são hepato e neurotóxicos. Estas toxinas são liberadas na água através da lise celular e permanecem dissolvidas por períodos variáveis de tempo.

Dentre as cianobactérias capazes de produzir toxinas destaca-se o gênero *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann, produtora de diversas isoformas de microcistinas (hepatotoxinas). A microcistina causa danos nas células do fígado principalmente em decorrência da desorganização de componentes do citoesqueleto.

No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde nº 518 tornou obrigatório a partir de 2005 o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas, incluindo microcistinas. Com isso, há necessidade de se desenvolver e empregar métodos sensíveis que garantam a detecção e quantificação dessas cianobactérias e cianotoxinas tanto na água tratada como no manancial utilizado para a captação, com custos pouco elevados. Nesta tarefa destaca-se a detecção molecular do genótipo potencialmente produtor de microcistina. A detecção molecular visa, através de ensaios de PCR, investigar a existência dos genes *mcy* (microcystin sintetase genes) nas populações, os quais são responsáveis pela codificação do complexo enzimático, denominado sintetase de microcistina, bem como de sintases de policetídeos (PKS), que juntos são responsáveis pela incorporação de sete aminoácidos na molécula de microcistina e sua ciclização.

A inexistência de diferenças morfológicas entre colônias tóxicas e não tóxicas as quais possibilitem a distinção com o uso de microscópio óptico torna a detecção molecular do genótipo potencialmente produtor de microcistinas bastante útil.

No Brasil, as preocupações a respeito das cianobactérias e cianotoxinas se elevaram após o incidente ocorrido em Caruaru, Pernambuco em 1996 (JOCHIMSEN et

al. 1998). A Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde, atualizada pela Portaria 518/2004, foram os primeiros dispositivos legais brasileiros que obrigaram o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas. Na análise quantitativa de cianobactérias, o valor de $2,0 \times 10^4$ células por mililitro é considerado como quantidade máxima permitida na amostra bruta para considerar a água potável (BRASIL 2004). Por este motivo, o foco do presente estudo foi desenvolver metodologia para quantificação de $2,0 \times 10^4$ células por mililitro.

A metodologia que utiliza a câmara de Sedgwick-Rafter, juntamente com um microscópio óptico, destina-se à quantificação de fitoplâncton, incluindo cianobactérias (WHO, 1998). Porém, diversos gêneros coloniais de cianobactérias, com destaque para *Microcystis*, são de difícil contagem, pois suas células formam agregados densos não permitindo a distinção de células (BERNARD et al. 2004).

O presente estudo objetivou desenvolver e investigar a aplicabilidade e eficiência do método de PCR competitiva para quantificar células tóxicas e não tóxicas de *Microcystis*. Para tanto, objetivou-se desenvolver seqüências de nucleotídeos denominadas de DNA competidores para o gene da ficocianina (*cpcBA*) e também para o gene *mcyB* da sintetase de microcistina e posterior realização de PCR competitiva a fim de verificar a concordância desta técnica e a contagem de células em microscópio óptico. Portanto, a hipótese é que a PCR competitiva pode ser utilizada como metodologia de quantificação de células tóxicas e não tóxicas de *Microcystis* para atender a Portaria MS518/2004 em substituição à contagem direta de células através da microscopia óptica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As cianobactérias

Cianobactérias (Classe Cyanophyceae) são microrganismos unicelulares ou multicelulares, possuem clorofila “a” e ficobiliproteínas, realizando fotossíntese com liberação de oxigênio associado com o fotossistema I e II. Análises de seqüências a partir do 16S e rRNA inseriram as cianobactérias junto com as eubactérias (WOESE et al. 1990). Tradicionalmente são chamadas de microalgas as quais constituem o maior grupo procariótico estudado por botânicos ficologistas. Surgiram na Terra há aproximadamente 3,5 bilhões de anos e provavelmente foram os primeiros organismos a liberar oxigênio elementar na atmosfera primitiva. Atualmente, atividades humanas, tais como agricultura, urbanização e industrialização aceleram o processo de eutrofização das águas ocasionando condições favoráveis para desenvolvimento de grande quantidade de biomassa fitoplanctônica principalmente de cianobactérias (SMITH, 2003).

Florações de cianobactérias têm efeitos adversos na estética e nas atividades de recreação nos corpos d’água em que ocorrem e também podem ser associados a odores, não potabilidade da água e morte de peixes devido à redução de oxigênio na água (CHORUS et al. 2000). Entretanto, a consequência mais danosa vem do fato de alguns gêneros serem capazes de produzir neuro (saxitoxinas, anatoxina-a, anatoxina-a(s) entre outras) e hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsinas) (CARMICHAEL et al. 1994, SIVONEN e JONES 1999, CHORUS et al. 2000). Entre as toxinas de cianobactérias, as hepatotoxinas e, especialmente as microcistinas (MCs), estão entre as mais frequentemente relatadas em casos de intoxicação e morte de mamíferos (ZURAWELL et al. 2005)

2.2 A Microcistina

Algumas espécies dos gêneros *Anabaena* Bory ex Bornet & Flahault, *Anabaenopsis* (Woloszyńska) Miller, *Aphanizomenon* Morren ex Bornet & Flahault, *Microcystis* Kützinger ex Lemmermann, *Nostoc* Vaucher ex Bornet & Flahault e *Planktothrix* Anagnostidis & Komárek são conhecidos pela produção de microcistinas em corpos d'água (CHORUS 2001). A estrutura da microcistina compreende um heptapeptídeo cíclico com massa molecular entre 900 e 1100 daltons sendo o maior e o mais diverso grupo de cianotoxinas conhecidas (KAEBERNICK e NEILAN 2001). Carmichael et al. (1988) propuseram denominação unificada de microcistina para todas hepatotoxinas com sete aminoácidos monocíclicos, independentemente do gênero e da espécie a qual é produzida. Além disso, propuseram adicionar ao termo microcistina o sufixo "XY", designando os aminoácidos variantes da molécula. Assim, a microcistina mais comumente encontrada, a microcistina-LR (MC-LR), contém leucina e arginina nas posições variáveis da molécula.

Os primeiros testes toxicológicos com a microcistina que comprovam seu alto potencial de envenenamento datam de meados da década de 60 do século passado (HUGHES et al. 1958, GORHAM 1960, KONST et al. 1965). A microcistina causa danos nas células do fígado principalmente em decorrência da desorganização de componentes do citoesqueleto. Consequentemente, há perda da integridade da membrana, perda de microvilosidades e da adesão entre células, extravazamento do conteúdo celular e intra-hepático os quais podem levar os organismos à morte por choque hemorrágico (MIURA et al. 1989, HOOSER et al. 1990, MACKINTOSH et al. 1990, HOOSER et al. 1991, WICSTROM et al. 1995). Além disso, Ueno et al. (1996) e Zhou et al. (2002) relataram em trabalhos realizados na China, relação positiva entre exposições à microcistinas e tumores de fígado e colo-retal, respectivamente.

No Brasil, testes bacteriológicos, virológicos e toxicológicos relacionaram uma severa epidemia de gastroenterites seguida de hemorragia, que resultou na morte de 88 pessoas em 1988, com a presença de cianobactéria dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis* no reservatório de Itaparica em Paulo Afonso, BA (TEIXEIRA 1993).

Entretanto o caso mais grave de contaminação humana ocorreu em 1996 na cidade de Caruaru, Pernambuco, nordeste do Brasil, relatado por Jochimsen et al. (1998) e Pouria et al. (1998) em que vários pacientes de uma clínica de hemodiálise morreram em decorrência da presença de microcistina nos filtros de carvão ativado das máquinas de diálise. Mais recentemente, Soares et al. (2006) relatou contaminação subletal de microcistina em pacientes insuficientes renais de um centro de hemodiálise na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

A Organização Mundial de Saúde têm publicado periodicamente desde 1958 documentos que contém diretrizes e recomendações para assegurar o controle e a qualidade da água potável com o objetivo principal de proteção da Saúde Pública (WHO 1998). Através do documento "*Guidelines for Drinking-water Quality*" publicado a partir de 1984, certos microorganismos e substâncias químicas são avaliadas e suas relações com a proteção e controle da qualidade da água potável e riscos para a saúde são relatadas. O Grupo de trabalho intitulado "*Protection and Control of Drinking Water Quality*" identificou as cianobactérias como uma das mais urgentes preocupações a serem relatadas. Desta forma, assuntos relativos a cianobactérias e cianotoxinas foram incluídas em "*Guidelines for Drinking-water Quality*" em 1998 no adendo da 2ª edição (WHO 1998). Neste documento a concentração de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi assumido como valor provisório máximo tolerável de microcistina-LR para potabilidade da água tratada (WHO 1998).

No Brasil a Portaria do Ministério da Saúde nº 518/2004, apresentou as Normas de Qualidade da Água para Consumo Humano (BRASIL 2004). Nesta, foi adotado o valor máximo permitido pela Organização Mundial da Saúde de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina na água tratada. Além disso, estabeleceu a obrigatoriedade de monitoramento semanal de cianotoxinas na saída da estação de tratamento, na entrada (hidrômetros) das clínicas de hemodiálise e indústria de injetáveis quando o biovolume de cianobactérias exceder $2\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$ ou $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$ na água do manancial de captação (BRASIL 2004).

A maior parte da microcistina produzida fica retida no interior das células e é liberada na água em estágios avançados da floração ou após tratamento com produtos químicos como os algicidas devido a lise celular (LAHTI et al. 1996). Após a liberação, elas se dispersam pelo corpo d'água e os procedimentos convencionais de floculação e filtração de uma Estação de Tratamento de Água (ETA) não são capazes de removê-las (HRUDEY et al. 1999). Apesar de estudos comprovarem que os aperfeiçoamentos nas etapas convencionais de uma ETA são eficientes na diminuição de células viáveis de cianobactérias da água (HIMBERG et al. 1989, LAHTI et al. 1996) e que processos de otimização tais como adsorção em carvão ativado (FALCONER et al. 1989, HIMBERG et al. 1989) e oxidação (NICHOLSON et al. 1994, HART et al. 1998) são capazes de remover grande parte das cianotoxinas dissolvidas, uma abordagem preditiva de florações tóxicas seria mais vantajoso social e economicamente.

2.3 Genes da sintetase da microcistina

Tais como outros pequenos peptídeos que contém aminoácidos incomuns, as microcistinas são sintetizadas por via não-ribossomal (ARMENT e CARMICHAEL 1996, DITTMANN et al. 1997). Arment e Carmichael (1996) confirmaram a síntese não-ribossomal através de ensaio *in vitro* para mensurar a biossíntese de microcistinas em células de *Microcystis* lisadas com adição de cloranfenicol o qual inibe síntese de proteína, mas não interfere em mecanismos não-ribossomais. Este processo, primeiramente caracterizado na síntese de gramicidina S e tirocidina em *Bacillus* (MARAHIEL et al. 1993), funciona como uma alternativa à síntese protéica mediada por RNA. Desta forma, a biossíntese da microcistina resulta de uma via não-ribossomal, formada através de um complexo enzimático multifuncional que compreendem sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS) e sintases de policetídeos (PKS). Este complexo contém módulos de domínios específicos que são responsáveis pela incorporação de aminoácidos na cadeia do peptídeo (KLEINKAUF e VON DÖHREN, 1996, DITTMANN et al. 1997, NISHIZAWA et al. 1999, 2000; TILLET et al. 2000). A disposição desses domínios determinam o número e a sequência dos aminoácidos na cadeia do peptídeo (NISHIZAWA et al. 1999).

Meißner et al. (1996) investigaram genes codificadores de sintetases de peptídios em *M. aeruginosa* e observaram que linhagens tóxicas e não tóxicas possuem diversos destes genes. Porém, linhagens tóxicas possuem genes de sintetases de peptídeos diferenciados em relação às não tóxicas. Dittmann et al. (1997) interromperam um provável gene codificador da sintetase da microcistina a partir da inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol. Seus dados confirmaram que o gene inativado estava envolvido na codificação da sintetase da microcistina e que a diferença básica entre linhagens tóxicas e não tóxicas é a existência de um ou mais genes envolvido na biossíntese da sintetase da microcistina presentes apenas nos organismos tóxicos.

Poucos anos mais tarde, pesquisadores japoneses e australianos, em estudos paralelos, finalmente identificaram, clonaram e sequenciaram todo o agrupamento de genes que codificam para sintetase da microcistina denominados genes *mcy* (*microcystin synthetase*) das linhagens de *Microcystis aeruginosa* K-139 (NISHIZAWA et al. 1999, 2000) e PCC 7806 (TILLET et al. 2000). Estes estudos demonstraram que os genes da sintetase da microcistina são compostos por 55.000 pares de bases, compreendendo 10 ORF (*Open Reading Frames*) (*mcyA* a *J*) divididos em dois operons (*mcyA* a *C* e *mcyD* a *J*) mediados por uma região promotora e que são transcritos bidirecionalmente (TILLET et al. 2000). Análises desta região revelaram que o maior dos dois operons (*mcyD-J*) codifica o módulo híbrido PKS-NRPS que cataliza a formação do pentacetídeo-derivado β -aminoácido Adda e o liga ao D-glutamato, enquanto que o menor (*mcyA-C*) codifica um módulo NRPS que faz a extensão deste intermediário dipeptídeo para o heptapeptídeo e subsequente ciclização (TILLET et al. 2000).

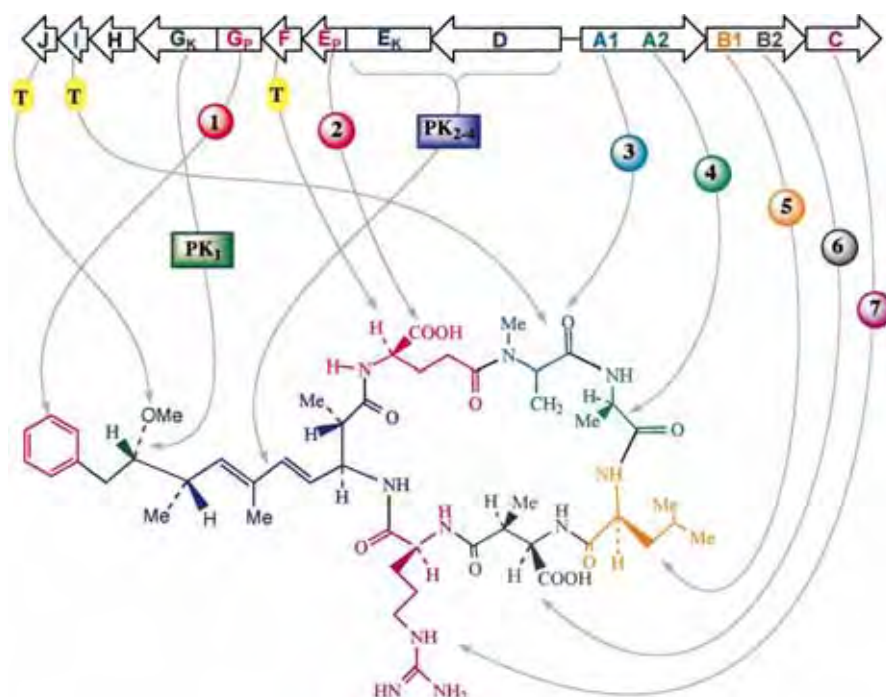


Figura 1. Modelo proposto para a biossíntese de microcistina-LR mostrando a organização do conjunto de genes *mcyA-J* e a microcistina. A via biossintética consiste em um complexo enzimático modular de sintetase de peptídeo e sintase de policetídeo. Os números em círculo indicam a sequência dos aminoácidos incorporados na biossíntese do peptídeo através de genes de peptídeos não ribossomais (NRPS) (*mcyA*, B, C, Ep, Gp). *mcyA* e *mcyB* contém dois módulos, A1/A2 e B1/B2, respectivamente. A1 também codifica um domínio N-metiltransferase. Retângulos mostram a ordem de síntese de policetídeo na formação do aminoácido Adda (*mcyGk*, Ek, D). ORFs adicionais com função de formação da cadeia são indicados por T. O tamanho relativo dos genes *mcy* compreende aproximadamente 55 Kb. Retirado e modificado de Kaebernick e Neilan (2001)

2.4 PCR competitiva

A toxicidade de cianobactérias é linhagem específica. Assim, linhagens podem ser não tóxicas, neurotóxicas, hepatotóxicas ou neuro-hepatotóxicas. Segundo Zurawell et al. (2005) a produção da hepatotoxina microcistina é regulada em três níveis: 1) nível genético: fator determinante da toxicidade de linhagens; 2) nível celular: a produção de toxina é regulada por fatores ambientais; 3) nível populacional: toxicidade de uma população de cianobactérias é relacionada com a proporção de linhagens tóxicas e não tóxicas presentes naquela comunidade de cianobactérias.

Devido ao fato de linhagens tóxicas e não tóxicas não serem distinguíveis ao microscópio óptico (BAKER et al. 2001), a detecção precoce de cianobactérias tóxicas na água é indispensável para evitar contaminações e problemas de Saúde Pública, tornando-se possível traçar planos preventivos.

A utilização de marcadores moleculares para microcistina *in situ* é extremamente útil na detecção de cianobactérias que possuem o potencial genético de produção da microcistina, uma vez que a detecção molecular independe da isoforma da toxina produzida, da categoria taxonômica da cianobactéria e da produção de toxina no momento da análise (BITTENCOURT-OLIVEIRA 2003).

Após a identificação, clonagem e sequenciamento do agrupamento de genes da sintetase da microcistina (TILLET et al. 2000, NISHIZAWA et al. 2000) foi possível desenvolver *primers* que amplificam partes dos genes *mcy*, tornando possível a detecção do genótipo que contém a codificação para sintetase da microcistina através da técnica molecular PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Tentativas anteriores foram realizadas com a finalidade de conhecer a correlação entre marcadores moleculares e a toxigenicidade de cianobactérias. Dentre eles há estudos com a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (NEILAN 1995, NISHIHARA et al. 1997), a hibridação *Southern* utilizando sequências de DNA repetitivo *RepA* e *RepB* de *Microcystis* (ASAYAMA et al. 1996), RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphic*) em *Anabaena* (ROUHIAINEN et al. 1995) e de genes 16S rRNA

(NEILAN et al. 1997, OTSUKA et al. 1998, RUDI et al. 1998, TILLET et al. 2000). Porém, somente com o uso de marcadores moleculares para genes da sintetase da microcistina foi possível correlacionar genótipo e produção de microcistina. A concordância entre análises imunoenzimáticas ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e de marcadores moleculares desenhados a partir de genes da sintetase da microcistina têm confirmado a aplicabilidade desta metodologia (KURMAYER et al. 2002; KURMAYER e KUTZENBERGER 2003, BITTENCOURT-OLIVEIRA 2003; HISBERGUES et al. 2003; MANKIEWICZ-BOCZEC et al. 2006 e SAKER et al. 2007, VALÉRIO et al. 2009). Contudo, estudos recentes revelaram que há ocorrência de linhagens de cianobactérias que contém os genes *mcy*, mas não são capazes de produzir microcistina. Estes estudos atribuem este fato à inativação dos genes devido a mutações, tais como eventos de deleção e de inserção através de elementos transponíveis (KURMAYER et al. 2004, OSTEMAIER e KURMAYER 2009).

Sendo a PCR convencional uma metodologia qualitativa, recebe críticas em relação ao seu potencial de uso em rotinas de monitoramento em reservatórios para abastecimento público. Métodos moleculares quantitativos são úteis para estudar o processo de sucessão de gêneros produtores e não produtores de toxinas em corpos d'água e também monitorar a formação de biomassas massivas de linhagens tóxicas, bem como correlacioná-las com os possíveis fatores que as ocasionam (VAITOMAA et al. 2003).

A PCR competitiva surge como uma alternativa na abordagem molecular de detecção de genótipos tóxicos, pois possui características quantitativas. De acordo com Yoshida et al. (2003) é uma poderosa ferramenta para detecção quantitativa de *Microcystis* tóxicas em amostras ambientais.

A PCR competitiva é baseada na co-amplificação do gene alvo e de um DNA competidor de concentração conhecida, sendo que ambos podem ser amplificados pelo mesmo *primer* (SIEBER et al. 1992). Pressupondo haver uma cópia do gene estudado no genoma do organismo, uma vez quantificado, o número de cópias do gene pode ser

convertido para o número de cromossomos e conseqüentemente para o número de células (YOSHIDA et al. 2005).

A PCR competitiva têm sido utilizada com êxito por alguns pesquisadores para diferentes abordagens como, por exemplo, quantificar cianobactérias no Mar Báltico (MÖLLER e JANSON 1997), na detecção e quantificação de cianobactérias tóxicas em linhagens e amostras ambientais (RUDI et al. 1998, YOSHIDA et al. 2003, YOSHIDA et al. 2005), na determinação da eficiência de metodologias de extração de DNA (MUMY e FINDLAY 2004) e no estudo da dinâmica sazonal da competição entre populações tóxicas e não tóxicas de cianobactérias em ambientes naturais (YOSHIDA et. al 2005).

Diversos autores utilizaram a técnica de PCR em tempo real para quantificar células de cianobactérias potencialmente tóxicas. Esta técnica usa uma sequência específica marcada fluorescentemente e *primers* para quantificar DNA molde inicialmente presente nas reações, sendo este calculado pela taxa de acumulação exponencial dos fragmentos amplificados, baseado em curva padrão (JUNG et al. 2000). Foulds et al. (2002) utilizaram *mcyA* e *mcyB* para quantificar *Microcystis*; Kurmayer e Kutzenberger (2003) genes *cpcBA* (ficocianina) e *mcyB* para quantificar diversos gêneros de cianobactérias de amostras naturais; Vaitomaa et al. (2003) genes *mcyE* para quantificar *Microcystis* e *Anabaena*; Rinta-Kanto et al. (2005) genes 16S rDNA e *mcyD* para quantificar *Microcystis*; Furukawa et al. (2006) genes *mcyA* para quantificar *Microcystis*; Koskeniemi et al. (2007) genes *nda* (sintetase de nodularina) para quantificar *Nodularia* e, finalmente Hotto et al. (2008) genes *mcyD* para quantificar *Microcystis*. Contudo, a PCR em tempo real requer equipamento de alto custo de aquisição e manutenção, podendo representar um empecilho para utilização da técnica (KURMAYER e KUTZENBERGER 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens, amostra e condições de cultivo

As linhagens de *Microcystis* sp. BCCUSP18 da coleção de cianobactérias “Brazilian Cyanobacteria of Collection University of São Paulo”, potencialmente produtora de microcistina (MC-LR) e BCCUSP03, não produtora de microcistina (BITTENCOURT-OLIVEIRA 2003) foram cultivadas em meio BG-11 descrito por Rippka et al. (1979) como modificações segundo Bittencourt-Oliveira (2000) e mantidas em câmara climática com $22 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ de temperatura, fotoperíodo 14h:10h (claro:escuro) e intensidade luminosa de $30 (\pm 1,0) \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (fotômetro LI-COR, mod. LI-250, com sensor esférico subaquático).

A amostra ambiental foi coletada através de rede de fitoplâncton 20 μm no Reservatório de Duas Unas, estado de Pernambuco (08° 05' 2,0" S 35° 02' 31,8" W). Espécies do gênero *Microcystis* foram os táxons predominantes na amostra avaliada por microscopia óptica.

3.2 Análise quantitativa de células

A contagem das células das linhagens foi realizada através de hemocitômetro *Fuchs Rosenthal* com auxílio de um microscópio binocular Olympus. Foi estabelecido um número mínimo de 400 células contadas de forma a se obter um erro de aproximadamente 10% para um nível de confiança de 95% (GUILLARD 1973).

Anteriormente à contagem, as amostras ambientais foram aquecidas à 35 °C por 10 minutos seguida de intensa agitação periódica durante 10 minutos. Desta maneira as colônias de *Microcystis* se desagregaram possibilitando a utilização de hemocitômetro para quantificação das células.

3.3 Extração de DNA

Foram extraídos DNA de número de células conhecido, sendo que o extrato de DNA final correspondeu à quantidade de DNA referente à 1 mL de cultura e de amostra

ambiental. Após eluir foi possível relacionar o volume da solução de DNA extraído com o número de células correspondente, expressando-o em número de “células DNA equivalente” (simplificado a C.D.E. neste estudo).

A contagem de células de *Microcystis* spp. revelou que haviam $2,68 \times 10^7$ células de *Microcystis* spp. por mililitro na amostra. Como a extração de DNA foi realizada com 1,0 mL de amostra e o DNA total obtido foi eluído em 50 μ L de TE (10mM de Tris-HCl, pH 7,4; 1mM de EDTA, pH 8,0), a concentração da solução de DNA da amostra ambiental foi de $5,36 \times 10^5$ C.D.E. μ L⁻¹.

A extração de DNA seguiu metodologia proposta por Roger e Bendich (1985) iniciando-se com a centrifugação (14.000 rpm, 2 minutos, 25 °C) de 1 mL de cultivo na fase logarítmica de crescimento ou 1 mL de amostra ambiental com alta densidade de *Microcystis* spp. e ressuspensão do centrifugado em 1 mL de água destilada, seguida de nova centrifugação (14000 rpm, 2 minutos, 25 °C). O material centrifugado foi ressuspendido em 400 μ L de tampão CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) e incubado por 30 minutos a 60 °C em banho-maria (Thermo Bath ALB64, Coréia do Sul) para promover a quebra das membranas celulares. Seguiu-se a adição de 60 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) para isolamento do DNA total das células. Dois ciclos de centrifugações foram realizados (14000 rpm, 5 minutos, 25 °C), com coleta do sobrenadante e descarte do centrifugado. Adicionou-se 5 μ L de RNase (10mg. μ L⁻¹) e o material foi incubado por 15 minutos a 37 °C. Em seguida foi acrescentado 900 μ L de isopropanol P.A., com inversão delicada dos tubos para promover a precipitação do DNA seguida de centrifugação (14000 rpm, 20 minutos, 25 °C). Após descarte do sobrenadante, adicionou-se 400 μ L de etanol 70% gelado para purificação do DNA total isolado e os tubos foram invertidos suavemente. Na sequência, o material foi centrifugado (14000 rpm, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante descartado. O DNA total isolado foi secado em rotaevaporador (Concentrator 5301 Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos para secagem do material. Para eluir, acrescentou-se 50 μ L de TE (10mM de Tris-HCl, pH 7,4; 1mM de EDTA, pH 8,0).

3.4 Construção do DNA competidor

3.4.1 Desenho dos *primers*

Com a finalidade de amplificar fragmento menor do que aqueles produzidos pelos iniciadores *cpcB-F* e *cpcA-R*, simplificadamente designados como *cpcBA* (NEILAN et al. 1995) e *mcvB-F/R* (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al. submetido), foram desenhados *primers reverse* internos à região genômica amplificada por estes, utilizando os softwares Primer 3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e Gene Runner Version 3.01. As seqüências que foram tomadas como base estão disponíveis no GenBank (números de acesso: AY147796 e AF385380) e outra disponível em Bittencourt-Oliveira et al. (submetido). Na Figura 2 os *primers* desenhados estão representados na cor vermelha.

Os *primers* foram sintetizados por laboratórios especializados e adquiridos comercialmente (IDT, Medley, USA) (Tabela 1).

3.4.2 PCR seqüenciais

O DNA competidor foi construído a partir de amplificações consecutivas com metodologia proposta por Yoshida et al. 2003. As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) utilizando o kit pureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Piscataway, NJ), 20µM de cada *primer*, 5 a 10 ng de DNA e água ultra-pura (Mili-Q, Millipore, EUA) para completar 25 µL de reação.

O DNA extraído da linhagem tóxica e não tóxica foram amplificados através de reações consecutivas utilizando *primers* e condições mostrados na Tabela 1.

A primeira amplificação (Figura 2.1) foi realizada com o *primer cpcBA* (NEILAN et al. 1995) e também *mcvB-F/R* (Bittencourt-Oliveira et al. submetido). Com o produto da primeira amplificação foi realizada a segunda, utilizando o *primer reverse* desenhado neste estudo (Figura 2.2). Na terceira amplificação utilizou-se o *primer reverse* composto da seqüência obtida em literatura sintetizada conjuntamente com a seqüência

desenhada no presente estudo, o R2-R1 (Figura 2.3). O produto da terceira amplificação (Figura 2.4) é constituído de seqüências que são menores do que a alvo, porém podem ser amplificados com os mesmos *primers* que amplificam as seqüências alvos.

Os produtos das amplificações foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídio ($2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A quantificação dos fragmentos amplificados foram realizadas com o sistema de fotodocumentação EDAS 290 (Kodak, Japão) a partir do programa Kodak Digital Science 1D 3.6 utilizando como marcador molecular Low DNA MassTM (Invitrogen, EUA).

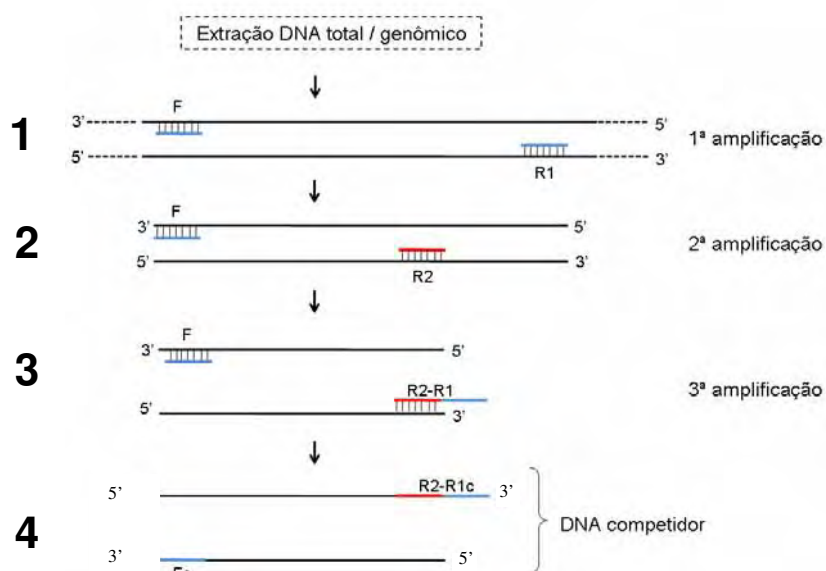


Figura 2. Etapas da construção do DNA competidor. F. *primer forward* obtido em literatura; R1. *primer reverse* obtido em literatura; R2. *primer reverse* desenhado no presente estudo; R2-R1. *primer reverse* com síntese conjunta de R1 e R2; Fc. Região genômica complementar ao *primer forward* F; R1/R2c. Região genômica complementar a *primer reverse* R1.

3.4.3 Purificação e quantificação do DNA competidor

Os produtos da 3ª amplificação foram recortados diretamente do gel de agarose com auxílio de uma lâmina cortante e purificados posteriormente utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, EUA) . A concentração do DNA competidor foi aferida em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, EUA).

3.5 Clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos extraídos do gel de agarose foram inseridos em plasmídio vetor disponível no sistema pGEM®-T Easy Vector System (Promega, EUA) e utilizados na transformação de células competentes de alta eficiência NEB 5-alpha (New England BioLabs) para a multiplicação dos plasmídeos, seguindo as recomendações do fabricante. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura Luria-Bertani (meio LB) acrescido de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, tendo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (XGAL) como substrato para a ação da enzima β -galactosidase, indicadora de transformação. Colônias positivas foram isoladas, cultivadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e utilizadas para a extração de plasmídeos. Os plasmídeos extraídos foram seqüenciados com os iniciadores T7 (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3') e SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'), cujo anelamento se dá em locais que flanqueiam o inserto, juntamente com kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare, EUA) e 3100 ABI Sequencer (Applied Biosystems, EUA), de acordo com instruções do fabricante. As seqüências foram analisadas em relação à similaridade com aquelas depositadas no GenBank utilizando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível na Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.6 PCR competitiva

3.6.1 Avaliação de amplificação de DNA competidores (*cpcBA* e *mcyB* competidor)

Para avaliar a eficiência de amplificação de DNA competidores foram realizados ensaios de PCR competitiva em triplicata. Foram utilizados DNA competidores em 4 quantidades diferentes, as quais diferiam entre si 10 vezes, juntamente com $2,0 \times 10^4$ C.D.E. de linhagens tóxicas e não tóxicas.

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) utilizando o kit pureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Piscataway, NJ), 20 μ M de cada *primer*, $2,0 \times 10^4$ C.D.E, *mcyB* competidores ($7,4 \times 10^{-2}$ ng, $7,4 \times 10^{-3}$ ng, $7,4 \times 10^{-4}$ ng ou $7,4 \times 10^{-5}$ ng) ou *cpcBA* competidores ($6,6 \times 10^{-3}$ ng, $6,6 \times 10^{-4}$ ng, $6,6 \times 10^{-5}$ ng ou $6,6 \times 10^{-6}$ ng); e água ultra-pura (Mili-Q, Millipore, EUA) para completar 25 μ L de reação.

Foi realizado o controle para o DNA alvo (Ca), utilizando na amplificação apenas DNA alvo, sem DNA competidor e também o controle para o DNA competidor (Cc), utilizando na amplificação apenas DNA competidor, sem DNA alvo.

O objetivo deste ensaio foi averiguar em qual das quantidades testadas de DNA competidor ter-se-ia a equivalência de amplificação entre DNA alvo ($2,0 \times 10^4$ células DNA equivalentes) e DNA competidor. Isto foi avaliado confeccionando-se no programa Excel 2007 (Microsoft, EUA) um gráfico de linhas com as densidades óptica (D.O.) das bandas que foram aferidas através da visualização da imagem digital do gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (2,0 μ g/mL) utilizando o programa Kodak Digital Science 1D 3.6, resultante das co-amplificações do DNA competidor e do DNA alvo. Densidades ópticas das bandas as quais as amplificações se equivaleram foram consideradas as mais eficientes na quantificação de aproximadamente $2,0 \times 10^4$ C.D.E.

3.6.2 PCR competitiva com linhagens

Utilizando a massa do DNA competidor considerada mais eficiente na quantificação de aproximadamente $2,0 \times 10^4$ C.D.E. foram realizados ensaios em triplicata de PCR competitiva amplificando-se DNA competidor juntamente com quantidades crescentes de C.D.E de DNA das linhagens. O objetivo foi investigar a eficiência de quantificação de aproximadamente $2,0 \times 10^4$ C.D.E. observando em qual das reações obter-se-ia a equivalência de amplificação entre DNA alvo ($1,0 \times 10^3$; $7,0 \times 10^3$; $2,0 \times 10^4$; $5,0 \times 10^4$; $8,0 \times 10^4$; $1,5 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ C.D.E.) e DNA competidor.

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) utilizando o kit pureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Piscataway, NJ), $20\mu\text{M}$ de cada *primer*, DNA alvo nas quantidades acima citadas, *mcyB* ou *cpcBA* competidor e água ultra-pura (Mili-Q, Millipore, EUA) para completar $25\mu\text{L}$ de reação.

Foi realizado controle para o DNA alvo utilizando na amplificação apenas o DNA alvo sem o competidor (Ca) e também o controle para o DNA competidor utilizando na amplificação apenas o DNA competidor sem o alvo (Cc).

A densidade óptica das bandas produzidas pelas amplificações foram aferidas através da visualização da imagem digital do gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio ($2,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizando o programa Kodak Digital Science 1D 3.6. Obteve-se uma equação de regressão linear utilizando o programa estatístico SAS statistical software for Windows (SAS Institute, Inc.) plotando-se no eixo X o \log_{10} da razão entre as D.O. de amplificações do DNA alvo e do DNA competidor e no eixo Y o \log_{10} da quantidade de C.D.E. de DNA alvo.

3.6.3 PCR competitiva com amostra ambiental

Foram realizados ensaios em triplicata de PCR competitiva com amostra ambiental coletadas no reservatório de Duas Unas, Pernambuco. Foram co-

amplificados diluições seqüenciais de $5,36 \times 10^5$ C.D.E. da amostra ambiental (1: 5×10^2 , 1: 2×10^3 , 1: 5×10^3 e 1: 10^4) e DNA competidor ($3,7 \times 10^{-3}$ ng de *mcyB* competidor ou $2,0 \times 10^{-4}$ ng de *cpcBA* competidor).

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) utilizando o kit pureTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham, Piscataway, NJ), $20 \mu\text{M}$ de cada *primer*, diluições seqüenciais de DNA da amostra ambiental acima citadas, *mcyB* ou *cpcBA* competidores e água ultra-pura (Mili-Q, Millipore, EUA) para completar $25 \mu\text{L}$ de reação.

Foi realizado controle para o DNA alvo utilizando na amplificação apenas o DNA alvo sem o competidor (Ca) e também o controle para o DNA competidor utilizando na amplificação apenas o DNA competidor sem o alvo (Cc).

A densidade óptica das bandas produzidas pelas amplificações foram aferidas através da visualização da imagem digital do gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio ($2,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) utilizando o programa Kodak Digital Science 1D 3.6. Obteve-se uma equação de regressão linear utilizando o programa estatístico SAS statistical software for Windows (SAS Institute, Inc.) plotando-se no eixo X o \log_{10} da razão entre as D.O. de amplificações do DNA alvo e do DNA competidor e no eixo Y o \log_{10} das diluições de C.D.E. da amostra ambiental. Com as equações de regressão linear obtidas foram verificadas as diluições as quais houve equivalência de amplificação entre DNA alvo e de DNA competidores. Multiplicando-se este valor pela quantificação conferida pelo *mcyB* ou *cpcBA* competidores utilizados, foi obtida a estimativa do número de células de *Microcystis* spp. da amostra ambiental utilizados na PCR competitiva.

Tabela 1. *Primers* e condições das reações utilizadas para a construção do DNA competidor

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Fragmento (pb)	Fonte	Condições de PCR
<i>cpcB</i> -F	GGCTGCTTGTTTACGCGACA		NEILAN et al. 1995	1 (94°C/4'); 30 (94°C /
<i>cpcA</i> -R	CCAGTACCACCCAGCAACTAA	685		10", 50°C / 20" e 72°C /
<i>cpcA</i> -R2	AGGGGGGTTTTTCATTGTTTGG	363	Este estudo	40");1 (72°C /7')
<i>mcyB</i> -F	TTCAACGGGGAAAACCCAAAG		BITTENCOURT-	1 (94°C/2'); 35 (94°C /
<i>mcyB</i> -R	CYAATATGTAAAYTCTCCAG ^a	570	OLIVEIRA et al. submetido	10", 56°C / 20" e 72°C / 1'); 1 (72°C /5')
<i>mcyB</i> -R2	TTAACCAGTCTCGCAAGTC	233	Este estudo	

^aY. C ou T

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção de DNA competidores para a região gênica *cpcBA* e para o gene *mcyB*

Resultados satisfatórios foram obtidos com os *primers* desenhados neste estudo. Em sua utilização foi possível deletar a região 3' das sequências amplificadas, gerando um produto de amplificação menor do que os dos *primers* obtidos em literatura.

Os *primers* desenhados neste estudo foram denominados *cpcA*-R2 e *mcyB*-R2 (Tabela 1). Os resultados das amplificações sequenciais, mostrados na Figura 3, culminaram na produção de DNA competidor para o gene codificador da ficocianina (*cpcBA*), o qual foi denominado *cpcBA* competidor e para um fragmento do gene *mcyB*, denominado *mcyB* competidor.

O tamanho dos produtos da primeira amplificação, em pares de base (pb), encontrou-se dentro da expectativa dos *primers* utilizados. A segunda amplificação produziu fragmentos de cerca de 300pb menores do que os da primeira amplificação. Assim sendo, satisfez-se a necessidade de produção de produtos de PCR menores, cuja diferença seja visualizada em uma matriz de gel de agarose. Na terceira amplificação o *primer reverse* utilizado foi aquele composto da sequência obtida em literatura sintetizada conjuntamente com a sequência desenhada no presente estudo (Figura 2.3). A diferença de aproximadamente 80bp entre produtos da segunda amplificação e da terceira indicou sucesso na tentativa de introduzir a sequência complementar dos *primers reverse* descritos em literatura adjacente às sequências dos *primers reverse* desenhados neste estudo. Desta maneira os dois principais requisitos para o DNA competidor foram contemplados: 1) ser menor do que a sequência alvo e 2) ser amplificável pelos mesmos *primers* que a sequência alvo. Isto possibilitou a co-amplificação do DNA competidor e do DNA alvo, utilizando o mesmo *primer* porém com produtos amplificados detectáveis de tamanhos diferentes, cuja diferença pode ser visualizada em gel de agarose.

A não amplificação de DNA na BCCUSP03, com o *primer* do *mcyB*, confirmou que esta linhagem não é potencialmente tóxica.

Os produtos da terceira amplificação, ou seja, os DNA competidores, foram extraídos e purificados diretamente do gel de agarose utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, EUA). Em seguida foram clonados e seqüenciados em procedimento descrito detalhadamente nos itens 4.4.

As sequências 5'- 3' podem ser visualizadas abaixo, sendo que as bases nitrogenadas sublinhadas com um traço são as sequências *forward* e *reverse* dos *primers* obtidos em literatura. As sequências sublinhadas com dois traços são aquelas dos *primers* R2 desenhados neste estudo (Tabela 1).

A sequência do *cpcBA* competidor possui 363 pb, 98% de identidade e 67% de cobertura com a sequência do gene *cpcBA* de *Microcystis* sp. KLL MB-K (nº acesso no GenBank AY524848.1) e pode ser visualizada a seguir:

```

1 GGCCGCGGGAATTCGATTGGCTGCTTGTTTACGCGACATGGAAATCATCTTGCGTTATGT
61 TACCTATGCTACCTTCTCTGGCGACGGCAGTGTTCTCGATGATCGTTGCTTAAATGGTCT
121 TCGCGAAACCTATGTAGCTTTAGGAGTACCTGGAGCTTCCGTAGCTGCTGGCGTAAGCAA
181 AATAAAAGAAACTGCTTTGTCCATCGCTAACGATCGCAACGGTATCACCCCCGGCGATTG
241 CAGTGCTTTAATGTNTGAAATTGCCAGCTACTTCGACCGCGCCGCGCTGCTGTGCCTA
301 GTCCCTGGGGCTAGTCTCAATTAAACCGTAGGAACTTATTGCAAGATTATTGGGAGATA
361 CCAAACAATGAAAACCCCCCTTTAGTTGCTGGTGGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGC
421 CTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTA
481 TAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGT

```

A sequência do *mcyB* competidor possui 233 pb de produto amplificado, 99% de identidade e 64% de cobertura com o gene *mcyB* de *Microcystis aeruginosa* B-47 (nº acesso no GenBank AY524848.1) que pode ser visualizada a seguir:

```

1 CTGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTTCAACGGGAAA
61 ACCCAAAGGAGTATTAATTAGCCATCGGGGGTTAATGAATTTAATATGTTGGCATCAAGA
121 CGCTTTTGAAATTACGCCTTTAGACAAAATTACTCAACTAGCAAGAAGTGCTTTTGACGC
181 TGCGGTTTGGGAGTTATGGCCCTGTTTAACAGCAGGTGCGAGTCTTGTCTTAGTTAAACC
241 TGAAATCATGCAATCTCCCCCGGACTTGCGAGACTGGTTAACTGGAGAGTTACATATTAG
301 AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCG

```

4.2 Avaliação de amplificação de DNA competidores (*cpcBA* e *mcyB* competidor)

Quantidades crescentes de DNA competidores foram co-amplificados com $2,0 \times 10^4$ C.D.E. para avaliar em qual das diluições obter-se-ia a equivalência entre amplificações de DNA competidores e de DNA alvo. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 4 e 5.

Para o *mcyB* competidor utilizado com a linhagem BCCUSP18 a equivalência de amplificações ocorreu entre as canaletas 2 ($7,4 \times 10^{-3}$ ng) e a 3 ($7,4 \times 10^{-4}$ ng), conforme mostra a Figura 4a. Tal como mostrado na Figura 5a optou-se em considerar a quantidade de $3,7 \times 10^{-3}$ ng, ou seja, a metade de $7,4 \times 10^{-3}$ ng como a mais próxima na quantificação de $2,0 \times 10^4$ C.D.E.

Os resultados revelaram que para o *cpcBA* competidor utilizado com a linhagem tóxica BCCUSP18 a quantidade de $6,6 \times 10^{-5}$ ng de *cpcBA* competidor mostrou-se a

mais próxima para quantificar $2,0 \times 10^4$ C.D.E. (Figura 5b). Visualmente percebe-se que a equivalência de amplificação ocorreu na canaleta 7 da Figura 4b.

No entanto, utilizando-se a linhagem não tóxica a quantidade de *cpcBA* competidor que mais se aproximou na quantificação de $2,0 \times 10^4$ C.D.E. ficou entre $6,6 \times 10^{-4}$ ng (canaleta 6, Figura 4c) e $6,6 \times 10^{-5}$ ng (canaleta 7, Figura 4c). Optou-se em considerar a quantidade de $3,3 \times 10^{-4}$ ng, ou seja, a metade de $6,6 \times 10^{-4}$ ng (Figura 5c) como aquela que mais se aproximou na quantificação de $2,0 \times 10^4$ C.D.E.

As canaletas designadas como 4 (*mcyB* competidor) e 5 (*cpcBA* competidor) foram desconsideradas na avaliação gráfica dos DNA competidores (Figura 5). Isto porque, tal como observado na Figura 4, as amplificações produziram fragmentos amplificados apenas referentes ao DNA competidor (Figura 4a) ou apenas referente ao DNA alvo (Figura 4b) ou ainda interferências de artefato do gel de agarose impossibilitaram uma adequada mensuração da D.O. da banda (Figura 4c).

Na Figura 6 é mostrado um exemplo das mensurações de D.O. das bandas, obtidas a partir do programa Kodak Digital Science 1D 3.6. Este exemplo se refere à primeira análise de *cpcBA* competidor testado com a linhagem BCCUSP18 (Figura 4b).

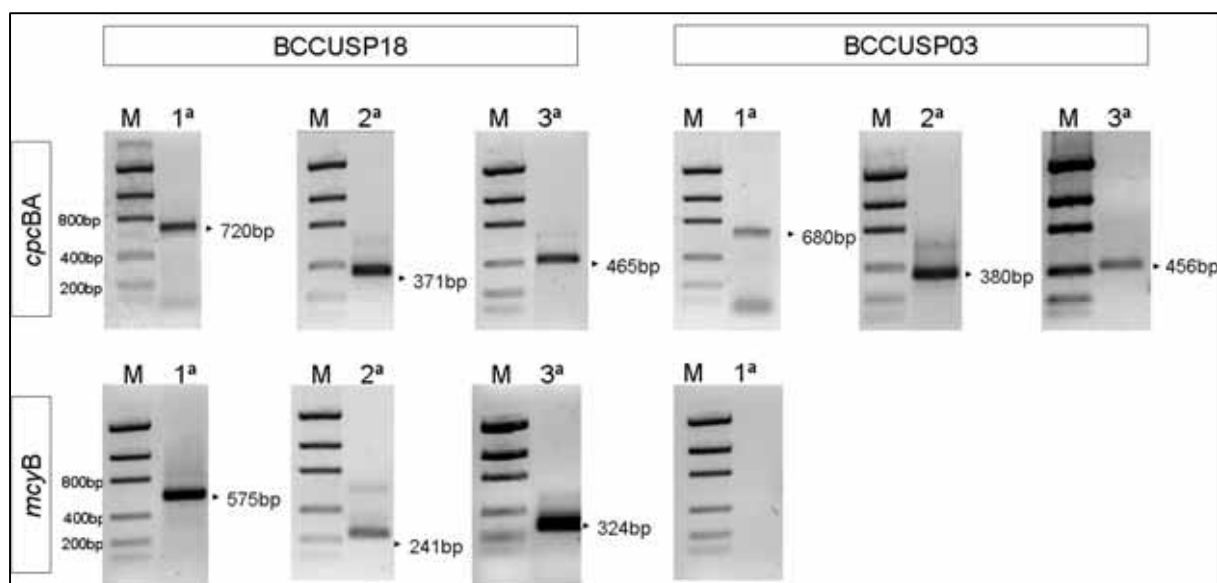


Figura 3. Géis de agarose corado com brometo de etídio mostrando as etapas de obtenção de DNA competidor a partir de amplificações seqüenciais. *cpcBA*. Gene amplificado com o *primer cpcBA*, *mcyB*. Gene amplificado com o *primer mcyB-F/R*; BCCUSP18. Linhagem *Microcystis* sp. tóxica; BCCUSP03. Linhagem *Microcystis* sp. não tóxica; M. Low DNA Mass LadderTM; 1ª. Primeira amplificação; 2ª. Segunda amplificação; 3ª. Terceira amplificação (tal como esquematizado na Figura 2).

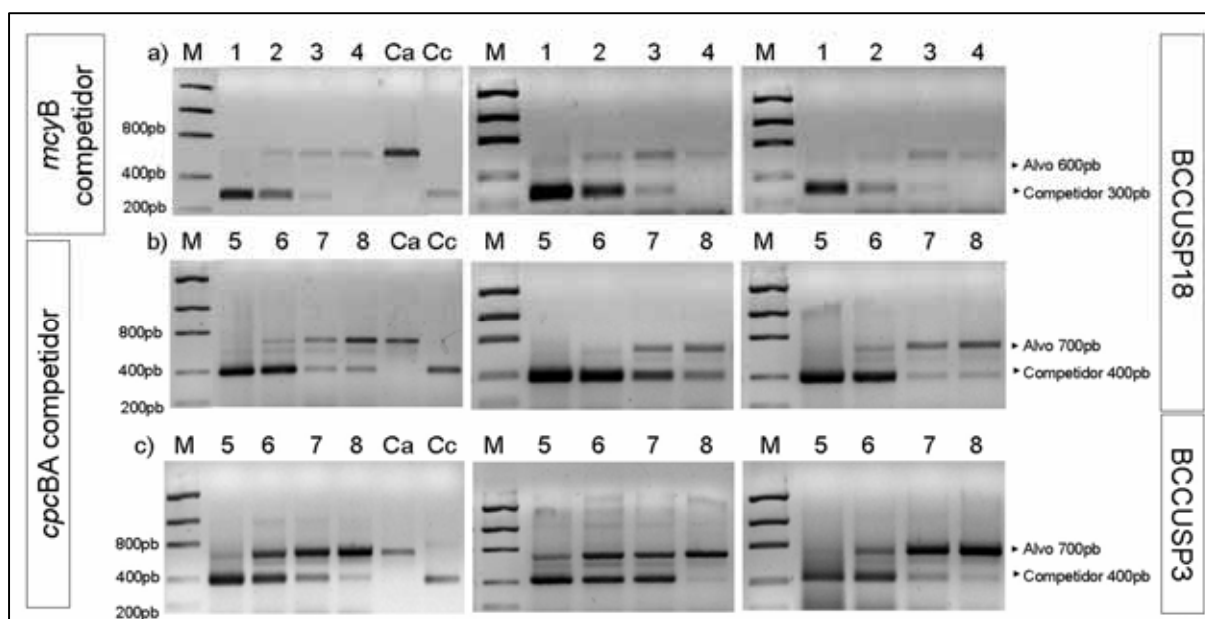


Figura 4. Géis de agarose corados com brometo de etídeo mostrando resultado das avaliações de DNA competidores em triplicata para quantificação de $2,0 \times 10^4$ C.D.E. **a.** *mycB* competidor com BCCUSP18; **b.** *cpcBA* competidor com BCCUSP18; **c.** *cpcBA* competidor com BCCUSP03 **M.** Low DNA Mass LadderTM; **1.** $7,4 \times 10^{-2}$ ng de *mycB* competidor; **2.** $7,4 \times 10^{-3}$ ng de *mycB* competidor; **3.** $7,4 \times 10^{-4}$ ng de *mycB* competidor; **4.** $7,4 \times 10^{-5}$ ng de *mycB* competidor; **5.** $6,6 \times 10^{-3}$ ng de *cpcBA* competidor; **6.** $6,6 \times 10^{-4}$ ng de *cpcBA* competidor; **7.** $6,6 \times 10^{-5}$ ng de *cpcBA* competidor; **8.** $6,6 \times 10^{-6}$ ng de *cpcBA* competidor; **Ca.** Controle do DNA alvo; **Cc.** Controle do DNA competidor.

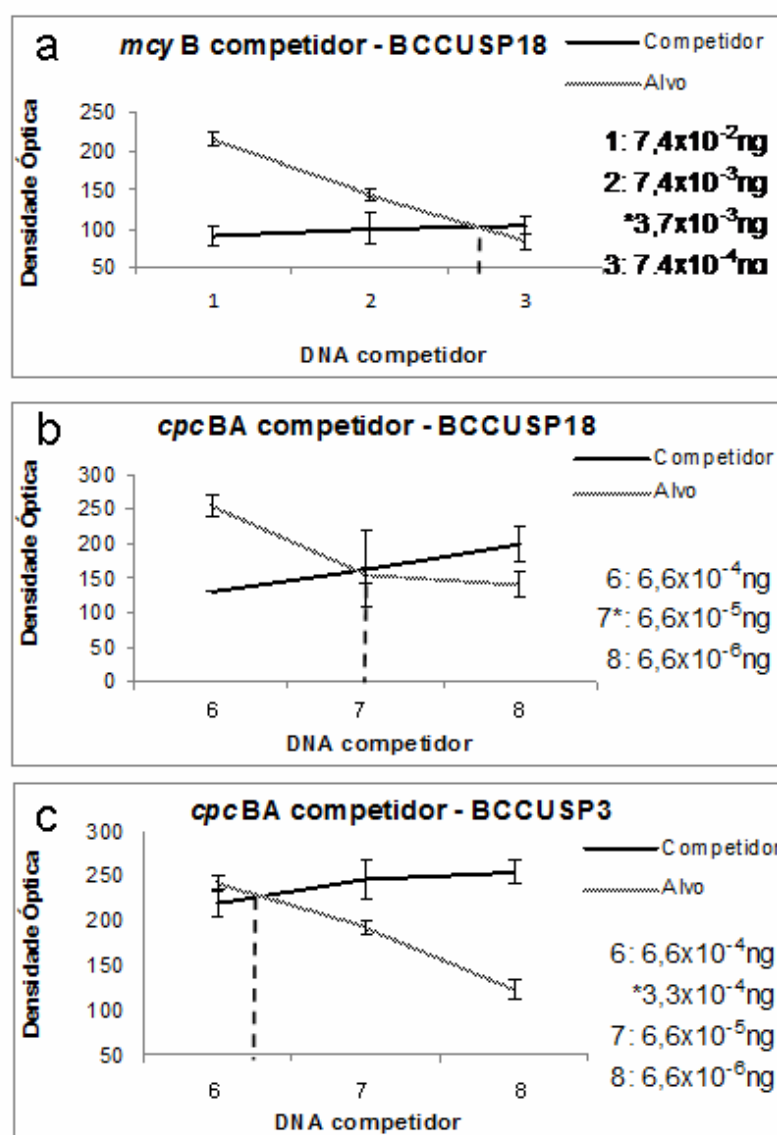


Figura 5. Representações gráficas mostrando as médias e desvios padrões das densidades ópticas dos produtos amplificados de cada quantidade de DNA competidor avaliado. O ponto da intersecção das linhas de densidade óptica das amplificações do DNA competidor e do DNA alvo foi considerado o mais próximo na quantificação de $2,0 \times 10^4$ C.D.E. **a.** *mcyB* competidor testado com BCCUSP18; **b.** *cpcBA* competidor testado com BCCUSP18; **c.** *cpcBA* competidor testado com BCCUSP3; 1. $7,4 \times 10^{-2} \text{ ng}$; 2. $7,4 \times 10^{-3} \text{ ng}$; 3. $7,4 \times 10^{-4} \text{ ng}$; 6. $6,6 \times 10^{-4}$; 7. $6,6 \times 10^{-5} \text{ ng}$; 8. $6,6 \times 10^{-6} \text{ ng}$ de DNA competidor; (*). Quantidade de DNA competidor considerada a mais próxima para quantificar $2,0 \times 10^4$ C.D.E.

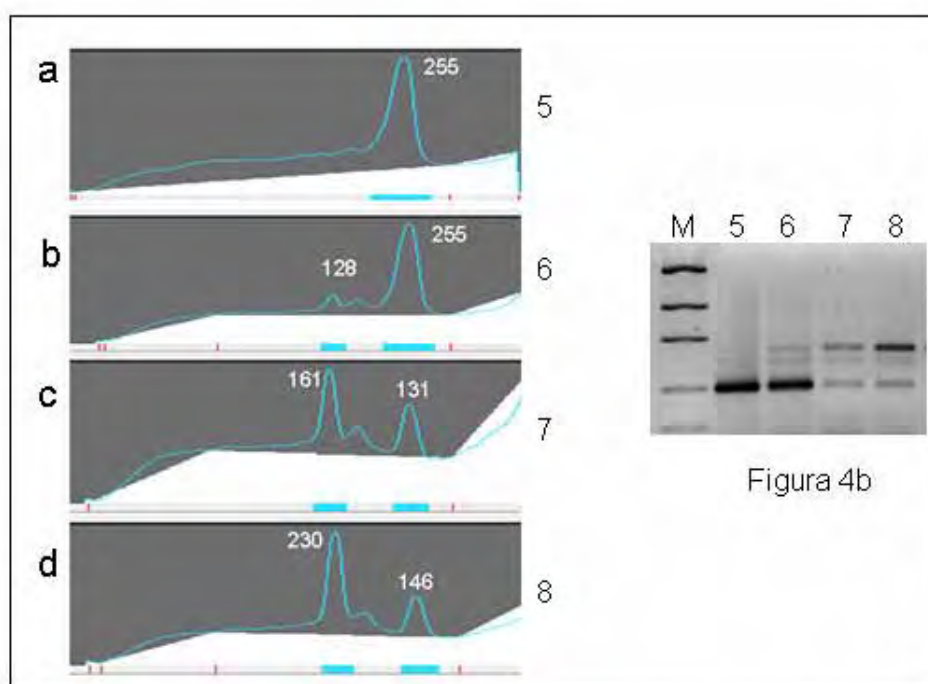


Figura 6. Esquema demonstrativo da obtenção dos dados de D.O. das amplificações através do programa Kodak Digital Science 1D 3.6. Exemplo referente às canaletas 5(a), 6(b), 7 (c) e 8(d) da primeira réplica do ensaio do *cpcBA* com BCCUSP18 (Figura 4b, página 26).

4.3 PCR competitiva

4.3.1 Linhagens

Utilizando a concentração do DNA competidor considerada mais próxima para quantificar $2,0 \times 10^4$ C.D.E., ou seja, $3,7 \times 10^{-3}$ ng para *mcvB* competidor utilizando com BCCUSP18 (tóxica), $6,6 \times 10^{-5}$ ng para *cpcBA* competidor utilizando com BCCUSP 18 e $3,3 \times 10^{-4}$ ng para *cpcBA* competidor utilizando com BCCUSP3 (não tóxica), foram realizados ensaios em triplicata de PCR competitiva amplificando-se DNA competidor juntamente com quantidades crescentes de C.D.E. de linhagens ($1,0 \times 10^3$, $7,0 \times 10^3$, $2,0 \times 10^4$, $5,0 \times 10^4$, $8,0 \times 10^4$, $1,5 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ C.D.E.).

A Figura 7 mostra os resultados obtidos para as PCR competitivas. O resultado esperado seria que as amplificações equivalessem em torno da canaleta 3, visto que os DNA competidores foram obtidos para a finalidade de quantificar aproximadamente $2,0 \times 10^4$ C.D.E.

Os resultados obtidos das D.O. de amplificações foram plotados conforme mostram as representações gráficas da Figura 8.

Cálculos de padronização das quantificações de células da linhagem tóxica e não tóxica com *cpcBA* competidor (Tabela 2) revelaram que para quantificar um mesmo número de células, seria necessário 3,33 vezes mais *cpcBA* competidor na PCR competitiva da linhagem não tóxica do que na da tóxica.

A Tabela 2 mostra as equações da reta e o R^2 das quantificações da linhagem tóxica e não tóxica realizadas separadamente com o *cpcBA* competidor resultante de ensaios em triplicata ($n=3$) e também a quantificação da análise realizada conjuntamente ($n=6$). A partir da análise única, obteve-se pequena diminuição do coeficiente de explicação da reta R^2 que passou de 0,989 e 0,968 para 0,895. Isto indicou que não há diferença significativa entre quantificação de células tóxicas e não tóxicas utilizando *cpcBA* competidor. Com relação à quantificação, separadamente obteve-se $1,45 \times 10^4$ e $2,14 \times 10^4$ células e conjuntamente $1,84 \times 10^4$ células, sendo este o valor considerado para o restante dos experimentos.

Em suma, verificou-se que os DNA competidores utilizados foram capazes de quantificar $1,84 \times 10^4$ células de *Microcystis* sp. BCCUSP18 e BCCUSP3 (*cpcBA* competidor) e $1,54 \times 10^4$ células de *Microcystis* sp. BCCUSP18 (*mcyB* competidor).

4.3.2 Amostra ambiental

Foram realizados ensaios em triplicata de PCR competitiva com uma amostra ambiental de Duas Unas, PE.

Foram co-amplificados diluições seqüenciais de $5,36 \times 10^5$ C.D.E. da amostra ambiental ($1: 5 \times 10^2$, $1: 2 \times 10^3$, $1: 5 \times 10^3$ e $1: 10^4$) e DNA competidor. Foram utilizados $3,7 \times 10^{-3}$ ng de *mcyB* competidor e $2,0 \times 10^{-4}$ ng de *cpcBA* competidor, ou seja, um valor entre $3,3 \times 10^{-4}$ ng e $6,6 \times 10^{-5}$ ng. O resultado destas amplificações pode ser visualizado na Figura 9.

Na Figura 9a observou-se que visualmente a equivalência de amplificação ocorreu entre as canaletas 2 ($1: 2 \times 10^3$) e 3 ($1: 5 \times 10^3$) e na Figura 9b entre a 3 ($1: 5 \times 10^3$) e a 4 ($1: 10^4$). Os valores exatos foram obtidos com as equações de regressão linear (Tabela 2) dos gráficos de dispersão gerados com os dados de D.O. das amplificações (Figura 10).

Esta avaliação foi realizada igualando-se a zero a variável X na equação da reta. O resultado obtido representa o valor da diluição de equivalência de amplificação de DNA alvo e DNA competidor. Este valor multiplicado pela quantificação de células conferida pelos DNA competidores utilizados, resultou na estimativa do número de células de *Microcystis* spp. da amostra ambiental utilizados na PCR competitiva. Portanto, para quantificar células a partir do gene *cpcBA* da amostra do reservatório de Duas Unas, PE, foi realizada a multiplicação de $2,48 \times 10^3$ (diluição de amplificação equivalente entre DNA alvo e *cpcBA* competidor) por $1,84 \times 10^4$ (quantificação conferida pelo *cpcBA* competidor utilizado) resultando em $4,5 \times 10^7$ C.D.E. De maneira análoga obteve-se a quantificação a partir de *mcyB* multiplicando-se $6,71 \times 10^3$ por $1,54 \times 10^4$ (quantificação conferida pelo *mcyB* competidor utilizado) resultando em $1,0 \times 10^8$ C.D.E. (Tabela 2).

Desta forma, comparando com o valor esperado ($5,36 \times 10^5$ C.D.E.), a quantificação por PCR competitiva de células de *Microcystis* spp da amostra ambiental. utilizando *cpcBA* e *mcyB* competidores superestimou o número de células em 83 e 186 vezes, respectivamente.

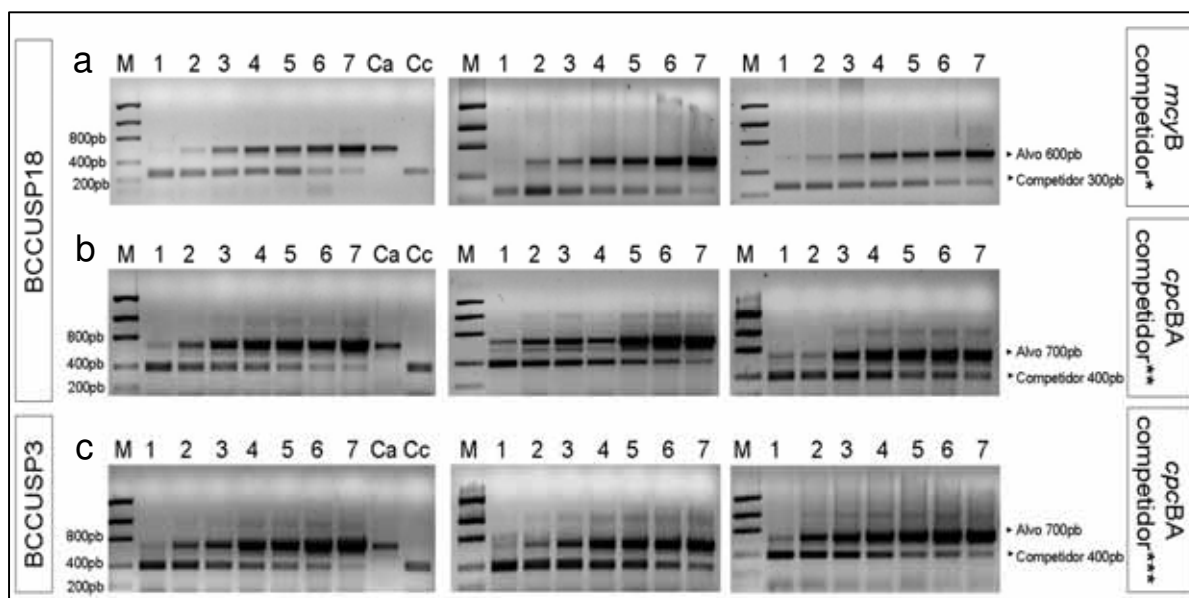


Figura 7. Géis de agarose corado com brometo de etídeo mostrando resultado das triplicatas de ensaio de PCR competitiva com linhagens. **a.** *mcyB* competidor com BCCUSP18; **b.** *cpcBA* competidor com BCCUSP18; **c.** *cpcBA* competidor com BCCUSP3; **M.** Low DNA Mass LadderTM; **1.** $1,0 \times 10^3$ C.D.E.; **2.** $7,0 \times 10^3$ C.D.E.; **3.** $2,0 \times 10^4$ C.D.E.; **4.** $5,0 \times 10^4$ C.D.E.; **5.** $8,0 \times 10^4$ C.D.E.; **6.** $1,5 \times 10^5$ C.D.E. e **7.** $3,0 \times 10^5$ C.D.E.; **Ca.** Controle do DNA alvo; **Cc.** Controle do DNA competidor; **(*)**. $3,7 \times 10^{-3}$ ng, **(**)**. $6,6 \times 10^{-5}$ ng; **(***)**. $3,3 \times 10^{-4}$ ng.

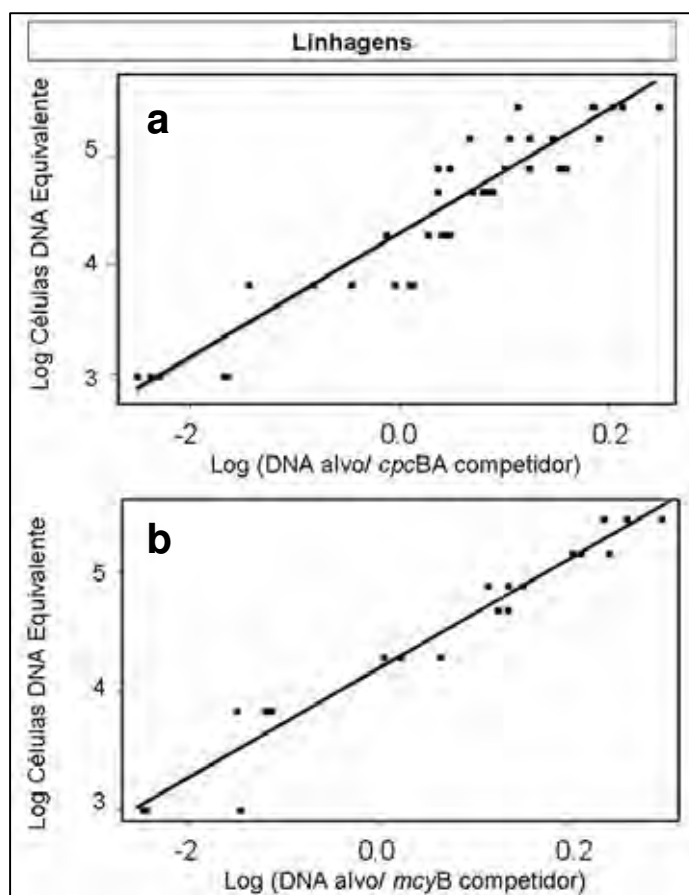


Figura 8. Representações gráficas de PCR competitiva obtidas através de dados de densidade óptica das bandas no gel de agarose resultante das amplificações dos ensaios com linhagens mensuradas pelo programa Kodak Digital Science 1D 3.6. **a.** Resultado de amplificação com *cpcBA* competidor, **b.** Resultado de amplificação com *mcyB* competidor.

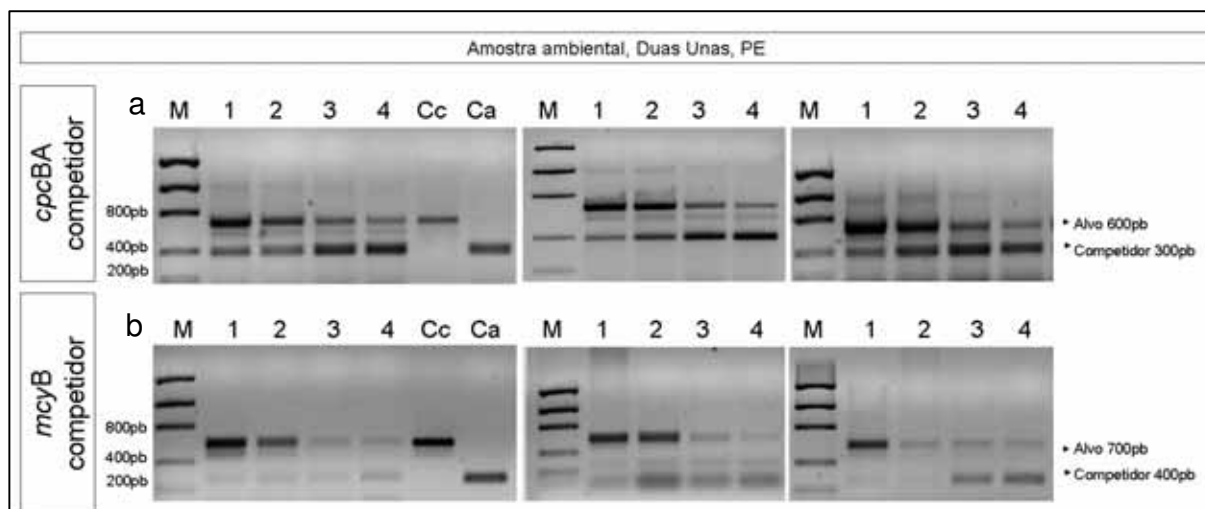


Figura 9. Géis de agarose corados com brometo de etídeo mostrando resultado dos ensaios de PCR competitiva com amostra ambiental do reservatório de Duas Unas, PE. **a.** *cpcBA* competidor; **b.** *mcyB* competidor; M. Low DNA Mass Ladder; 1. Diluição 1: 5×10^2 de C.D.E., 2. Diluição 1: 2×10^3 de C.D.E., 3. Diluição 1: 5×10^3 de C.D.E. e 4. Diluição 1: 10^4 de C.D.E.

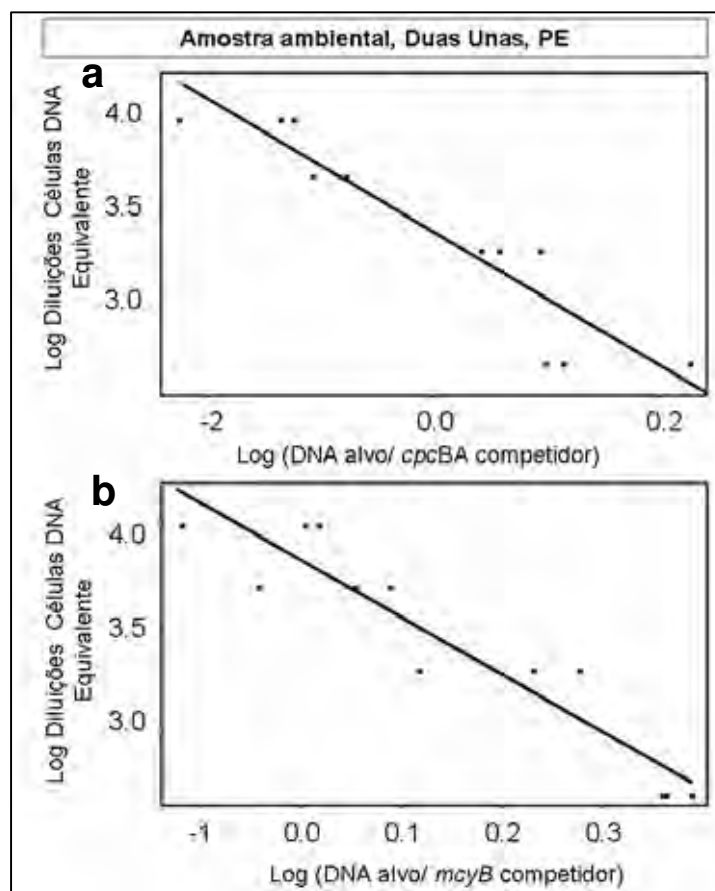


Figura 10. Representações gráficas obtidas através de dados de densidade óptica das bandas no gel de agarose resultante dos ensaios de PCR competitiva com amostra ambiental mensuradas pelo programa Kodak Digital Science 1D 3.6. **a.** Resultado de amplificação com *cpcBA* competidor, **b.** Resultado de amplificação com *mcyB* competidor.

Tabela 2. Análise quantitativa de linhagens e amostra ambiental utilizando PCR competitiva. R^2 . Coeficiente de explicação da reta; Q. Quantificação por PCR competitiva; M. massa de DNA competidor utilizado na PCR competitiva

Amostras	Repetições	R^2	Equação da Reta	Figura	Q (C.D.E.)	M (ng)
<i>cpcBA</i> competidor						
BCCUSP18	3	0,989	$y=4,164+6,465x$	7b	$1,45 \times 10^4$	$6,6 \times 10^{-5}$
BCCUSP03	3	0,968	$y=4,331+6,118x$	7c	$2,14 \times 10^4$	$3,3 \times 10^{-4}$
BCCUSP18 e	6	0,895	$y=4,265+5,6968x$	8a	$1,84 \times 10^4$	-
BCCUSP03						
Duas Unas	3	0,867	$y=3,395-3,538x$	9a / 10a	$4,5 \times 10^7$ ^a	$2,0 \times 10^{-4}$
<i>mcyB</i> competidor						
BCCUSP18	3	0,950	$y=4,187+4,607x$	7a / 8b	$1,54 \times 10^4$	$3,7 \times 10^{-3}$
Duas Unas	3	0,884	$y=3,827-2,736x$	9b / 10b	$1,0 \times 10^8$ ^b	$3,7 \times 10^{-3}$

^{a.} $(2,48 \times 10^3) \times (1,84 \times 10^4)$

^{b.} $(6,71 \times 10^3) \times (1,54 \times 10^4)$

5. DISCUSSÃO

5.1 Construção e avaliação dos DNA competidores

Segundo Zentilin e Giacca (2007), o maior problema enfrentado no uso da metodologia de PCR competitiva é a construção dos DNA competidores. Segundos eles, as duas possibilidades mais facilmente alcançáveis para a construção destes DNA competidores seriam a construção de uma molécula com uma pequena inserção ou com uma pequena deleção, que compreendesse mais ou menos 10% do tamanho do DNA alvo. Neste estudo, optou-se pela escolha da última estratégia, mas com uma deleção de cerca de 50% do tamanho do DNA alvo. O *cpcBA* competidor construído compreendeu 363 pares de bases com 47% de deleção do DNA alvo. Por sua vez, o *mcyB* competidor compreende 233 pares de base e 59,12% de deleção do DNA alvo. A diferença de cerca de 50% de tamanho dos DNA competidores e alvo favoreceram a visualização no gel de agarose dos produtos amplificados de ambos.

O sucesso da tentativa de introduzir a seqüência complementar dos *primers reverse* de literatura adjacente às seqüências dos *primers reverse* desenhados neste estudo foi comprovada a partir do seqüenciamento dos DNA competidores. Para o *mcyB* competidor o sucesso foi pleno, uma vez que não há nenhuma base nitrogenada localizada erroneamente ou faltante. Já para o *cpcBA* competidor houve algumas ausências de bases. No entanto a presença de 75% do *primer cpcA-R* de literatura introduzido adjacente às seqüências do *primer reverse* desenhado neste estudo demonstra que também houve sucesso.

As quantificações de células da linhagem tóxica e não tóxica com *cpcBA* competidor revelou que para quantificar um mesmo número de células seria necessário 3,33 vezes mais *cpcBA* competidor na PCR competitiva da linhagem não tóxica do que na da tóxica. Tal resultado poderia ser explicado por diferentes hipóteses:

1) A eficiência do *cpcBA* competidor utilizado para quantificar células da linhagem não tóxica poderia ter sido superestimado. Contudo esta hipótese não se

sustenta pois o *cpcBA* utilizado para quantificar ambas linhagens foram aliquotadas do mesmo material original.

2) O *primer cpcBA* pode ter menor afinidade de anelamento com o DNA da linhagem tóxica do que da não tóxica. Esta hipótese é pouco provável pois a seqüência do gene *cpcBA* de ambas as linhagens possuem as seqüência complementares do *primer* (nº acesso no GenBank AF385380 – BCCUSP03 e Bittencour-Oliveira et al. (submetido) – BCCUSP18).

3) A eficiência da extração de DNA da linhagem tóxica pode ter sido menor do que a da linhagem não tóxica. Esta hipótese não poderia ser testada pois foi realizada uma única extração de DNA de ambas as linhagens.

Foi utilizado a metodologia de extração através do tampão CTAB, o que pode ter sido escolha menos apropriada. Yoshida et al. (2003) utilizou a metodologia de PCR competitiva para avaliar a eficiência de quatro metodologias de extração de DNA. A metodologia de CTAB estava entre as testadas, porém aquela em que se obteve maior rendimento e DNA mais puro foi utilizando sódio dodecil sulfato associado com xantogenato (XS-SDS) (YOSHIDA et al. 2003).

5.2 Quantificação de células a partir de PCR competitiva

A atividade de monitoramento de cianobactérias de reservatórios para abastecimento público tal como determina a Portaria MS 518/2004 (BRASIL 2004) poderia ser facilitada por metodologias mais rápidas e que contornem a dificuldade de visualização de células em indivíduos coloniais (BERNARD et al. 2004) o que ocorre comumente ocorre em contagens de fitoplâncton realizadas em câmaras de Sedwick-Rafter.

Em virtude da PCR convencional não ser essencialmente quantitativa e de a PCR em tempo real, apesar de quantitativa, ser onerosa e de manipulação complexa,

esperou-se com este estudo avançar no conhecimento sobre a detecção de cianobactérias utilizando a capacidade quantitativa da PCR competitiva.

Estudos envolvendo a quantificação de cianobactérias por PCR competitiva são escassos no mundo e inexistem no Brasil. Desta forma, este estudo é pioneiro no desenvolvimento e investigação desta metodologia para quantificação de células de amostras ambientais brasileiras.

Dentre os métodos baseados na PCR, a em tempo real e a competitiva são consideradas as mais sensíveis e exatas (ZENTILIN e GIACCA 2007).

Miura et al. (2008) observaram que a PCR em tempo real poderia ser usada como um ensaio de alta qualidade por descartar o uso de qualquer manuseio dos produtos amplificados pós-PCR. No entanto, a PCR em tempo real é altamente influenciada pela natureza estocástica e pela qualidade dos moldes nas primeiras fases de amplificação. Neste contexto a PCR competitiva é mais robusta do que a PCR em tempo real, apesar de sua aplicação em larga escala ser dificultada pela necessidade de preparo de competidores padronizados para cada gene quantificado (MIURA et al. 2008)

A razão da quantificação de células da amostra ambiental por PCR competitiva utilizando o gene *mcyB* e o número obtido pela contagem direta foi igual a 186. Já é conhecido, através de seqüenciamento, que *Microcystis* spp. tem apenas uma cópia do operon *mcy* (TANABE et al. 2004). Deste modo a metodologia utilizada no presente estudo superestimou o número de células tóxicas da amostra ambiental em duas ordens de magnitude.

Resultado semelhante encontrou Vaitomaa et al. (2003) utilizando PCR em tempo real para quantificar genótipos de *mcyE*. O número de cópias de *mcyE* de *Microcystis* e *Anabaena* existentes nos corpos d'água pesquisados foram de 2 a mais de 200 vezes maior do que o número de células detectado por microscopia óptica. Erros metodológicos na contagem de células por microscopia óptica seria uma possível

explicação segundo estes autores, ou ainda, haver mais de um gene por célula, o que acarretaria mais de uma cópia de *mcyE*.

Falhas metodológicas de contagem por microscopia óptica que ocasionem erros de quantificação por PCR em tempo real de uma a duas ordens de grandeza, tal como sugerido por Vaitomaa et al. (2003), são muito elevados e dificilmente ocorrem. Além disso, a sugestão de haver mais de uma cópia do gene *mcyE* por célula é questionável, pois o seqüenciamento de *Microcystis* spp. revelou possuir apenas uma cópia do operon *mcy* (TANABE, et al. 2004).

Yoshida et al (2005) quantificou o número de genótipos de *mcyA* em amostras ambientais de um corpo d'água japonês com floração de *Microcystis aeruginosa* utilizando a metodologia de PCR competitiva. Uma das três amostras investigadas revelaram ter razão de número de genótipos de *mcyA* por células de 2,37. Yoshida et al. (2005) levantaram a hipótese de que células não coloniais não foram contabilizadas na contagem direta, constituindo um erro metodológico na contagem.

Furukawa et al. (2006) e Ha et al. (2009) quantificaram os genes *mcyA* da linhagem *Microcystis aeruginosa* NIES102 utilizando a metodologia PCR em tempo real. Furukawa et al. (2006) encontraram erros de 2 a 64% entre contagem direta e PCR em tempo real de *mcyA* enquanto que Ha et al. (2009) demonstraram superestimação de *mcyA* nas células de *Microcystis* assumindo existir 14 cópias de *mcyA* por célula. Tais discrepâncias de resultados indicam que mesmo a PCR em tempo real tida como uma ferramenta de alta sensibilidade e acurácia, apresentou dificuldades para quantificar células tóxicas de *Microcystis* a partir de genes *mcy*.

Neste estudo, a razão entre quantificação de células por PCR competitiva utilizando *cpcBA* competidor e a contagem direta foi de 83. Portanto pode-se sugerir que o número de cópias do gene da ficocianina (*cpcBA*) na amostra de Duas Unas, PE, seja maior 83 vezes do que nas linhagens BCCUSP3 e 18. Contudo, tal suposição seria pouco provável visto que seqüenciamento de *Microcystis aeruginosa* revelou apenas uma cópia do gene da ficocianina (KANEKO et al. 2007). Com isso, os resultados aqui

encontrados não expressam o número de cópias do gene *cpcBA* existentes no genoma desta cianobactéria.

Resultados contrários aos descritos acima foram encontrados por Kurmayer e Kutzenberger (2003) e Schober et al. (2007) os quais encontraram relação precisa entre o número de células e o número de genes *cpcBA* e *mcyB* utilizando a técnica de PCR em tempo real. Kurmayer e Kutzenberger (2003) quantificaram células totais de *Microcystis* spp. coletadas em 17 meses consecutivos no Lago Wannsee. Os autores observaram que número de genes de *cpcBA* se equivalem ao número de células contadas em microscópio invertido. Schober et al. (2007) encontraram proporção constante de genes *mcyB* e *cpcBA* correspondente 1:1 em experimento inter-laboratorial em suas quantificações em amostra ambiental.

Quantificar células tóxicas, seja por PCR competitiva ou PCR em tempo real, incluem a possibilidade de erros intrínsecos afetarem os resultados (HA et al. 2009). Tais erros podem derivar de perda de DNA no processo de sua extração, amplificação ineficiente, aumento da quantidade de DNA nas células em certas fases do crescimento e até mesmo devido à liberação de DNA de células mortas (HA et al. 2009).

De fato, neste estudo uma possível explicação para a superestimação das células quantificadas seria a eficiência diferenciada de amplificação entre DNA alvo e DNA competidor. Sendo o competidor menor do que o alvo, sua amplificação poderia ser facilitada. Deste modo, a PCR competitiva não seria útil para quantificar células em termos absolutos e na exatidão requerida pela Portaria MS518/2004 (BRASIL, 2004). Por outro lado, poderia ser utilizada para estudos sazonais de locais específicos realizando quantificações relativas (proporcionais), já que apresentou alta reprodutibilidade, representados por valores de coeficiente de explicação da reta (R^2) altamente significativos.

6. CONCLUSÕES

- A utilização da PCR competitiva para atender a Portaria MS 518/2004 mostrou-se inadequada para quantificar células tóxicas e não tóxicas de *Microcystis*.
- A metodologia desenvolvida para construção dos DNA competidores foi adequada pois permitiu a co-amplificação do DNA alvo e competidor.

Diante disso rejeitou-se a hipótese apresentada de que a PCR competitiva poderia substituir a técnica da contagem direta de células para atender a Portaria MS 518/2004. Contudo, a metodologia apresentou reprodutibilidade em seus resultados e mostrou potencial de ser utilizada como uma alternativa menos onerosa do que a PCR em tempo real em pesquisas que necessitem de resultados quantitativos relativizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMENT, A.R.; CARMICHAEL, W.W. Evidence that microcystins is a thio-template product. **Journal of Phycology**, v. 32, n.4, p. 591-597, 1996.

ASAYAMA, M.; KABASAWA, M.; TAKAHASHI, I.; AIDA, T.; SHIRAI, M. Highly repetitive sequences and characteristics of genomic DNA in unicellular cyanobacterial strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 137, n. 2-3, p. 175-181, 1996.

BAKER, J.A.; NEILAN, B.A.; ENTSCHE, B.; McKAY, D.B. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 472-482, 2001.

BERNARD, C.; MONIS, P.; BAKER, P. Disaggregation of colonies of *Microcystis* (Cyanobacteria): efficiency of two techniques assessed using an image analysis system. **Journal of Applied Phycology**, v.16, n. 2, p. 117-125, 2004.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Development of *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (Cyanophyceae/Cyanobacteria) under cultivation and taxonomic implications. **Algological Studies**, v. 99, p. 29-37, 2000.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potencial microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, v. 2, n. 1, p. 51-60, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS n.º 518/2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 de março de 2004. Seção I, p. 266-270.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.I.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M.J.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v.26, n.11, p. 971-973, 1988.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v.270, n.1, p. 78-86; 1994.

CHORUS, I.; FALCONER, I.R.; SALAS, H.J.; BARTRAM, J. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews**, v.3, n.4, p. 323-347, 2000.

CHORUS, I. (ed). **Cyanotoxin occurrence in freshwaters—A summary of survey results from different countries. Cyanotoxins—Occurrence, causes, consequences**, Springer-Verlag., Berlin, p. 75-78, 2001.

DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. **Molecular Microbiology**, v. 26, n.4, p. 779-787, 1997.

FALCONER, I.R.; RUNNEGAR, M.T.C.; BUCKLEY, T.; HUYN, V. L.; BRADSHAW, P. Using activated carbon to remove toxicity from drinking-water containing cyanobacterial blooms. **Journal American Water Works Association**, n.81, v.2, p. 102-105, 1989.

FOULDS, I.V.; GRANACKI, A.; XIAO, C.; KRULL, U.J.; CASTLE, A.; HORGAN, P.A. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 50-nuclease PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, n.5, p.825-834, 2002.

FURUKAWA, K.; NODA, N.; TSUNEDA, S.; SAITO, T.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.102, n.2, p. 90-96, 2006.

GORHAM, P. R. Toxic waterblooms of blue-green algae. **Canadian Veterinary Journal**, v.1, n.6, p. 235-245, 1960.

GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J.R. **Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements**. London: Cambridge University Press, 1973. p. 289-311.

HA, J.H.; HIDAKA, T.; TSUNO, H. Quantification of toxic *Microcystis* and evaluation of its dominance ratio in blooms using Real-Time PCR. **Environmental Science & Technology**, v.4, n.3, p. 812-818, 2009.

HART, J.; FAWELL, J.K.; CROLL, B. The fate of both intra and extracellular toxins during drinking water treatment. **IWSA World Congress**, Blackwell Science, Oxford, v.18, n.18, p. 1-6, 1997

HIMBERG, K.; KEIJOLA, A. M.; HIISVIRTA, L.; PYYSALO, H.; SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. **Water Research**, v. 23, n. 8, p. 979-984, 1989.

HISBERGUES, M.; CHRISTIANSEN, G.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera. **Archives of Microbiology**, v.180, n.6, p.402-410, 2003.

HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; BASGALL, E.J.; CARMICHAEL, W.W.; HASCHEK W.M. Microcystin-LR-induced ultrastructural changes in rats. **Veterinary Pathology**, v.27, n.1, p. 9-15, 1990.

HOOSER, S. B.; BEASLEY, V. R.; WAITE, L. L.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; CARMICHAEL, W. W.; HASCHEK, W. M. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. **Veterinary Pathology**, v.28, n.4, p. 259-266, 1991.

HOTTO, A.M.; SATCHWELL, M.F.; BERRY, D.L.; GOBLER, C.J.; BOYER, G.L. Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. **Harmful Algae**, v.7, n.5, p.671–681, 2008.

HRUDEY, S.; BURCH, M.; DRIKAS, M.; GREGORY, R. Remedial Measures. In: Chorus, I; Bartram, J. (Eds). **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. E&F Spoon, London; p. 267-302, 1999.

HUGHES, E. O.; GORHAM, P. R.; ZEHNDER, A. Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.4, n.3, p. 225-236, 1958.

JOCHIMSEN, E.M.; CARMICHAEL, W.W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S.T.; HOLMES, C.E.M.; ANTUNES, M.B.C.; MELO-FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. **New England of Journal of Medicine**, v.338, v.13, p. 873-878, 1998.

JUNG, R.; SOONDRUM, K.; NEUMAIER, M. Quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 38, n. 9, p. 833-836, 2000.

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

KANEKO, T.; NAKAJIMA, N.; OKAMOTO, S.; SUZUKI, I.; TANABE, Y.; TAMAOKI, M.; NAKAMURA, Y.; KASAI, F.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; KISHIDA, Y.; ONO, A.; SHIMIZU, Y.; TAKAHASHI, C.; MINAMI, C.; FUJISHIRO, T.; KOHARA, M.; KATOH, M.; NAKAZAKI, N.; NAKAYAMA, S.; YAMADA, M.; TABATA, S.; WATANABE, M.M. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA Research**, v. 14, n. 6, p. 247-256, 2007.

KLEINKAUF, H., VON DÖHREN, H. A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 335-351, 1996.

KONST, H.; MCKERCHER, P.D.; GORHAM, P.R.; ROBERTSON, A.; HOWEL, J. Symptoms and Pathology Produced By Toxic *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in Laboratory and Domestic Animals. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 29, n. 9, p. 221-228, 1965.

KOSKENNIEMI, K.; LYRA, C.; RAJANIEMI-WACKLIN, P.; JOKELA, J.; SIVONEN, K. Quantitative real-time PCR detection of toxic *Nodularia* cyanobacteria in the Baltic Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p.2173-2179, 2007.

KURMAYER, R.; DITTMANN, E.; FASTNER, J.; CHORUS, I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). **Microbial Ecology**, v. 4, n. 3, p. 107-118, 2002.

KURMAYER R, KUTZENBERGER T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6723-6730, 2003.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; BORNER, T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. **Environmental Microbiology**, v.8, n. 6, p. 831-841, 2004.

LAHTI, K.; KILPONEN, J.; KIVIMÄKI, A.L.; ERKOMAA, K.; SIVONEN, K. Removal of cyanobacteria and their hepatotoxins from raw water in soil and sediment columns. In **Artificial Recharge of Groundwater**. Kivimäki, AL e Suokko, T [Eds] NHP/Report n°. 38, Helsinki, 187-195, 1996.

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

MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; IZYDORCZYK, K.; ROMANOWSKA-DUDA, Z.; JURCZAK, T.; STEFANIAK, K.; KOKOCINSKI, M. Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 380-387, 2006.

MARAHIEL, M.A.; NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. **Molecular Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 631-636, 1993.

MEIBNER, K.; DITTMANN, E.; BÖRNER, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2-3, p. 295-303, 1996.

MIURA G. A.; ROBINSON N. A.; GLISBERT T. W.; BOSTIAN K. A.; WHITEJ. D.; PACE J. G. Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR in fasted rats. **Toxicol**, v. 27, n. 11, p. 1229-1240, 1989.

MIURA, F.; KAWAGUCHI, N.; YOSHIDA, M.; UEMATSU, C.; KITO, K.; SAKAKI, Y.; ITO, T. Absolute quantification of the budding yeast transcriptome by means of competitive PCR between genomic and complementary DNAs. **BMC Genomics**, v. 574, n. 9, p. 1-14, 2008.

MÖLLER, A.; JANSSON, J.K. Quantification of genetically tagged cyanobacteria in Baltic Sea sediment by competitive PCR. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 512-518, 1997.

MSAGATI, T.A.M.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 4, p. 382-39, 2006.

MUMY, K. L.; FINDLAY, R. H. Convenient determination of DNA extraction efficiency using an external DNA recovery standard and quantitative-competitive PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 2, p. 259– 268, 2004.

NEILAN, B.A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2286-2291, 1995.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3875-3883, 1995.

NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T; GOODMAN, A.E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and

nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 693-697, 1997.

NICHOLSON, B.C.; ROSITANO, J.; BURCH, M.D. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Research**, v. 28, n. 6, p. 1297-1303, 1994.

NISHIHARA, H.; MIWA, H.; WATANABE, M.; NAGASHIMA, M.; YAGI, O.; TAKAMURA, Y.. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 61, n.7, p. 1067-1072, 1997.

NISHIZAWA, T.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; SHIRAI, M. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. **Journal of Biochemistry**, v.126, n. 3, p. 520–529, 1999.

NISHIZAWA, T.; UEDA, A.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; OCHI, K.; SHIRAI, M. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 5, p. 779–789, 2000.

OSTEMAIER, V.; KURMAYER, R. Distribution and abundance of non-toxic mutants of cyanobacteria in Lakes of the Alps. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 2, 323-333, 2009.

OTSUKA, S.; SUDA, S.; LI, R.; WATANABE, M., OYAIZU, H.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M.M. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, n. 1, p. 119-124, 1998.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R.L.; BARRETO, V.T.S.; WARD, C.J.; PREISER, W.; POON, G.K.; NEILD, G.H.; CODD, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **Lancet**, v. 352, n. 9121, p. 21-26, 1998.

RINTA-KANTO, J.M.; OUELLETTE, A.J.; BOYER, G.L.; TWISS, M.R.; BRIDGEMAN, T.B.; WILHELM, S.W. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 11, p. 4198-4205, 2005.

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

ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extration of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1985.

ROUHIAINEN, L., SIVONEN, K.; BUIKEMA, W.J.; HASELKORN, R. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 20, p. 6021-6026, 1995.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**, Krawetz, S.; Misener, S. (ed), Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; JAKOBSEN, K. S. Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 13, p. 3453-3461, 1998.

RUDI, K.; SKULBERG, O.M.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K.S. Quantification of Toxic Cyanobacteria in Water by Use of Competitive PCR Followed by Sequence-Specific Labeling of Oligonucleotide Probes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2639–2643, 1998.

SAKER, M.L.; VALE, M.; KRAMER, D. Molecular techniques for the early warning of toxic cyanobacteria blooms in the freshwater lakes and rivers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 441-449, 2007.

SCHOBER, E.; WERNDL, M.; LAAKSO, K.; KORSCHINECK, I. Interlaboratorial comparison of Taq Nuclease Assays for the quantification of the toxic cyanobacteria *Microcystis* sp. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 1, p. 122–128, 2007.

SIEBERT, P.D.; LARRIK, J.M. Competitive PCR. **Nature**, v. 359, n. 6395, p. 557-558, 1992.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**, Chorus, I.; Bartram, J. (Ed). E&F Spoon, London, p. 55-124, 1999.

SMITH, V.H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. **Environmental Science Pollution Research**, v. 10, n. 2, p. 126-139, 2003.

SOARES, R.M.; YUAN, M.; SERVAITES, J.C.; DELGADO, A.; MAGALHÃES, V.F.; HILBORN, E.D.; CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 95-103, 2006.

TANABE, Y.; KAYA, K.; WATANABE, M.M. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, n. 6, p. 633-641, 2004.

TEIXEIRA, M.G.L.C.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 27, n. 3, p. 244-253, 1993.

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

TILLET, D.; PARKER, D. L.; NEILAN, B. A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*:

comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2810-2818, 2001.

UENO, Y.; NAGATA, S.; TSUTSUMI, T.; HASEGAWA, A.; WATANABE, M. F.; PARK, H. D.; CHEN, G. C.; CHEN, G.; YU, S.Z. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1317–1321, 1996.

VAITOMAA, J., RANTALA, A., HALINEN, K., ROUHIAINEN, L., TALLBERG, P., MOKELKE, L., SIVONEN, K. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase e copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7289-7297, 2003.

VALÉRIO, E.; CHAMBEL, L.; PAULINO, S.; FARIA, N.; PEREIRA, P.; TENREIRO, R. Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. **Environmental Toxicology**, DOI 10.1002/tox.20502, 2009.

[WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR. Guideline for Drinking Water Quality**. Addendum to Volume 2, Geneva, p. 95-110, 1998.

WICKSTROM, M.L.; KHAN, S.A.; HASCHEK, W.M.; WYMAN, J.F.; ERIKSSON, J.E.; SCHAEFFER, D.J.; BEASLEY, V.R. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. **Toxicologic Pathology** v. 23, n. 3, p. 326-337, 1995.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

YOSHIDA, T.; YUKI, Y.; LEI, S.; CHINEN, H.; YOSHIDA, M.; KONDO, R.; HIROISHI, S. Quantitative detection of toxic strains of the cyanobacteria genus *Microcystis* by competitive PCR. **Microbes and Environments**, v. 18, n. 1, p. 16-23, 2003.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; KONDO, R.; HIROISHI, S. Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata. **Environmental Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 229-234, 2005.

ZENTILIN, L.; GIACCA, M. Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2092-2104, 2007.

ZHOU, L.; YU, H.; CHEN, K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. **Biomedical Environmental Sciences**, v. 15, n. 2, p. 166–171, 2002.

ZURAWELL, R.W.; CHEN, H.R.; BURKE, J.M.; PREPAS, E. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1-37, 2005.