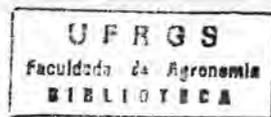


Sys 391082



S89.9
C932.i

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E
DO AMBIENTE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS EM BIOFILMES DE SUPERFÍCIES
EXTERNAS DE PRÉDIOS HISTÓRICOS: ANÁLISE MORFOLÓGICA E
MOLECULAR**

CÉZAR AUGUSTO CRISPIM
Farmacêutico

Dissertação apresentada como requisito a obtenção do grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Biodegradação,
Biocorrosão e Biodeterioração

Porto Alegre, RS, Brasil
Fevereiro de 2003.

CÉZAR AUGUSTO CRISPIM
Farmacêutico - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Faculdade de Agronomia

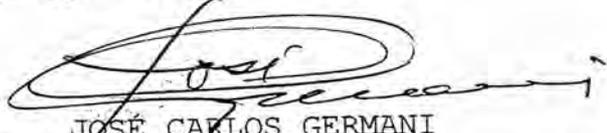
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

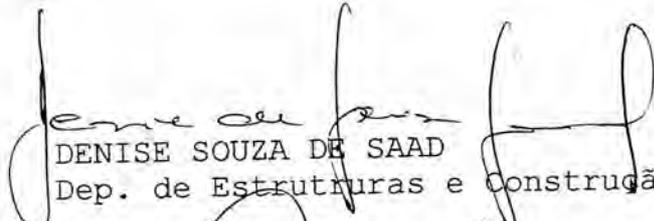
Porto Alegre (RS), Brasil.

Aprovada em: 20.02.2003
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 29/04/2003
Por

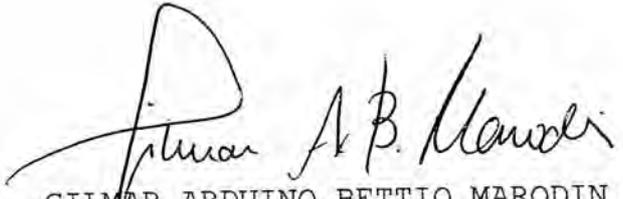

JOÃO RUY JARDIM FREIRE
Orientador-PPG-Microbiologia
Agrícola e do Ambiente


JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Microbio-
logia Agrícola e do Ambiente


DENISE SOUZA DE SAAD
Dep. de Estruturas e Construção Civil - UFSM


CARLOS HENRIQUE LEMOS SOARES
DEP. DE BIOQUÍMICA - UFSC


PEDRO ALBERTO SELBACH
DEP. SOLOS - UFRGS


GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos colegas Anelise, Margaroni, Patrícia Bender, Roberta, Patrícia Cataluña, Adriana, Neida, Marcos e Luis Gustavo, pelos bons momentos durante os intervalos das aulas.

Ao professor João J. R. Freire pela orientação e oportunidade de desenvolver meu trabalho no laboratório de Microbiologia dos Solos.

Ao professor Enilson L. S. de Sá pelas sugestões e críticas sempre construtivas.

Ao professor João Antônio Pegas Henriques pela oportunidade de utilizar seus laboratórios para algumas análises e ao Diego e Heike pelo auxílio técnico.

À professora Marisa Cardoso pela oportunidade de utilizar seu laboratório para realizar as reações em cadeia da polimerase.

Ao professor Germani por ter me apresentado à professora Christine Gaylarde.

Ao professor Peter M. Gaylarde por sua inestimável ajuda no isolamento e identificação das cianobactérias contidas neste estudo.

Ao professor Brett A. Neilan pela oportunidade dada a professora Christine Gaylarde para realizar parte das análises em seu laboratório na Universidade de New South Wales, Austrália.

À professora Christine Claire Gaylarde, pela diferença que ela fez neste processo. Algumas pessoas realmente fazem a diferença em nossas vidas. Você é uma delas. Você me apresentou um outro mundo e uma nova forma de ver as coisas. Muito obrigado pela orientação, pelo otimismo, pelo encorajamento, pelas oportunidades (Ouro Preto foi maravilhoso), pela amizade, pela tranqüilidade no trato das coisas e pela paciência. Espero ter correspondido às suas expectativas. Muito obrigado por tudo.

A Capes e ao CNPq pelo financiamento.

Aos meus pais pelo apoio durante estes três últimos anos.

À minha amada esposa Elisa, companheira de todas as horas. Obrigado pela paciência, compreensão, dedicação e cumplicidade.

Ao Criador, pelo dom da vida.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS EM BIOFILMES DE SUPERFÍCIES EXTERNAS DE PRÉDIOS HISTÓRICOS: ANÁLISE MORFOLÓGICA E MOLECULAR¹

Autor: Cézar Augusto Crispim
Orientador: João R. J. Freire

Atualmente existe uma crescente preocupação com a preservação de monumentos que fazem parte do patrimônio histórico e cultural de povos e nações, e tem-se observado que dentre os vários fatores que contribuem para a degradação destes monumentos, há a ação de uma microbiota fototrófica ativa e diversa, formada principalmente por cianobactérias e algas. Foram estudadas em Porto Alegre seis igrejas com importância histórica, utilizando-se técnicas de microbiologia tradicionais e de biologia molecular. Um método rápido e simples para a amplificação por PCR foi desenvolvido, não sendo necessário o cultivo das células. Foram encontrados oito gêneros de cianobactérias filamentosas e quatro gêneros de cianobactérias cocóides. Vários dos grupos identificados são reconhecidos como degradadores de pedras (o grupo *Pleurocapsa*, *Synechocystis*, *Gloeocapsa*, *Microcoleus*, *Scytonema* e *Mastigocladus*). Alguns produtos de PCR foram seqüenciados e submetidos ao algoritmo BLAST, com o intuito de verificar o nível de similaridade com as seqüências depositadas de outras cianobactérias. Foi observado que o nível de similaridade da maioria das amostras foi baixo, provavelmente em função do fato de que a maioria das seqüências depositadas nos bancos de dados é proveniente de espécies aquáticas, as quais são consideravelmente diferentes das cianobactérias presentes em biofilmes em construções. Os dendrogramas construídos utilizando-se o "bootstrapping" mostraram que as amostras filamentosas nos biofilmes estudados geralmente agruparam-se com espécies semelhantes presentes nos bancos de dados. Contudo, de acordo com os resultados deste estudo e da literatura corrente, ainda há muitos problemas em relação à taxonomia de cianobactérias, o que indica a necessidade de mais estudos nesta área.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF CYANOBACTERIA IN BIOFILMS ON EXTERNAL SURFACES OF HISTORIC BUILDINGS: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR ANALYSIS¹

Author: César Augusto Crispim

Adviser: João R. J. Freire

There is today an increasing concern about the preservation of monuments, which are part of the historic and cultural heritage of peoples and nations. Among several factors contributing to the degradation of these monuments, the action of an active and diverse microflora, formed principally by cyanobacteria and algae, has been emphasized. Six churches of historic importance were studied in Porto Alegre, using traditional microbiological and molecular methods. A simple and fast PCR amplification methodology was developed, which did not require the culturing of samples. Eight genera of filamentous and four genera of coccoid cyanobacteria were identified in the biofilms. Several of the groups detected are known to degrade stone (the *Pleurocapsa* group, *Synechocystis*, *Gloeocapsa*, *Microcoleus*, *Scytonema* and *Mastigocladus*). Some PCR products were sequenced and submitted to the BLAST algorithm, in order to verify the level of similarity with sequences deposited for other cyanobacteria. The level of homology of most samples was low, probably because most of the deposited sequences are from aquatic cyanobacteria species, which are considerably different from those present in biofilms on buildings. The dendrograms, constructed by bootstrapping, showed that the filamentous samples in the biofilms generally grouped with similar species in data banks. However, according to the results of this study and the current literature, there are many problems with the present taxonomy of cyanobacteria, which indicates the need for further studies in this area.

SUMÁRIO

Resumo	iii
Abstract	iv
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	x
GLOSSÁRIO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A micro-ecologia em construções de pedra	4
2.2 Sucessão biológica em superfícies externas de monumentos históricos ...	6
2.3 Biofilmes, biodegradação e biodeterioração	7
2.4 Comunidades aderidas e agregadas complexas	9
2.5 Biofilmes e biodeterioração em prédios e construções	12
2.6 O Papel das cianobactérias na degradação de prédios	14
2.7 As cianobactérias	18
2.7.1 Estrutura celular e fisiologia.....	19
2.7.1.1 <i>Envelope celular</i>	19
2.7.1.2 <i>Divisão celular</i>	21
2.7.1.3 <i>Interior celular</i>	21

2.7.1.4 <i>Heterocistos e fixação de Nitrogênio</i>	23
2.7.1.5 <i>Acinetos</i>	23
2.7.1.6 <i>Hormogônia</i>	24
2.7.1.7 <i>Motilidade</i>	24
2.7.1.8 <i>Fisiologia e bioquímica</i>	24
2.7.1.9 <i>Ecologia</i>	25
2.8 Técnicas moleculares para o estudo de microrganismos	27
2.9 Técnicas de detecção de cianobactérias	29
2.10 Análise molecular da comunidade microbiana	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Obtenção das amostras de cianobactérias	34
3.2 Isolamento e manutenção das culturas	37
3.3 Isolamento e crescimento em meio sólido e líquido	37
3.4 Extração de DNA	38
3.4.1 Extração com fenol/clorofórmio	38
3.4.2 Extração do DNA com sílica	39
3.4.3 PCR direto	41
3.5 Quantificação do DNA	42
3.6 Amplificação por PCR	42
3.6.1 Amplificação por PCR de DNA extraído	43
3.7 Eletroforese de gel de agarose	43
3.8 Sequenciamento dos produtos de PCR	44
3.9 Análise das seqüências e preparação do dendrograma	44
3.9.1 "Bootstrapping"	45

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Isolamento das cianobactérias	46
4.2 Extração de DNA	58
4.3 PCR	60
4.3.1 PCR de DNA genômico extraído com fenol/clorofórmio	60
4.3.1.2 PCR da extração com sílica	63
4.3.2 PCR direto	63
4.4 Sequenciamento dos produtos de PCR e análise das seqüências	65
4.5 Árvores baseadas nas seqüências de rRNA 16S cianobacteriano	72
4.5.1 Análise do dendrograma com região hipervariável	72
4.5.2 Análise do dendrograma sem região hipervariável	75
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
7 APÊNDICES	97

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Gêneros /ordens de cianobactérias encontradas nas paredes de seis igrejas amostradas e a população qualitativa de algas 48
- TABELA 2 - Número de cianobactérias cocóides e filamentosas presentes em cada igreja 53
- TABELA 3 - Similaridade mais próxima com seqüências depositadas e % de homologia do DNA extraído de amostras de cianobactérias de biofilmes em igrejas de Porto Alegre, dada pelo programa BLAST ... 69

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS 1-6 - As igrejas de Porto Alegre estudadas neste trabalho	36
FIGURAS 7-18 - Morfologia dos gêneros identificados nos biofilms	56
FIGURA 19 - Gel de agarose mostrando DNA genômico extraído com fenol/clorofórmio e sílica	61
FIGURA 20 - Gel de agarose mostrando produtos de PCR de DNA genômico extraído com fenol/clorofórmio com e sem DMSO	61
FIGURA 21 - Gel de agarose mostrando produtos de PCR de DNA genômico extraído com sílica pelo método de Sá (2001)	63
FIGURA 22 - Gel de agarose de amostras submetidas à uma reação de PCR feito diretamente sobre as colônias	63
FIGURA 23 - Escaneamento do gel do sequenciamento de uma amostra com pouco DNA	67
FIGURA 24 - Escaneamento do gel do sequenciamento de uma amostra com DNA misturado	67
FIGURA 25 - Escaneamento do gel do seqüenciamento de uma amostra apropriada	67
FIGURAS 26-32 - Morfologia dos isolados seqüenciados	71
FIGURA 33 - Dendrograma construído utilizando-se as seqüências Inteiras dos produtos do PCR	74
FIGURA 34 - Dendrograma construído utilizando-se as seqüências dos produtos do PCR sem a região hipervariável	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ARDRA - Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado

BLAST - Basic Alignment Search Tool – Ferramenta de Procura de Alinhamento Básico

DAF – DNA amplification fingerprinting - genotipificação da amplificação do DNA

dNTP – desoxiribonucleosídeo trifosfato

DGGE – denaturing gradient gel electrophoresis – gel de eletroforese de gradiente desnaturante

ERIC - enterobacterial repetitive intergenic consensus – consenso intergênico enterobacteriano repetitivo

HIP1 - highly iterated palindromic sequences - seqüências palindrômicas altamente iteradas

ITS – internal transcribed spacer – espaçador transcrito interno

LPS - lipopolisacarídeo

NAG – N-acetilglicosamina

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase

RAPD — random amplified polymorphic DNA – DNA polimórfico amplificado aleatoriamente

PCC – Pasteur Culture Collection – Coleção de Culturas do Instituto Pasteur

RDP – Ribosomal Database Project – Projeto de Banco de Dados Ribossomal

REP - repetitive extragenic palindromic sequences – seqüências extragênicas palindrômicas repetitivas

RFLP - restriction fragment length polymorphism - polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

SDS – duodecil sulfato de sódio

STRR - short tandemly repeated repetitive sequences – seqüências curtas repetitivas em pares

Tris – Tris(hidroximetil) aminometano

TGGE – temperature gradient gel electrophoresis – gel de eletroforese de gradiente de temperatura

GLOSSÁRIO

Alguns termos específicos de cianobacteriologia estão aqui definidos.

Acineto – célula em estado de dormência ou esporo que diferencia-se de uma célula vegetativa.

Baeócito – célula pequena formada internamente por fissões múltiplas em células parentais do subgrupo II.

Fissão binária – divisão de uma célula em duas, seguida do aumento de pelo menos uma, e usualmente ambas células filhas.

Brotamento – fissão binária assimétrica de uma célula parental, na qual uma célula filha é menor que a outra.

Filamento – cadeia de células na qual a separação das células não inclui uma bainha intercalante, apesar de uma bainha linear poder estar presente.

Heterocisto – célula especializada que funciona na fixação de N_2 ; diferencia-se da célula vegetativa.

Hormocisto – cadeia de células envelopadas ou encapsuladas por uma espessa bainha externa.

Hormogônio – um segmento curto de tricoma que é móvel e aparentemente tem papel de disseminação.

Tricoma – uma cadeia de células sem a presença de uma bainha.

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a preservação de monumentos que fazem parte do patrimônio histórico e cultural tem levado a um maior interesse na biodeterioração nessas construções. A colonização da superfície de prédios por bactérias, algas, fungos e outros microrganismos, causa danos físicos e estéticos à estrutura e pode ocasionar problemas de saúde para os seres humanos através da liberação de esporos alergênicos. Dentre as principais atividades microbianas que são importantes na deterioração de superfícies, podemos citar o crescimento de colônias de microrganismos, a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos, a ação de enzimas hidrolíticas e o crescimento de filamentos microbianos, principalmente hifas de fungos, algas e cianobactérias sobre e dentro do material.

Os microrganismos mais comuns encontrados nas superfícies externas dos edifícios são as algas verdes, fungos e bactérias azul-verdes que podem resistir a repetidos ciclos de secagem e reidratação. Por este motivo, bem como a sua capacidade de sobreviver a altos níveis de luz UV, as cianobactérias são particularmente importantes em superfícies expostas e têm provavelmente a maior importância ecológica como organismos pioneiros do que qualquer outra classe.

O crescimento de algas e cianobactérias em superfícies de construções leva diretamente à deterioração estética da superfície. Os biofilmes fotossintéticos podem ser cinzas, pretos, marrons, vermelhos ou verdes, dependendo das linhagens predominantes de organismos e de condições

ambientais. A umidade, a temperatura e o grau de exposição à luz podem afetar o crescimento e a produção de pigmentos em células de algas e de cianobactérias.

Os métodos utilizados atualmente para detecção de cianobactérias são baseados no cultivo desses microrganismos em meios de crescimento específicos. Contudo, tais métodos podem resultar na detecção de números artificialmente baixos por causa da presença de células inibitórias e predatórias tais como fungos, eubactérias e protozoários, bem como da presença de espécies não-cultiváveis. Essa baixa biodiversidade fototrófica após o uso destas técnicas de cultura e enriquecimento tradicionais sugere que o uso de métodos moleculares é a melhor alternativa para a identificação e caracterização de microrganismos em paredes de construções.

Este trabalho teve como objetivo geral, contribuir para a preservação do Patrimônio Histórico e Cultural. Os objetivos específicos desse trabalho foram detectar, isolar e identificar os diferentes tipos de cianobactérias presentes em paredes externas de igrejas na cidade de Porto Alegre através dos métodos tradicionais e desenvolver uma técnica de biologia molecular para identificá-las sem cultivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A humanidade, como parte do ambiente natural, contribui para a degradação de materiais de pedras expostos. A poluição do ar resultante de fontes antropogênicas tais como os meios de transporte aéreos e terrestres, tem aumentado a concentração atmosférica de compostos orgânicos e inorgânicos na forma de gases, aerossóis e matéria particulada e sua deposição sobre superfícies de pedras. As complexas interações físicas e químicas desses agentes com o material mineral têm acelerado a degradação de pedras drasticamente (Arnold, 1993). Além disso, o descaso com sítios históricos e sua conseqüente deterioração, e/ou tratamentos de restauração e conservação inapropriados, têm agravado a preservação de propriedades culturais e históricas em todo o mundo (Charola, 1993).

Um número considerável de investigações tem começado a elucidar o papel essencial que os agentes biológicos desempenham na deterioração de pedras (Warscheid & Braams, 2000) e o que está se tornando claro é que agentes físicos, químicos e biológicos agem em associação para a sua deterioração (Valentin, 1993).

A biodeterioração tem geralmente sido considerada como um processo de degradação que segue os efeitos deteriorantes iniciais de agentes inorgânicos. Pensava-se que esses agentes condicionavam as superfícies de pedras para a contaminação microbiana devido à mudanças estruturais e o enriquecimento de substratos nutrientes orgânicos e inorgânicos. Contudo, investigações recentes sobre a biodeterioração de pedras, especialmente em

relação aos biofilmes que cobrem as superfícies, formados por microrganismos para se proteger contra fatores ambientais prejudiciais, têm descoberto que os efeitos biodeteriorantes podem ser claramente detectados nos estágios iniciais da exposição da pedra (Gaylarde & Morton, 1999).

Estes efeitos incluem a aparência estética inaceitável das manchas na superfície das pedras causadas por pigmentos biogênicos e mais importante ainda, a presença de substâncias poliméricas extracelulares que resultam em estresse mecânico à estrutura mineral (Warscheid & Braams, 2000). Além disso, a presença precoce de biofilmes em superfícies de pedras expostas, acelera o acúmulo de poluentes atmosféricos (Wittenburg, 1994). Assim, a contaminação microbiana age como um precursor preliminar para a formação de crostas em superfícies de rochas, produzidas pela corrosão acidolítica e oxidoreductora nas estruturas dos minerais (Warscheid & Braams, 2000).

2.1A microecologia em construções de pedra

A microflora nas pedras em construções representa um ecossistema complexo que se desenvolve de várias formas dependendo das condições ambientais e das propriedades físico-químicas dos materiais em questão. Os microrganismos presentes podem ser divididos nos seguintes grupos (Brock *et al.*, 1994):

1 – Organismos fotolitoautotróficos tais como algas, cianobactérias, musgos e plantas superiores, os quais usam a luz do sol como fonte de energia e liberam oxigênio durante a fotossíntese. Suas necessidades de carbono são satisfeitas pela fixação de CO₂ da atmosfera. A atividade dos primeiros colonizadores pré-

condiciona a construção para os quimiolitoautotróficos e inicia a sucessão biológica (Warschheid *et al.*, 1993). As cianobactérias têm a maior influência no intemperismo de pedras e rochas naturais expostas, penetrando a rocha em ambientes secos à uma taxa de 5µm/ano (Gaylarde & Morton, 1999).

2 – Bactérias quimiolitoautotróficas usam compostos inorgânicos (amônia, nitritos, hidrogênio, sulfeto, tiosulfetos ou enxofre elementar) para obter energia de sua oxidação e fixar o CO₂ da atmosfera. Isso resulta na liberação de ácidos nitrosos (*Nitrosomonas* spp.), ácido nítrico (*Nitrobacter* spp.), ou ácido sulfúrico (*Thiobacillus* spp.). Algumas bactérias desse grupo também são capazes de crescer mixotroficamente, usando nutrientes orgânicos para a síntese de componentes celulares (quimiolitomixotrofia).

3 – Bactérias e fungos quimiorganotróficos usam substratos orgânicos como fontes de carbono e energia. Eles freqüentemente liberam ácidos orgânicos complexadores biocorrosivos ou enfraquecem a estrutura mineral pela oxidação de cátions como Fe²⁺ ou Mn²⁺.

4– Os líquens são uma associação simbiótica entre um fungo (chamado de micobionte) e uma alga ou cianobactéria (ambas chamadas de ficobiontes). Os fungos utilizam os nutrientes orgânicos produzidos pelas algas e cianobactérias pela fotossíntese; as algas por sua vez, utilizam os minerais lixiviados da pedra pelos ácidos secretados pelas hifas do líquen. Os fungos também podem proteger as algas e cianobactérias das condições ambientais adversas, tais como dessecação e substâncias tóxicas (Gaylarde & Morton, 1999).

Enquanto os microrganismos quimiolitotróficos têm sido freqüentemente descritos em associação com materiais inorgânicos danificados, estudos mais

recentes têm enfatizado o significado de bactérias e fungos quimiorganotróficos, juntamente com os fotoautotróficos, como os primeiros colonizadores microbianos em pedras de monumentos e construções (Warscheid & Braams, 2000).

2.2 Sucessão biológica em superfícies externas de monumentos históricos

A colonização microbiana de pedras e concretos comumente inicia com os organismos fototróficos, que constroem um biofilme visível, enriquecido com biomassa orgânica e inorgânica sobre a superfície da pedra depletada de nutrientes (Darlington, 1981). O crescimento e a atividade metabólica de algas, cianobactérias e líquens, bem como musgos e plantas superiores, é regulado por parâmetros naturais tais como a luz e umidade (Monte, 1993; Ortega-Calvo *et al.*, 1995).

Os microrganismos fototróficos podem crescer sobre a superfície da pedra (chamados de fotótrofos epilíticos) ou podem penetrar alguns milímetros no sistema de poros da rocha (chamados de fotótrofos endolíticos) (Golubic *et al.*, 1981). Acreditava-se que eles não tinham efeito direto sobre a deterioração de pedras, a não ser pelo efeito estético devido aos seus pigmentos (Pietrini *et al.*, 1985; Urzi *et al.*, 1992) e que sob certas condições climáticas, eles formavam um filme protetor sobre a superfície da pedra, regulando a umidade e a temperatura (Warschied, 2000). Contudo, outras investigações têm mostrado a importância dos fotótrofos na deterioração física e química de pedras, especialmente quando vários elementos são disponibilizados pela

poluição antropogênica sob climas moderados. Esses processos de biodeterioração são caracterizados pela excreção de ácidos orgânicos corrosivos especialmente sobre calcário e mármore (Caneva *et al.*, 1992), a absorção e o acúmulo de enxofre e cálcio dentro de suas células (Caneva & Salvadori, 1989; Ortega-Calvo *et al.*, 1994), a alteração de minerais formadores de pedras (Jones *et al.*, 1988) e o aumento dos poros devido à penetração de filamentos (Jaton *et al.*, 1985).

O acúmulo de uma biomassa fototrófica fornece uma excelente base de nutrientes orgânicos para a subsequente microflora heterotrófica e suas atividades biodegradadoras. Os fotótrofos podem excretar carboidratos, fatores de crescimento e antibióticos, facilitando assim o estabelecimento de uma comunidade microbiana complexa sobre a rocha e a associação de organismos fototróficos formada pode ser usada como indicador dos parâmetros físico-químicos do ambiente em que vivem (Warscheid & Braams, 2000).

2.3 Biofilmes, biodegradação e biodeterioração

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos ligados às superfícies ou associados com interfaces. Hoje, é amplamente reconhecido que a maioria das bactérias encontradas em ambientes naturais, hospitais, clínicas e indústrias persistem associados às superfícies (Davey & O'Toole, 2000). Além disso, estas comunidades microbianas são freqüentemente compostas de múltiplas espécies que interagem umas com as outras e com o ambiente. A arquitetura do biofilme tem profundas implicações na função dessas complexas comunidades. Até recentemente, a falta de métodos para

explorar essas comunidades *in situ* tem dificultado análises detalhadas. A observação direta de uma ampla variedade de habitats naturais tem estabelecido que a maioria dos microrganismos persiste aderida à superfície dentro de um ecossistema estruturado de biofilme e não como organismos de vida livre. Além disso, está se tornando claro que essas montagens naturais de bactérias dentro da matriz do biofilme funcionam como um consórcio cooperativo e de uma forma relativamente complexa e coordenada (Costerton *et al.*, 1995). Por isso, apesar dos microrganismos poder ter uma existência planctônica independente, também é possível e de fato mais típico, ter um estilo de vida interdependente no qual eles funcionam como parte integrante de uma população ou comunidade.

Novas e numerosas abordagens e metodologias experimentais têm sido desenvolvidas a fim de explorar interações metabólicas, agrupamentos filogenéticos e a competição entre os membros do biofilme. Para complementar esta ampla visão da ecologia dos biofilmes, os organismos individuais têm sido estudados com o uso de genética molecular a fim de identificar genes necessários para o desenvolvimento do biofilme e para dissecar as rotas regulatórias que controlam a transição do plâncton para o biofilme. Estes estudos têm favorecido a emergência do conceito da formação do biofilme como um novo sistema para o estudo do desenvolvimento bacteriano (Davey & O'Toole, 2000).

2.4 Comunidades aderidas e agregadas complexas

Grupos de microrganismos que conduzem processos fisiológicos interdependentes formam as comunidades microbianas (e.g., bactérias fermentativas, redutoras de sulfeto e enxofre e metanogênicas). Em essência, os biofilmes podem ser compostos de uma população que se desenvolveu a partir de uma única espécie ou uma comunidade derivada de espécies microbianas múltiplas, que podem se formar sobre uma vasta variedade de superfícies bióticas e abióticas. Os microrganismos também formam painéis naturais em interfaces ar-água e em suspensões, tais como digestores anaeróbicos, nos quais eles agregam-se preferencialmente para formar flocos ou grânulos (Wu *et al.*, 1996). Apesar do substrato para ligação ser difícil de discernir nesses grânulos, essas formações são chamadas de biofilmes. Para o propósito dessa dissertação, os biofilmes são amplamente definidos como reuniões de microrganismos e seus produtos extracelulares associados sobre uma interface e tipicamente ligados à uma superfície abiótica.

Shapiro (1988) propôs a visão de bactérias como organismos interativos capazes de uma significativa atividade coletiva como uma característica bacteriana geral mais de uma década atrás. Uma diferenciação complexa e um comportamento coletivo têm sido observados em um número de organismos diferentes sob uma variedade de situações diferentes. Mais notáveis são exemplos de *Myxococcus* que se diferenciam quando da falta de nutrientes para formar corpos de frutificação, *Anabaena* durante o desenvolvimento dos heterocistos, *Bacillus subtilis* durante sua metamorfose em esporo, *Streptomyces coelicolor* durante sua diferenciação morfológica em resposta às

condições nutricionais, e *Serratia liquefaciens* durante a migração de populações (Davey & O'Toole, 2000). Esses exemplos certamente testemunham a habilidade que os microrganismos apresentam de explorar interações e comunicações intercelulares para facilitar sua adaptação a parâmetros ambientais em mudança (Kaiser, *et al.*, 1993). À primeira vista, contudo, não é óbvio que a maioria dos procariotos são capazes de tal comportamento coletivo coordenado, a não ser que os consideremos no contexto dos biofilmes. O desenvolvimento dos biofilmes requer um comportamento multicelular, sejam eles formados por uma única espécie ou por espécies múltiplas. A formação de biofilmes pode requerer ainda a coordenação, interações e a comunicação entre espécies bacterianas múltiplas.

Descobertas notáveis têm ocorrido na pesquisa dos biofilmes durante a última década. A aplicação de novas técnicas de microscopia e biologia molecular na investigação dos biofilmes tem mostrado que esses não são simplesmente camadas de sujeira contendo organismos sobre uma superfície; em vez disso, os biofilmes representam sistemas biológicos com um alto nível de organização onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (O'Toole *et al.*, 2000).

Os habitats naturais dos procariotos são notavelmente diversos (Pace, 1997). Os procariotos podem habitar qualquer ambiente que seja apropriado para formas de vida superiores, bem como uma variedade de locais inabitáveis que a maioria das formas de vida superiores acharia extremamente desagradáveis (Madigan *et al.*, 1997). Sua habilidade em persistir através da

biosfera deve-se, em parte, à sua versatilidade metabólica inigualável e plasticidade fenotípica. Um elemento chave de sua adaptabilidade é sua habilidade em posicionar-se em um nicho onde eles podem se propagar. Vários mecanismos de posicionamento têm sido descobertos em bactérias. O mecanismo mais comum é a motilidade flagelar e métodos diferentes de translocação em superfícies (deslizamento, lançamento, escorregamento). Contudo há outros mecanismos utilizados pelas bactérias para se posicionarem em resposta ao seu ambiente. Algumas espécies são capazes de afetar sua posição sintetizando celulose, formando assim uma película fibrosa que coloca as células próximas da interface ar-água. Além disso, a síntese de celulose auxilia na aderência à superfícies tais como células vegetais (Ross *et al.*, 1991). Um dos mecanismos de posicionamento mais importantes é a aderência. A agregação favorece a interação célula-célula, bem como a taxa de sedimentação das células. Através da aderência, as bactérias não só se posicionam na superfície, como também podem formar comunidades e obter benefícios adicionais da versatilidade fenotípica de seus vizinhos. Uma vez que um estilo de vida aderido a uma superfície é onipresente, é provável que este tipo de existência baseado na comunidade seja uma característica crítica para a persistência das bactérias. Os organismos podem existir independentemente num dado ambiente, mas em muitos casos eles proliferam mais eficientemente interagindo e formando comunidades (Caldwell *et al.*, 1997).

As comunidades bacterianas têm papel chave na produção e degradação de matéria orgânica, na degradação de muitos poluentes ambientais e na reciclagem do nitrogênio, enxofre e muitos metais. A maioria

desses processos necessita do esforço organizado de bactérias com diferentes capacidades metabólicas e é provável que as bactérias que habitam a comunidade do biofilme desempenhem muitos deles. Estudos em bioreatores e culturas de enriquecimento têm mostrado que os biofilmes estão envolvidos no processamento do esgoto e na nitrificação (Davey & O'Toole, 2000). Os biofilmes também se formam em muitos ambientes extremos, tais como em drenos de minas (pH 0), onde eles contribuem para a reciclagem do enxofre (Edwards *et al.*, 2000). Biofilmes de tapetes cianobacterianos têm sido estudados intensivamente em fontes termais (Ramsing *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 1998) e recentemente os pesquisadores têm investigado biofilmes nos lagos da Antártida (Paerl & Priscu, 1998). Foi constatado que comunidades complexamente estruturadas nestes ambientes extremos conduzem uma variedade de processos biológicos, tais como fotossíntese, fixação de nitrogênio e fermentação.

2.5 Biofilmes e biodeterioração em prédios e construções

Os processos biológicos envolvidos na degradação de paredes de edifícios e construções são fortemente influenciados por condições climáticas e influências antropogênicas. A importância da biodeterioração na alteração e deterioração de superfícies tem sido freqüentemente menosprezada e subordinada a processos físico-químicos. Contudo, sua importância como um dos fatores com grande influência nestes processos foi demonstrada e reconhecida (May *et al.*, 1993). Os biofilmes ativos são encontrados em qualquer local onde estão presentes microrganismos e umidade. Sua formação

é afetada pelos tipos de organismos presentes, pela natureza da superfície e pelas condições ambientais (Costerton *et al.*, 1987; Walker e Keevil, 1995).

Um complexo sistema de biofilme pode desenvolver-se em paredes de edifícios e construções. Sabe-se que a maioria dos microrganismos (bactérias, fungos, algas, cianobactérias) desempenha vários papéis na colonização e degradação de pedras e rochas encontradas em construções e monumentos, e não há dúvida de que eles também atuam no desgaste de rochas. Vários mecanismos têm sido sugeridos sobre como eles podem agir como deteriôgenos ativos de pedras (Allsopp & Seal, 1986). A deterioração dos materiais é acelerada pela presença de produtos de seu metabolismo, tais como ácidos e materiais poliméricos. Estes polímeros, geralmente polissacarídeos, agem como colas, retendo sujeira e outras partículas, aumentando os efeitos desfigurantes do biofilme e tornando a estrutura mais difícil de ser limpa. Os microrganismos podem ainda aumentar a taxa de transformação por outras atividades metabólicas, tais como a absorção de íons e a produção de ácidos e agentes quelantes. Eles também alteram a permeabilidade de minerais pela deposição de materiais poliméricos e surfactantes (Gaylarde & Morton, 1999). A biodeterioração causa alterações na distribuição do tamanho dos poros em pedras, alargamento de fissuras e mudanças na circulação de umidade, mudança da coloração de superfícies de pedra e finalmente, corrosão acidolítica e óxido-redutora, com o conseqüente enfraquecimento de estruturas minerais (Griffin *et al.*, 1991; Warscheid & Krumbein, 1993). As bactérias heterotróficas e os fungos podem usar os compostos orgânicos das camadas de tinta como substratos para seu

crescimento, produzindo ácidos que causam a fragilização da tinta ou mudam sua consistência (Krumbein & Petersen, 1990).

Em ambientes tropicais ou em outras áreas de alta umidade tais como banheiros, a formação de biofilmes é extremamente rápida (Lim *et al.*, 1989). Os materiais em condições secas são os menos susceptíveis à formação de biofilmes e biodeterioração. Crispim *et al.* (2003) mostraram que o tipo de substrato influencia a diversidade de cianobactérias nos biofilmes em paredes. Contudo, pouco é conhecido sobre a influencia do substrato na formação do biofilme em superfícies secas.

2.6 O papel das cianobactérias na degradação de prédios

As cianobactérias são classificadas sob dois sistemas taxonômicos: o código Botânico e o Bacteriológico. Nessa dissertação, os nomes usados são do Código Bacteriológico apresentados no manual de Bergey (Holt *et al.*, 1994), exceto onde a informação é dada a partir da literatura no qual o sistema Botânico é aplicado.

As cianobactérias são os principais colonizadores de uma ampla variedade de ambientes terrestres, incluindo solos desérticos, superfícies de rochas e construções antigas e modernas. A formação de biofilmes nas superfícies de construções antigas leva à sua deterioração e o papel das cianobactérias neste processo tem sido assunto de vários estudos recentes (Gaylarde & Gaylarde, 2000; Tomaselli *et al.*, 2000; Ortega-Morales *et al.*, 2001).

Dentre os microrganismos mais comuns encontrados nas superfícies externas de construções, as cianobactérias podem resistir aos repetidos ciclos de secagem e reidratação, bem como a altos níveis de luz UV. As cianobactérias geralmente são mais adaptadas para resistir tais condições adversas, produzindo pigmentos de proteção dentro de suas células (Garcia-Pichel *et al.*, 1992; Matsunaga *et al.*, 1993; Chazal & Smith, 1994). Essa capacidade adaptativa pode ajudar a explicar a presença de números maiores de cianobactérias do que algas em edifícios que não foram pintados recentemente (Gaylarde & Gaylarde, 1999). Contudo, os efeitos do crescimento de cianobactérias em superfícies de construções não são meramente estéticos. Danin & Caneva (1990) sugeriram que as cianobactérias contribuem para a degradação de pedras calcárias da seguinte forma:

- 1 – Adesão de células cianobacterianas em pequenas fissuras
- 2 – Crescimento dentro da fissura
- 3 – Absorção de água e expansão da massa celular, exercendo pressão dentro da estrutura
- 4 – Precipitação de carbonatos e oxalatos em volta das células
- 5 – Abertura da fissura devido às pressões internas
- 6 – Entrada de poeira, pólen, sementes, etc
- 7 – Morte parcial de células cianobacterianas e estabelecimento de bactérias, fungos heterotróficos e de pequenos animais tais como ácaros dentro da fissura
- 8 – Pressão interna crescente da camada superficial da estrutura levando eventualmente ao seu descolamento.

Células cianobacterianas sobre construções de calcário são frequentemente cobertas por depósitos calcários, sugerindo migração de cálcio de locais próximos (Ortega-Morales *et al.*, 2000). A imobilização biológica do carbono como carbonato, o qual pode ser depositado intra e extracelularmente, ocorre em algumas bactérias, fungos, algas, alguns metazoários e cianobactérias. Os organismos fototróficos depositam CaCO_3 na presença de luz e solubilizam-no à noite por causa da modificação de concentrações de carbonato. Esse processo foi estudado na cianobactéria GL24 (Schultze-Lam & Beveridge, 1994). Essas células esféricas possuem uma camada S em sua superfície externa que é capaz de ligar íons cálcio em locais carregados negativamente. O cálcio ligado complexa-se com íons carbonato quando o pH é maior que 8.3 e este alto pH é prontamente produzido da seguinte forma: os íons bicarbonato são absorvidos pela célula e convertidos pela enzima anidrase carbônica em CO_2 e OH^- ; o dióxido de carbono é incorporado na massa celular e os íons hidroxila são liberados e concentrados em volta da célula, aumentando os níveis locais de pH. As células de *Synechococcus* podem tornar-se encrustadas com calcita dentro de oito horas num ambiente apropriado e devem liberar áreas de camada S mineralizadas para permanecerem viáveis. Todo o procedimento é então repetido, permitindo novas absorções de cálcio. A mobilização de íons cálcio por tal atividade metabólica, além do aprisionamento de partículas de calcita liberadas, quer seja biótica ou abiótica na bainha gelatinosa das cianobactérias, é um mecanismo importante da degradação de pedras. As rochas silíceas também são prontamente degradadas em altos níveis de pH por causa da labilidade dos

cátions constituintes sob estas condições, porque a hidrólise de polissilicatos é favorecida em altos níveis de pH.

A sugestão de que algas e cianobactérias também podem dissolver pedras por produção de ácidos (Gillatt, 1991) é mais questionável. Os organismos fotossintetizantes concentram CO_2 ativamente dentro das células como bicarbonato, aumentando o pH externo para 10.5 dentro de 48 horas de crescimento em laboratório (Douglas & Beveridge, 1998). Contudo, Vander Oost e colaboradores (1989) mostraram que o gênero *Cyanothece* desempenha fermentação ácida mista e poderia então induzir a degradação ácida de pedras. Mao Che *et al.* (1996) demonstraram a liberação de um líquido pelas células apicais do grupo *Pleurocapsales*, o qual digere carbonato; apesar da natureza da substância não ser determinada, foi sugerido que poderia ter propriedades acídicas. Contudo, há pouca evidência que as cianobactérias produzem ácidos *in situ* e Waterbury (1989) sugere que a degradação de materiais calcários na presença de cianobactérias é devido à presença simultânea de bactérias heterotróficas.

Tais associações de algas e cianobactérias com bactérias heterotróficas podem aumentar a degradação de minerais nas pedras através da produção de ácidos orgânicos bacterianos. Também se sabe que a microflora fúngica pode metabolizar a matéria orgânica secretada por biofilmes fototróficos e contribuem para a degradação de pedras pela liberação de metabólitos acídicos (Gómez-Alarcón *et al.*, 1994). Urzi (1992) tem desafiado a visão aceita de que a colonização fototrófica de pedras é seguida pelo crescimento de organismos quimioautotróficos, mas Gaylarde & Gaylarde (1999)

demonstraram que o tratamento de paredes externas com uma substância algicida (composto contendo cobre) - usada em concentrações tão baixas para apresentar atividade fungistática e bacteriostática - reduzia o crescimento fúngico e bacteriano. Isso indica que a inibição da colonização das algas reduz o crescimento de fungos e bactérias heterotróficas e suporta a seqüência de colonização aceita, apesar de que em construções poluídas por substâncias químicas, os materiais orgânicos podem agir como nutrientes para os microrganismos não fototróficos. Sob estas condições, as bactérias heterotróficas poderiam de fato ser os primeiros colonizadores em construções (Gaylarde & Morton, 2001).

2.7 As cianobactérias

As cianobactérias têm habitado a superfície da Terra há bilhões de anos (Mazel *et al.*, 1990) e são o maior subgrupo de procariotos Gram-negativos fotossintetizantes que contêm um grande número de gêneros e espécies presentes em paredes de edificações (Rippka, 1988). Elas têm colonizado muitos nichos ecológicos e têm desenvolvido diversas estratégias para sobreviver em ambientes muito diferentes. As antigas formas endosimbionticas formaram as organelas fotossintetizantes (cloroplastos e cianelas) dos eucariotos (Giovannoni *et al.*, 1988), assim compartilhando sua habilidade de realizar a fotossíntese. As formas livres existentes exibem propriedades fisiológicas variadas e sua morfologia apresenta desde formas unicelulares até formas filamentosas complexas (Castenholz & Waterbury, 1989). Sob condições de limitação de nitrogênio, muitas linhagens

filamentosas, tais como *Nostoc* PCC 7120, são capazes de se diferenciar em heterocistos, que são células especializadas para a fixação aeróbica do N₂ molecular (Wolk, 1996).

Esta diversidade morfológica e fisiológica é espelhada por uma extensa variabilidade genética, sendo que os genomas cianobacterianos variam na composição média de bases de DNA de 32 a 71 mol % de G+C e em complexidade de 2.0 a 13.2 Mbp (Herdman *et al.*, 1979; Castenholz, 2001). Conseqüentemente não se pode excluir que o controle transcricional e os mecanismos de processamento podem variar dentro dos diferentes membros do filo das cianobactérias. Contudo, pouco é conhecido sobre a organização de seus operons de rRNA. Pouca informação é obtida de mapas físicos e genéticos das linhagens unicelulares de *Synechocystis* PCC 6301 (Tomioka *et al.*, 1981), *Synechococcus* PCC 7002 (Chen & Widger, 1993) e *Synechocystis* PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996).

2.7.1 Estrutura celular e fisiologia

2.7.1.1 Envelope Celular

Apesar de sua estrutura Gram-negativa geral, o peptidoglicano encontrado em cianobactérias é consideravelmente mais espesso do que a maioria das bactérias Gram-negativas (Hoiczyc *et al.*, 2000). Em linhagens unicelulares tais como *Synechococcus*, sua espessura é de 10nm, chegando de 15 a 35nm em espécies filamentosas como *Phormidium uncinatum* e mais de 700nm em cianobactérias grandes como *Oscillatoria princeps* (Hoiczyc *et al.*, 1995). A análise química do peptidoglicano de cianobactérias tem mostrado

características incomuns. O grau de ligações cruzadas entre cadeias de peptidoglicanos dentro da mureína de *Synechocystis* sp. PCC6714 é muito mais alto do que os 20 a 33% encontrados no peptidoglicano da maioria das bactérias Gram-negativas (Glauner *et al.*, 1988) e de fato, a extensão de ligações cruzadas (56 a 63%) (Jürgens *et al.*, 1983) é similar aos valores relatados para bactérias Gram-positivas (Labischinski *et al.*, 1994). No entanto, o peptidoglicano de cianobactérias é complexado com polissacarídeos específicos de forma muito similar àquela das bactérias Gram-positivas (Jürgens *et al.*, 1985, 1986).

A parede celular de cianobactérias também apresenta um mosaico singular de características diferentes nas membranas externas: os lipopolissacarídeos (LPS) não só contêm pequenas quantidades de fosfato ligado (Schmidt *et al.*, 1980), mas também não apresentam cetodesoxioctonato (Weckesser *et al.*, 1988), um componente comum do LPS de membranas externas de bactérias Gram-negativas. Por outro lado, o antígeno O de cianobactérias é remanescente do antígeno O de *E. coli* (Xu *et al.*, 1997) e é responsável pela adsorção de cianofagos (Samimi *et al.*, 1978) e pela atividade endotóxica em ambientes aquáticos (Keleti *et al.*, 1982). Além disso, a membrana externa de cianobactérias apresenta componentes geralmente ausentes em bactérias Gram-negativas. Dentre estes estão os carotenóides (Omata, 1984; Resch *et al.*, 1983), ácidos graxos incomuns tais como o ácido β -hidroxipalmítico encontrado no lipídio A (Schrader *et al.*, 1981) e porinas (Hansel *et al.*, 1998). Essa lista de características específicas do envelope celular de cianobactérias não está completa, mas dá uma idéia de como essas

células têm mudado como consequência de adaptações específicas durante seus quase 3.5 bilhões de anos de evolução (Cockell, 1998).

Várias cianobactérias unicelulares e filamentosas possuem um “envelope” por fora da membrana externa. Este é chamado de bainha, glicocálice, cápsula, ou, dependendo da consistência, pode ser chamada de gel, mucilagem ou limo. As bainhas de cianobactérias são predominantemente compostas de polissacarídeos, mas em algumas linhagens, cerca de 20% do peso pode consistir de polipeptídeos.

2.7.1.2 Divisão Celular

A maioria das cianobactérias unicelulares e algumas das formas filamentosas sofrem fissão binária por um tipo de divisão constritiva, na qual todas as camadas do envelope (freqüentemente incluindo a bainha), crescem para dentro até que a separação da célula esteja completa. A fissão binária em cianobactérias resulta em populações unicelulares quando a separação constritiva é completa e quando nenhuma bainha mantém células filhas juntas (Castenholz, 2001).

2.7.1.3 Interior Celular

Apesar de nem todos os tilacóides em cianobactérias parecerem ser invaginações da membrana citoplasmática, há “pontos de ligação” ou “centros de tilacóides” ordenados, associados com a periferia do citoplasma ou à membrana citoplasmática. A maioria das cianobactérias possui ficobilissomos hemidiscoidais ou hemisféricos, que são agregados complexos de pigmentos protéicos arranjados em filas ordenadas em ambas as superfícies dos tilacóides. O ficobilissomo constitui o principal complexo captador de luz em

cianobactérias. Os pigmentos contidos em um ficobilissomo típico são a alofococianina no centro, que tem um limite comum com a superfície da membrana do tilacóide, geralmente em contato com a clorofila *a* do FSII, e a ficocianina em bastões. A ficoeritrocianina ou ficoeritrina, se presentes, ocorrem como discos externos dos bastões (Castenholz, 2001).

No citoplasma de cianobactérias há muitos outros componentes e inclusões, a maioria das quais pode ser visualizada prontamente usando microscopia eletrônica de transmissão. Essas incluem glicogênio; grânulos de cianoficina, que são polímeros de arginina ou de ácido aspártico e servem como reservas de nitrogênio; carboxisomos, que são estruturas angulares grandes, compostas principalmente de ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase, aparentemente servindo de reservas desta enzima descarboxiladora; grânulos de volutina (polifosfato) variando de 100 a 300nm de diâmetro; vacúolos de gás que são compostos por muitas vesículas de gás cilíndricas e alongadas, os quais ocorrem principalmente em cianobactérias planctônicas; cianelas, que são similares aos cloroplastos de células eucarióticas; e a região do nucleóide, freqüentemente chamada de “centroplasma”, que parece pigmentada em microscopia ótica.

As fibrilas de DNA de cianobactérias ocorrem em um arranjo complexo, mas cada um é circular quando desenrolado. O genoma total de cianobactérias varia de 1.6 a 8.6 x 10⁹ Daltons (Herdman *et al.*, 1979a). O genoma completo de *Synechocystis* PCC 6803 já foi seqüenciado (Kaneko *et al.*, 1996) e o tamanho é de 2.1 x 10⁹ Daltons.

2.7.1.4 Heterocistos e Fixação de Nitrogênio

As cianobactérias dos subgrupos IV e V produzem heterocistos em tricomas a intervalos ou em suas terminações através da diferenciação de células vegetativas, geralmente somente depois que a concentração do nitrogênio inorgânico combinado (especialmente amônia) tenha diminuído consideravelmente no meio circundante. Em resumo, células vegetativas diferenciam-se em células menos granulares com camadas de parede adicionais e tilacóides modificados que não apresentam o Fotossistema II operante. A nitrogenase é sintetizada e a fixação do N_2 prossegue, especialmente na luz, com o ATP fornecido pelo transporte cíclico de elétrons do Fotossistema I (PS I). A regulação do espaçamento do heterocisto e números de heterocistos relacionados às células oxigênicas fotossintetizantes é mediado através do transporte intercelular de um peptídeo de 17 aminoácidos, descoberto em *Anabaena* PCC 7120 (Yoon & Golden, 1998).

2.7.1.5 Acinetos

São produzidos por muitas cianobactérias do Subgrupo IV. Muitas, mas não todas as cianobactérias heterocísticas produzem acinetos, particularmente sob condições de deficiência de nutrientes e/ou limitação de luz. Os acinetos diferenciam-se das células vegetativas, crescem e adquirem uma parede espessa circundando a parede velha. Acumulam cianoficina, glicogênio, lipídeos e pigmentos carotenóides, mas os polifosfatos desaparecem. Toleram secagem, congelamento e armazenamento longo em sedimentos anóxicos e aparentemente não necessitam de um período de descanso antes da germinação (van Dok & Hart, 1996,1997).

2.7.1.6 *Hormogônia*

Apesar de serem simplesmente uma corrente curta de células, essas geralmente diferem das células vegetativas do tricoma. São geralmente as fases migrantes, na qual ocorre a motilidade de deslizamento ou a flutuação das formas com vacúolo de gás (Herdman & Rippka, 1988; Tandeau de Marsac, 1994).

2.7.1.7 *Motilidade*

Uma motilidade tipo deslizamento é conhecido em uma grande variedade de cianobactérias, mas principalmente em formas filamentosas. Nessa forma de propulsão, é necessário contato com material sólido ou semi-sólido (Castenholz, 2001).

2.7.1.8 *Fisiologia e Bioquímica*

A principal característica fisiológica/bioquímica das cianobactérias que as distingue de todos os outros procariotos é o sistema fotossintético duplo que permite o uso da H₂O como fotoredutor com a conseqüente liberação de O₂. A clorofila *a* serve como o pigmento de centro de reação e também está envolvida na absorção de luz para todas as cianobactérias, como os cloroplastos de algas eucarióticas e plantas. As ficobiliproteínas que formam os ficobilissomos constituem os principais pigmentos captadores de luz em quase todas as cianobactérias, exceto em algumas condições de estresse, tais como a exposição à alta irradiação solar (Castenholz, 2001). A redução do CO₂ utiliza principalmente o ciclo redutor da pentose fosfato.

A maioria das cianobactérias são fotoautotróficas obrigatórias. Contudo, um número relativamente pequeno delas pode crescer como heterótrofos

aeróbicos no escuro à taxas muito mais lentas do que as fotoautotróficas, principalmente pela utilização de glicose, sucrose ou frutose (Castenholz, 2001). A respiração é normalmente reduzida grandemente sob condições fotossintetizantes luminosas, uma vez que uma parte da cadeia de elétrons dos tilacóides também é usada na respiração e serve principalmente para manutenção (Stal, 1995). O tempo de duplicação de cianobactérias durante crescimento exponencial é de 12 a 24 horas, mesmo em culturas com nutrientes abundantes e uma intensidade saturante de luz contínua (Whitton, 1987).

2.7.1.9 *Ecologia*

A ocorrência e predominância de cianobactérias em uma série de habitats é resultado de várias características gerais e de algumas outras que caracterizam certas espécies. Algumas espécies toleram uma ampla variação de condições ambientais, incluindo extremos que geralmente excluem as algas eucarióticas. Presume-se que as cianobactérias evoluíram no período Pré-Cambriano bem antes da fronteira do Paleozóico, e isto é sustentado pela existência de microfósseis do período intermediário e final da Era Proteozóica que são morfologicamente quase idênticos a algumas cianobactérias vivas hoje (Knoll, 1985; Schopf, 1996).

A predominância planctônica de várias formas filamentosas está fortemente relacionada ao fato de elas possuírem vesículas de gás e sua habilidade de regular a flutuação na água ou simplesmente boiar (Walsby, 1994). O uso muito eficiente de CO_2 em baixas concentrações e a habilidade de usar o HCO_3^- em pH alto também foram propostos como fatores que

promovem a dominância das cianobactérias sob algumas condições (Shapiro, 1997). A capacidade de crescer em condições alcalinas é uma das características importantes na colonização de superfícies de rochas e concreto. Além disso, várias cianobactérias planctônicas produzem toxinas potentes de dois tipos: neurotoxinas alcalóides e peptídeos hepatotóxicos (Willén & Mattsson, 1997). A cianobactericina, um inibidor eficiente de outras cianobactérias e algumas algas eucarióticas, é uma lactona diaril substituída com um cloro substituído em um dos anéis aromáticos. Ela é produzida por *Scytonema hofmanni* (não planctônica) (Gleason & Baxa, 1986). O tamanho das populações cianobacterianas em água às vezes é controlado por ataques de cianofagos específicos, mixobactérias líticas ou fungos aquáticos (Garza & Suttle, 1998).

A temperatura ótima para o crescimento de muitas cianobactérias é mais alta pelo menos em vários graus do que para a maioria das algas eucarióticas. Esta característica pode ter um papel importante na predominância de cianobactérias no verão em latitudes temperadas. Algumas espécies toleram temperaturas até mais altas (até 74°C para pelo menos uma espécie), habitando fontes termais (Castenholz, 1984a), superfícies de pedras terrestres e solos de desertos quentes (Garcia-Pichel & Belnap, 1996), habitats onde fotótrofos eucarióticos podem ser excluídos ou inibidos. As cianobactérias também predominam em temperaturas baixas e congelantes em lagos de água doce de regiões polares, provavelmente devido à exclusão da maioria dos outros organismos fototróficos, mas nesses casos, a temperatura ótima real

para a maioria desses organismos pode ser consideravelmente mais alta (Tang *et al.*, 1997).

A habilidade de resistir às altas salinidades (Borowitzka, 1986) permite que as cianobactérias predominem em muitas lagoas marinhas hipersalinas e lagos salgados no continente (Javor & Castenholz, 1981; Stal, 1995). Esta capacidade também ajuda as células a sobreviver em ambientes secos, como paredes de construções.

2.8 Técnicas moleculares para estudo de microrganismos

Durante a última década, os biólogos têm utilizado uma variedade de técnicas moleculares para responder perguntas sobre filogenia, evolução e diversidade populacional. A análise do rRNA 16S e mais recentemente do espaçador transcrito interno (ITS) 16S-23S tem aparecido amplamente nesses estudos, particularmente aqueles que envolvem microrganismos procariotos e eucariotos (Boyer *et al.*, 2001). Vários ficologistas têm usado o gene rRNA 16S para fornecer uma penetração nas relações filogenéticas de gêneros de cianobactérias dentro das ordens propostas por Komárek & Anagnostidis (1986, 1989) (ex. Giovannoni *et al.*, 1988; Wilmotte & Golubic, 1991; Wilmotte *et al.*, 1992 e 1994; Nelissen *et al.*, 1996; Nubel *et al.*, 1996; Turner, 1997). Os pesquisadores têm se voltado crescentemente para os ITSs 16S-23S mais variáveis (Boyer *et al.*, 2001).

A digestão da região ITS 16S-23S por enzimas de restrição tem sido usada para a análise filogenética de linhagens de gêneros de eubactérias não fototróficas (Navarro *et al.*, 1992; Vinuesa *et al.*, 1998). Os produtos de

digestão de restrição têm também sido usados para examinar a variabilidade e relações filogenéticas dentro da ordem das cianobactérias (Lu *et al.*, 1997) e dentro de gêneros de cianobactérias heterocísticas (West & Adams, 1997). Otsuka *et al.* (1999) foram os primeiros e são atualmente o único grupo de pesquisa a usar o seqüenciamento direto do ITS para estudar relações filogenéticas subgenéricas em *Microcystis*.

Operons que contêm os genes que codificam os três rRNAs bacterianos (16S, 23S e 5S) e suas regiões ITS associadas estão normalmente presentes em múltiplas cópias no genoma bacteriano (sete em *E. coli* e *Salmonella*, 10 em *Bacillus subtilis*) (Boyer *et al.*, 2001). Em *E. coli* essas cópias são chamadas *rrA-rrE*, *rrnH* e *rrnG*. Antón *et al.* (1998) demonstraram que há heterogeneidades maiores entre os operons em termos do tipo e número de genes de rRNA presentes. Foi sugerido que a seqüência espaçadora pode refletir filogenias intraespecíficas (Garcia-Martínez *et al.*, 1996), mas para ter o mesmo operon como alvo em múltiplas linhagens, deve-se usar oligonucleotídeos iniciadores específicos para operon no PCR (Antón *et al.*, 1998).

Alguns genes de rRNA 16S de cianobactérias e a região do espaçador transcrito interno entre os genes rRNA 16S e rRNA 23S já foram seqüenciados com finalidade taxonômica (Wilmotte *et al.*, 1992, 1993 e 1994; Neilan *et al.*, 1994; Nelissen *et al.*, 1994 e 1996). As regiões ITS de cianobactérias investigadas até o presente variam de 354 a 545 nucleotídeos e para aquelas que já foram seqüenciadas, somente uma única espécie de ITS foi encontrada em cada linhagem. Isto é surpreendente uma vez que as informações de

seqüência e comprimento do espaçador do rRNA 16S-23S em outros grupos bacterianos sugerem que pode ocorrer uma variação considerável não somente entre espécies, mas também entre os alelos do operon do rRNA dentro de uma única linhagem (Gürtler & Stanisich, 1996).

Há algumas boas razões para o uso de sondas para o rRNA 16S: a grande quantidade de rRNA na maioria das células, a aparente ausência de transferência gênica lateral e um bom comprimento de cerca de 1500 nucleotídeos para o rRNA 16S com uma faixa de sítios bem conservados (Woese, 1987). A principal vantagem, contudo, é a disponibilidade de grandes bancos de dados de rRNA para análise comparativa de seqüências (Maidak *et al.*, 1999; Van de Peer *et al.*, 1999; Strunk *et al.*, 2000).

2.9 Técnicas de detecção de cianobactérias

As cianobactérias podem ser diferenciadas das algas por análise microscópica e cultura microbiológica, e ainda pelo uso de sondas genéticas e outros métodos de análise de DNA. Descobriu-se que as cianobactérias são os organismos fotossintéticos dominantes em superfícies pintadas na Índia, Brasil e México, sendo que nos dois últimos, formas coloniais cocóides de cianobactérias foram as mais encontradas (Gaylarde & Gaylarde, 2000). Isto indica uma diferença básica em populações dos diferentes países ou uma diferença importante em técnicas de detecção e identificação.

As técnicas tradicionais para a identificação e sistemática de cianobactérias têm sido baseadas primeiramente nas suas características morfológicas. Contudo, a morfologia pode mudar dependendo das condições

ambientais (Evans *et al.*, 1976) e a diversidade das linhagens numa cultura pode ser suprimida por condições seletivas de cultivo (Doers *et al.*, 1988). O conteúdo do pigmento fotossintético, a composição de lipídios, as estruturas celulares diferenciadas e outras características podem também estar sujeitas à mudanças devido à expressão variável dos produtos dos genes de cianobactérias em cultura (Kenyon *et al.*, 1972; Klein *et al.*, 1973).

Os métodos utilizados atualmente para detecção de cianobactérias são baseados no cultivo desses microrganismos em meios de crescimento específicos. As técnicas de isolamento tradicionais foram desenvolvidas na área de microbiologia aquática, estendida a habitats terrestres e envolvem o enriquecimento em meios líquidos, seguidos de isolamento usando micromanipulação ou plaqueamento em meio sólido (Rippka *et al.*, 1979; Hoffmann, 1989). Contudo, tais métodos podem resultar na detecção de números artificialmente baixos devido à presença de células inibitórias e predatórias tais como fungos, bactérias e protozoários. É aparente que muitas espécies de cianobactérias que crescem em ambientes secos são perdidas no meio de cultura devido à atividade de fungos e mais recentemente foi reconhecido que muitos tipos de microrganismos no ambiente não são detectados por técnicas de culturas normais (Ward *et al.*, 1990). Ferris *et al.* (1996) relataram a biodiversidade fototrófica artificialmente baixa após o uso destas técnicas de cultura e enriquecimento tradicionais e sugerem que a biologia molecular é a resposta.

As limitações dos métodos atuais têm favorecido o desenvolvimento de técnicas biológicas moleculares para a identificação de cianobactérias. Os

métodos de genotipificação do DNA usando as reações de PCR, tais como DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), são usadas extensivamente atualmente para classificar isolados em grupos. A genotipificação da amplificação do DNA (DAF) é capaz de agrupar as cianobactérias simbióticas do gênero *Azolla* (Eskew *et al.*, 1993). Além disso, o ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus – consenso intergênico enterobacteriano repetitivo) e o REP (repetitive extragenic palindromic sequences - seqüências palindrômicas extragênicas repetitivas), têm sido usados com oligonucleotídeos iniciadores para a genotipificação de culturas de cianobactérias axênicas (Lupski & Weinstock, 1992). O STRR (short tandemly repeated repetitive sequences – seqüências curtas duplicadas repetitivas) e o HIP1 (highly iterated palindromic sequences - seqüências palindrômicas altamente repetidas) demonstraram ser capazes de distinguir *Nostoc* e *Anabaena* simbióticas em samambaias (Rasmussen & Svenning, 1998) e muitas cianobactérias como *Synechococcus* sp., além de algumas cianobactérias toxigênicas (Robinson *et al.*, 1995; Rouhiainen *et al.*, 1995). Por outro lado, para determinar a diversidade e confirmar a capacidade de fixação de nitrogênio baseada em propriedades genotípicas e fenotípicas, as características dos genes *nifH* e ensaios de redução de acetileno têm sido usados extensivamente (Teauroong *et al.*, 2002).

A caracterização genética de linhagens de cianobactérias tem sido desenvolvida com o uso de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição aleatórios (RFLP) do espaçador intergênico dos genes que codificam subunidades de ficobilissomos (*cpc BA*) (Bolch *et al.* 1996). A técnica do DNA

polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), juntamente com o PCR, também tem sido usada para caracterizar cianobactérias em cultura pura e em associações simbióticas (Neilan *et al.*, 1995; Eskew *et al.*, 1993). Estas abordagens têm sido usadas para identificar muitos organismos em nível de classificação de linhagem (Welsh *et al.*, 1990 e 1991), mas a exigência de culturas axênicas restringe a aplicabilidade do RAPD e RFLP.

2.10 Análise molecular da comunidade microbiana

A identificação e quantificação de membros de comunidades microbianas, bem como um claro entendimento da relação funcional entre os membros são necessários, antes que possamos apreciar e possivelmente gerenciar, os complexos processos que essas comunidades desempenham. Avanços tecnológicos têm ajudado na obtenção desse objetivo. A notável descoberta da análise filogenética baseada no rRNA (Woese, 1987) tem fornecido um meio de desenvolver ferramentas com as quais investigar comunidades microbianas.

Para se obter uma melhor compreensão da comunidade microbiana e o papel potencial das bactérias no processo de degradação de paredes de construções, foi utilizada a abordagem molecular de fragmentos de genes codificadores para rRNA 16S amplificados por PCR e separados por eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE). Com o uso dessa técnica, os fragmentos de DNA com o mesmo comprimento, mas com seqüências de pares de bases diferentes podem ser separados. Esse método foi introduzido há pelo menos 14 anos na ecologia microbiana molecular para

determinar a diversidade genética de comunidades microbianas naturais e para identificar a associação filogenética dos membros de comunidades de Eubactérias e Archaea (Röllerke *et al*, 1996). Contudo, poucos trabalhos tem sido desenvolvidos sobre populações de cianobactérias; essas populações são freqüentemente desconsideradas pelos bacteriologistas que estudam comunidades microbianas ambientais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de amostras de cianobactérias

As amostras foram coletadas de biofilmes visíveis de paredes externas de igrejas. Algumas das igrejas que serviram como local de coleta de amostras encontram-se em avançado estado de deterioração. A igreja de São José já está em processo de tombamento pelo Patrimônio Histórico e Cultural. Todas são localizadas na cidade de Porto Alegre e datam do começo à metade do século XX. As igrejas e o material de suas superfícies são as seguintes: Igreja Santo Antônio do Partenon (revestimento com mica) (1932), Igreja São José (argamassa) (1923), Igreja São Judas (tijolo) (1943), Igreja Nossa Senhora das Dores (argamassa) (1903), Igreja Nossa Senhora dos Navegantes (argamassa) (1913) e Igreja São Geraldo (revestimento com mica) (1940). A Igreja São Judas foi inteiramente construída com tijolos sem revestimento, deixando evidente a ação do tempo em sua estrutura. A Igreja São José (em processo de tombamento) foi construída com tijolos e revestida com argamassa, mas já apresenta avançado estado de deterioração. As demais apresentam bom estado de conservação, mas já é evidente a presença de biofilmes na edificação (Figuras 1 a 6). As coletas das amostras foram feitas em três épocas diferentes utilizando-se a técnica de fita adesiva de Gaylarde & Gaylarde (1998): uma em agosto de 2001, uma em fevereiro de 2002 e uma em outubro de 2002. Visualizou-se o biofilme e colocou-se a fita sobre o mesmo fazendo-se pressão para que a maior quantidade possível do biofilme fique aderida à

fita. Foram coletadas 10 amostras de cada igreja. Não foi utilizada a técnica de raspagem para evitar danos à superfície.



FIG. 1 Santo Antônio



FIG. 2 São José

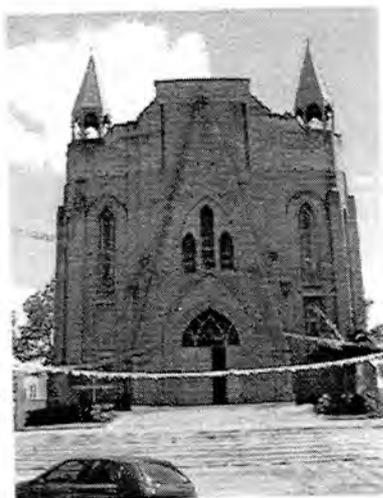


FIG. 3 São Judas



a)



b)

FIG. 4 N.S. das Dores a) fachada b) biofilmes nos cantos

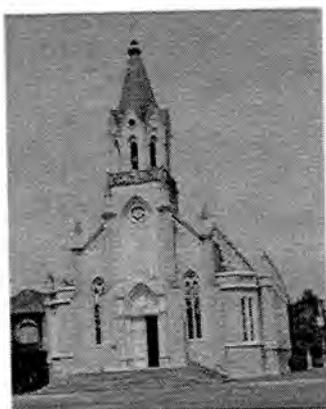


FIG. 5 N.S. dos Navegantes



FIG. 6 São Geraldo

FIGURAS 1- 6. As igrejas de Porto Alegre estudadas neste trabalho

3.2 Isolamento e manutenção das culturas

Após a coleta de amostras do biofilme, a fita foi colocada diretamente sobre placas de Petri com MKM sólido para cianobactérias (Apêndice 1). As amostras foram incubadas numa estufa incubadora iluminada para B.O.D. (Fanem, modelo 347FG) a 25°C (Gaylarde & Gaylarde, 1998) por até oito semanas. As amostras foram examinadas por microscopia após a rehidratação (1 a 3 horas) e diariamente por quatro dias durante as oito semanas. As características das células de cianobactérias presentes foram utilizadas para identificá-las quando possível. Após aproximadamente uma ou duas semanas, a fita foi removida para uma nova placa de Petri com MKM sólido e as duas placas continuaram sob observação. A remoção da fita é preferível, uma vez que isto permite o desenvolvimento tridimensional das colônias, ajudando em sua diferenciação sob o microscópio. Foi utilizada Ciclohexamida (Sigma) para inibir o crescimento de fungos. Uma vez que as colônias atingiam um tamanho adequado, estas eram coletadas com uma fina agulha e transferidas para um nova placa, com o objetivo de conseguir culturas puras.

3.3 Isolamento e crescimento em meio sólido e líquido

Após o crescimento das colônias em meio sólido, algumas delas foram isoladas em Erlenmeyers contendo 25ml de meio MKM líquido e incubadas durante até três semanas, com repiques para outros Erlenmeyers ou placas cada mês. As células e colônias foram visualizadas sob uma lupa Olympus SZ40 e microscópio ótico Olympus CH30 (60X) com câmera fotográfica acoplada. As células também foram observadas em lâminas sob microscopia

ótica (1000X). Os organismos foram identificados morfológicamente de acordo com a classificação de Holt *et al.* (1994).

3.4 Extração de DNA

Três técnicas foram utilizadas para extrair o DNA das células.

3.4.1 Extração com fenol/clorofórmio

O DNA foi isolado de acordo com a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989). As células bacterianas foram coletadas das placas de Petri com o uso de uma agulha fina (uma a cinco colônias dependendo do tamanho) e lavadas com solução de NaCl 1M. Foram ressuspensas em 395 μL de TE 1X (Apêndice 2) e adicionados 30 μL de SDS 10% (conc. final 0.6%) e 10 μL de lisozima 10 mg/ml em 10 mM Tris/HCl pH 8.0 (conc. final de 0.2 mg/ml). Os tubos foram homogeneizados (vol. final de 450 μL) e incubados a 37°C por uma hora. Adicionou-se 2,5 μL de proteinase K 20mg/ml (conc. final de 0.1 mg/ml). Todos os reagentes eram Sigma (St. Louis, Mo, EUA). Após a incubação por 15 minutos a 56°C, foi colocado um volume igual de fenol (equilibrado com TRIS pH 8,0) e o tubo homogeneizado por inversão. Após a centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm (ALC PK 131R Multispeed Refrigerated Centrifuge), o sobrenadante foi transferido para outro tubo e a extração com fenol foi repetida. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e adicionado um volume igual de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) e fenol/ clorofórmio 1:1 v/v), e ressuspensado. Após a centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm, transferiu-se o sobrenadante para um tubo novo e

adicionou-se igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O tubo foi homogeneizado bem e centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm. Após transferir o sobrenadante para um tubo novo, foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol, e o tubo homogeneizado e centrifugado por 20 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado em etanol 70%, secado em temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μ l de TE pH 8,0.

Após extraído, o DNA foi semi-purificado da seguinte maneira: adicionou-se 1 volume de clorofórmio e foi homogeneizado em vortex por 30s. As amostras foram centrifugadas por 1min a 12.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para um tubo novo. Neste tubo foi adicionado 1/10 volumes de acetato de potássio 3M pH 5.2. Adicionou-se 2 volumes de etanol e centrifugou-se por 5min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 1 volume de etanol 70%. Centrifugou-se por 2 min a 12.000 rpm e o sobrenadante foi retirado. O pellet foi deixado para secar em temperatura ambiente e ressuspendido em 10 μ l de TE 1X, pH 8.

3.4.2 Extração de DNA com sílica

A extração do DNA das amostras também foi realizada utilizando-se o método de Fiore *et al.* (2000) modificado por Sá (2001). As amostras foram coletadas com uma agulha (uma a cinco colônias dependendo do tamanho) e colocadas em um Eppendorf contendo 750 μ l de TE. Os tubos foram invertidos várias vezes para homogeneização e em seguida submetidos a um pulso por 10 a 20 segundos em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 750 μ l de TNE (Solução. I, Apêndice 2). Os tubos foram invertidos

várias vezes para homogeneização e em seguida submetidos a um pulso por 10 a 20 segundos em microcentrífuga. Esse passo foi repetido mais uma vez. O sedimento foi ressuspenso em 100µl de solução EDTA-Salina (Apêndice 2) e homogeneizado por um pulso em vortex. Foram adicionados aos tubos 100µl de SDS 20% aquecido a 55°C, e homogeneizou-se com cuidado. Em seguida, os tubos foram colocados em banho de água a 55°C por 10 minutos e periodicamente homogeneizados por inversão. Após, adicionou-se 50µl de perclorato de sódio (5M), gota a gota com cuidadosa inversão do tubo após a adição de cada gota. Adicionou-se 500µl da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e homogeneizou-se cuidadosamente por inversão até a formação de uma emulsão no tubo. Os tubos foram cuidadosamente centrifugados à temperatura ambiente por 10 minutos a 15000rpm (ALC PK 131R Multispeed Refrigerated Centrifuge). Após a centrifugação, transferiu-se a fase aquosa cuidadosamente com uma micropipeta para um novo tubo de Eppendorf esterilizado. Adicionou-se o dobro do volume da amostra (aproximadamente 500µl) de NaCl 4M e centrifugou-se por 15 minutos. Ocorrendo a presença de depósitos no fundo dos tubos, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para um tubo novo. Para a precipitação do DNA, adicionou-se, para cada 250µl de volume de amostra, 40µl de suspensão de dióxido de sílica (Apêndice 2) mantida refrigerada e no escuro. Os tubos foram homogeneizados cuidadosamente e deixados em banho de água a 55°C por 5 minutos. Após rápido pulso em microcentrífuga, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado lavado várias vezes com 250µl de solução G gelada (Apêndice 2). Em cada lavagem aplicou-se um pulso rápido em microcentrífuga e

sobrenadante foi descartado. Os tubos foram colocados para secar à temperatura ambiente em dessecador sob vácuo durante 1 hora ou durante a noite. O precipitado foi ressuspenso delicadamente em 40µl de água Milli-Q esterilizada e os tubos foram colocados em banho de água a 45°C por 10 minutos. Após isso, os tubos foram centrifugados por 3 minutos e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para novos tubos de Eppendorf esterilizados. Depois das extrações, o DNA genômico resultante foi analisado em gel de agarose (Q-BIOgene, EUA) 1% de acordo com o item 3.6.

3.4.3 PCR direto

Após a rehidratação dos biofilmes e/ou o crescimento das colônias em placas, estas foram observadas em microscópio óptico para verificar sua homogeneidade. Quando as microcolônias ficavam fixadas no meio, após a retirada da fita, estas podiam ser coletadas imediatamente com uma fina agulha, ou deixadas por um período maior de tempo se fosse necessário para alcançar o tamanho apropriado. Em alguns casos, especialmente no caso de espécies com uma bainha externa, as microcolônias permaneciam ligadas à fita adesiva e eram coletadas diretamente da fita após crescimento em uma outra placa. Neste estágio, separava-se as amostras das placas com culturas puras ou semi-puras. As formas filamentosas eram coletadas como tricomas isolados no estágio apropriado. Para o PCR, as microcolônias ou filamentos (até aproximadamente 10^3 células) eram colocadas em 10µl de água MilliQ em um tubo Eppendorf e congeladas a -35°C e descongeladas em temperatura ambiente (25°C) cinco vezes num freezer doméstico. Após o último

descongelamento, todos os reagentes necessários para a reação de PCR foram adicionados diretamente no Eppendorf para dar um volume final de 25µl. Estes reagentes incluíam: 2.5µl de tampão de DNA polimerase 10X, 2.5µl de MgCl₂ 25 mM, 2.0µl de dNTP, 1µl de cada oligonucleotídeo iniciador, 5.8µl de água MilliQ e 0.2µl de Taq polimerase 5U/µl. A amplificação foi conduzida como descrita em item 3.7.1.

3.5 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA extraído nas técnicas descritas nos itens 3.4.1 e 3.4.2, foi feita em espectrofotômetro (UV-160A Visible Recording Spectrophotometer - Shimadzu) com leitura em 260 e 280 nm. Diluiu-se 1µl de amostra em 1ml de água Milli-Q e colocou-se no aparelho para leitura. A pureza do DNA foi obtida pela razão A_{260}/A_{280} , sendo que o valor deve ser próximo de 1.8 para obter-se um DNA livre de impurezas (Trevors, 1992). A quantidade de DNA em µg/µl foi calculada pela expressão: $DNA = A/0.02$ (Sambrook *et al.*, 1989).

3.6 Amplificação por PCR

Foram realizadas duas técnicas de amplificação, PCR com o DNA extraído, e PCR direto nas células do biofilme, juntamente com controle positivo (DNA extraído de *Microcystis*, gentilmente cedido pelo Dr. David Moon, CENA-SP).

3.6.1 Amplificação por PCR de DNA extraído

O DNA extraído foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos para rRNA 16S descritos por Neilan *et al.* (1997, 2002): 27F1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (universal) e 809R GCTTCGGCACGGCTCGGGTCGATA (específico para cianobactéria) (MWG Biotech, High Point, NC, EUA). O PCR foi feito para um volume final de 25µl contendo: 2.5µl de tampão de PCR 10x, 1.25µl de MgCl₂ (50 mM), 2.0µl dNTPs (2.0 mM), 1.0µl de cada oligonucleotídeo iniciador (100pM), 0.2µl de Taq DNA Polimerase (5U/µl) e 80 – 160ng do DNA molde. Todos os reagentes foram comprados de Invitrogen, Alameda, CA, USA. Várias concentrações de MgCl₂ e dNTPs foram testadas e também adicionou-se DMSO (1.25µl) em algumas reações como um promotor do PCR. A amplificação foi conduzida em um termociclador (Termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc. Michigan, EUA) com o seguinte programa: 96°C por 5 min para a desnaturação inicial, 30 ciclos de 94°C por 20 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por 50 seg. e uma extensão final a 72°C por 2 min. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% usando brometo de etídio como corante.

3.7 Eletroforese de gel de agarose

A eletroforese foi desenvolvida de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Adicionou-se 1,0g de agarose em 100ml de TAE (previamente diluído do estoque de TAE 5X, Apêndice 2). Aqueceu-se a mistura em forno microondas até a dissolução completa da agarose. Após o resfriamento, adicionou-se brometo de etídio (10mg/ml) para uma concentração final no gel de 0.5µg/ml.

Para 100ml de gel, adicionou-se 2 μ l de brometo de etídio. Verteu-se o gel na placa e esperou-se endurecer. O gel foi montado na cuba. A cuba foi preenchida com a quantidade apropriada de TAE e as amostras foram distribuídas já com o tampão apropriado (tampão de amostra, Apêndice 2) Correu-se a eletroforese a 80mA até a migração apropriada das amostras (Sambrook *et al.*, 1989). Os géis foram observados sob luz UV utilizando-se um transiluminador e fotografados com o sistema de fotodocumentação Kodak.

3.8 Sequenciamento dos produtos de PCR

As técnicas de sequenciamento de DNA são ferramentas chave em muitas áreas. Um grande número de ciências diferentes estão recebendo os benefícios destas técnicas, dentre elas a arqueologia, antropologia, genética, biotecnologia, biologia molecular e as ciências forenses.

Alguns produtos de PCR foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores 27F1 e 408R no laboratório do colaborador Dr. Brett Neilan da Universidade de New South Wales, Austrália (UNSW). Estes produtos foram sequenciados utilizando-se a técnica "BigDye™ dideoxy termination" com o oligonucleotídeo iniciador 408R e analisados no Laboratório de Análise de DNA da UNSW.

3.9 Análise das seqüências e preparação do dendrograma

As seqüências foram corrigidas manualmente e submetidas à análise de similaridade pelo programa BLAST (Basic Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov), que é um conjunto de programas de pesquisa de

similaridade projetado para explorar todos os bancos de dados de seqüências disponíveis seja para proteínas ou para DNA.

As seqüências foram alinhadas com seqüências de cianobactérias já depositadas utilizando-se o programa CLUSTAL-X (Higgins *et al.*, 1992) e analisadas estatisticamente pelo método de “bootstrap”, com 1000 comparações. Após o alinhamento, uma região hipervariável de comprimento variável foi identificada, começando na posição 310. Seguindo a recomendação (www.upm.edu/biology/estgrad), esta região foi retirada das seqüências, a fim de minimizar o efeito de inserções e deleções. As novas seqüências foram re-analizadas pelo BLAST e re-submetidas à análise “bootstrap”.

3.9.1 “Bootstrapping”

As árvores evolutivas são freqüentemente estimadas a partir de dados de seqüências de DNA ou RNA. Em 1985, Felsenstein sugeriu o uso do “bootstrap” como um método de análise estatística para a preparação do dendrograma. O dendrograma será a melhor possibilidade das relações filogenéticas de seus membros, baseada na comparação de suas seqüências alinhadas. O método “bootstrap” recalcula o dendrograma várias vezes com cálculos independentes. Neste trabalho, a árvore mais provável foi calculada pelo “bootstrapping” em 1000 vezes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento das cianobactérias

Muitos biofilmes em monumentos históricos são dominados por cianobactérias cocóides (Ortega-Morales *et al.*, 2001; Crispim *et al.*, 2003), que são difíceis de isolar em culturas uniclanobacterianas. Deve-se considerar também as espécies viáveis e não cultiváveis. Devido ao fato destes microrganismos se encontrarem associados com outras espécies de fungos, algas e bactérias heterotróficas no biofilme - incluindo actinomicetos - seu isolamento é bastante trabalhoso, requerendo muito cuidado e o uso de sucessivos repiques das células. Neste trabalho, foram encontrados alguns problemas no desempenho desta tarefa, que tomam o isolamento de cianobactérias uma tarefa difícil.

Algumas células cianobacterianas produzem exopolissacarídeos aos quais as bactérias heterotróficas aderem, tornando o isolamento praticamente impossível (Billi *et al.*, 1998). Sempre que um isolamento era feito, havia a presença inevitável de eubactérias nas colônias. O isolamento sucessivo levava então à obtenção de colônias mais puras e, em alguns casos, livres de eubactérias. A maioria das colônias foi isolada de meio sólido com uma fina agulha de metal. Posteriormente foram transferidas para meio líquido, onde somente uma espécie pareceu não se adaptar. Foi obtido o isolamento de algumas culturas puras em meio sólido somente após um exaustivo trabalho de microdissecção. De fato, existem muito poucas culturas axênicas de cianobactérias em coleções de culturas (Komagata, 1987).

Fungos também apresentaram uma dificuldade para o isolamento de cianobactérias, porque estão freqüentemente presentes nos biofilmes e crescem simultaneamente com aquelas quando de seu cultivo em meio sólido. Neste trabalho, a tentativa de inibir o crescimento de fungos com ciclohexamida não demonstrou-se satisfatória pois inibia fungos e favorecia o crescimento de eubactérias. Em muitos casos, o crescimento dos fungos filamentosos foi tão exacerbado que inibiu o crescimento de cianobactérias e causou sua morte, possivelmente pela produção de algum tipo de antibiótico, ou por competição por substrato.

Mixomicetos também são microrganismos presentes em biofilmes associados à cianobactérias nas superfícies dos prédios (Gaylarde & Gaylarde, 2000), mas numa escala muito menor e também apresentaram um sério problema de contaminação no presente trabalho. Todas as placas contaminadas com mixomicetos foram perdidas. Foi impossível retirá-los do meio e eles destruíram as cianobactérias presentes. Os actinomicetos, apesar de presentes em menor número, apresentavam um sério risco para colônias de cianobactérias cocóides, sendo que muitas delas não sobreviviam por muito tempo, uma vez contaminadas por actinomicetos.

Ácaros presentes nas amostras espalhavam-se rapidamente devido à produção de milhares de ovos e colonizavam as placas de Petri. Uma vez instalada, sua população utilizava as cianobactérias, bem como os fungos, como fonte de nutrientes e destruíam todo o conteúdo das placas. Não havia outra alternativa a não ser autoclavar as placas contaminadas para debelar a infestação por ácaros.

Apesar dos problemas apresentados pelos organismos contaminantes, foi possível isolar 12 gêneros de cianobactérias (Tabela 1), dos quais, aproximadamente 20 culturas de células morfológicamente diferentes foram selecionadas para dar prosseguimento ao trabalho.

TABELA 1. Gêneros/ordens de cianobactérias encontradas nas paredes de seis igrejas amostradas e a população qualitativa de algas.

Grupo/Igreja	São José	São Geraldo	Sto Antônio	São Judas	Navegantes	Dores
Substrato	argamassa	micáceo	micáceo	tijolo	argamassa pintada	argamassa pintada
<i>Calothrix</i> (fil.)		+	+		+	
<i>Chroococcus</i> (coc.)				+	+	
<i>Gloeocapsa</i> (coc.)	+	+		+	+	
<i>Leptolyngbya</i> (fil.)			+	+	+	+
<i>Lyngbya</i> (fil.)		+	+	+	+	+
<i>Mastigocladus</i> (fil.)		+				
<i>Nostoc</i> (fil.)		+	+	+	+	
<i>Oscillatoria</i> (fil.)	+		+		+	
<i>Plectonema</i> (fil.)	+	+	+	+	+	+
<i>Pleurocapsales</i> (coc.)	+	+	+	+	+	
<i>Scytonema</i> (fil.)	+	+	+		+	
<i>Synechocystis</i> (coc.)		+	+	+	+	
ALGAS	+	+/-	+++	++	+++	+++

fil = filamentosas; coc=cocóides; * amostras cujas morfologias concordaram com o resultado do BLAST.

As cianobactérias foram identificadas morfológicamente de acordo com Holt *et al.* (1994), mas Castenholz (2001) sugere que no presente momento não é apropriado dar nomes às espécies, uma vez que a Biologia Molecular

demonstra que até os gêneros cujos nomes são definidos atualmente podem estar classificados incorretamente.

Brevemente, os grupos citados na Tabela 1 foram colocados no seu gênero, ou, no caso das *Pleurocapsales*, sua ordem, de acordo com as seguintes características (Holt *et al.*, 1994):

Calothrix (subgrupo IV) (Fig. 7). Membros deste gênero são filamentosas e produzem heterocistos. Os filamentos maduros encapsulados apresentam um alto grau de afilamento na direção do final do tricoma. As homogônias móveis são geralmente muito curtas e não apresentam bainha. A pigmentação marron clara ou escura da bainha, frequentemente observada nas amostras naturais, tem sido tradicionalmente considerada um traço taxonômico (Whitton, 1989).

Chroococcus (subgrupo I) (Fig. 8). Células grandes (22-32 μm de diâmetro) que se reproduzem por fissão binária em dois planos sucessivos em ângulos retos; as células ocorrem em agregados geralmente de duas ou quatro células, mantidas juntas por uma bainha multilaminada.

Gloeocapsa (subgrupo I) (Fig. 9). Cianobactérias unicelulares com células esféricas de 3-10 μm de diâmetro que se dividem por fissão binária em dois ou três planos sucessivos em ângulos retos e ocorrem em agregados cobertos por uma bainha de múltiplas camadas.

Mastigocladus (subgrupo V) (Fig. 10). As verdadeiras ramificações deste gênero filamentoso são uniseriadas e compostas de células, particularmente aquelas distais da base, que são geralmente mais longas que largas. O tricoma primário do qual eles se originam é também uniseriado, mas pode tornar-se multiseriado em parte, com divisões em mais de um plano. A maioria das

células do tricoma axial, contudo, apresentam uma natureza verdadeiramente filamentosa. Castenholz (2001) diz que a diferenciação entre este gênero e *Fischerella* (Fig. 10) provavelmente ainda não está garantida.

Leptolyngbya (subgrupo III) (Fig. 11). Tricomas cilíndricos com menos de 3µm de diâmetro; as células são isodiamétricas ou mais longas que largas; as constrições entre as células são geralmente ausentes, raramente excedendo 1/8 do diâmetro do tricoma. As células apicais são redondas ou excepcionalmente cônicas. Não ocorrem heterocistos nem acinetos. As bainhas podem ser produzidas, mas não são de consistência firme. Algumas linhagens naturais podem apresentar uma falsa ramificação, que depende principalmente da força da bainha. A maioria das linhagens desse gênero teriam tradicionalmente sido identificadas como espécies de *Lyngbya* Agardth 1824, *Phormidium* Kützing 1843, *Plectonema* Thuret 1875, (se a falsa ramificação for freqüente), ou até mesmo *Oscillatoria* Voucher 1803. Agnostidis e Komárek (1988) e Agnostidis (1989) revisaram a ordem *Oscillatoria* e criaram vários gêneros novos, incluindo *Leptolyngbya*, para acomodar quase todas as espécies de tricoma de diâmetro pequeno anteriormente classificados num dos três gêneros “clássicos” mencionados acima. Por hora, o gênero *Leptolyngbya* serve simplesmente como um repositório para cianobactérias “oscillatorianas” de células pequenas sem motilidade evidente que são difíceis de classificar. O acúmulo de evidência genética resultará em subdivisões genéricas adicionais, uma vez que várias linhagens filogenéticas discretas de *Leptolyngbya* parecem estar emergindo (Turner, 1997).

Lyngbya (subgrupo III) (Fig. 12). Cianobactérias filamentosas que compartilham uma completa faixa de tipos celulares com *Oscillatoria*, mas que produzem uma bainha firme, distinta e persistente, a qual pode ser fina mas visível por microscopia de contraste de fase, particularmente quando esta bainha se estende além da célula terminal do tricoma. O diâmetro do tricoma varia de 6-80µm. A bainha pode atingir vários µm de espessura em algumas espécies e apresentar laminações, como demonstrado na Fig. 11. As células que formam o tricoma têm forma de disco (mais curtas que largas), sendo que essa é também uma característica de *Oscillatoria*.

Nostoc (subgrupo IV) (Fig. 13). Os tricomas são imóveis, altamente espiralados e compostos de células vegetativas esféricas ou ovóides. Em membros típicos, as hormogônias são retas, distintas na morfologia celular, e móveis. Os heterocistos terminais são diferenciados em ambas as extremidades da hormogônia em maturação; o desenvolvimento subsequente apresenta tricomas contendo heterocistos predominantemente intercalados. A produção de bainha ou formação de mucilagem é típica de muitos membros. Os acinetos são iniciados distantes dos heterocistos, ocorrendo freqüentemente em longas cadeias. Os membros deste gênero apresentam propriedades estruturais similares às dos membros do gênero *Anabaena*. A reprodução ocorre por fissão binária num único plano e os tricomas têm o mesmo diâmetro ao longo de toda sua extensão. Contudo, com algumas poucas exceções, os membros do gênero *Nostoc* são caracterizados por um ciclo de desenvolvimento no qual há a produção de hormogônias que são claramente distintas dos tricomas parentais maduros. As hormogônias novas

não apresentam heterocistos e apresentam motilidade de deslizamento transitória.

Oscillatoria (subgrupo III) (Fig. 14). Cianobactérias filamentosas que dividem-se exclusivamente por fissão binária e num único plano. Os tricomas cilíndricos são retos, flexíveis ou semi-rígidos e não são encobertos por uma bainha. As células com forma de disco são mais largas que longas. O diâmetro do tricoma varia de 4-16 μm . As paredes transversas são geralmente visíveis em microscopia ótica.

Plectonema (subgrupo III ou IV) (Fig. 15). O tipo de espécie, linhagem marinha *Plectonema norvegicum* F3, difere das linhagens de *Leptolyngbya* pelos tricomas mais sinuosos, células mais redondas que não podem tornar-se mais longas que largas, uma bainha mais irregular e a presença de falsas ramificações (Wilmotte, 1991). Ainda é questionável se o gênero *Plectonema* deveria ser mantido ou incluído no gênero *Leptolyngbya*.

Pleurocapsales (subgrupo II) (Fig. 16). Ordem cocóide que se reproduz pela formação de baeócitos (células pequenas e esféricas) que aparecem a partir de fissões múltiplas das células parentais e são liberadas depois da ruptura de sua parede externa fibrosa. O aumento das células vegetativas é acompanhado pelo espessamento da parede externa. A fissão múltipla é uma propriedade fenotípica que distingue os membros desse gênero de todas as outras cianobactérias.

Scytonema (subgrupo IV) (Fig. 17). Apresenta tricomas imóveis, altamente encapsulados e forma numerosas ramificações falsas que exibem um modo de crescimento aéreo. Os heterocistos geralmente apresentam posições

intercaladas, apesar de algumas ramificações falsas apresentar um heterocisto terminal em sua base. As hormogônias são menos encapsuladas e pouco diferem morfológicamente dos filamentos maduros que são suficientemente grandes ($> 10\mu\text{m}$ de diâmetro) para ser visíveis a olho nu.

Synechocystis (subgrupo I) (Fig. 18). Linhagens unicelulares que possuem células esféricas de 2-6 μm de diâmetro e se reproduzem por fissão binária em dois ou três planos em ângulos retos. As células ocorrem em pares ou só nas culturas. Camadas de bainha bem definidas nunca são produzidas.

A distribuição dos gêneros de cianobactérias encontradas nos diferentes locais de coleta mostra que os gêneros *Mastigocladus*, *Calothrix* e *Chroococcus* foram os que apareceram menos freqüentemente. O gênero *Plectonema* foi o único presente em todas as igrejas. Por ordem, as igrejas Nossa Senhora dos Navegantes, Santo Antônio e São Geraldo foram as que apresentaram a maior diversidade de gêneros e Nossa Senhora das Dores apresentou a menor diversidade com apenas três gêneros.

TABELA 2. Número de cianobactérias cocóides e filamentosas presentes nas igrejas

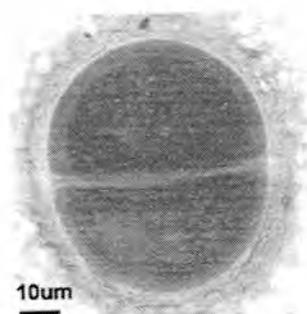
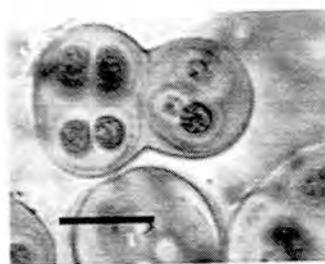
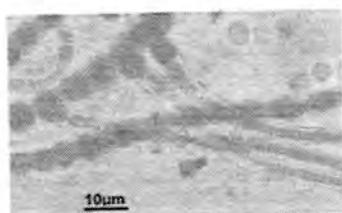
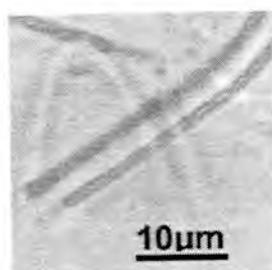
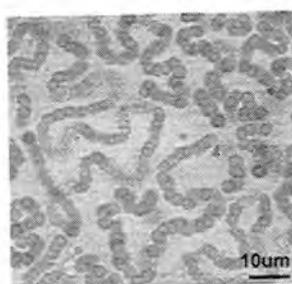
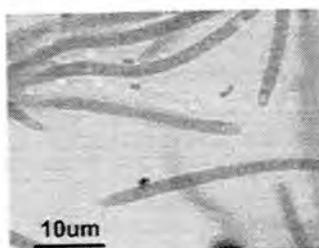
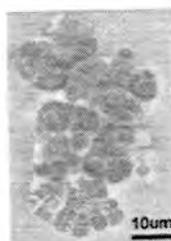
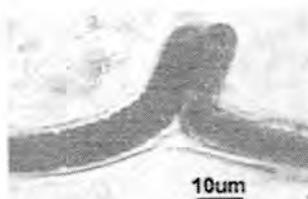
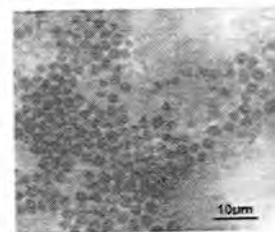
Morfologia/igreja	São José	São Geraldo	Sto. Antônio	São Judas	N.S. Navegantes	N.S. Dores
cocóide	2	6	2	4	4	-
filamentosa	3	2	7	4	6	2

A Tabela 2 mostra o número de cianobactérias cocóides e filamentosas isoladas em cada igreja. Podemos especular sobre estes resultados em

relação à localização das igrejas. A igreja Nossa Sra. dos Navegantes está localizada muito próximo ao lago Guaíba, sendo aquela área mais úmida, o que poderia contribuir para a presença do maior número de cianobactérias nesta igreja. A igreja São Geraldo está localizado na avenida Farrapos à algumas quadras do lago Guaíba. Apesar de um pouco mais distante do lago, também apresentou uma grande variedade de gêneros. É interessante observar que esta igreja está localizada em uma área de intenso tráfego de veículos e está sujeita à poluição dos gases produzidos pelos veículos automotores que ali trafegam (Silva Lima, 1998). Apesar disso, a biodiversidade foi ampla, reafirmando a resistência das cianobactérias à poluentes (Warschied, 1990 e 1996a).

Os tipos de cianobactérias detectados (Tabela 1) enfatizam a baixa diversidade nos biofilmes da igreja Nossa Senhora das Dores, que também era uma das construções visualmente mais limpas. Das cianobactérias detectadas, somente três gêneros (*Plectonema*, *Lyngbya* e *Leptolyngbya*) foram encontradas nessa igreja que localiza-se no centro da cidade, numa área de pouquíssimo tráfego de veículos e próxima ao lago Guaíba. Dadas as condições ambientais favoráveis, era de se esperar uma maior diversidade de gêneros e espécies de cianobactérias neste local. As amostras foram tiradas de áreas descoloridas, perto de calhas para drenagem de água e nos cantos (Fig 4b). A maior quantidade de umidade é provavelmente a razão para a presença de um alto número de algas nestes locais (Crispim *et al.*, 2003; Gillatt & Tracey, 1987). Estes fotótrofos eucarióticos formaram a maior biomassa nesta igreja. A igreja de Sto. Antônio também apresentou um alto número de

algas, mas nesse caso, juntamente com muitos outros microrganismos. Esta é construída com cimento e sua superfície não é pintada. Na base, ocorrem os biofilmes marrons típicos da alga *Trentepohlia* (Fig 1, flecha). A alta biodiversidade concorda com a aparência “desagradável” desta igreja, causada pela presença de extensos biofilmes escuros em suas paredes.

FIG. 7 *Calothrix* sp.FIG. 8 *Chroococcus* sp.FIG. 9 *Gloeocapsa* sp.
(Gaylarde & Gaylarde, 1998)FIG. 10 *Mastigocladus* sp.FIG. 11 *Leptolyngbya* sp.FIG. 12 *Lyngbya* sp.FIG. 13 *Nostoc* sp.FIG. 14 *Oscillatoria* sp.FIG. 15 *Plectonema* sp.FIG. 16 Grupo
PleurocapsaFIG. 17 *Scytonema* sp.FIG. 18 *Synechocystis* sp.

FIGURAS 7-18. Morfologia dos gêneros identificados nos biofilmes.
Fotos tiradas pelo autor. Barras = 10µm.

A presença de *Pleurocapsales* em todos os biofilmes estabelecidos nas igrejas confirma sugestões anteriores desse grupo como indicadores de biofilmes maduros em construções (Gaylarde & Gaylarde, 1999; Shirakawa *et al.*, 2002). Membros da ordem *Pleurocapsales* detectados em culturas de paredes são difíceis de classificar, uma vez que muitos dos isolados não combinam com os gêneros citados em trabalhos modernos. Os organismos identificáveis mais freqüentes em paredes pertencem aos gêneros *Xenococcus*, *Stanieria*, *Chroococcidiopsis*, *Myxosarcina* e o grupo *Pleurocapsa* (Gaylarde e Gaylarde, comunicação particular). Neste trabalho, foram detectados o grupo *Chroococcidiopsis*, o grupo *Pleurocapsa* (Fig. 16) e um membro não identificado da ordem *Pleurocapsales*.

Os grupos *Chroococcales* e *Pleurocapsales* (Subgrupos 1 e 2), formaram a principal biomassa nas igrejas mais deterioradas, São Judas e Santo Antônio. Os membros do grupo *Pleurocapsa* têm sido indicados como um gênero litolítico, uma vez que suas células apicais liberam um líquido que digere carbonato (Mao-Che *et al.*, 1996). *Synechocystis* e *Gloeocapsa* (Ordem *Chroococcales*) também foram declaradas ser capazes de degradar pedra, juntamente com os gêneros filamentosos, *Stigonema*, *Schizothrix* (Hoffman, 1989), agora chamado de *Microcoleus*, *Scytonema* (Golubic *et al.*, 2000) e *Mastigocladus* (Boone *et al.*, 2001). A maioria destes gêneros foi encontrada nas igrejas pesquisadas, demonstrando assim a necessidade de controle destes organismos para a conservação destas construções.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA é um passo importante no desenvolvimento da técnica de identificação de cianobactérias proposta neste trabalho. É necessária a extração de uma quantidade de DNA genômico de boa qualidade, i.e. sem contaminantes e sem degradação, para se ter resultados satisfatórios nas etapas de PCR e seqüenciamento desenvolvidas. De acordo com Trevors (1992), um DNA deve apresentar um valor \geq a 1,8 de razão de absorbância (A1/A2) a 260/280 nm para ser considerado puro. Apesar disso, neste trabalho obtivemos amplificação de fragmentos de DNA por PCR mesmo com um valor de A1/A2 igual a 1,4.

No caso específico de cianobactérias, esse passo é particularmente mais complicado devido ao fato de algumas espécies apresentarem uma parede celular mais espessa que outras, o que torna a extração menos eficiente (Hoiczky & Hansel, 2000). Além disso, alguns desses microrganismos têm estruturas de superfície adicionais (e.g., camada S, e bainha ou cápsula limosa) (Fiore *et al.*, 2000) que complicam a extração de DNA.

Vários métodos de extração de DNA de cianobactérias têm sido relatados, sendo que a maioria deles utiliza a extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, variando apenas nas etapas de lise das células. Alguns métodos combinam o uso da extração com fenol e pérolas de vidro (Billi *et al.*, 1998), lisozima, proteinase K, pérolas de vidro e extração com fenol/clorofórmio (Díez *et al.*, 2001), pérolas de vidro, SDS e fenol/clorofórmio (Nyree *et al.*, 1997), NaOH-SDS, proteinase K e fenol/clorofórmio (Schmalenberger *et al.*, 2001), 2-mercaptoetanol misturado ao TE, lisozima,

Sarcosyl e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Teaumroong *et al.*, 2002). Dentre os métodos que não utilizam fenol/clorofórmio, apenas Marchesi *et al.* (1998) utiliza lisozima, proteinase K e acetato de amônio 7.5M e Fiore *et al.* (2000) utiliza sílica. Contudo, esses métodos são laboriosos e variam de acordo com as espécies e gêneros utilizados (Fiore *et al.*, 2000). A variação dos métodos de acordo com espécies e/ou gênero está provavelmente relacionado à grande diversidade de fenótipos morfológicos encontrados entre as cianobactérias, que variam de organismos unicelulares simples, formas filamentosas ramificadas (ver Figuras 7 a 18), até linhagens com uma estrutura filamentosa ramificada mais elaborada, como *Fischerella* (Figura 12).

A técnica de extração utilizada inicialmente nesse trabalho foi a descrita por Sambrook *et al.* (1989) e envolve o uso da mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico como solventes para a extração. Esta técnica permitiu a extração de boa quantidade de DNA (Figura 19), mas gera rejeitos tóxicos e cria problemas no manejo destes, bem como dificulta o trabalho pelos cuidados necessários para trabalhar com fenol.

A técnica descrita por Fiore *et al.* (2000) e modificada por Sá (2001) também foi utilizada para extração. É uma técnica eficiente e rápida que envolve o uso de sílica para adsorver o DNA e produziu DNA de alto peso molecular e não degradado (Figura 20), com a vantagem de não gerar rejeitos tóxicos. Devido ao fato de não utilizar solventes tóxicos, foi escolhida como técnica padrão para obtenção de DNA de cianobactérias.

4.3 PCR

A amplificação dos fragmentos de rDNA 16S foi obtida usando-se os oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos por Neilan *et al.* (1997, 2002). Duas abordagens foram implementadas: a amplificação de DNA genômico extraído com duas técnicas diferentes, e a amplificação de fragmentos feita diretamente sobre as colônias a fim de comparar a eficiência de cada uma. Várias tentativas foram feitas para obter-se o melhor produto em ambas as abordagens.

4.3.1 PCR de DNA genômico extraído com fenol/clorofórmio

Verificou-se que a presença de DMSO não aumentou a eficiência da reação, como pode ser comprovado pela Figura 21. Aparentemente, o uso de DMSO (que deveria ser um facilitador da reação - www.alkami.com) diminuiu a eficiência da reação, sendo então descartado o uso. A variação das concentrações dos outros reagentes, tais como $MgCl_2$ e dNTPs, não resultou no melhoramento dos resultados, sendo então mantidas as concentrações descritas na literatura (Neilan *et al.*, 1997, 2000). Os fragmentos de DNA amplificados apresentaram o tamanho esperado (800pb) e uma única banda foi obtida em todos os casos.



FIGURA 19. Gel de agarose mostrando DNA genômico extraído de várias amostras. Canaletas 1 a 10: extração com fenol/clorofórmio; Canaleta 11: 2kb Ladder; Canaletas 12 a 19: extração com sílica.

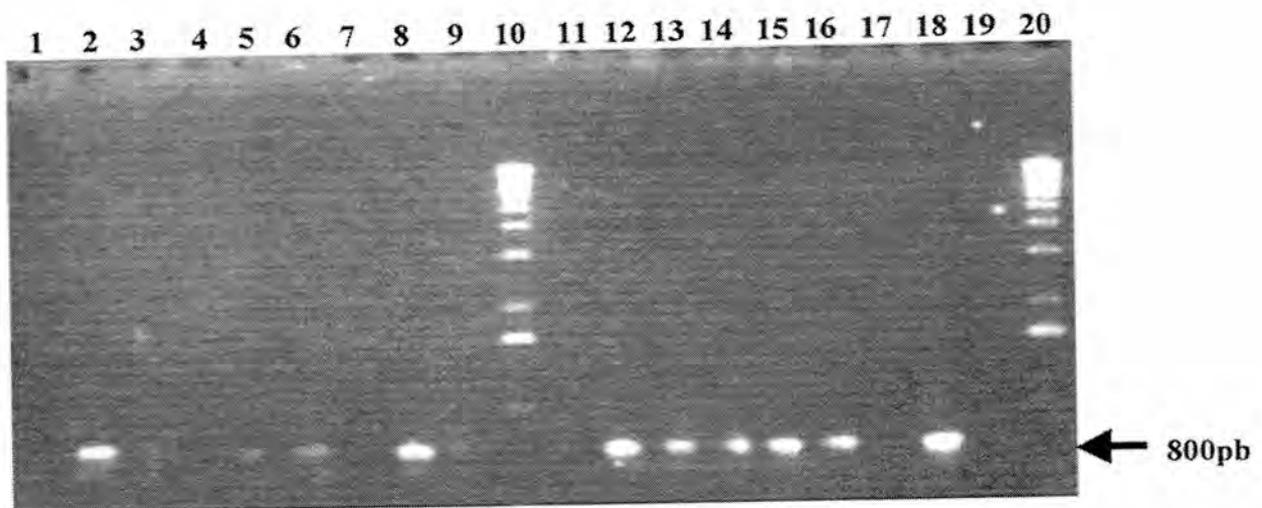


FIGURA 20. Gel de agarose mostrando produtos de PCR de DNA genômico extraído com fenol/clorofórmio. Com DMSO (canaletas 1 a 9) e sem DMSO (canaletas 11 a 19). Canaleta 1, A2; canaleta 2, Ant1; canaleta 3, Nav; canaleta 4, Ant2; canaleta 5, Jud; canaleta 6, Dor; canaleta 7, Ger; canaleta 8, José; canaleta 9, CN (controle negativo); canaleta 10, 2kb Ladder; canaleta 11, A2; canaleta 12, Ant1; canaleta 13, Nav; canaleta 14, Ant2; canaleta 15, Jud; canaleta 16, Dor; canaleta 17, Ger; canaleta 18, Jos; canaleta 19, CN; canaleta 20, 2kb Ladder.

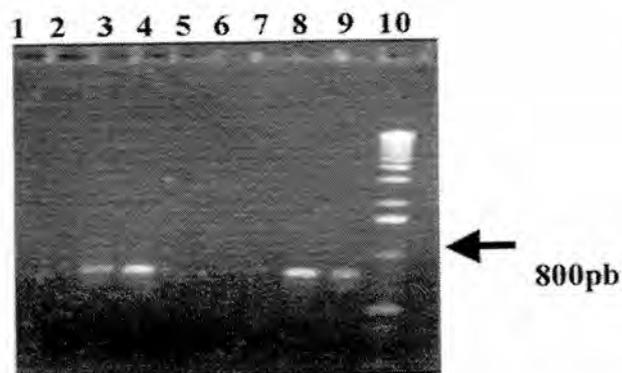


FIGURA 21. Gel de agarose mostrando produtos de PCR de DNA genômico extraído com sílica pelo método de Sá (2001). Canaleta 1, CN (controle negativo); canaleta 2, Nav4; canaleta 3, Nav8; canaleta 4, C4; canaleta 5, Jud5; canaleta 6, Jud6; canaleta 7, Jud7; canaleta 8, C3b; canaleta 9, D2b; canaleta 10, 2kb Ladder.



FIGURA 22. Gel de agarose de amostras submetidas á uma reação de PCR feito diretamente sobre as colônias. Canaleta 1, 2kb Ladder; Canaleta 2, A1; Canaleta 3, A2; Canaleta 3, A4; Canaleta 5, C1; Canaleta 6, C3b; Canaleta 7, C4; Canaleta 8, D1; Canaleta 9, D2b; Canaleta 10, Controle positivo; Canaleta 11, D6; Canaleta 12, controle negativo; Canaleta 13, 2kb Ladder.

4.3.1.2 PCR da extração com sílica

A amplificação do DNA extraído com sílica também apresentou resultados satisfatórios. Uma única banda foi observada e de tamanho previsto. Deve-se tomar cuidado com a purificação do DNA para que o PCR não seja inibido pela presença de sílica, como mostra a Figura 22. As amostras 2, 5, 6 e 7 estavam contaminadas com sílica e não apresentaram produto de amplificação.

4.3.2 PCR direto

Outra técnica testada para auxiliar na identificação das cianobactérias foi o chamado PCR direto. Essa reação é feita diretamente sobre as colônias obtidas das placas de Petri. Usando o método de lise direta (lise das células sem extrair o DNA) pode-se extrair altas quantidades de DNA intacto.

Após várias tentativas sem sucesso, foi possível finalmente obter um resultados positivos com fragmentos amplificados de tamanho esperado. A figura 22 mostra um dos problemas encontrados com o uso dessa técnica. Podemos observar que das amostras testadas, somente quatro (5, 6, 7 e 9) apresentaram resultado positivo, todos apresentando fragmentos amplificados do tamanho esperado. As outras canaletas apresentaram resultados negativos sugerindo que as reações estavam sendo inibidas, ou que as células não estavam sendo lisadas eficientemente. Foi verificado a presença de impurezas na forma de pedaços de metal que descolavam da agulha no momento da coleta das amostras da placa. Após coletar as amostras, a agulha era flambada em bico de Bunsen e isto favorecia o desprendimento de lascas de metal que

ficavam soltas dentro dos tubos, inibindo a reação. A substituição da agulha por um palito de madeira não foi possível, pois a ponta era demasiadamente grossa para coletar as amostras, o que dificultava o trabalho. O problema foi superado utilizando-se agulhas novas com muito cuidado, e diminuição da intensidade da flambagem para evitar a oxidação do metal e o conseqüente desprendimento de lascas.

Esta técnica é interessante pelo fato de não ser necessário o uso de substâncias químicas ou enzimas para a extração do DNA. Isto é particularmente importante considerando-se a toxicidade de alguns solventes e também do ponto de vista econômico. A principal vantagem dessa técnica é o fato não ser necessário cultivar as células em meio específico. Colônias individuais podem ser coletadas do biofilme e submetidas ao PCR direto. Também é possível coletar uma parte do biofilme e aplicar-se a técnica diretamente sobre ele. Nesse caso, várias cianobactérias presentes terão seu DNA extraído e amplificado, fazendo-se necessário o uso de uma técnica capaz de separar DNAs de microrganismos diferentes mas com o mesmo número de pares bases (DGGE e TGGE). Se for o caso de se reidratar o biofilme, as células e as microcolônias já presentes, serão facilmente coletadas se estiverem isoladas. Uma outra vantagem dessa técnica é o fato de ser rápida e simples, envolvendo apenas o congelamento e descongelamento das amostras entre cinco e seis vezes.

4.4 Seqüenciamento dos produtos do PCR e análise das seqüências

Foram produzidas várias seqüências dos produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores 27F1 e 408R no laboratório do Dr. Brett Neilan, da Universidade de New South Wales, Austrália (UNSW). Esta parte do trabalho foi desenvolvido pela professora Christine Gaylarde.

As seqüências obtidas da unidade de seqüenciamento da UNSW variaram em relação à sua qualidade. Algumas seqüências, tais como mostradas na Figura 24, foram inúteis aparentemente por causa das baixas quantidades de DNA. É provável que o DNA amplificado tenha sido perdido durante os estágios de purificação, uma vez que o fragmento purificado foi submetido à unidade de seqüenciamento da UNSW sem ser corrido em gel de agarose (Esse era o procedimento recomendado). Outras, tais como a Figura 25, mostraram seqüências misturadas. Há duas razões possíveis para isso. Primeiro a amostra usada pode não ter sido unicianobacteriana. Apesar de tipos morfológicos similares terem sido usados para a extração do DNA ou PCR direto, não há garantia de que apenas uma espécie estava presente, exceto nos casos onde filamentos únicos e bem separados foram selecionados. Alternativamente, os iniciadores podem ter se pareado em mais de um local no DNA. Sabe-se que isto ocorre com iniciadores de ITS usados para o domínio Bactéria (Rainey *et al.*, 1996), mas não se considerou o fato disto ter ocorrido para os iniciadores usados neste trabalho à esta temperatura de pareamento (B. Neilan, comunicação pessoal). Os géis de agarose mostraram a presença de apenas uma banda, indicando que, se fosse produzido mais de um produto de amplificação, eles seriam de tamanhos

similares. O DGGE poderia ter solucionado estes problemas, mas infelizmente esta técnica não estava disponível.

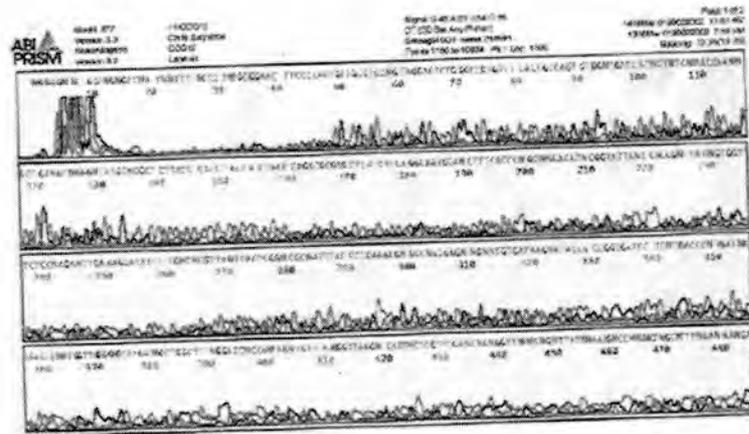


FIGURA 24 Escaneamento do seqüenciamento de uma amostra com pouco DNA

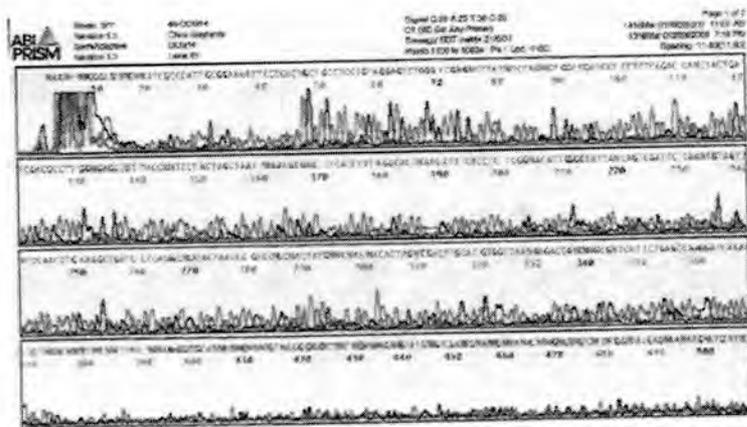


FIGURA 25 Escaneamento do seqüenciamento de uma amostra com DNA misturado

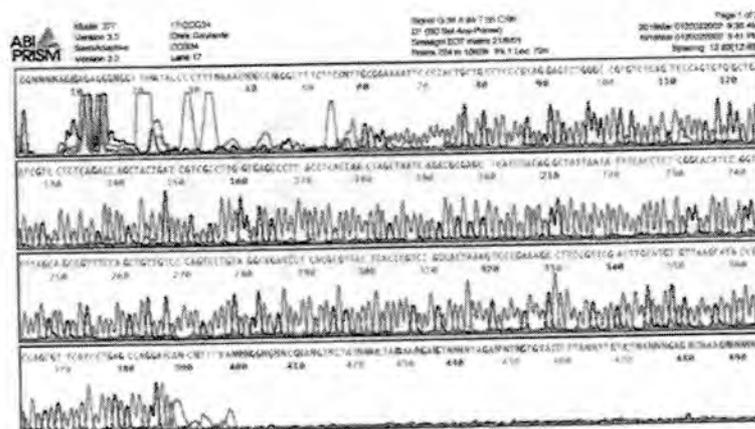


FIGURA 26 Escaneamento do seqüenciamento de uma amostra apropriada

As seqüências apropriadas, aquelas que apresentaram picos grandes e bem separados (e.g., Figura 26), foram submetidas à análise pelo algoritmo BLAST, após terem sido imprimidas e corrigidas manualmente. Somente em alguns casos as seqüências submetidas ao BLAST mostraram homologia (>96%) com organismos com seqüências depositadas nos bancos de dados (Tabela 3). Contudo, essas “identificações” freqüentemente não concordaram com a morfologia observada. Isso pode ser a consequência do fato de que quase todas as seqüências de cianobactérias depositadas até o presente são de ambientes aquáticos ou polares. As cianobactérias no ambiente específico das paredes das igrejas estudadas, sujeitas à repetidas dessecações e altos níveis de UV, são aparentemente diferentes daquelas que têm sido investigadas em outros ambientes e em outras partes do mundo.

A Tabela 3 apresenta a relação entre a morfologia verificada pela microscopia e os resultados de similaridade e homologia produzidos pelo programa BLAST. O maior nível de homologia foi apresentado pela amostra B1 (isolado nº 07), que pela morfologia parece ser do gênero *Plectonema* (Figura 15), mas obteve 99% de homologia com *Microcoleus sociatus* de acordo com BLAST. A seqüência de *M. sociatus* foi depositada por Garcia-Pichel *et al.* (2001), que comentaram em seu artigo que este gênero necessita reclassificação. A foto publicada no artigo mostra que o isolado não tinha a morfologia típica de *Microcoleus*, uma vez que ela não apresentou filamentos múltiplos dentro de uma bainha única. Em vista da alta homologia desta seqüência com aquela da amostra B1 (isolado nº 07), é provável que estas sejam idênticas, ou pelo menos espécies intimamente relacionadas, que, de

acordo com a morfologia de nosso isolado, pertencem ao gênero (ainda imperfeitamente definido) *Plectonema*.

TABELA 3. Similaridade mais próxima com seqüências cianobacterianas depositadas e porcentagem de homologia do DNA extraído de amostras de cianobactérias de biofilmes em igrejas de Porto Alegre, dada pelo programa BLAST.

Código*	Morfologia	Similaridade e % de homologia
C1 (44)	<i>Scytonema</i> (Fig 26)	<i>Cyanospira rippkae</i> / <i>Anabaena</i> PCC 7120 95%
C3a (38)	<i>Lyngbya</i> (Fig. 30)	<i>Phormidium murrayii</i> 94%
D6 (08)	<i>Lyngbya</i> (Fig. 27)	<i>Phormidium murrayii</i> 95%
D5b (14)	<i>Lyngbya</i> (Fig. 31)	<i>Phormidium autumnale</i> 93%
D1 (28)	<i>Lyngbya</i> (Fig. 32)	<i>Plectonema boryanum</i> / <i>Leptolyngbya</i> PCC 73110/ <i>Oscillatoria</i> sp. 90%
C8 (32)	<i>Plectonema</i> (Fig. 28)	<i>Plectonema boryanum</i> / <i>Leptolyngbya</i> PCC 73110/ <i>Oscillatoria</i> sp. 90%
S1 (16)	<i>Scytonema</i> (Fig. 17)	<i>Anabaena</i> PCC 7120 92%
D3 (34)	<i>Leptolyngbya</i> (Fig. 29)	<i>Leptolyngbya</i> sp. 97%
B1 (07)	<i>Plectonema</i> (Fig. 15)	<i>Microcoleus sociatus</i> 99%

*Os números entre parênteses são representados nos dendrogramas e correspondem às amostras.

A próxima homologia mais alta foi apresentada pelas amostras D3 (isolado nº 34), que morfologicamente parece ser do gênero *Leptolyngbya* (Figura 29) e apresentou 97% de similaridade com *Phormidium murrayii* (o nome botânico do gênero *Lyngbya*). As porcentagens de similaridade dos outros isolados são baixo demais para inferir o gênero.

A retirada da região hipervariável das seqüências resultou em poucas diferenças nas porcentagens de homologia entre as amostras e cianobactérias nos bancos de dados. Entretanto, não apareceram similaridades com bactérias não fotossintetizantes, fato este que ocorreu com a análise das seqüências inteiras, mostrando assim uma melhoria nos resultados.

Embora alguns resultados tenham apoiado a identificação dos isolados, maiores estudos são indicados para aprimorar a técnica, tais como, o uso de ambos os iniciadores no seqüenciamento, e o emprego de outros iniciadores para conseguir seqüências maiores. Genes não ribossomais também podem ser utilizados. Fox *et al.* (1992) consideram que as informações da seqüência do rRNA 16S não eram suficientes para estabelecer a identidade de espécies e assim, não eram apropriadas para estudos em nível subgenérico.

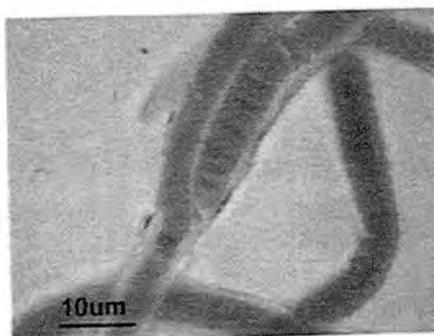


FIG. 26 Isolado no. 44

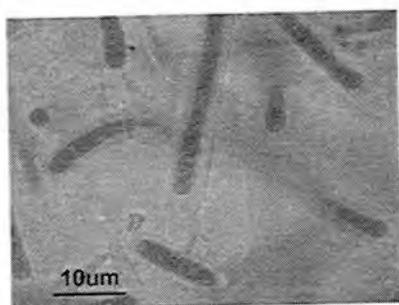


FIG. 27 Isolado no. 8

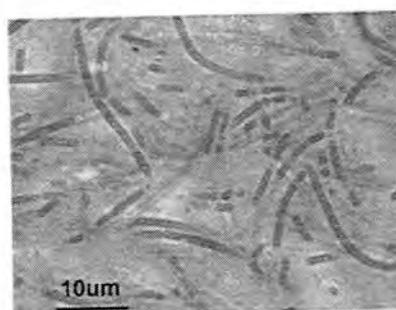


FIG. 28 Isolado no. 32

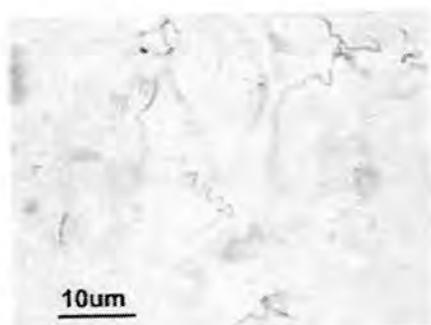


FIG. 29 Isolado no. 34

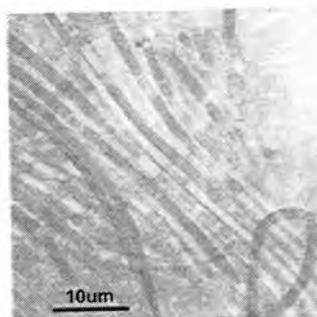


FIG. 30 Isolado no. 38

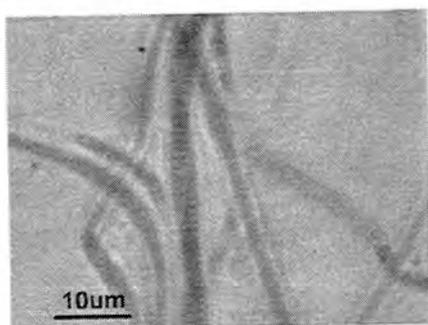


FIG. 31 Isolado no. 14

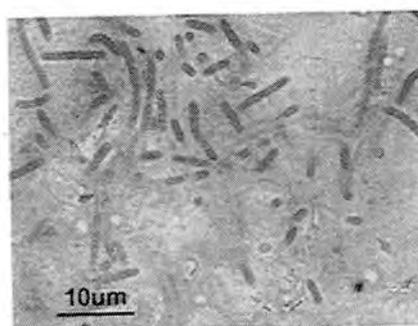


FIG. 32 Isolado no. 28

FIGURAS 26-32. Morfologia dos isolados sequenciados. Fotos tiradas pelo autor.

4.5 Árvores baseadas nas seqüências de rRNA 16S cianobacteriano

Os dendrogramas foram construídos de acordo com o programa Clustal X com o "bootstrap" de 1000 vezes (Felsenstein, 1985), com e sem as regiões hipervariáveis.

4.5.1 Análise do dendrograma com região hipervariável

A análise do dendrograma das amostras obtidas no estudo foi feita comparando-se as seqüências destas com as de outras cianobactérias obtidas nos bancos de dados utilizados pelo BLAST. Nesta primeira análise, foi mantida a região do RNA 16S que é hipervariável para todas as seqüências. Como podemos observar no dendrograma (Figura 33), houve a formação de três grupos principais de similaridade.

O primeiro grupo é formado por duas ramificações, que incluem a amostra 44 na primeira e as amostras 8 e 38 na segunda. A amostra 44 (morfologicamente *Scytonema*, Figura 27) agrupa-se próxima à *Nodularia harviani* PCC7804 que está na mesma raiz de *Anabaena* PCC7120 (também classificada como *Nostoc*). Apesar de parecer incorreto, este resultado pode-se explicar pelo fato de que foi utilizado apenas uma parte (aproximadamente 400 pb) da seqüência do rRNA 16S indicando que há a possibilidade destes microrganismos agruparem-se juntos pelo fato de suas seqüências coincidirem exatamente nesses locais. Uma análise de seqüências mais longas poderia resolver esse problema, considerando-se que o gene completo apresenta aproximadamente 15000pb. Por outro lado, estudos comparativos com produtos de amplificação de somente 120pb têm fornecido resultados

interessantes (Erdman et al., 1985) e é igualmente provável que a íntima relação demonstrada por esta análise filogenética entre a amostra 44 e os dois gêneros morfológicamente diferentes, indica a inadequação da atual taxonomia de cianobactérias (Neilan, 1997; Castenholz, 2001). Várias coleções de culturas contêm cianobactérias incorretamente identificadas (Komárek, 1994) e Otsuka *et al.* (1999) também anotaram que a filogenia baseada nas informações sobre a região ITS não se correlaciona perfeitamente com morfoespécies de *Microcystis* ou com a produção de ficoeritrina, apesar de ter ficado evidente a concordância com a produção de microcistina.

A segunda ramificação deste grupo apresenta o isolado no. 08 com 95% de similaridade com *P. murrayii* e sua morfologia (Figura 27) indica ser um organismo similar. A amostra 38 com 96% de similaridade com *P. murrayii* também apresentou morfologia de acordo com este gênero (Figura 30).

No segundo grupo, encontramos duas ramificações principais. A primeira apresenta a amostra nº 34 agrupada na mesma raiz de *Leptolyngbya* sp. A julgar pela sua morfologia, são provavelmente o mesmo microrganismo (Figura 30). Neste grupo encontramos *Microcoleus sociatus* MP196M agrupado na mesma raiz do isolado nº 07. Pela suas posições no dendrograma, poderiam ser o mesmo organismo. Contudo a amostra nº 07 apresentou morfologia de *Plectonema* (Figura 15), que difere muito da morfologia de *Microcoleus sociatus*, o que nos faz crer que a amostra nº 07 não pertence ao gênero *Microcoleus*, como foi discutido na seção 4.4.

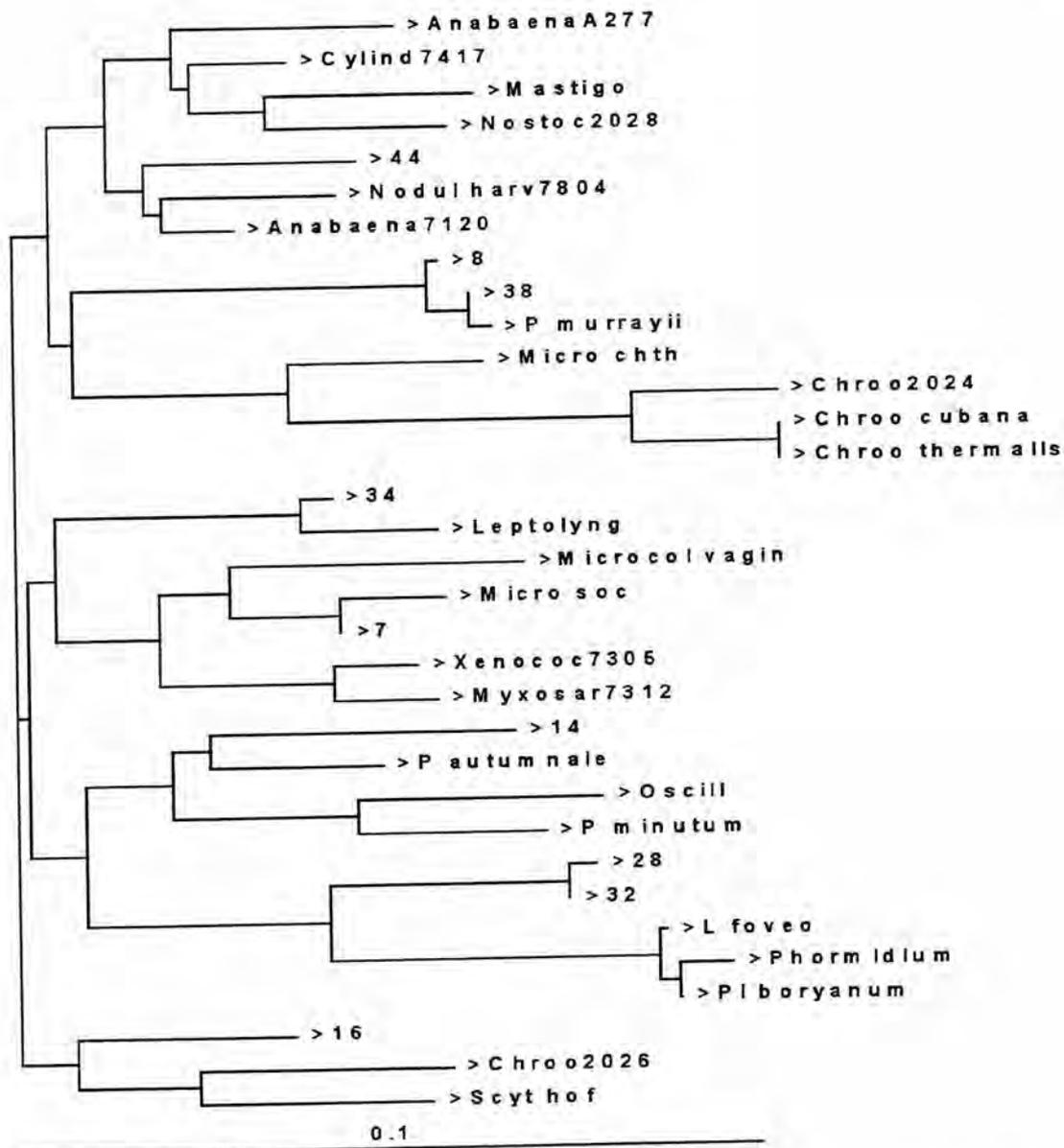


FIGURA 33. Dendrograma construída utilizando-se as seqüências inteiras dos produtos do PCR. Abreviações utilizadas: Cylind, *Cylindrospermum* PCC7417; Mastigo, *Mastigocladus laminosus*; Nodul harv, *Nodularia harviani* PCC 7804; P, *Phormidium*; Micro chth, *Microcoleus chthonoplastes*; Chroo, *Chroococcidiopsis*; Leptolyng, *Leptolyngbya*; Microcol vagin, *Microcoleus vaginatus*; Micro soc, *Microcoleus sociatus*; Xenococ, *Xenococcus*; Myxosar, *Myxosarcina*; Oscill, *Oscillatoria*; O, *Oscillatoria*; L, *Lyngbya*; Pl, *Plectonema*; Scyt hof, *Scytonema hofmanni*. A escala mostra uma diferença de 10%.

Na segunda ramificação deste grupo, encontramos o isolado nº 14 na mesma raiz de *Phormidium autumnale*, com 93% de similaridade, o qual é considerado um nível baixo, apesar da morfologia (Figura 32) ser consistente com a identificação. Os isolados 28 e 32, apesar de se agruparem na mesma raiz, tiveram 91% de similaridade com *Oscillatoria* sp. e 90% de similaridade com *Plectonema boryanum*, respectivamente. Estas similaridades são baixas, indicando assim que a identidade destas amostras através da biologia molecular não é confiável. Os isolados 28 e 32 apresentaram a mesma morfologia (Figuras 33 e 29, respectivamente) e foram isolados da mesma igreja. É provável que sejam o mesmo organismo, que não foram capazes de serem identificados pelas técnicas moleculares empregadas. Na verdade, as seqüências diferem por somente uma base, na posição 17, no qual o G da amostra 17 torna-se um T na amostra 32. Provavelmente, trata-se de um erro do seqüenciamento.

O terceiro grupo deste dendrograma apresenta o isolado nº16 agrupado com *Chroococciopsis* SAG 2026 e *Scytonema hofmanni*, sendo que sua morfologia indica ser uma espécie de *Scytonema* (Figura 17). *S. hofmanni* é a única espécie de *Scytonema* encontrada no banco de dados, enfatizando a necessidade de mais seqüências serem depositadas.

4.5.2. Análise do dendrograma sem região hipervariável

A análise do dendrograma sem as regiões hipervariáveis (Figura. 34) excluiu a presença de bactérias não fotossintetizantes em altos níveis de similaridade quando as seqüências foram submetidas ao algoritmo BLAST. A

distribuição das amostras no dendrograma, contudo, foi exatamente a mesma que se observou quando da análise com as regiões hipervariáveis ainda presentes nas seqüências. Por outro lado, a árvore evolutiva mais provável ficou muito diferente daquela obtida com as seqüências inteiras. Por exemplo, no dendrograma com as regiões hipervariáveis, a amostra nº 16 formou um grupo isolado (grupo 3) com *Chroococidiopsis* SAG2026 e *Scytonema hofmanni*. Já no dendrograma sem as regiões hipervariáveis, ela agrupou-se com os mesmos microrganismos, mas no grupo 1 que é altamente ramificado.

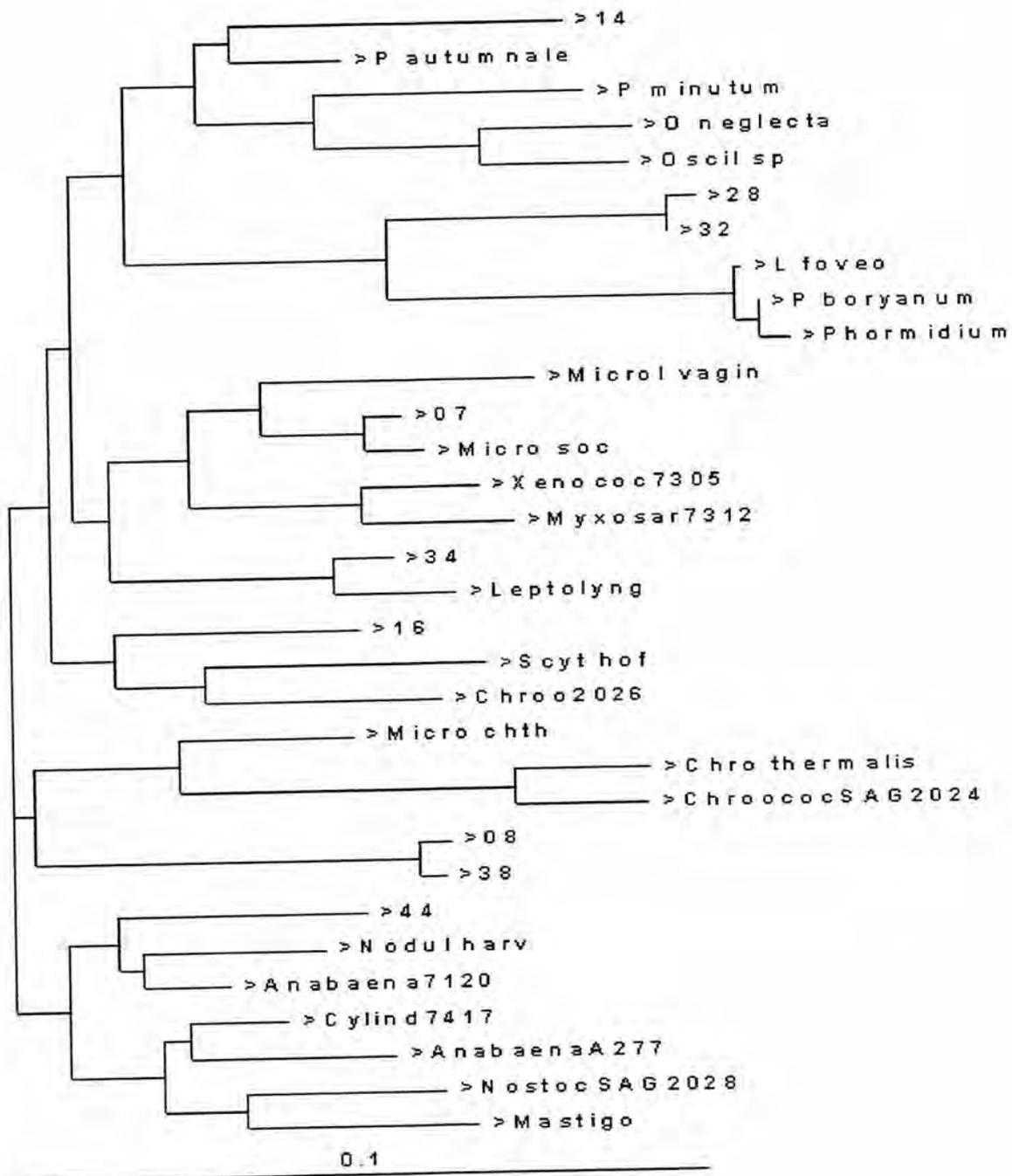


FIGURA 34. Dendrograma construído utilizando-se as seqüências dos produtos do PCR sem a região hipervariável. As abreviações utilizadas são iguais àquelas da Fig. 33. A escala mostra uma diferença de 10%.

A análise por “bootstrap” não nos diz se o nosso método de calcular árvores está correto, ou se nosso modelo de evolução está correto, ou mesmo se genes como o 16S são representantes da história evolutiva “verdadeira”. Ele somente nos diz se temos dados de seqüências suficientes para aplicar aos nossos modelos. Também é importante salientar que Wilmotte & Herdman (2001), especialistas em filogenia e biologia molecular de cianobactérias, sugerem que tentativas de agrupar os gêneros de cianobactérias filogeneticamente são prematuras no presente momento.

Apesar dos problemas ainda inerentes à análise de cianobactérias em biofilmes por biologia molecular, estes métodos adicionam-se às técnicas morfológicas tradicionais e permitem uma análise mais rápida, evitando a necessidade de cultivo. A análise molecular fornece uma boa base para determinar a sistemática, estrutura de populações e diversidades cianobacterianas. O aprimoramento das técnicas, junto com bancos de dados mais completos, ofereceria uma grande ferramenta para a identificação das cianobactérias em biofilmes terrestres.

As igrejas estudadas neste projeto foram todas construídas no século passado. Apesar de algumas serem tombadas pelo Patrimônio Cultural, elas são recentes no sentido global. Os materiais usados em suas construções são modernos e são assim, menos resistentes à colonização biológica e à deterioração (Lisci *et al.*, 2003). Portanto, é ainda mais importante que elas sejam estudadas para que, uma vez conhecendo-se os microrganismos responsáveis por sua degradação, seja possível propor métodos de proteção e desta forma preservar o Patrimônio Histórico e Cultural.

5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que pelo menos oito gêneros de cianobactérias filamentosas (*Calothrix*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Mastigocladus*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Plectonema* e *Scytonema*) e quatro gêneros/ordens de cianobactérias cocóides (*Chroococcus*, *Gloecapsa*, *Pleurocapsales* e *Synechocystis*), entre eles cianobactérias conhecidas como degradadoras de pedra, estão presentes nas paredes externas de igrejas em Porto Alegre.

Estes microorganismos formaram a principal biomassa microbiana nas amostras de biofilmes em igrejas que apresentaram um óbvio processo de deterioração.

Foram observados baixos níveis de similaridade entre as seqüências dos microorganismos detectados e aquelas depositadas nos bancos de dados.

O isolamento de colônias puras de cianobactérias do biofilme foi um processo altamente difícil e trabalhoso devido à presença de uma grande diversidade microbiana contaminante.

O PCR direto desenvolvido neste trabalho apresentou-se rápido e fácil de ser implementado, evitando o uso de solventes para a extração do DNA e o crescimento das células em meio de cultivo.

As técnicas de biologia molecular utilizadas para a identificação de cianobactérias em biofilmes demonstraram-se até o presente momento, pouco apropriadas e devem ser utilizadas juntamente com outras técnicas de identificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLSOPP, D; SEAL, K.J. **Introduction to Biodeterioration**. Londres: Edward Arnold (ed.), 1986. 136 p. Cap. 2: Natural Materials. p.25-29.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. III. *Oscillatoriales*. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.80, n. 3, p.327-472, 1988.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. IV. *Nostocales*. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.82, n. 3, p.247-345, 1989.

ANTÓN, A.I.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. **J. Molec. Evol.** Heidelberg, v.47, n. 1, p.62-72, 1998.

ARNOLD, A. **Composition-mechanical properties - porosity and humidity - diagnosis of stone material - pollution effect**. In: CONGRÈS INTERNATIONAL SUR LA CONSERVATION DE LA PIERRE ET AUTRES MATÉRIAUX, 1993, Paris. **Proceedings...** [S.l. : s.n.], [1993?]. p. 23-29.

BILLI, D. et al. A method for DNA extraction from the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* and its application to identification of *ftsZ*. **Appl. Env iron. Microbiol.**, Washington, v.64, n.10, p.4053-4056, 1998.

BOLCH, C.J.S. et al. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP on the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions. **J. Phycol.**, Malden, v.32, n. 3, p.445 - 451, 1996.

BOROWITZKA, L.J. Osmoregulation in blue-green algae. **Progr. in Phycol. Res.**, Bristol, v.4, p.243-256, 1986.

BOYER, S.L.; FLECHTENER, V.R.E.; JOHANSEN, J.R. Is the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v.18, n. 6, p.1057-1069, 2001.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. **Phylogenetic Relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences**. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd. ed. New York: Springer Verlag, 2001. vol. 1. p.487-493.

BROCK, T.D. et al. **Biology of Microorganisms**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1994. 991p.

CALDWELL, D.E. et al. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. **Adv. Dent. Res.**, Princeton, v.11, p.4-13, 1997.

CANEVA, G. et al. **Pitting of marble roman monuments and the related microflora**. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 7., 1992, Lisboa. **Proceedings...** [S.l. : s.n.], [1993?]. p. 521-526.

CANEVA, G.; SALVADORI, O. **Biodeterioration of stone**. In: THE DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 1989, Paris. **Proceedings.....** [S.l. : s.n.], [1993?]. p.182-234.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. **Cyanobacteria**. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1989. v.3, p.1710-1727.

CASTENHOLZ, R.W. **Phylum BX Cyanobacteria**. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York: Springer-Verlag, 2001. p.472-480.

CASTENHOLZ, R.W. **Microbial Mats: Stromatolites: Composition of hot spring microbial mats: a summary**. New York: [s.n.], 1984. p.101-119.

CHAROLA, A.E. **General report on prevention and treatment. Cleaning, biocides and mortars**. In: CONGRÉS INTERNATIONAL SUR LA CONSERVATION DE LA PIERRE ET AUTRES MATÉRIAUX, 1993, Paris. **Actes...** Paris : UNESCO. p.65-68.

CHAZAL, N.M.; SMITH, G.D. Characterization of a brown *Nostoc* species from Java that is resistant to high light intensity and UV. **Microbiology**, Reading, v.140, Part 11, p.3183-3189, 1994.

CHEN, X.; WIDGER, W.R. Physical genome map of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. **J. Bacteriol.**, Washington, v.175, n. 16, p.5106-5116, 1993.

COCKELL, C.S. Ultraviolet radiation, evolution and the π -electron system. **Biol. J. Linn. Soc.**, Londres, v.63, n. 3, p.449-457, 1998.

COSTERTON, J.W. et al. Microbial Biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.49, p.711-745, 1995.

COSTERTON, J.W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.41, p.453-464, 1987.

- CRISPIM, C.A.; GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. **Current Microbiol.**, Heidelberg, v.46, n. 2, p.79-82, 2003.
- DANIN, A.; CANEVA, G. Deterioration of limestone walls in Jerusalem and marble monuments in Rome caused by cyanobacteria and cyanophilous lichens. **Int. Biodeterior.**, Londres, v.26, n. 6, p.397-417, 1990.
- DARLINGTON, A. **Ecology of Walls**. Londres: Heinemann, 1981.
- DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiol. Molecular Biology Reviews**, Washington, v.64, n. 4, p.847-867, 2000.
- DÍEZ, B. et al. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with other Molecular Techniques. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v.67, n. 7, p.2942-2951, 2001.
- DOERS, M.P.; PARKER, D.L. Properties of *Microcystis aeruginosa* and *M. flos-aquae* (Cyanophyta) in culture: taxonomic implications. **J. Phycol.**, Malden, v.24, n. 4, p.502-508, 1988.
- DOUGLAS, S.; BEVERIDGE, T.J. Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Amsterdam, v.26, n. 2, p.74-88, 1998.
- EDWARDS, K.J. et al. An archeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. **Science.**, Washington, v.287, n.5459, p.1796-1799, 2000.
- ERDMAN, V.A. et al. Collection of published 5S, 5.8s and 4.5s ribosomal RNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, Tokyo, v.13[Suppl], p.105-153, 1985.
- ESKEW, D.L. et al. DNA amplification fingerprinting of the symbiosis. **Plant Mol. Biol.**, Dordrecht, v.21, n. 2, p.363-373, 1993.
- EVANS, E.H.; FOULDS, I.; CARR, N.G. Environmental conditions and morphological variation in the blue-green alga *Chlorogloela fritschii*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.92, p.147-155, 1976.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, Lawrence, v.39, n. 4, p.783-791, 1985.

FERRIS, M.J. et al. Enrichment culture and microscopy conceal diverse thermophilic *Synechococcus* populations in a single hot spring microbial mat habitat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, n. 3, p.1045-1050, 1996.

FIORE, M.F. et al. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **J. Microbiol. Method.**, Amsterdam, v.39, n. 2, p.159-169, 2000.
FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK Jr. P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Reading, v.41, n. 1, p.166-170, 1992.

GARCIA-MARTINEZ, J.A. et al. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the RNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K12. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, n. 21, p.6374-6377, 1996.

GARCIA-PICHEL, F.; LÓPEZ-CORTÉS, A.; NÜBEL, U. Phylogenetic and Morphological Diversity in Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.67, n.4, p.1902-1910, 2001.

GARCIA-PICHEL, F.; SHERRY, N.D.; CASTENHOLZ, R.W. Evidence for ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. **Photochem. Photobiol.**, Lawrence, v.56, n. 1, p.17-23, 1992.

GARCIA-PICHEL, F.; BELNAP, J. Microenvironments and microscale productivity of cyanobacterial desert crusts. **J. Phycol.**, Malden, v.32, n. 5, p.774-782, 1996.

GARZA, D.R.; SUTTLE, C.A. The effect of cyanophages on the mortality of *Synechococcus* spp. and selection for UV resistant viral communities. **Microb. Ecol.**, Heidelberg, v.36, n. 3, p.281-292, 1998.

GAYLARDE, C.C.; MORTON, L.H.G. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**: Biodeterioration of mineral materials. New York: Wiley, 2001. p.516-527.

GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C. A Rapid Method for the Detection of Algae and Cyanobacteria on the External Surfaces of Buildings. In: LABS 3 - LATIN AMERICAN BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION SYMPOSIUM, 3., 1998, Florianópolis. **Proceedings...** Londres : The Phycological Society, [1998?]. 1 CD-ROM. Paper n. 37.

- GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C. Algae and cyanobacteria on painted surfaces in Southern Brazil. **Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.30, n. 3, p.209-213, 1999.
- GAYLARDE, C.C.; MORTON, L.H.G. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a Review. **Biofouling**, Londres, v.14, n.1, p.59-74, 1999.
- GAYLARDE P.M.; GAYLARDE, C.C. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. **Internat. Biodet. Biodeg.**, London, v.46, n. 2, p.93-97, 2000a.
- GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M. Biodeterioration of external painted walls and its control. In: RILEM WORKSHOP ON MICROBIAL IMPACTS ON BUILDING MATERIALS, 2000, São Paulo. **Proceedings**....[S.l. : s.n.], [2000?]. 2000b. Paper 4.
- GILLATT, J.W. The need for antifungal and antialgal additives in high performance surface coatings. **Surface Coatings Internat.**, Londres, v.74, n. 6, p.6-12, 1991.
- GILLATT, J.W.; TRACEY, J.A. The biodeterioration of applied surface coatings and its prevention. In: BIODETERIORATION of Constructional Materials. Kew: Biodeterioration Society, 1987. p.103-112. .
- GLAUNER, B.; HÖLTJE, J.V.; SCHWARZ, U. The composition of the murein of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.263, n. 21, p.10088-10095, 1988.
- GLEASON, F.K.; BAXA, C.A. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on eukaryotic microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.**, Heidelberg, v.33, n. 1, p.85-88, 1986.
- GIOVANNONI, S.J. et al. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **J. Bacteriol.**, Washington, v.170, n. 8, p.3584-3592, 1988.
- GOLUBIC, S.; FRIEDMAN, E.; SCHNEIDER, J. The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. **J. Sediment. Petrol.**, Albuquerque, v.51, n. 2, p.475-478, 1981.
- GOLUBIC, S.; SEONG-JOO, L.; BROWNE, K.M. Cyanobacteria: architects of sedimentary structures. In: MICROBIAL Sediments. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2000. p.57-67
- GÓMEZ-ALARCÓN, G.; MUÑOZ, M.L.; FLORES, M. Excretion of organic acids by fungal strains isolated from decayed sandstone. **Internat. Biodet. Biodeg.**, Londres, v.34, n. 2, p.169-180, 1994.
- GRIFFIN, P.S.; INDICTOR, N.; KOESTLER, R.J. The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories and treatment. **Int. Biodeterior.**, Londres, v.28, n. 1-4, p.187-208, 1991.

GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, Reading, v.142, Part 1, p.3-16, 1996.

HANSEL, A.F. et al. Cloning and characterization of the genes coding for two porins in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1399, n. 1, p.31-39, 1998.

HERDMAN, M. et al. Genome size of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.111, Mar., p.73-85, 1979.

HERDMAN, M.; RIPPKA, R. Cellular differentiation: hormogonia and baeocytes. **Methods Enzymol.**, Londres, v.167, p.232-242, 1988.

HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J.; FUCHS, R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. **Com. Appl. Biosc.**, Trier, v.8, n. 2, p.189-191, 1992.

HOFFMAN, L. Algae of terrestrial habitats. **Botanical Reviews**, Nova Yorque, v.55, n. 2, p.77-105, 1989.

HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. Minireview. **J. Bacteriol.**, Washington, v.182, n. 5, p.1191-1199, 2000.

HOICZYK, E.; BAUMEISTER, W. Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v.177, n. 9, p.2387-2395, 1995.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1994, 787p.

JATON, C.; ORIAL, G.; BRUNET, A. **Actions des vegetaux sur les materiaux pierreux**. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 5., 1985, Lausanne. **Proceedings...** [S.l. : s.n.], [1993?]. v.2, p.577-582.

JAVOR, B.J.; CASTENHOLZ, R.W. Laminated microbial mats, Laguna Guerrero Negro, Mexico. **J. Geomicrobiol.**, Londres, v.2, n. 3, p.237-274, 1981.

JONES, D.; WILSON, M.J.; MCHARDY, W. J. Effects of lichens on mineral surfaces. **Biodeterioration**, London, v.7, p.129-134, 1988.

JÜRGENS, U.J.; DREWS, G.; WECKESSER, J. Primary structure of the peptidoglycan of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6714. **J. Bacteriol.**, Washington, v.154, n. 1, p.471-478, 1983.

JÜRGENS, U.J.; WECKESSER, J. Polysaccharide covalently linked to the peptidoglycan of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6714. **J. Bacteriol.**, Washington, v.168, n. 2, p.568-573, 1986.

JÜRGENS, U.J.; GOLECKI, J.R.; WECKESSER, J. Characterization of the cell wall of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6714. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v.42, n. 2, p.168-174, 1985.

KAISER, D.; LOSICK, R. How and why bacteria talk to each other. **Cell**, Cambridge, v.73, n. 5, p.873-885, 1993.

KANEKO, T. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. II Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Res.**, Tóquio, v.3, n. 3, p.109-136, 1996.

KELETI, G.; SYKORA, J.L. Production and properties of cyanobacterial endotoxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.43, n. 1, p.104-109, 1982.

KENYON, C.N.; RIPPKA, R.; STANIER, R.Y. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v.83, n. 3, p.216-236, 1972.

KLEIN, S.; CHAPMAN, D.J.; GARBER, E.D. Chemotaxonomy of the Oscillatoria-Phormidium complex. **Biochem. Syst.**, Amsterdam, v.1, n. 4, p.173-177, 1973.

KNOLL, A.H. The distribution and evolution of microbial life in the late Proterozoic era. **Ann. Rev. of Microbiol.**, Palo Alto, v.39, p.391-417, 1985.

KOMAGATA, K. **World Catalogue of Algae**. World Data Center of Microorganisms. Paris:UNESCO. 1987.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 2. *Chroococcales*. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.73, n. 3, p.157-226, 1986.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4. *Nostocales*. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.82, n. 3, p.247-345, 1989.

KOMÁREK, J. Current trends and species delimitation in the cyanoprocarote taxonomy. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.105, p.11-29, 1994.

KRUMBEIN, W.E.; PETERSEN, K. Mikroorganismen beschleunigen den Zerfall mittelalterlicher Wandgemälde. **Wandmalereischäden Arbeitshefte Denkmalpflege Niedersachsen**, [S.l.], v.8, p.115-121, 1990.

LABISCHINSKI, H.; MAIDHOF, H. **Bacterial peptidoglycan: overview and evolving concepts**. In: Bacterial cell wall. Amsterdam: The Netherlands: Elsevier, 1994. p.23-28

LAMENTI, G. et al. Biodiversity and Molecular Analysis of cyanobacteria from biofilms degrading works of art in Tuscany. Abst. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MICROBIOLOGY AND CONSERVATION (ICMC '99), 1999, Florence. **Proceedings...** [S.l. : s.n.], [1993?]. p.35-40.

LIM, G.; TAN, T.K.; TOH, A. The fungal problem in buildings in the humid tropics. **Biodeterioration**, Londres, v.7, Part 2, p.27-37, 1989.

LISCI, M.; MONTE, M.; PACINI, E. Lichens and higher plants on stone: a review. **Internat. Biodet. Biodeg.**, Londres, v.51, n. 1, p.1-17, 2003.

LU, W.; EVANS, E.H.; SAUNDERS, V.A. Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR amplified ribosomal DNA spacer region. **FEMS Microbiol. Letters**, Heidelberg, v.153, n. 1, p.141-149, 1997.

LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **J. of Bacteriol.**, Washington, v.174, n. 14, p.4525-4529, 1992.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER. **Microbial Ecology**. In: BROCK, T.D. (ed.). *Biology of Microorganisms*. 8th. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997. Cap. 16, p. 645. 991p.

MAIDAK, B.L., et al. A new version of the RPD (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Res.**, Toquio, v.27, n. 1, p.171-173, 1999.

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

MAO-CHE, L. et al. Biodeterioration of shells of black pearl oyster, *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*, by microbes and sponges of French Polynesia. **Mar. Biol.**, Heidelberg, v.126, n.3, p.509-515, 1996.

MARCHESI, J.R. et al. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.64, n. 6, p.795-799, 1998.

MATSUNAGA, T. et al. An ultra-violet (uv-a) absorbing bioprotein glucoside from marine planktonic cyanobacterium *Oscillatoria* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v.39, n. 2, p.250-253, 1993.

- MAY, E. et al. Microbial deterioration of building stone - a review. **Biodeter. Abstr.**, London, v.7, p.109-123, 1993.
- MAZEL, D. et al. Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. **J. Bacteriol.**, Washington, v.172, n. 5, p.2755-2761, 1990.
- NAVARRO, E. et al. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v.157, n. 2, p.107-115, 1992.
- NEILAN, B.A. et al. Molecular identification of cyanobacteria associated with stromatolites from distinct geographical locations. **Astrobiol.** Larchmont, N.Y. (in press). 2003.
- NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A.E. Genetic Diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphism within the phycocyanin locus. **Appl. Environ. Microbiol.**, Heidelberg, v.61, n. 11, p.3875-3883, 1995.
- NEILAN, B.A. DNA profiling of complex bacterial populations: Toxic cyanobacterial blooms. **Recent Res. Devel. Microbiol.**, Heidelberg, v.1, p.277-296, 1997.
- NEILAN, B.A. et al. 16S rRNA gene sequence and phylogeny of toxic *Microcystis* sp. (Cyanobacteria). **DNA Seq.**, Londres, v.4, n. 5, p.333-337, 1994.
- NEILAN, B.A. et al. Specific amplification and restriction polymorphism of the cyanobacterial rRNA operon spacer region. **Syst. Appl. Microbiol.**, Munique, v.20, n. 4, p.612-621, 1997.
- NELISSEN, B. et al. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. **Syst. Appl. Microbiol.**, Munique, v.17, n. 2, p.206-210, 1994.
- NELISSEN, B. et al. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. **J. Mol. Evol.**, Heidelberg, v.42, n. 2, p.194-200, 1996.
- NÜBEI, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **J. Bacteriol.**, Washington, v.178, n. 19, p.5636-5643, 1996.
- NYREE, J.W.; ADAMS, D.G. Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n. 11, p.4479-4484, 1997.

- OMATA, T.; MURATA, N. Isolation and characterization of three types of membranes from the cyanobacterium (blue-green alga) *Synechocystis* sp. PCC 6714. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v.139, p.113-116, 1984.
- ORTEGA-CALVO, J.J. et al. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. **Science Total Environ.**, Amsterdam, v.167, n. 1-3, p.329-341, 1995.
- ORTEGA-CALVO, J.J. et al. Cyanobacterial sulfate accumulation from black crusts of a historic building. **J. Geomicrobiol.**, Londres, v.12, n.1, p.15-22, 1994.
- ORTEGA-MORALES, O. et al. Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico **Current Microbiol.**, Londres, v.40, n. 2, p.81-85, 2000.
- ORTEGA-MORALES, B.O. et al. Extracellular polymers of microbial communities colonizing ancient limestone monuments. **Methods Enzimol.**, Londres, v.336, p.331-339, 2001.
- O'TOOLE, G.A.; KAPLAN, H.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.54, p.49-79, 2000.
- OTSUKA, S. et al. Phylogenetic relationships between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. **FEMS Microbiol. Lett.**, Heidelberg, v.172, n. 1, p.15-21, 1999.
- PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Nova York, v.276, n. 5313, p.734-740, 1997.
- PAERL, H.W.; PRISCU, J.C. Microbial phototrophic, heterotrophic and diazotrophic activities associated with aggregates in the permanent ice cover of Lake Bonney, Antarctica. **Microb. Ecol.**, Amsterdam, v.36, n. 3, p.221-230, 1998.
- PIETRINI, A.M. et al. A reddish color alteration caused by algae on stoneworks. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON DETERIORATION AND CONSERVATION OF STONE, 5., 1985. Lausanne. **Proceedings...** Lausanne: Presses Polytechniques Romandes, [1985?]. v.2, p.653-663.
- RAINEY, F. A. et al. *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16SrRNA genes with heterogeneous intervening sequences. **Microbiology**, Reading, v.142, Part 8, p.2087-2095, 1996.
- RAMSING, N.B.; FERRIS, M.J.; WARD, D.M. Highly ordered vertical structure of *Synechococcus* populations within the 1-millimeter-thick photic zone of a hot spring cyanobacterial mat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n. 3, p.1038-1049, 2000.

RASMUSSEN, U.; SVENNIG, M.M. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. **Appl. Env. Microbiol.**, Washington, v.64, n. 1, p.265-272, 1998.

RESCH, C.M.; GIBSON, J. Isolation of the carotenoid-containing cell wall of three unicellular cyanobacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v.155, n. 1, p.345-350, 1983.

RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods Enzimol.**, Londres, v.167, p.28-67, 1988.

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

ROBINSON, N.J. et al. Singular over-representation of an octameric palindrome, HIP1, in DNA from many cyanobacteria. **Nucleic Acid Research.**, Tóquio, v.23, n. 5, p.729-735, 1995.

RÖLLEKE, S. et al. Identification of Bacteria in a Biodegraded Wall Painting by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragment Coding for 16S rRNA. **Appl. Env. Microbiol.**, Washington, v.62, n. 6, p.2059-2065, 1996.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol. Rev.**, Palo Alto, v.55, n. 1, p.35-58, 1991.

ROUHIAINEN, L. et al. Characterization of toxin-producing cyanobacteria using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. **J. Bacteriol.**, Washington, v.177, n. 20, p.6021-6026, 1995.

SÁ, E.L.S. de. **Diversidade Fenotípica e Genética de Rizóbios Isolados de Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em Solos Ácidos de Cunha-SP.** 2001. 109 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SAMIMI, B.; DREWS, G. Adsorption of cyanophageAS-1 to unicellular cyanobacteria and isolation of receptor material from *Anacystis nidulans*. **J. Virol.**, Washington, v.25, n. 1, p.164-174, 1978.

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

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. Effect of primers hybridizing to different evolutionary conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, n. 8, p.3557-3563, 2001.

- SCHMIDT, W. et al. Characterization of the lipopolisaccharides from eight *Synechococcus* strains. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v.127, n. 3, p.217-222, 1980.
- SCHOPF, W.J. Cyanobacteria: pioneers at the early Earth. **Nova Hedw. Behe.**, Stuttgart. v.112, p.13-32, 1996.
- SCHRADER, M.; DREWS, G.; WECKESSER, J. Chemical analyses on cell wall constituents of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6716. **FEMS Microbiol. Lett.**, Heidelberg, v.11, n. 1, p.37-40, 1981.
- SCHULTZELAM, S.; BEVERIDGE, T.J. Physicochemical characteristics of the mineral-forming S-layer from the cyanobacterium *Synechococcus* strain GL24. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.60, n. 3, p.447-453, 1994.
- SHAPIRO, J. The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. **Freshwater Biol.**, Londres, v.37, n. 2, p.307-323, 1997.
- SHAPIRO, J.A. Bacteria as multicellular organisms. **Sci. Am.**, Heidelberg, v.256, n. 6, p.82-89, 1988.
- SHIRAKAWA, M.A. et al. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Heidelberg, v.39, n. 2, p.165-173, 2002.
- SILVA LIMA, C.B. et al. Emissões Atmosféricas: impacto na qualidade do ar. In: ATLAS Ambiental de Porto Alegre. Porto Alegre : Ed.UFRGS, 1998. p.163-168.
- STAL, L. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. **New Phytol.**, Londres, v.131, n. 1, p.1-32, 1995.
- STRUNK, O. et al. **ARB: a software environment for sequence data**. Disponível em: [http:// www.mikro.biologie.tu-muenchen.de](http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de) [do]. Department of Microbiology, Technische Universität München, Munich, Germany. Acesso em: 10 / 05 / 2000.
- TANDEAU DE MARSAC, N. **Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes**. In: THE MOLECULAR Biology of Cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p.825-842.
- TANG, E.P.Y.; TRAMBLAY, R.; VINCENT, W.F. Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high-latitude mat-formers adapted to low temperature? **J. Phycol.**, Malden, MA, v.33, n. 2, p.171-181, 1997.
- TEAUMROONG, N. et al. Diversity of nitrogen-fixing cyanobacteria under various ecosystems of Thailand: I Morphology, physiology and genetic diversity. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, Dordrecht, v.18, n. 7, p.673-682, 2002.

- TOMASELLI, L. et al. Biodiversity of Photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments. **Internat. Biodet. Biodeg.**, Londres, v.46, n. 3, p.251-258, 2000.
- TOMIOKA, N.; SUGIURA, M. Nucleotide sequence of the 16S-23S spacer region in the *rrnA* operon from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. **Mol. Gen. Genet.**, Heidelberg, v.193, n. 3, p. 427-430, 1984.
- TREVORS, J.T. DNA extraction from soil. **Microb. Releases**, [S.l.], v.1, p.3-9, 1992.
- TURNER, S. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. **Plant Syst. Evol. Suppl.**, Heidelberg, v.11, p.13-52, 1997.
- URZI, C.E.; KRUMBEIN, W.E.; WARSCHEID, Th. On the question of biogenic colour changes of mediterranean monuments (coating-crust-microstromatolite-patina-scialbatura-skin-rock varnish). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE CONSERVATION OF MONUMENTS IN MEDITERRANEAN BASINS, 2, 1992. Geneve. **Proceedings...** [S.l. : s. n.], [1992?] p.397-420.
- VALENTIN, N. Trends on Biological Deterioration of Rocks and Monumental Stones. In: CONGRÉS INTERNATIONAL SUR LA CONSERVATION DE LA PIERRE ET AUTRES MATÉRIAUX, 1993, Paris. **Proceedings...** [S.l. : s.n.], [1993?] p.30-34.
- VAN DE PEER, Y. et al. Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res.**, Toquio, v.27, n. 1, p.179-183, 1999.
- VAN DER OOST, J. et al. Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC7822. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v.152, p.415-419, 1989.
- van DOK, W.; HART, B.T. Akinete differentiation in *Anabaena circinalis* (Cyanophyta). **J. Phycol.**, Malden, v.32, n. 4, p.557-565, 1996.
- van DOK, W.; HART, B.T. Akinete differentiation in *Anabaena circinalis* (Cyanophyta). **J. Phycol.**, Malden, v.33, n. 1, p.12-17, 1997.
- VINUESA, P. et al. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic wood legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Appl. Environ. Microbio.**, Washington, v.64, n. 6, p:2096-2104, 1998.

- WALKER, J.T.; KEEVIL, C.W. Study of microbial biofilms using light microscope techniques. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Londres, v.34, n. 3-4, p.223-236, 1994.
- WALSBY, A.E. Gas Vesicles. **Microbiol. Rev.**, Palo Alto, v.58, n. 1, p.94-144, 1994.
- WARD, D.M., et al. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Oxford, v.62, n. 4, p.1353-1370, 1998.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, Londres, v.345, n. 6270, p.63-65, 1990.
- WARSCHEID, Th.; OELTING, M.; KRUMBEIN, W.E. Physico-chemical aspects of biodeterioration processes on rocks with special regard to organic pollutants. **Int. Biodeterior.**, Londres, v.28, n. 1-4, p.37-48, 1991.
- WARSCHEID, Th. **Integrated concepts for the protection of cultural artifacts against biodeterioration.** In: OF MICROBES and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p.185-202.
- WARSCHEID, Th.; BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: a review. **Internat. Biodeterior. Biodegrad.**, Londres, v.46, n. 4, p.343-368, 2000.
- WARSCHEID, Th. et al. **Studies on the temporal development of microbial infection of different types of sedimentary rocks and its effects on the alteration of the physico-chemical properties in building materials.** In: CONSERVATION of stone and other materials. London: E & FN Spon, 1993. v.1, p.303-310.
- WATERBURY, J.B. **Cyanobacteria. Subsection II. Order Pleurocapsales.** In: BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1989. v.3, p.1746-1770.
- WECKESSER, J.; JURGENS, U.J. Cell walls and external layers. **Methods Enzymol.**, Londres, v.167, p.173-188, 1988.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, Tóquio, v.18, n. 24, p.7213-7218, 1990.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. **Nucleic Acids Res.**, Tóquio, v.19, n. 19, p.5275-5279, 1991.

- WEST, N.J.; ADAMS, D.G. Phenotypic and genotypic comparison of symbiotic and free-living cyanobacteria from a single field site. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n. 11, p.4479-4484, 1997.
- WHITTON, B.A. **The biology of Rivulariaceae**. In: THE CYANOBACTERIA. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987. 1st ed. Vol. 1. p.513-534.
- WHITTON, B.A. **Genus I. Calothrix**. In: BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1989. v.3, p.1791-1793.
- WILLÉN, T.; MATTSSON, R. Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1918-1995. **Hydrobiol.**, Dordrecht, v.353, p.181-192, 1997.
- WILMOTTE, A. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (*Cyanophyceae*, Cyanobacteria) with narrow trichomes. I. Morphological variability and autecological features. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.92, n., p.215-248, 1991.
- WILMOTTE, A. et al. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S rRNA. **J. Phycol.**, Malden, v.28, n. 6, p.828-838, 1992.
- WILMOTTE, A.; VAN DER AUWERA, G.; DE WACHTER, R. Structure of the 16SrRNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC 7518 and phylogenetic analysis. **FEBS Lett.**, Heidelberg, v.317, n. 1-2, p.96-100, 1993.
- WILMOTTE, A.; NEEFS, J.M.; DE WACHETER, R. Evolutionary affiliation of the marine nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium* sp. Strain NIBB 1067, derived by 16S rRNA sequence analysis. **Microbiol.**, Reading, v.140, Part 8, p.2159-2164, 1994.
- WILMOTTE, A.; GOLUBIC, S. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of cyanophyta/cyanobacteria. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.92, p.1-24, 1991.
- WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. **Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences**. In: BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology, New York: Springer-Verlag. 2001. p.487-493.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, Palo Alto, v.51, n. 2, p.221-271, 1987.
- WOLK, C.P. Heterocyst formation. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.30, p.59-78, 1996.

WU, W.M.; JAIN, M.K.; ZEIKUS, J.G. Formation of fatty acid-degrading anaerobic granules by defined species. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, n. 6, p.2037-2044, 1996.

XU, X.; KHUDYAKOV, I.; WOLK, C.P. Lipopolysaccharide dependence of cyanophage sensitivity and aerobic nitrogen fixation in *Anabaena* PCC 7120. **J. Bacteriol.**, Washington, v.179, n. 9, p.2884-2891, 1997.

YOON, H.S.; GOLDEN, J.W. Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. **Science**, Heidelberg, v.282, n. 5390, p.935-938, 1998.

APÊNDICE 1**Meio de Knop Modificado****(g/l):**

KNO ₃	1,25
KH ₂ PO ₄	1,25
MgSO ₄ ·7H ₂ O·50	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,004
Citrato de Sódio	0,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036
Micronutrientes	1ml.

Micronutrientes (g/l):

H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,045

APÊNDICE 2

Soluções

1 - Tampão de amostra

0,25% azul de bromofenol

40% sucrose (p/v) em água

Para 20ml: 0,05g de azul de bromofenol

8,0g de sucrose

2 – TE (10mM Tris, 25mM EDTA pH 8,0)

Solução estoque 0,5M para 100ml: 15,14g de Tris.

Ajustar o pH para 8,0 com 42ml de HCl.

Ajustar o volume para 1000ml com água.

Solução de uso

$$C1V1 = C2V2$$

$$0,5.V1 = 0,01.100ml$$

$$V1=2ml$$

3 - EDTA sol. estoque 100ml

18,61g de EDTA. Ajustar o pH para 8,0 com HCl.

Solução de uso

$$C1V1 = C2V2$$

$$5.V1=25 mM.100$$

$$V1=5,0 ml$$

4 – SDS 10%

Solução estoque 100 ml – 10g de SDS

Aquecer até 68°C e ajustar o pH para 7,2 com HCl

5 – RNase 10 mg/ml

Dissolver RNase pancreática em:

10 mM Tris HCL (pH 7,5)

15 mM NaCl

Aquecer a 100°C por 15 min.

Esfriar a temperatura ambiente e estocar à -20°C.

6 – Solução 1 - TNE

	estoque	uso/100 ml
Tris pH 8	1M	5 ml
EDTA	0.5M	1 ml
NaCl	4M	1.25 ml

7 – EDTA – salina

	estoque	uso/100 ml
EDTA pH8	0,5 M	0,8 ml
NaCl	4 M	1,5 ml
H ₂ O		completar volume

8 – Solução G

	estoque	uso/100 ml
NaCl	4 M	0,5 ml
Tris pH 7.5	1 M	0,4 ml
EDTA	0,5M	0,2 ml
Etanol 50%		completar volume

9 – Clorofórmio/álcool isoamílico

24 ml de clorofórmio
1 ml de álcool isoamílico

10 – TBE estoque 5X

54g de Tris
27,5g de ácido bórico
20ml EDTA 0,5M

APÊNDICE 3

Seqüências de DNA

As bases sublinhadas correspondem ao iniciador 27F1.

Amostra 07

GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCA
 GACCAGCTACCGATCGTCGCCTTGGTAAGCTTTTACCCTACCAACTAGCTA
 ATCGGACGCGAGCTCATCTTCAGGCTATAAATATTTACCTCTCGGCATAT
 CCGGTCTTAGCAGTCGTTTCCAAGTGTATCCCCGTCCTGAAGGCAGATTC
 TCACGCGTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGC
 AAACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACTCT

Amostra 08

GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA
 GACCAGCTACTGATCGATGCCTTGGTGAGCTTTTACCTACCAACTAGCTA
 ATCAGACGCGAGCTCTTCCCTAGGCAATTAATCTTTTACCTTCCGGCTTAT
 CCGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTGCCCGACCTAAGGGCAGATTC
 TCACGCGTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGC
 ARACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACTCT

Amostra 14

GTAGGAGTCTGGGCCGWGWCTCATKCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTC
 AGACCAGCTACTGATCGACGCCTTGGKGAGCCGTTACCACTCCTACTAGC
 TAATCAGACGCGAGTTCATCCTTAGGCACTWAAGCTTTCACCTCTCGGCA
 CATTGGGTATTAGCAGTCGATTCCAAMTGTWGTCCCCAACCTGAAGGCTG
 ATCCTCACGCGTACTMACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTT
 AAGCAGACCGYCAGCGTTCATTCTGAGCCAGGATCAAACTCT

Amostra 16

GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA
 GACCAGCTACTGATCGGTGCCTTGGTGCGCTTTACCACACCAACTAGCT
 AATCAGACGCGAGCTCATCTTYAGGTGATAAATCTTTCACCGTTAGGCACA
 TCCGGTATTAGCAATCGTTTCCRACTGTTGTCCCGAACCTGAAGCCAKATT
 CTCACGCGTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAG
 CATACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACTCT

Amostra 28

GTAGGAGTCTGGGCCGGGTCTCAGTCCCAGTGTGTCTGGTCATCCTCTCA
 GACCAAATACAGATCGTCGCCTTGGTAAACCGTTACTCCACCAACTAGCTA
 ATCTGACGCGAGCCAATCCCTAGGCAATATATCTTTCACCTCTCGGCACAT
 TCGGTATTAGCAGCCGTTTCCAAGTGTGTCCCGAACCTAAGGGCATGTTT
 TCACGCGTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGC
 ATACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACTCT

Amostra 32

GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGTCTGGTCATCCTCTCA
GACCAAATACAGATCGTCGCCTTGGTAAACCGTTACTCCACCAACTAGCTA
ATCTGACGCGAGCCAATCCCTAGGCAATATATCTTTACCTCTCGGCACAT
TCGGTATTAGCAGCCGTTTCCAAGTGTGTCCCAGAACCTAAGGGCATGTTT
TCACGCGTTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGC
ATACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAGTCT

Amostra 34

GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCA
GACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCCCTTACCTCACCAACTAGCT
AATCAGACGCGAGCTCATCTACAGGCTATTAATATTTACCTCTCGGCACA
TCCGGTTTTAGCAGCCGTTTCCAGCTGTTGTCCCAGTCTGTAGGCAGATC
CTCACGCGTTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAG
CATACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAGTCT

Amostra 38

GTAKGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA
GACCAGCTACTGATCGATGCCTTGGTGAGCCCTTACCTCACCAACTAGCTA
ATCAGACGCGAGCTCTTCTCTAGGCAATTAATCTTTTACCTTCCGGCTTATC
CGGTATTAGCCATCGTTTCCAATGGTTGKCCCCGACCTAAGGGCAGATTCT
CACGCGTTACTCACCCGTCCGHCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAGCA
GACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAGTCT

Amostra 44

GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCA
GACCAGCTACTGATCGTCGCCTAGGTGCGCTCTTACCACACCTACTAGCT
AATCAGACGCGAGCTCATCTTCAGGCTATAAATATTTACATCACTGCACA
TTCGGTATTAGCCACCGTTTCCAGTGGTTGTCCCAGAACCTGAAGGCAGATT
CTCACGCGTTACTCACCCGTCCGCCACTACGTTTCGACTTGCATGTGTTAAG
CATACCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAAGTCT