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

**Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema
manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos
naturais**

Caroline Souza Pamplona da Silva

Tese apresentada para obtenção de título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

Caroline Souza Pamplona da Silva
Farmacêutica

**Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal
do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**

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

Tese apresentada para obtenção de título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2010**

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

Silva, Caroline Souza Pamplona da

Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais / Caroline Souza Pamplona da Silva. - - Piracicaba, 2010.
199 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Ecossistemas de mangue 3. Espectrometria de massas 4. Metabólitos secundários 5. Peptídeos 6. Toxinas I. Título

CDD 589.46
S586c

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

*Aos meus pais,
Mariana e Carlos,
e à minha irmã, Anne,*

*pelo amor, carinho e apoio
em todos os momentos de minha vida.*

DEDICO

Ao Murilo, meu sobrinho, com todo amor,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação e oportunidade concedida;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

À FAPESP pelo auxílio financeiro no projeto e pela bolsa de estudos;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

À Dra. Maria Estela Stenico pelas contribuições indispensáveis, sugestões, auxílio, revisão da tese e principalmente pela amizade;

Ao Dr. Itamar Soares de Melo e à Dra. Siu Mui Tsai por todo apoio oferecido;

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin (Instituto Thompson-UNICAMP) e ao Prof. Dr. Roberto Berlinck (Instituto de Química-USP) pelo auxílio nas análises de espectrometria de massas;

Ao Prof. Dr. João Sarkis Yunes (Instituto de Oceanografia-UFRG) pela análise de HPLC-FLD;

À Profa. Dra. Simone Possedente Lira pelas contribuições indispensáveis nas análises químicas;

À doutoranda Elaine Cristina Cabral e ao mestrando Boniek Gontijo Vaz (Instituto Thompson-UNICAMP) pelo auxílio nas análises por Q-TOF e FT-ICR/MS.

À Dra. Adriana Sturion Lorenzi e à doutoranda Marina Gumireri pelo apoio e revisão da tese;

Ao João Silva (EMBRAPA-Meio Ambiente) pelas coletas e por todo apoio;

Ao mestrando Diego Bonaldo Genuário pelo isolamento das linhagens;

Às alunas de iniciação científica, Anaíle e Camila pelo auxílio;

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA-USP) pelo auxílio nesse trabalho;

Aos colegas e amigos, Ana Paula Dini, Caroline Hoff, Danillo Alvarenga, Elaine Crespim, Janaína Rigonato, Luciana Mecatti, Natália Nardelli, Tânia Shishido do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA-USP) pelo companheirismo e auxílio fornecido;

Ao Tito Furlan, pelo incentivo e apoio;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESES.....	19
3 OBJETIVOS	19
4 DESENVOLVIMENTO	21
4.1 Revisão Bibliográfica.....	21
4.1.1 Ecossistema Manguezal.....	21
4.1.2 Ecossistema Manguezal no Brasil.....	22
4.1.2.1 Manguezal na Ilha do Cardoso.....	24
4.1.2.2 Manguezal em Bertioga.....	25
4.1.2.3 Petróleo em manguezais.....	26
4.1.3 Cianobactérias	27
4.1.3.1 Cianobactérias em Ecossistema Manguezal.....	29
4.1.3.2 Taxonomia de cianobactérias.....	30
4.1.3.2.1 Filogenia de cianobactérias baseado na subunidade 16S do RNA ribossômico (RNAr 16S).....	36
4.1.4 Produtos naturais produzidos por cianobactérias.....	37
4.1.4.1 Biossíntese de peptideos sintetases não ribossômicas (NRPS) e policetídeo sintase (PKS).....	40
4.1.4.2 Genes de NRPS e PKS em cianobactérias.....	43
4.1.4.3 Toxinas produzidas pelas cianobactérias (cianotoxinas).....	46
4.1.4.3.1 Microcistina (MC).....	47
4.1.4.3.2 Saxitoxina (STX).....	50
4.1.4.3.3 Métodos analíticos para detectar cianotoxinas.....	53
4.1.4.4 Sideróforos	54
4.1.4.4.1 Vias metabólicas para produção de sideróforos.....	57
4.1.4.4.2 Excesso de ferro para saúde.....	58
4.1.4.4.3 Importância do estudo de sideróforos	59
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	61

4.2.1 Culturas de cianobactérias	61
4.2.2 Caracterização molecular dos isolados	63
4.2.2.1 Extração de DNA	63
4.2.2.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S	64
4.2.2.3 Clonagem	65
4.2.2.4 Transformação	65
4.2.2.5 PCR usando colônias	65
4.2.2.6 Extração de DNA plasmidial	66
4.2.2.7 Sequenciamento	67
4.2.2.8 Processamento e análise filogenética das sequências	67
4.2.3 Detecção de genes envolvidos com a biossíntese de cianopeptídeos	68
4.2.3.1 Extração de DNA	68
4.2.3.2 Amplificação de sequências conservadas de NRPSs	68
4.2.3.3 Amplificação de sequências conservadas de PKSs	69
4.2.3.4 Sequenciamento dos genes de NRPS e PKS	69
4.2.4 Produção de substâncias bioativas	69
4.2.4.1 Cultivo de culturas	69
4.2.4.2 Extração de substâncias bioativas	70
4.2.4.3 Análise de bioatividade	70
4.2.4.4 Espectrometria de massas	70
4.2.5 Produção de microcistinas	71
4.2.5.1 Ensaio Imunológico ELISA	71
4.2.5.2 Amplificação por PCR do domínio NMT do gene de microcistinas sintetase (<i>mcyA</i>)	71
4.2.6 Produção de saxitoxinas	72
4.2.6.1 Ensaio Imunológico ELISA	72
4.2.6.2 Amplificação do gene que codifica para O-carbamoil transferase (<i>sxtI</i>)	72
4.2.6.3 Análises químicas de saxitoxinas	73
4.2.6.3.1 Extração de saxitoxinas	73
4.2.6.3.2 Espectrometria de massas de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR/MS)	74

4.2.6.4. Investigação da produção de saxitoxinas por <i>Leptolyngbya</i> CENA137	75
4.2.6.4.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLC).....	75
4.2.7 Produção de sideróforos	76
4.2.8 Análise de sideróforos da linhagem <i>Phormidium</i> CENA135 pelos métodos bioquímicos de Csácky e Arnow.....	76
4.2.8.1 Isolamento e caracterização do sideróforo	77
4.2.8.2 Análise do sideróforo por Espectrometria de massas Q-TOF	77
4.2.8.3 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	78
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
4.3.1 Caracterização molecular dos isolados	79
4.3.1.1 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias	79
4.3.1.2 Caracterização molecular usando a sequência de RNAr 16S.....	79
4.3.2 Detecção de genes envolvidos com a biossíntese de cianopeptídeos.....	87
4.3.2.1 Sequenciamento dos genes que codificam para NRPS	91
4.3.2.2 Sequenciamento dos genes que codificam para PKS.....	94
4.3.3 Atividade antimicrobiana	98
4.3.4 Espectrometria de massas	103
4.3.5 Produção de microcistinas	106
4.3.5.1 Ensaio imunológico ELISA	106
4.3.5.2 Detecção do domínio NMT do gene <i>mcyA</i>	107
4.3.6 Produção de saxitoxinas	109
4.3.6.1 Ensaio imunológico ELISA	109
4.3.6.2 Amplificação do gene que codifica para O-carbamoil transferase.....	110
4.3.6.3 Análises químicas de saxitoxinas	114
4.3.7 Análises químicas do extrato celular de <i>Leptolyngbya</i> CENA137 (HPLC-FLD, Q-TOF/MS e FT-ICR/MS).....	119
4.3.8 Produção de sideróforos	128
4.3.9 Análise do sideróforo da linhagem <i>Phormidium</i> CENA135 pelos métodos bioquímicos de Csácky e Arnow.....	130
4.3.9.1 Isolamento e caracterização do sideróforo	131

4.3.9.2 RMN do sideróforo produzido por <i>Phormidium</i> CENA135	133
5 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS	139
ANEXOS	175
ANEXO A	177
ANEXO B	197

RESUMO

Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais

O gene de RNAr 16S tem sido amplamente utilizado na inferência filogenética de organismos procariotos, entretanto, sequências desse gene de cianobactérias isoladas de manguezais brasileiros são inexistentes. Neste estudo, 42 sequências inéditas do gene de RNAr 16S de cianobactérias isoladas de manguezais brasileiros foram geradas. Na análise BLAST as sequências apresentaram similaridades variando de 91 a 99% com outras sequências conhecidas de cianobactérias depositadas no GenBank. Na análise filogenética do gene de RNAr 16S várias sequências do gênero *Chlorogloea* ficaram agrupadas com sequências do gênero *Synechococcus* e algumas sequências de *Nostoc* ficaram mais próximas de sequências de *Nodularia*. As sequências de *Leptolyngbya* agruparam-se separadas das típicas de *Leptolyngbya*. Esses resultados corroboram com outros estudos, os quais mostraram que o filo Cyanobacteria necessita de revisão taxonômica. Na avaliação do potencial de produção de substâncias bioativas de 44 isolados de manguezais utilizando a técnica de PCR e dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores degenerados específicos para sequências gênicas codificantes de peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS) e policetídeo sintase (PKS) modular, 10 linhagens apresentaram resultado positivo para presença de NRPS e todos os isolados apresentaram resultado positivo para PKS. Na tentativa de atribuir função a esses genes e posteriormente explorar as potencialidades das linhagens, um produto da PCR de NRPS e 19 de PKS foram sequenciados, as sequências obtidas foram traduzidas para aminoácidos e utilizadas na construção de árvores filogenéticas. A análise filogenética da sequência de aminoácido do domínio de adenilação da NRPS indicou uma possível síntese de sideróforo pela linhagem *Phormidium* CENA135. Extratos extracelulares dessa linhagem analisados por Q-TOF/MS e RMN indicaram a produção de um sideróforo anfifílico com massa molecular e estrutura similar ao sideróforo synechobactina A. As sequências de aminoácidos do domínio da cetossintase de PKS das 19 linhagens mostraram relações filogenéticas com várias PKSs de linhagens conhecidas por produzirem substâncias, tais como sideróforo, algicida, microginina, oscilaginina B, hectoclorina e scytonemina. No teste da atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos dos extratos intra e extracelulares das 44 linhagens, 17 delas inibiram o crescimento de vários dos micro-organismos testados. Os extratos ativos foram analisados por Q-TOF/MS e 34 substâncias putativas conhecidas foram identificadas, tais como fungicidas, inibidores de proteases, antimaláricos e outras de funções desconhecidas. O teste imunológico ELISA específico para detecção da hepatotoxina microcistina (MC) apresentou resultado positivo para 16 das 23 linhagens testadas. Fragmentos de sequências do gene *mcyA* envolvido na síntese de MC foram amplificados por PCR em cinco linhagens (*Synechococcus* CENA136, *Phormidium* CENA135, *Chlorogloea* CENA142, *Chlorogloea* CENA146 e *Nostoc* CENA160), inclusive em dois gêneros sem registro de produção dessa toxina (*Synechococcus* e *Chlorogloea*). O teste ELISA específico para detecção da neurotoxina saxitoxina (SXT) apresentou resultado positivo para três linhagens. Entretanto, a análise em Q-TOF/MS e FT-ICR/MS de 15 linhagens, inclusive das que apresentaram resultado positivo no ELISA, não confirmaram a produção de saxitoxinas.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Peptídeo sintetase; Policetídeo sintase; Espectrometria de massas; Antimicrobianos; Toxinas

ABSTRACT

Molecular characterization of cyanobacteria isolated from mangrove ecosystem of the State of São Paulo and identification of natural products

The 16S rRNA gene has been widely used in phylogenetic inference of prokaryotic organisms, however, sequences of this gene of cyanobacteria isolated from Brazilian mangroves are absent. In this study, 42 newly sequences of 16S rRNA gene of cyanobacteria isolated from Brazilian mangroves were generated. BLAST analysis of the sequences showed similarities ranging from 91-99% with other known cyanobacterial sequences deposited in GenBank. Phylogenetic analysis of several 16S rRNA sequences from the genus *Chlorogloea* were clustered with sequences from the genus *Synechococcus* and some sequences of *Nostoc* were closer to sequences of *Nodularia*. The *Leptolyngbya* sequences clustered separated from those of typical *Leptolyngbya*. These results corroborate with other studies which showed that the phylum Cyanobacteria need taxonomic revision. In assessing the potential of bioactive compounds production of 44 mangrove isolates using PCR technique and two sets of degenerated primers specific for gene sequences encoding non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) and modular polyketide synthase (PKS), 10 strains showed positive results for the presence of NRPS and all isolates were positive for PKS. In an attempt to assign function to these genes and further explore the potential of the strains, a PCR product of NRPS and 19 PKS were sequenced and the sequences obtained were translated into amino acids and used to construct phylogenetic trees. Phylogenetic analysis of amino acid sequence of the NRPS adenylation domain indicated a possible synthesis of siderophore by the *Phormidium* strain CENA135. Extracellular extracts of this strain analyzed by Q-TOF/MS and NMR indicated the production of an amphiphilic siderophore with molecular mass and structure similar to the siderophore synechobactin A. The amino acid sequences of the PKS ketosynthase domain of 19 strains showed phylogenetic relationships with several PKSs of strains known to produce compounds such as siderophore, algicide, microginin, oscillagin B, hectochlorin and scytonemin. In the antimicrobial activity test against pathogenic microorganisms of the intra- and extracellular extracts of 44 strains, 17 of them inhibited the growth of various microorganisms tested. The active extracts were analyzed by Q-TOF/MS and 34 putative known substances were identified such as fungicides, protease inhibitors, antimalarials, and others of unknown function. The immunological test ELISA specific for detection of the hepatotoxin microcystin (MC) was positive for 16 of the 23 strains tested. Sequence fragments *mcyA* gene involved in the synthesis of MC were amplified by PCR in five strains (*Synechococcus* CENA136, *Phormidium* CENA135, *Chlorogloea* CENA142, *Chlorogloea* CENA146 and *Nostoc* CENA160), including two genera with no record of production of this toxin (*Synechococcus* and *Chlorogloea*). Specific ELISA test for detection of the neurotoxin saxitoxin (SXT) showed positive results for three strains. However, analysis by Q-TOF/MS and FT-ICR/MS of 15 strains, including those that showed positive ELISA results, did not confirm the saxitoxin production.

Keywords: Secondary metabolites; Peptide synthetase; Polyketide synthase; Mass spectrometry; Antibiotics; Toxins

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias constituem um grande grupo de micro-organismos pertencentes ao domínio *Bacteria*, capazes de realizar fotossíntese com liberação de O₂ e muitas são também fixadoras de nitrogênio atmosférico apresentando assim uma exigência nutricional bastante simples. Elas são encontradas em todos os tipos de ecossistemas terrestres e aquáticos, incluindo condições ambientais extremas. O clima tropical do Brasil favorece o crescimento de cianobactérias e a diversidade destes organismos em tais condições é notável.

Estudos sobre a diversidade de cianobactérias em manguezais são bastante restritos. No Brasil alguns estudos foram realizados nos estados do Maranhão (NOGUEIRA; FERREIRA-CORREIA, 2001), Pernambuco (BRANCO et al., 2003), Rio de Janeiro (BAETA-NEVES; TRIBUZI, 1992) e São Paulo (BRANCO; SILVA; SANT'ANNA, 1994; BRANCO; SANT'ANNA; AZEVEDO, 1996a, b). Entretanto, em todos eles a identificação taxonômica de cianobactérias foi realizada utilizando amostras ambientais e visualização em microscópio ótico. O cultivo desses organismos em laboratório está no início e, portanto, este é o primeiro estudo sobre filogenia molecular das espécies isoladas de áreas de manguezais brasileiros.

Investigações conduzidas durante a última década com cianobactérias mostraram que esses organismos são fontes potenciais de metabólitos secundários bioativos, sendo que substâncias com atividade citotóxica, antifúngica, antibacteriana e antiviral já foram identificadas (BURJA et al., 2001). Há um interesse crescente por parte das indústrias farmacêuticas e agroquímicas na busca de novas substâncias, como os produtos naturais que apresentam potencial farmacêutico, nutricional, agrícola e outras aplicações. Muitas dessas bioatividades são atribuídas, em particular, às enzimas peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS) e policetídeo sintase (PKS) (ETCHEGARAY et al., 2004b). Tais enzimas possuem estrutura modular, sendo que cada módulo subdivide-se em domínios envolvidos nas etapas sequenciais da catálise. O número mínimo de domínios em cada módulo necessários para a incorporação de um aminoácido (NRPS) ou de um ácido-graxo (PKS) é três: adenilação (A), tioesterificação (T ou PCP) e condensação (C) para NRPSs e seus correspondentes acila transferase (AT), proteína carreadora de grupamentos acila (ACP) e cetossintase

(KS) para PKSs. As PKSs podem elaborar substâncias macrocíclicas como o antimicrobiano eritromicina ou aromáticos como antraciclinas. Na síntese de substâncias macrocíclicas as enzimas são multifuncionais e são chamadas de PKSs modulares ou do tipo I, e na biossíntese de substâncias aromáticas as enzimas são monofuncionais, sendo chamadas de PKSs do tipo II. O arranjo modular dos genes que codificam para essas enzimas contém regiões de sequência altamente conservada. O alto grau de conservação destas sequências permite que se identifiquem seus genes com certa facilidade. Na biossíntese de cianotoxinas e de alguns antimicrobianos importantes os genes de NRPSs e de PKSs identificados encontram-se geralmente agrupados. Assim, as sequências repetitivas altamente conservadas dos genes das sintetases permitem que sejam desenhados oligonucleotídeos iniciadores visando a sua detecção por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A identificação prévia de genes biossintéticos facilita a seleção de micro-organismos com potencial para uso em estudos de bioprospecção e a compreensão do funcionamento das enzimas NRPSs e PKSs possibilita a construção racional de novos metabólitos. A especificidade por substratos aminoácido (NRPSs)/ácido graxo (PKS) é determinada pelos domínios de A/AT respectivamente para NRPS e PKS. Analisando-se os aminoácidos que conferem especificidade em tais domínios, pode-se inferir aspectos da estrutura do metabólito sintetizado. Utilizando-se essas informações, novos metabólitos podem ser produzidos contendo atividades diferentes das originais. A síntese de novos metabólitos pode ser feita alterando-se aminoácidos específicos nos domínios A/AT que conferem a especificidade, através de mutações pontuais, alterando-se todo o domínio A/AT, ou todo o módulo. A alteração da especificidade permite a produção artificial de novas substâncias naturais, pela modificação ao nível molecular da especificidade da enzima pelo seu substrato.

Técnicas moleculares seguidas de análises químicas têm sido empregadas para a identificação de cianopeptídeos. Neste trabalho, uma triagem utilizando oligonucleotídeos iniciadores para amplificar os genes envolvidos na síntese de substâncias que apresentam bioatividade foi realizada entre linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo, na tentativa de associar a sequência obtida com o cianopeptídeo produzido. Análises químicas,

utilizando espectrometria de massas foram empregadas com o objetivo de identificar os metabólitos produzidos pelas linhagens estudadas.

A caracterização molecular usando as sequências gênicas de RNAr 16S das linhagens isoladas dos manguezais do Estado de São Paulo permite o conhecimento da variabilidade genética desses micro-organismos, além de propiciar a inclusão dessas linhagens no sistema atual de classificação de micro-organismos. A investigação dos isolados como fontes de produtos naturais potencialmente úteis permite a identificação dessas substâncias para a exploração no campo da biotecnologia.

2 HIPÓTESES

- 1) Os manguezais, um ambiente de regiões tropicais e subtropicais, possuem uma diversidade específica de cianobactérias ainda pouco explorada;
- 2) Sequências gênicas codificantes das enzimas NRPS e PKS podem ser usadas para prever a possível síntese de substâncias bioativas;
- 3) As cianobactérias que colonizam ecossistema manguezal são importantes fontes de produtos naturais bioativos com potencial para aplicação farmacológica;
- 4) Algumas linhagens de cianobactérias presentes nos manguezais são produtoras de toxinas oferecendo riscos à saúde de animais e humanos.

3 OBJETIVOS

- Caracterizar por meio do sequenciamento do gene de RNAr 16S os isolados obtidos de manguezais do Estado de São Paulo;
- Selecionar as linhagens potencialmente produtoras de cianopeptídeos utilizando iniciadores específicos;
- Identificar os cianopeptídeos produzidos pelas linhagens selecionadas;
- Constatar a atividade antimicrobiana dos cianopeptídeos identificados contra fungos, levedura e bactérias patogênicas.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Revisão Bibliográfica

4.1.1 Ecossistema Manguezal

Mangue é o nome dado a diversas plantas, pertencentes a várias famílias, próprias das formações vegetais de águas salobras ou meio salobras (CORRÊA, 1984). Os mangues crescem na interface entre terra e mar em latitudes tropicais e subtropicais, sobrevivendo em condições de elevada salinidade, variação de marés, fortes ventos, altas temperaturas e solos anaeróbicos. É um grupo de plantas que apresenta morfologia e fisiologia altamente desenvolvida para adaptação às condições extremas (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

Os manguezais desempenham um importante papel nos ecossistemas costeiros, contribuindo com a manutenção da biodiversidade marinha (SHIADAH, 1998; GETTER et al., 1984). Eles protegem a área costeira contra erosão, danos causados por tempestades e ação das ondas. Além disso, ajudam no tratamento de efluentes, fornecem habitats de reprodução e de crescimento para diferentes organismos, sendo refúgio e zonas de alimentação para organismos marinhos e também fornecem grandes quantidades de matéria orgânica para águas costeiras adjacentes (RONNBACK, 1999). Os principais fatores condicionantes da ocorrência, estrutura e funcionamento desses ecossistemas são as temperaturas tropicais, substratos aluviais, proteção contra ondas, presença de água salgada e considerável amplitude de marés (WALSH, 1974). Os materiais sedimentares provenientes tanto do mar quanto do continente são responsáveis pela formação e evolução desse ambiente, o que o torna um ambiente de transição de alta produtividade (WOODWELL et al., 1977; DELAUNE; PATRICK; BURESH, 1978).

Devido à influência da mistura de águas doces e marinhas pela variação das marés, os manguezais sofrem amplas alterações diárias na salinidade, o que implica em grande adaptação fisiológica para os organismos que vivem ali. O substrato é instável, com partículas de solo finas e há grande variação no volume de água (BRANCO et al., 2003).

Os manguezais do Brasil caracterizam-se pela semelhança na composição florística, porém contêm menor número de gêneros e espécies que em outros países

(ANDRADE; LAMBERTI, 1965). A vegetação dos manguezais é representada por espécies arbóreas como *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia tormentosa* e *Avicennia schaueriana*, entre outras, altamente especializadas e adaptadas a condições de solos alagados, com baixas concentrações de oxigênio e salinidade variável. Estas espécies apresentam raízes escora (responsáveis pela sustentação das árvores sobre o sedimento) e glândulas excretoras de sais (conferem tolerância às elevadas concentrações de sais) como estruturas de adaptação ao mangue (ROSSI; MATOS, 1992; ODUM, 1972). Para Veloso e Góes Filho (1982), essas espécies variam conforme a latitude.

De acordo com Constanza e colaboradores (1997) o manguezal é conhecido como um ecossistema altamente produtivo, que apresenta um eficiente mecanismo de reciclagem de nutrientes e de conservação dos mesmos. A diversidade de bactérias e fungos que habitam esse ecossistema desempenha um importante papel na transformação de nutrientes (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). A microflora do mangue é composta por uma combinação de solos terrestres, marinhos e de micro-organismos de água doce (ANANDA; SRIDHAR, 2002) e, devido à alta diversidade de organismos fotossintetizantes, como as algas, também contribuem com a produtividade primária (BRANCO et. al, 2003).

Segundo Alongi e colaboradores (1988), Bano e colaboradores (1997), algas constituem 7% da biomassa microbiana total em manguezais tropicais, enquanto protozoários representam apenas 2% e as bactérias e fungos em sua grande maioria, constituem 91%.

4.1.2 Ecossistema Manguezal no Brasil

A costa do Brasil tem extensão de 7.408 km, sendo que 6.786 km apresentam florestas de mangue, abrangendo uma área de aproximadamente 25.000 km². Somente a costa do Estado do Rio Grande do Sul não tem cobertura de mangue. Os manguezais ocorrem desde a fronteira com a Guiana Francesa, um pouco acima do Equador para além do Trópico de Capricórnio próximo de Santa Catarina (SCHAEFFER-NOVELLI et. al, 2000). No Estado de São Paulo, uma das principais áreas de ocorrências de mangues é a Baixada Santista, formada pelos municípios de Bertioga, Cubatão,

Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente. Essa região possui uma área total de cobertura vegetal de 1.716,6 Km², sendo que aproximadamente 6% correspondem à vegetação de mangue. A área estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape encontra-se em bom estado de preservação e localiza-se no extremo sul da costa litorânea (SÃO PAULO, 2000). No estado de São Paulo as áreas de mangue vêm sendo alvo de constantes pressões sócio-econômicas, dentre elas a construção de aterros para formação de marinas, condomínios náuticos e loteamentos, e a recepção de dejetos, esgotos e produtos químicos diversos.

Do ponto de vista ecológico, manguezais possuem grande importância, tanto do ponto de vista florístico, com espécies adaptadas às condições de salinidade e carência de oxigênio, quanto do faunístico, por constituírem abrigo para a reprodução e a alimentação (ROSSI; MATTOS, 2002).

Rhizophora mangle, *Avicenna shaveriana* e *Laguncularia racemosa* são as principais espécies de mangue encontradas na Baixada Santista. O gênero *Rhizophora*, pertencente à família Rhizophoraceae, é conhecido como mangue vermelho, árvores médias ou arbustos. São encontrados em contato com o mar, nas franjas, na embocadura de alguns rios e baías interiores. Apresenta ramificações peculiares dos caules de sustentação, ramificadas, curvas e arqueadas. Os ramos são carnosos cilíndricos (raízes aéreas). Essa espécie tolera salinidades elevadas devido a um sistema capaz de filtrar a água salgada durante o processo de absorção de sais pela raiz (SCHAEFFER-NOVELLI, 1994). Já o gênero *Avicenna*, pertencente à família Verbenaceae, é conhecido como mangue preto e tolera a maior salinidade do solo, comparada às outras espécies. Elas possuem sistemas glandulares em suas folhas capazes de excretar o excesso de sais absorvidos (SCHAEFFER-NOVELLI, 1994). Suas folhas apresentam ápice arredondado com coloração mais clara, as raízes radiais emitem prolongamentos com geotropismo negativo, os pneumatóforos (CARMO et al., 1994). O gênero *Laguncularia*, família Combretaceae, é conhecido como mangue branco, encontrado em costas de baixa salinidade, embora tolere altas salinidades. Esse gênero também não tolera grandes flutuações dos níveis de água. Possuem nos troncos pequenos agrupamentos de tecidos específicos, lenticelas, que permitem a troca de gases entre a planta e o meio externo (SCHAEFFER-NOVELLI, 1994).

De acordo com Andrade e Lamberti (1965), Rizzini (1979) e Schaeffer-Novelli, Lima-Mesquita e Cintron-Molero (1990), a *Laguncularia racemosa*, é encontrada com maior frequência em Cananéia (SP), onde a cobertura basal é composta por 65% de *L. racemosa*, 23% de *R. mangle* e 12% de *A. schaueriana*.

4.1.2.1 Manguezal na Ilha do Cardoso

O sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape está localizado no extremo sul do Estado de São Paulo. Esse ambiente é composto por um complexo sistema de corpos d'água que circundam quatro ilhas: Iguape, Comprida, Cananéia e do Cardoso (Figura 1). Esta região tem importância ecológica bastante relevante, sendo um dos trechos mais estudados do litoral brasileiro e classificado atualmente como área de preservação ambiental (BERNARDES, 2001). O ecossistema do manguezal da Ilha do Cardoso, que se localiza no município de Cananéia, apresenta uma topografia predominantemente montanhosa, com diversas formações vegetais e é representativo de um ambiente sem interferências de ação antrópica e, portanto, em condições mais próximas às naturais.

Os manguezais se formam no Canal do Ararapira e na Baía de Trapandé, na face ocidental da ilha. Além disso, uma extensa restinga cobre a maior parte da planície litorânea da Ilha.

De acordo com Schaeffer-Novelli, Mesquita e Citron-Malero (1990) na região de Cananéia, quando há influência mais pronunciada das águas dos rios, os sedimentos contêm mais matéria orgânica (14,5%) e substancialmente mais carbono orgânico (5-5,5%), sendo que sedimentos são na maioria finos (ROSSI; MATOS, 2002).

Diatomáceas, dinoflagelados, silicoflagelados, cianobactérias e microflagelados são os produtores primários componentes do fitoplâncton do mangue da Ilha do Cardoso (SCHAEFFER-NOVELLI; MESQUITA; CITRON-MALERO, 1990). Segundo investigações feitas por Kutner (1975), poucos representantes de dinoflagelados foram encontrados no fitoplâncton e perifiton de Cananéia, cianobactérias apareceram ocasionalmente e silicoflagelados eram escassos na maioria das vezes. Enquanto isso, microflagelados foram encontrados abundantemente.

Figura 1 - Foto aérea da Ilha do Cardoso-Cananéia (retirado de Google Earth versão 2009)

4.1.2.2 Manguezal em Bertioga

A Baixada Santista, zona costeira do Estado de São Paulo, é caracterizada como uma região que vem sofrendo vários impactos ambientais. Os manguezais ainda existentes no estuário de Santos, São Vicente e Bertioga (Figura 2) são constantemente atingidos por dejetos e vazamentos de petróleo, de metais pesados, pelo depósito de lixo urbano-industrial, esgoto, além do desmatamento para usos industriais e residenciais. São atingidas também as populações locais que vivem da pesca e da catação de caranguejo, que vendem pescado contaminado à beira das estradas (OLIVEIRA; RIBEIRO NETO, 1989). Em 14 de outubro de 1983, devido à abertura da Rodovia Rio-Santos (SP-55), uma rocha com cerca de 20 toneladas caiu sobre o oleoduto da Petrobrás, responsável pela ligação entre o Terminal Marítimo Almirante Barroso (TEBAR), em São Sebastião e a Refinaria Presidente Bernardes (RPBC) em Cubatão. Com o rompimento do oleoduto houve vazamento de 3,5 milhões de litros de óleo cru (tipo Carmópolis, Bacia Sergipe-Alagoas). Praticamente todo petróleo

derramado foi drenado para o Rio Iriri, alcançou o Canal de Bertioga e atingiu extensas áreas de manguezal (SANTOS; CUNHA-LIGNON; SCHAEFFER-NOVELLI, 2007). Após o acidente, foram descritas a ocorrência de quedas de folhas, redução da área foliar e maior susceptibilidade ao ataque por herbívoros, reduzindo assim a taxa fotossintética do sistema (PONTE; FONSECA; CLARO, 1987).

Figura 2 - Fotografia aérea de Bertioga, Santos e São Vicente (retirado de Google Earth versão 2009)

4.1.2.3 Petróleo em manguezais

O petróleo e seus derivados podem persistir por mais de 20 anos nos manguezais, antes que a vegetação se recupere totalmente (MICHEL, 2002). A alta persistência ocorre devido à lenta biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, devido à limitação de oxigenação do meio e a lenta ciclagem dos nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia (SCHERRER; MILLE, 1989).

Pequenas quantidades de petróleo podem ter efeitos de longo prazo diminuindo a diversidade de espécies em um sistema (HOWARTH, 1991). A diminuição da diversidade de espécies vegetais e de invertebrados marinhos em um ambiente contaminado é causada principalmente por efeitos fisiológicos, carcinogênicos e

citogenéticos de longo prazo, alterando a reprodução, crescimento, respiração, movimentação e susceptibilidade a doenças (SUCHANEK, 1993).

Segundo Clarke e Ward (1994), houve uma drástica diminuição na produção de sementes nas plantas do mangue durante 17 meses no Sudeste da Austrália após um derramamento de petróleo. Em outras regiões a presença do óleo exerceu impacto negativo sobre a vegetação durante 17 anos (BAKER et al., 1993).

Os micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo estão largamente distribuídos pelos oceanos. Vários gêneros de bactérias presentes no mar são responsáveis pela degradação do petróleo (FLOODGATE, 1995). Os estudos de bactérias marinhas em ambientes contaminados são importantes para a restauração do ecossistema (SLOAN, 1999).

4.1.3 Cianobactérias

Evidências paleontológicas, geológicas e geoquímicas isotópicas indicam que as cianobactérias já existiam há aproximadamente 3.500 milhões de anos (SCHOPF, 1996). Esses organismos podem ser considerados a chave da evolução da vida no planeta Terra, pois provavelmente foram os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (SCHOPF, 1994).

O modo nutricional dominante das cianobactérias é o autotrófico (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Sua natureza é tipicamente fotossintética aeróbica, mas algumas espécies são heterotróficas facultativas, crescem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). Outras espécies em condições anaeróbicas utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986). As cianobactérias desempenham importante papel no ciclo do carbono, oxigênio e nitrogênio e tem significância evolutiva em relação às plantas (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973).

A fotossíntese oxigênica das cianobactérias ocorre em um aparato fotossintético contendo clorofila a, ficobiliproteínas e vários carotenóides como pigmentos da antena coletora de luz (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977), sendo a água o doador de elétrons. Além da capacidade de realizar fotossíntese, algumas espécies de cianobactérias

possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico contribuindo para a fertilidade dos solos e águas (RAI, 1990). Essa propriedade está associada à presença de células modificadas chamadas heterocitos, as quais contêm a enzima nitrogenase que fixa o N_2 do ar atmosférico e o transforma em amônia (STEWART, 1973), ou à presença de células especializadas, os diazocitos (BERMAN-FRANK et al., 2001). Os heterocitos possuem um envoltório celular espesso que evita a entrada de O_2 capaz de inativar a enzima nitrogenase. Em várias linhagens unicelulares, a fixação de nitrogênio ocorre no escuro e, em algumas linhagens filamentosas, a fixação de nitrogênio ocorre em células vegetativas em condições anóxicas (FAY, 1992; GALLON, 1992).

As cianobactérias podem desenvolver os acinetos, que são células especializadas, mais resistentes que desempenham o papel de “esporos”, auxiliando na adaptação em diversos ambientes (THIEL; WOLK, 1983). Além disso, outras características morfológicas estruturais representam vantagem adaptativa para as cianobactérias, como os hormogônios e os aerótopos. Como instrumento de colonização, o hormogônio, que são filamentos modificados, atua como elemento de dispersão e infecção no estabelecimento da associação cianobionte-hospedeiro (FIORE; HONDA, 2008). Os aerótopos, considerados vesículas de ar, são responsáveis pela flutuabilidade e pela habilidade de regular a movimentação ao longo da coluna d'água, conforme as condições ambientais (OLIVER; GANF, 2000). As cianobactérias apresentam grande variedade fenotípica, sendo encontradas diversas formas e arranjos, como as unicelulares (cocóides e bacilos) e filamentosas (ramificadas ou não) (WHITTON; POTTS, 2000).

A longa história evolutiva das cianobactérias é tida como a razão de sua abundante ocorrência nos mais diversos tipos de habitat (SCHOPF, 1994). A grande diversidade metabólica das cianobactérias propiciou a sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também favoreceu a sua colonização nos ambientes atuais. Esses micro-organismos são encontrados em todos os tipos de ecossistemas bem iluminados, inclusive em ambientes extremos, como areia e rochas desérticas, águas termais (“hot springs”) e lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1976; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). Podem ser encontrados em vida livre no ambiente, como nas florações planctônicas ou turfás, ou em associação com outros organismos

como plantas, fungos, algas e bactérias, formando líquens e mantos microbianos (STAL, 1995; OLIVER; GANF, 2000; STENROOS et al., 2006; FIORE; HONDA, 2008). Podem também ser encontradas em solos e ambientes aerofíticos, como troncos e folhas de árvores e rochas (WHITTON; POTTS, 2000; AGUIAR et al., 2008; BRANCO et al., 2009).

As cianobactérias propiciam também uma extraordinária e ampla faixa de contribuição para a vida dos humanos, apresentando inclusive importância econômica (MANN; CARR, 1992). Além da produção primária de matéria orgânica e da fixação biológica de nitrogênio por algumas espécies, o uso de cianobactérias na produção de alimentos com valores nutricionais elevados, conversão de energia solar e produtos farmacológicos apresentam um potencial promissor para o futuro (KREITLOW; MUNDT; LINDEQUIST, 1999; SKULBERG, 1995). Porém, algumas linhagens de cianobactérias são também capazes de produzir toxinas que constituem um perigo em potencial para a saúde dos animais e humanos.

4.1.3.1 Cianobactérias em Ecossistema Manguezal

Os manguezais fornecem um ambiente ecológico único para diversas comunidades de bactérias, onde esses micro-organismos preenchem uma série de nichos e são fundamentais para o seu funcionamento. Muitas bactérias controlam a dinâmica do ferro, fósforo, enxofre, contribuindo com os padrões de vegetação (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998). Bactérias metanogênicas são abundantes em sedimentos onde as espécies de *Avicennia* predominam (RAMAMURTHY; RAJU; NATARAJAN, 1990; MOHANRAJU; NATARAJAN, 1992).

As cianobactérias marinhas são um componente da microbiota muito importante como fonte de nitrogênio em todos os sistemas de mangue (SHERIDAN, 1991, 1992; HUSSAIN; KHOJA, 1993; KRISHNAMURTHY et al., 1995; PALANISELVAM, 1998). Segundo Mann e Steinke (1993), cianobactérias fixadoras de N_2 isoladas de raízes de *Avicennia* no manguezal da Reserva Beachwood, na África do Sul, fornecem 24,3% do requerimento anual de nitrogênio no pântano. As taxas de fixação de nitrogênio são controladas pela luz e temperatura e mostram as tendências sazonais, como baixas no inverno e altas no verão. Toledo e colaboradores (1995) afirmam que as taxas de

fixação são mais elevadas quando as cianobactérias estão no ambiente de manguezal do que quando estão mantidas em meio de cultura artificial.

As cianobactérias nos manguezais colonizam qualquer superfície submersa, incluindo os sedimentos, raízes, raízes aéreas, galhos e troncos (SHERIDAN, 1991). A cianobactéria *Calothrix viguieri* isolada da superfície das raízes de mangue apresenta uma resposta morfológica à variação de salinidade, como o desenvolvimento de “pêlos” em baixa salinidade. Esses “pêlos” podem ser uma adaptação para hidrolisar fósforo orgânico que ocorrem nos habitats após chuvas pesadas (MAHASNEH; GRAINGER; WHITTON, 1990).

Estudos sobre a diversidade de cianobactérias em manguezais são bastante restritos. No Brasil, alguns estudos foram realizados nos estados do Maranhão (NOGUEIRA E FERREIRA-CORREIA, 2001), Pernambuco (BRANCO et al., 2003), Rio de Janeiro (BAETA-NEVES; TRIBUZI, 1992) e São Paulo (BRANCO; SILVA; SANT’ANNA, 1994; BRANCO; SANT’ANNA; AZEVEDO, 1996). Entretanto, em todos eles a identificação taxonômica de cianobactérias foi realizada utilizando amostras ambientais e visualização em microscópio ótico. O conhecimento das cianobactérias de manguezais, além de contribuir para a complementação de dados da biodiversidade, pode também trazer contribuições relevantes à taxonomia e ecologia do grupo, uma vez que, fatores relacionados à ecofisiologia e capacidade de dispersão, como temperatura, distribuição de habitats, dispersão e especiação, podem explicar os diferentes padrões de distribuição geográfica das cianobactérias (HOFFMANN, 1996).

4.1.3.2 Taxonomia de cianobactérias

De acordo com Komárek (2010), a classificação taxonômica seria um método para reconhecer e registrar a diversidade de organismos no mundo, sempre levando em consideração as contínuas evoluções do conhecimento sobre informações genéticas, relações ecológicas e variações fenotípicas.

A sistemática de cianobactérias tem sido notavelmente tumultuada, sendo um grupo de micro-organismos muito discutido entre bacteriologistas e botânicos. A classificação dos organismos deve refletir as relações evolutivas entre eles (KOMÁREK, 2003; WILMOTTE; GOLUBIC, 1991), visando o seu arranjo em grupos taxonômicos,

além de reger sua identificação e fornecer uma linguagem comum aos especialistas (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001). Vários sistemas de classificação já foram propostos para as cianobactérias, porém sua sistemática continua sendo alterada.

Inicialmente as cianobactérias foram classificadas junto às algas, devido ao seu aparato fotossintético semelhante ao das plantas. Eram chamadas de algas verde-azuladas ou cianofíceas (STANIER et al., 1971). Segundo o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, cada espécie é classificada baseada em descrições fenotípicas, incluindo a morfologia da célula e bainha, formação de colônia, pigmentação, modo de reprodução, fisiologia e bioquímica, incluindo a descrição do material tipo em latim e sua inclusão em coleção de herbário.

A sistemática de cianobactérias passou a receber um enfoque bacteriológico proposto inicialmente por Stanier e colaboradores (1978) após a confirmação da origem procariótica desses organismos, com base nos estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares (STANIER et al, 1971; WOESE et al., 1975; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; BONEN; DOOLITTLE, 1978). Por meio desses estudos constatou-se a semelhança do envoltório celular das cianobactérias com o das bactérias Gram negativas, a estrutura procariótica celular com ausência de organelas citoplasmáticas e também a natureza bacteriana do ribossomo. O material em cultivo, mantido em coleção de cultura como linhagem referência, passou a ser pré-requisito para descrição dos gêneros de cianobactérias, diferente do enfoque botânico.

Em uma outra abordagem, J. Komárek e K. Anagnostidis (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005) tentaram conciliar as diferenças entre os sistemas botânicos e bacteriano. O sistema de classificação de Anagnostidis e Komárek (1985) propõe quatro ordens (Choococcales, Nostocales, Oscillatoriales e Stigonematales), subdivididas em famílias, subfamílias, gêneros e espécies. Esse sistema também considerou a possibilidade da identificação morfológica de espécies em amostras da natureza e seu uso como uma ferramenta para estudos de diversidade de cianobactérias.

Recentemente, ferramentas botânicas e bacteriológicas estão convergindo; a classificação botânica utiliza informação genética em adição à morfológica, citológica, ecológica e bioquímicas de cianobactéria (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY,

2005; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Nomes botânicos são usados em classificação bacteriológica dentro de subseções de ordens usadas na classificação botânica.

De acordo com Komárek (2003), as relações filogenéticas encontradas entre os organismos devem estar de acordo com os critérios modernos de classificação, que consideram aspectos paleontológicos, fenotípicos (morfológicos), ecológicos, ultraestruturais (microscopia eletrônica) e moleculares (hibridização DNA-DNA e sequenciamento). Os caracteres morfológicos tradicionais analisados, na maioria das vezes, está coerente com a caracterização genotípica dos vários gêneros utilizando sequências de RNAr, por isso apresentam-se como informações relativamente robustas para serem aceitas pelo Manual de Bergey. Porém, alguns problemas surgem com a classificação em nível infragenérico pela utilização de características variáveis, como tamanho e forma das células, presença de bainhas, pigmentação e tipo de ramificação. Em muitos casos, a análise dessas características não coincide com as análises moleculares, provavelmente por omitirem a especificidade ecofisiológica. O autor propõe a existência de “morfotipos” dentro dos gêneros que são considerados mais estáveis, em contraste com a variabilidade descrita para gêneros geneticamente um pouco mais definidos. Esses “morfotipos” podem ocorrer algumas vezes em diferentes áreas e persistirem por muitos anos nos biótopos em condições ecológicas mais ou menos estáveis, apresentando agrupamentos coerentes em análises filogenéticas. Com isso, para determinação de espécies pela abordagem polifásica, a estabilidade de critérios fenotípicos, genéticos e aspectos ecológicos deve ser considerada em conjunto. De acordo com essa mesma abordagem, a maioria dos gêneros e espécies deverão ser reavaliados futuramente e a diversidade de cianobactérias em vários ambientes deverá ser revisada.

Baseados no aumento de informações taxonômicas das cianobactérias gerados pelas técnicas modernas como o sequenciamento genético, ultraestrutura e caracterização ecofisiológica, Hoffmann, Komárek e Kastovsky (2005) propuseram uma nova revisão da taxonomia em cianobactérias. Esse sistema, sempre que possível, utiliza culturas isoladas e é baseado principalmente em critérios taxonômicos botânicos, mas tentando integrar caracteres bioquímicos, ultraestruturais e moleculares.

Uma característica desse sistema é o arranjo lógico dos organismos de acordo com várias combinações possíveis de padrão de divisão celular, forma celular e organização das células dentro da bainha e/ou mucilagem (WHITTON; POTTS, 2000).

Baseado no enfoque da taxonomia polifásica, cujo objetivo é integrar de forma consensual informações genotípicas, fenotípicas e filogenéticas (VANDAMME et al., 1996), o filo *Cyanobacteria* atualmente pertence ao domínio Bactéria (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001).

Novas informações serão sempre necessárias para corrigir e atualizar o sistema de classificação de cianobactérias, sendo importante a realização de constante revisão. Recentemente, Komárek (2010) propôs outras mudanças na taxonomia de cianobactérias baseado na combinação molecular, fenotípica e ecológica, inserindo novo conceito de gênero e espécies. Esse novo sistema de cianobactérias deve ser modificado de acordo com marcadores combinados, no qual informações moleculares devem ser associadas a informações bioquímicas, ultraestruturais, fenotípicas e ecológicas. Neste caso, o grande problema está sendo transferir para a prática toda informação moderna derivada de investigações moleculares e estabelecer uma regra para nomenclatura correta. As ferramentas moleculares devem ser a base para a reorganização do conhecimento; todavia, isso deverá explicar e estar de acordo com variações morfológicas e ecológicas dos genótipos de cianobactérias.

O Sistema de Classificação Bacteriológico (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001), o sistema proposto por Komárek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005) e Anagnostidis e Komárek (1985, 1990) que reuniu informações morfológicas com ultraestrutura e fisiologia, o sistema proposto por Hoffmann, Komárek e Kastovský (2005) e alguns gêneros revisados por Komárek (2010) estão comparativamente incluídos na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de cianobactérias de acordo com sistema bacteriológico e botânico (Modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006; KOMÁREK, 2010) (continua)

Classificação pelo Manual de Bacteriologia sistemática de Bergey (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001)	Classificação por Komárek e Anagnostidis (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005)	Classificação por Hoffmann, Komárek e Kastovsky (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVCKY, 2005)	Revisão por Komárek (KOMÁREK, 2010)
Subseção I (Chroococcales): unicelular ou colonial, divisão por fissão binária em 1 a 3 planos ou por <i>budding</i> Ex: <i>Gloeobacter</i> , <i>Microcystis</i> Subseção II (Pleurocapsales): unicelular ou colonial, divisão por fissão múltipla ou em conjunto com fissão binária Ex: Subgrupo I – <i>Cyanocystis</i>	Chroococcales: unicelular ou colonial Ex: Família <i>Gloeobacteraceae</i> - <i>Cloeobacter</i> Família <i>Synechococcaceae</i> - <i>Microcystis</i>	Gloeobacterales: cocóide, sem tilacóides Família <i>Bloeobacteraceae</i> Synechococcales: tilacóides paralelos à superfície da célula, unicelular ou colonial Ex: Famílias <i>Synechococcaceae</i> – <i>Anhanotece</i> Chroococcales: arranjo radial dos tilacóides, unicelular ou colonial Ex: Família <i>Microcystaceae</i> - <i>Microcystis</i>	<i>Synechococcus</i> deverá ser dividida dentro de diversas unidades genéticas. Registrou-se no banco de dados 12 diferentes agrupamentos filogenéticos designados por <i>Synechococcus</i> . <i>Synechocystis</i> de referência deve ser renomeada com o código PCC 6803 <i>Aphanothece</i> deve ser revisada junto com <i>Gloeothece</i> , pois formam 4 a 5 diferentes agrupamentos. Dois agrupamentos são distantes na árvore filogenética e apresentam diferentes tamanho de células, estrutura de mucilagem e diferenças na ultraestrutura. <i>Cyanothece</i> gêneros menores têm sido classificados erroneamente como <i>Cyanothece</i> . Sugere-se os nomes <i>Euhalothece</i> , <i>Halothece</i> e <i>Cyanobacterium</i> <i>Phormidium</i> é um gênero muito heterogêneo, dele originou-se um novo gênero chamado <i>Phormidesmis</i> . <i>Phormidesmis</i> é geneticamente e ultraestruturalmente mais relacionado com <i>pseudanabaenaceae</i> do que com <i>phormidiaceae</i> .
Subseção III (Oscillatoriales): filamentoso, não heterocitado Ex: <i>Geitlerinema</i> , <i>Planktothrix</i>	Oscillatoriales: filamentoso, não heterocitado Ex: Família <i>Pseudanabaenaceae</i> – <i>Geitlerinema</i> Família <i>Phormidiaceae</i> – <i>Arthrospira</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Planktothrix</i>	Oscillatoriales: arranjo radial dos tilacóides, filamentos largos Ex: Família <i>Phormidiaceae</i> – <i>Planktothrix</i> Pseudoanabaenales: tilacóide paralelos à superfície da célula, filamentos finos Ex: Família <i>Pseudanabaenaceae</i> - <i>Geitlerinema</i>	Nostocales: heterocitado, acinetos presentes - Família <i>Scytonemataceae</i> : isopolar, ramificação falsa. Ex: <i>Scytonematopsis</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Brasilonema</i> , <i>Scytonema</i>
Subseção IV (Nostocales): filamentoso, heterocitado, não ramificado Ex: Subgrupo 1 – <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> Subgrupo II – <i>Microchaete</i> , <i>Rivularia</i>	Nostocales: filamentoso, heterocitado, acinetos, ramificação falsa Ex: Família <i>Microchaetaceae</i> – <i>Microchaete</i> Família <i>Rivulariaceae</i> – <i>Rivularia</i> Família <i>Nostocaceae</i>	Nostocales: filamentoso, heterocitado Ex: Família <i>Symphyonemataceae</i> – <i>Mastigocladopsis</i> , <i>Symphyonemopsis</i> , <i>Symphyonema</i> , <i>Umezakia</i> Família <i>Rivulariaceae</i> – <i>Rivularia</i>	

Tabela 1 - Classificação de cianobactérias de acordo com sistema bacteriológico e botânico (Modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006; KOMÁREK, 2010) (conclusão)

Classificação pelo Manual de Bacteriologia sistemática de Bergey (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001)	Classificação por Komárek e Anagnostidis (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005)	Classificação por Hoffmann, Komárek e Kastovsky (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVCKY, 2005)	Revisão por Komárek (KOMÁREK, 2010)
	Nostocales Subfamília Anabaenoideae - <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> Subfamília Nostocoideae – <i>Nodularia</i> e <i>Nostoc</i>	Nostocales Família Microchaetaceae – <i>Microchaete</i> Família Nostocaceae – <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> Família Chlorogloeopsidaceae – <i>Chlorogloeopsis</i> Família Hapalosiphonaceae – <i>Fischerella</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Mastigocladus</i> , <i>Westiellopsis</i>	Nostocales - Família Symphyonemataceae; ramificação verdadeira (Y). Ex: <i>Iyengariella</i> , <i>Mastigocladopsis</i> , <i>Symphyonemopsis</i> , <i>Symphyonema</i> , <i>Umezakia</i> - Família Rivulariaceae: heteropolar Ex: <i>Calothrix</i> , <i>Gloeotrichia</i> , <i>Isactis</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Sacconema</i> . - Família Microchaetaceae: heteropolar Ex: <i>Borzinema</i> , <i>Camptylonemopsis</i> , <i>Coleodesmium</i> , <i>Microchaete</i> , <i>Rexia</i> , <i>Spirirestis</i> , <i>Sacconema</i> , <i>Tolypothrix</i> - Família Nostocaceae: isopolar, sem ramificação Ex: <i>Anabaena</i> (planctônica – <i>Dolichospermum</i>), <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Cuspidothrix</i> , <i>Cyanospira</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Richeli</i> , <i>Trichormus</i> - Família Chlorogloeopsidaceae. Ex: <i>Chlorogloeopsis</i> - Família Hapalosiphonaceae: ramificação verdadeira (T) Ex: <i>Albrightia</i> , <i>Brachytrichiopsis</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Geitleria</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Mastigocladus</i> , <i>Mastigocoleopsis</i> , <i>Mastigocoleus</i> , <i>Thalpopphila</i> , <i>Westiella</i> , <i>Westiellopsis</i> - Família Stigonemataceae: ramificação verdadeira, multiseriada Ex: <i>Cyanobotrys</i> , <i>Desmosiphon</i> , <i>Doliocatella</i> , <i>Homoeoptycha</i> , <i>Nematoplaca</i> , <i>Pulvinularia</i> , <i>Stauromatonema</i> , <i>Stigonema</i>
Subseção V (Stigonematales): filamentoso, heterocitado, ramificado Ex: <i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Fischerella</i> , <i>Westiella</i>	Stigonematales: filamentoso, heterocitado, acinetos, ramificação verdadeira Ex: Família Chlorogloeopsaceae – <i>Chlorogloeopsis</i> Família Fischerellaceae – <i>Fischerella</i> , <i>westiellopsis</i> Família Mastigocladaceae - <i>Hapalosiphon</i> , <i>Mastigocladus</i>		

4.1.3.2.1 Filogenia de cianobactérias baseado na subunidade 16S do RNA ribossômico (RNAr 16S)

Os genes *rrs*, *rrl* e *rrf* codificam para os RNAs ribossômicos 16S, 23S e 5S respectivamente. Os RNAs ribossômicos (RNAr, ou rRNA, do inglês “*ribosomal ribonucleic acid*”) são componentes essenciais dos ribossomos envolvidos na tradução do RNA mensageiro (RNAm, ou mRNA, do inglês “*messenger ribonucleic acid*”) para a síntese de proteínas. Uma das formas de inferir relações filogenéticas e identificar bactérias é utilizando o gene *rrs* que codifica para a subunidade 16S do RNAr (RNAr 16S) como marcador genético. O gene de RNAr 16S tem uma distribuição universal entre os procariotos, consistência funcional, regiões variáveis e conservadas, tamanho grande e conteúdo de informação elevado, o que o torna um bom marcador genético (WOESE, 1987; LUDWIG; KLENK, 2001). As sequências do gene de RNAr 16S são relativamente fáceis de se alinhar, e contém grande banco de dados, permitindo a comparação entre linhagens (LUDWIG; KLENK, 2001). O impacto da transferência lateral de genes sobre a filogenia baseada nos genes RNAr 16S é limitada, pois os genes conservados RNAr 16S são recalcitrantes para a transferência na natureza (DOOLITTLE, 1999; WOESE, 2004; COENYE et al., 2005). O genoma cianobacteriano pode conter 5 cópias do gene de RNAr 16S (ITEMAN et al., 2002; RAJANIEMI-WACKLIN et al., 2005). A similaridade de sequências do gene de RNAr 16S de bactéria tem mostrado boa correlação com o genoma dessas bactérias, expresso como valor de reassociação DNA:DNA (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994) ou como média da identidade de nucleotídeos ou aminoácido dos genes (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005a, b). Essas correlações suportam a robustez da filogenia bacteriana baseada no gene do RNAr 16S (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005b). O poder de resolução do gene de RNAr 16S é até nível intragenérico (STALEY, 2006), sendo que o limite de similaridade para esse nível entre o gênero cianobactéria é de 95% (WAYNE et al., 1987; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Esse limite não pode ser usado como um critério padrão para separação biológica, mas isso pode ser um importante marcador para diferenciação genérica (KOMÁREK, 2010).

Outros genes constitutivos também são recomendados e utilizados para filogenia de cianobactérias, pois são também conservados e poucos sujeitos à transferência

lateral, inserção/deleção ou recombinação. Para análises filogenéticas de cianobactérias têm-se utilizado os seguintes genes: espaço intergênico da ficocianina (*cpcBA*), subunidade B da DNA girase (*gyrB*), gene envolvido na diferenciação do heterocito (*hetR*), subunidade L da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase e chaperonina proteína X - RubisCO (*rbcLX*) (RUDI et al., 1998; GUGGER et al., 2002), subunidade β da RNA polimerase DNA-dependente (*rpoB*) (PALENIK; SWIFT, 1996; WILSON et al., 2000), subunidade C da RNA (*rpoC1*), subunidade D da RNA polimerase (*rpoD1*), e fator Tu de elongação (*tufA*) (DELWICHE; KUHSEL; PALMER, 1995), além do RNAr 16S.

4.1.4 Produtos naturais produzidos por cianobactérias

Cianobactérias são uma grande fonte de metabólitos secundários com potencial aplicação como antimicrobianos, agentes anticancerígenos ou substâncias promissoras em estudos de biologia celular (BURJA et al., 2001; WELKER; VON DÖHREN, 2006; SIVONEN; BÖRNER, 2008).

Assim como fungos filamentosos, leveduras, outras bactérias e plantas as cianobactérias são produtoras de metabólitos secundários, os quais podem ser substâncias com atividade biológica que contribuem para a competição entre os organismos e que não são necessários para o seu metabolismo primário, tais como, divisão celular ou metabolismo. As cianobactérias constituem um grupo promissor de organismos dos quais pode-se isolar produtos naturais bioquimicamente ativos (BURJA et al., 2001). No período entre janeiro de 2001 a dezembro de 2006, cerca de 300 metabólitos secundários, representados por diversas estruturas químicas, foram relatados sendo produzidos por cianobactérias marinhas (TAN, 2007) (Tabela 2). A maioria desses metabólitos são biologicamente ativos e são produtos da via biossintética de peptídeos não ribossômicos (NRP, do inglês “*Nonribosomal polypeptide*”) ou de sistema integrado entre NRP-Policetídeo (TAN, 2007; WELKER; VON DÖHREN, 2006). Entre as substâncias isoladas e caracterizadas com bioatividade, encontram-se inibidores enzimáticos, herbicidas, antimicóticos, inibidores de apetite, antimaláricos e imunossupressores (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et. al., 2004a; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996). Como exemplos de

substâncias conhecidas encontram-se o antibacteriano vancomicina; o agente imunossupressor ciclosporina; e o agente anticancerígeno bleomicina (SCHWARZER; FINKING; MARAHIEL, 2003). Outros anticancerígenos também são encontrados sendo produzidos por cianobactérias marinhas, como curacina A e a dolastatina 10 (GERWICK; TAN; SITACHITTA, 2001). Essas mesmas estruturas podem ser utilizadas na química farmacêutica para desenvolvimento de análogos sintéticos (WIPF, et al., 2002; MITA et al., 2006; WATANABE; MINAMI; KOBAYASHI, 2006).

Diversas hepatotoxinas (microcistinas, nodularina, cilindrospermopsinas) e neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a, anatoxina-a (S)) produzidas por cianobactérias também são sintetizadas por meio do metabolismo secundário (SIVONEN; JONES, 1999). Neurotoxinas provenientes de cianobactérias marinhas podem agir tanto como bloqueadores (kalkitoxina e jamaicamida A) quanto como ativadores (antillatoxina) de canais de sódio de células eucarióticas. As propriedades neurotóxicas dessas moléculas são muito potentes, em escala de nanomolar. Essas toxinas permitem a caracterização funcional de canais de sódios e também são importantes no estudo de potentes analgésicos e neuroprotetores (BLUMENTHAL; SUBERT, 2003).

A maioria das biomoléculas entre 300 alcalóides isolados de cianobactérias marinhas, reportadas na literatura, são isoladas de linhagens filamentosas pertencentes à ordem Nostocales, principalmente dos gêneros: *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Symploca* (GERWICK; TAN; SITACHITTA, 2001).

Segundo Teruya et al (2005), 2 alcalóides, denominados phormidinas A e B, foram isolados de uma linhagem de *Phormidium* sp. marinha.

Tabela 2 - Metabólitos secundários produzidos por cianobactérias (continua)

Metabólito	Organismo produtor	Atividade Biológica	Referências
Semiplenamida	<i>Lyngbya semiplena</i>	Inibidor de membrana transportadora	Han et. al., 2003
Anabaenopeptina	<i>Microcystis aeruginosa</i> W61 e <i>Anabaena</i> sp. 90	Inibidor da protease	Erhard; von Döhren, 1997
Aeruginosina	<i>Planktothrix</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibidor de trombina e tripsina	Welker; Christiansen; Von Döhren, 2004 Murakami et al., 1995
Nostoginina BN578	<i>Nostoc</i> sp.	Inibidor de serina-protease	Ploutno; Carmeli, 2002
Criptoficina-24	<i>Nostoc</i> sp. GSV224	Inibidor de células antitumorais	Golakoti et. al., 1995
Oscilapeptina G	<i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidor de tirosinase e Toxina	Sano; Kaya, I., 1996
Anabaenopeptina B	<i>Anabaena flos-aquae</i> NRC 525-17	Inibidor de protease	Harada et. al., 1995
Brunsvicamida B	<i>Tychonema</i> sp.	Inibidor de proteína tirosina fosfatase B (MptpB)	Müller et. al., 2006
Banyasciclamida C	<i>Nostoc</i> sp.	Inibidor de serina protease	Ploutno; Carmeli, 2002
Cianostatina B	<i>Microcystis</i> sp.	Inibidor de leucina aminopeptidase M	Czarnecki et. al., 2006 Welker et. al., 2006 Sano et. al., 2005
Oscilapeptina G	<i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidor de tirosina	Sano, Kaya, 1996
Microginina	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibidor de aminopeptidase e enzima conversora de angiotensina	Ishida et al., 2000
Microviridina	<i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidor de elastase, tirosinase	Murakami et al., 1997 Ishitsuka et al., 1990
Cianopeptolina ou micropeptina	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inibidor de serina protease	Czarnecki et al., 2006 Okino et al., 1993 Reshef; Carmeli, 2001 Ploutno; Carmeli, 2002
Ambiguina H isonitrila	<i>Fischerella</i> sp.	Antimicrobiano	Raveh; Carmeli, 2007
Criptoficina-326	<i>Nostoc</i> sp. GSV224	Antitumoral e antifúngico	Chaganty et. al., 2004
Ictiopeptina A	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	Antiviral	Zainuddin et. al., 2007
12-epi-fischerindol U isonitrila		Antifúngico	Stratmann et. al., 1994
Kasumigamida B	<i>Microcystis</i>	Antialgal	Welker et. al., 2006
Calothrixina A	<i>Calothrix</i>	Antimalárico	Rickards et. al., 1999
Hierridina B	<i>Phormidium ectocarp</i>	Antiplasmodial	Papendorf et. al., 1998
Ipaoamida	<i>Lyngbya majuscula</i>	Antipredador	Nagle et. al., 1996
Curacina D	<i>Lyngbya majuscula</i>	Citotoxina, antimitótico.	Marquez et. al., 1998
Toliporfina J	<i>Tolypothrix nodosa</i>	Agente de resistência reversa	Prinsep, et. al., 1998
Nostociclamida M	<i>Nostoc</i> 31	Agente de resistência reversa	Jüttner et. al., 2001
Dendroamida C	<i>Stigonema dendroideum</i>	Agente de resistência reversa	Ogino et. al., 1996
Cianopeptolina	<i>Planktothrix rubescens</i>	Inibidor de protease	Welker, et. al., 2007
Trungapeptina A	<i>Lyngbya majuscula</i>	Depsipeptídeo (tóxico)	Bunyajetpong et. al., 2006

Tabela 2 - Metabólitos secundários produzidos por cianobactérias (conclusão)

Metabólito	Organismo produtor	Atividade Biológica	Referências
Guamamida	<i>Symploca</i> sp.	Citotoxina	Williams et. al., 2004
Lyngbyastatina 3	<i>Lyngbya majuscula</i>	Citotoxina	Williams; Moore; Paul, 2003
Ulongamida F	<i>Lyngbya</i> sp.	Citotoxina	Luesch et. al., 2002
Cilindrociclofano A	<i>Cylindrospermum licheniforme</i>	Citotoxina	Smith et. al., 2001
Raociclamida B	<i>Oscillatoria raoi</i>	Citotoxina	Admi et. al., 1996
Lyngbyatoxina	<i>Lyngbya majuscula</i>	Citotoxina	Edwards; Gerwick, 2004
Jamaicamida C	<i>Lyngbya majuscula</i>	Neurotoxina	Edwards et. al., 2004
Barbamida	<i>Lyngbya majuscula</i>	Toxina	Chang et al., 2002
Curacina	<i>Lyngbya majuscula</i>	Toxina cancerígena	Wipf et al. 2004

A maior parte dos metabólitos secundários é um peptídeo ou possui subestrutura peptídica. A maioria desses oligopeptídeos é sintetizada supostamente pelas peptídeo sintetases não ribossômicas (NRPS, do inglês “*Nonribosomal Peptide Synthetase*”), policetídeo sintase (PKS, do inglês “*Polyketide Synthase*”) e/ou sistemas híbridos de NRPS/PKS (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

4.1.4.1 Biossíntese de peptídeos sintetases não ribossômicas (NRPS) e policetídeo sintase (PKS)

Enquanto na síntese ribossômica de peptídeo, a formação das pontes peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o RNAm funciona como molde determinando a sequência do aminoácido do produto, na síntese não ribossômica de peptídeos, proteínas modulares com múltiplas atividades catalizam o agrupamento dos peptídeos e simultaneamente servem como molde. A síntese não ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não-protéicos, hidroxiácidos e substâncias policetílicas, especialmente elaboradas para serem incorporadas na estrutura destes peptídeos. Mais de 300 precursores diretos são conhecidos (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996). O tamanho desses peptídeos varia de 2 a 48 aminoácidos (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996) em contraste com os peptídeos ribossômicos, os quais podem consistir de mais de 3.000 resíduos de aminoácidos.

Na biossíntese de metabólitos secundários ocorrem atividades enzimáticas, fusão de genes e formação de proteínas complexas de forma integrada (VON DÖHREN et al., 1997). As enzimas envolvidas na biossíntese desses metabólitos são

caracterizadas por um arranjo modular, encontrando-se de forma correspondente, blocos de sequências repetitivas nos genes que as codificam (ETCHEGARAY, 1998; ETCHEGARAY et al., 2004b; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997).

As NRPSs são formadas por módulos e domínios e funcionam como uma linha de montagem industrial, onde os aminoácidos que constituem a estrutura do peptídeo são incorporados sequencialmente, através de uma série de reações enzimáticas parciais e repetitivas. Para a incorporação de um aminoácido em um peptídeo não ribossômico, a enzima utiliza um módulo composto por cerca de 1.000 aminoácidos, o qual é subdividido em regiões menores, envolvidas em reações enzimáticas específicas.

Cada módulo está envolvido com uma etapa da biossíntese. Sendo assim, o primeiro módulo de uma NRPS está envolvido na ativação e incorporação do aminoácido N-terminal e os demais módulos na incorporação dos aminoácidos subsequentes, obedecendo-se uma colinearidade entre o aminoácido incorporado e o módulo responsável pela sua adição. As reações mínimas de NRPS são adenilação (domínio A), tioesterificação (domínio P) e condensação (domínio C) (ETCHEGARAY, 1998; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997). O domínio de formação de tioésteres também é conhecido como proteína carreadora de peptídeos (PCP), em analogia à biossíntese de ácidos graxos, onde se tem a proteína carreadora de acilas (ACP, do inglês “*acyl carrier protein*”) (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997).

Existem outros domínios que não são essenciais para a incorporação de aminoácidos, como por exemplo, os domínios de N-metilação (envolvido na acilação do aminogruppo com um grupamento metila) e epimerização (conversão de L-aminoácidos para a forma D).

O domínio T está comumente inserido no último módulo das NRPSs e tem atividade de tioesterase, liberando os peptídeos ao término da síntese enzimática (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997).

Para as peptídeos sintetases se tornarem funcionais elas necessitam incorporar cofator 4'-fosfopantoteína (PAN) ao domínio PCP através de uma ligação covalente do

tipo fosfodiéster ao resíduo de serina após sua tradução (WALSH et al., 1997). Nessa modificação ocorre a transformação de uma apoenzima (inativa) em haloenzima (ativa). A extremidade R-SH do cofator está envolvida na formação de intermediários ativos na forma de tioéster, importantes nas etapas de biossíntese de peptídeos não ribossômicos, ácidos graxos e de substâncias policetílicas. Enzimas envolvidas na transferência do cofator PAN chamadas de fosfopantotenil transferases já foram descritas (WALSH et al., 1997) e estão, muitas vezes, associadas ao agrupamento de biossíntese de peptídeos não ribossômicos.

Em cianobactérias, actinobactéria, mixobactéria e pseudomonades encontram-se predominantemente as policetídeos sintases do tipo I (BODE; MÜLLER, 2005) que são PKSs modulares ou proteínas multifuncionais. São classificadas como PKS I devido à sua semelhança estrutural com as sintases de ácidos graxos (FAS) de fungos e animais. Existem também as PKSs iterativas que são complexos de multiproteínas constituindo-se de enzimas individuais que são utilizadas repetidamente, ou seja, de forma iterativa, sendo denominadas tipo II (PKS II), como uma FAS II encontrada em bactérias e plantas (JENKE-KODAMA et al., 2005). As PKSs do tipo III são as mais simples e são tipicamente encontradas em plantas e bactérias (MOFFITT; NEILAN, 2003).

As PKSs I, assim como as NRPSs, são enzimas multifuncionais, que apresentam uma estrutura modular, e as regiões envolvidas nas reações parciais que estão localizadas em domínios PKSs modulares, sintetizam a maioria dos produtos policetílicos não-aromáticos. A principal diferença entre NRPSs e PKSs reside no fato de que PKSs condensam ácidos carboxílicos a uma cadeia crescente para formar um produto, ao passo que NRPSs adicionam aminoácidos.

A biossíntese de PKSs também ocorre pela ação de, no mínimo, três domínios por módulo. São eles: domínio acil transferase (AT), responsável pela ativação e incorporação da unidade extensora, a qual é então covalentemente ligada ao carreador fosfopantoteína do domínio ACP adjacente; domínio de cetossintase (KS) que captura o grupamento acila do domínio ACP anterior via ataque nucleofílico desse carbânion em relação a acila já existente no domínio condensando os dois grupamentos (KEATING;

WALSH, 1999); e domínio de tioesterase (T) que libera o produto do complexo PKS (DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001).

Existem domínios adicionais como: cetoreductase (KR), orto-metil-transferase (O-MT) para O-metilação, desidratase (DH), enoil redutase (ER), acil CoA ligase (AL), amino transferase (AMT) e metiltransferase (MT) (DU; SÁNCHEZ; SHEN, 2001; JENKE-KODAMA et al., 2005). Acetato e malonato são utilizados pelas PKSs como iniciadores de cadeia, assim como propionato, butirato, benzoato, cinamato e aminoácidos também podem ser iniciadores de cadeia. Malonato, metilmalonato e etilmalonato são utilizados como unidades de elongação, contribuindo assim para a diversidade de substâncias produzidas por essas enzimas (SIMPSON, 1995).

Nos sistemas híbridos de NRPS-PKS os módulos de NRPS são seguidos por módulos de PKS, sendo que a condensação ocorre através do domínio de cetossintase da PKS, entre um ácido carboxílico e um aminoácido. Da mesma forma, existem sistemas PKS-NRPS, nos quais o domínio de condensação da NRPS é responsável pela condensação entre um aminoácido e um ácido carboxílico. Existem dois tipos de sintetases híbridas: em uma delas os módulos das NRPSs e PKSs são ligados covalentemente (Tipo I) e no outro os módulos das NRPSs e PKSs são proteínas separadas fisicamente (Tipo II).

Em alguns sistemas híbridos foi detectado um grupo de multienzimas complexas que apresentam um módulo de PKS e de NRPS em um mesmo quadro aberto de leitura (ORF, do inglês "*Open Reading Frame*") (DITTMANN et al., 1999; SILAKOWSKI et al., 1999).

4.1.4.2 Genes de NRPS e PKS em cianobactérias

Uma abordagem para estimar o potencial de biossíntese de metabólitos secundários nos táxons de cianobactérias é a detecção de genes de NRPS e PKS usando oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados. A aplicação dessa abordagem permitiu constatar a presença de genes de NRPS em 75% de 146 linhagens de culturas axênicas de cianobactérias, com representantes de todas as subseções (CHRISTIANSEN et al., 2001). Entretanto, não foram identificados genes homólogos em vários gêneros, principalmente dentro da ordem Chroococcales (em linhagens de

Cyanothece, *Gloeobacter*, *Synechococcus* e *Synechocystis*). Numa análise similar conduzida em comunidades de estromatólitos, diversos fragmentos de genes de PKS foram identificados (BURNS et al., 2005). Genes de NRPS foram identificados em uma linhagem simbiótica de *Prochloron* que não pôde ser cultivada (SCHMIDT et al., 2005). Esse fato indica que alguns metabólitos que têm sido atribuídos ao hospedeiro podem estar sendo de fato produzidos pelo simbiote.

Silva-Stenico e colaboradores (2010) constataram a presença de genes de NRPS e PKS em 92 e 80% de 55 linhagens de cianobactérias isoladas em regiões brasileiras, respectivamente, com representantes das ordens Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales.

NRPSs e PKSs, bem como sistemas integrados dessas duas enzimas estão envolvidos na biossíntese de diversas substâncias conhecidas, como: barbamida produzida por *Lyngbya majuscula* 19L (CHANG et al., 2002); microcistinas produzidas por *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (TILLET et al., 2000), *Microcystis aeruginosa* K-139 (NISHIZAWA et al., 2000), *Planktothrix agardhii* CYA126 (CHRISTIANSEN et al., 2003), *Anabaena* 90 (ROUHIAINEN et al., 2004), *Nodularia spumigena* NSOR10 (MOFFITT; NEILAN, 2004); *Fischerella* (FIORE et al., 2009) e nostopeptolida A produzida por *Nostoc* sp. GSV224 (HOFFMANN et al., 2003)

Fewer e colaboradores (2009) identificaram um agrupamento de genes de 21 kb que codifica duas peptídeos sintetases não ribossômicas que estão envolvidos na síntese de diferentes variantes de spumiginas em *Nodularia spumigena*. A mesma linhagem de cianobactéria é conhecida pela produção da toxina nodularina (SIVONEN et al., 1989). Segundo Moffitt e Neilan (2004), as nodularinas também são sintetizadas por NRPSs e PKSs.

Rounge e colaboradores (2009) descrevem pela primeira vez o genoma inteiro de uma NRPS de *Planktothrix rubescens* NIVA CYA 98, identificando 7 distintos agrupamentos de genes putativos para oligopeptídeos. A similaridade na estrutura dos domínios e agrupamento das sequências levam os autores a associarem os agrupamentos de genes identificados à produção de aeruginosinas, cianopeptolina e microcistinas.

Frangéul e colaboradores (2008) relatam que os genomas de *Microcystis* PCC7806, *Microcystis* NIES843 e *Crocosphaera watsonii* WH8501 diferem de cianobactérias unicelulares de outros gêneros pois contêm um grande número de genes que codificam para NRPSs e PKSs. A linhagem *Microcystis* PCC7806 é conhecida por produzir duas isoformas de microcistinas (DIERSTEIN et al, 1990). Como resultados obtidos por sequenciamento do genoma dessa linhagem, o agrupamento de genes *mcyA-J* codificando NRPS, PKS puderam ser identificados. Genes para biossíntese de cianopeptolina (*mcn*) também foram reconhecidos (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática do agrupamento de genes envolvidos com a biossíntese de metabólitos secundários de *Microcystis* PCC7806. (A) Gene envolvido na síntese de microcistinas, cianopeptolina, aeruginosina e PKSs com função desconhecida. (B) Genes envolvidos na síntese de patelamida. (modificado de FRANGEUL et al., 2008)

4.1.4.3 Toxinas produzidas pelas cianobactérias (cianotoxinas)

Cianotoxinas podem ser classificadas de acordo com os órgãos ou sistemas que eles afetam, ou seja, com base nos seus efeitos biológicos (Codd; Morrison; Metcalf, 2005; Wiegand; Pflugmacher, 2005). De acordo com essa classificação, Funari e Testai (2008) dividem as cianotoxinas nos seguintes tipos: hepatotoxinas (mais de 70 variantes de microcistina, 6 variantes de nodularinas conhecidas); Neurotoxinas (anatoxina-a, homoanatoxina-a, anatoxina-a (S), 21 variantes de saxitoxinas conhecidas, também chamadas de toxinas paralisantes de moluscos); Citotoxinas (cilindrospermopsinas); Toxinas irritantes e que atuam na região gastrointestinal (aplisiotoxina, debromoaplisiotoxina, lyngbyatoxina, endotoxinas lipopolissacarídicas - LPS); e outras cianotoxinas cujo perfil toxicológico e ecológico é ainda parcialmente desconhecido, como microviridina e β -N-metilamino-L-alanina (BMAA).

Uma mesma cianotoxina pode ser produzida por diferentes espécies de cianobactérias e uma mesma cianobactéria pode produzir mais de um tipo de toxina (Tabela 3). Em 2002, Kurmayer e colaboradores demonstraram por meio das microcistinas (MCs) que dentro de uma mesma espécie ocorrem diferenças no genótipo, sendo que alguns deles possuem os genes para produção de determinada toxina e a outra não. Em 50-75% das florações de cianobactérias, a toxicidade é associada com a produção simultânea de diversas cianotoxinas (AN; Carmichael, 1994), sendo que a toxicidade das florações é determinada pela composição de suas linhagens (Funari; Testai, 2008).

A quantidade de produção de MCs pela população de cianobactérias em cultura é diretamente proporcional à velocidade de crescimento da cultura, sendo que a maior produção de toxinas é observada no final da fase logarítmica de crescimento (Van Apeldoorn et al., 2007). A variabilidade na concentração de MCs em corpos d'água tem sido atribuída a variações nas condições ambientais, o que pode influenciar o seu índice de produção (Sivonen; Jones, 1999).

Os fatores ambientais na produção de cianotoxinas não são muito conhecidos. Alguns estudos mostraram que a variação de parâmetros como luz, idade da cultura,

temperatura, pH e nutrientes trazem diferenças na produção de MC (SIVONEN; JONES, 1999).

A produção das cianotoxinas pelas cianobactérias tem sido firmada por testes em laboratório usando isolados de culturas monoespecíficas. Contudo, há a possibilidade de que bactérias heterotróficas associadas podem ter uma função na produção da cianotoxina ou na sua modulação (Codd; Morrison; Metcalf, 2005).

Tabela 3 - Cianobactérias produtoras de toxinas (modificado de FUNARI; TESTAI, 2008)

Cianotoxina	Genes envolvidos	Efeito biológico	Linhagens produtoras
Microcistina	Microcistina sintetase	Hepatotoxina. Inibidor das fosfatases PP1 e PP2A	<i>Microcystis</i> spp. <i>Planktothrix</i> spp., <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Cyanobium bacillare</i> , <i>Arthospora fusiformis</i> , <i>Limnothrix redekei</i> , <i>Phormidium formosum</i> , <i>Hapalosiphon hibernicus</i> , <i>Fischerella</i>
Nodularina	Nodularina sintetase	Hepatotoxina	<i>Nodularia spumigena</i>
Cilindrospermopsina	Cilindrospermopsina sintetase	Inibidor da biossíntese protéica, dano citogenético (DNA)	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Umezakia natans</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Raphidiopsis curvata</i> , <i>Anabaena lapponica</i> , <i>Anabaena bergii</i>
Anatoxina a-(S)		Neurotoxina. Liga-se aos receptores de acetilcolinesterase	<i>Anabaena flos-aquae</i> e <i>A. lemmermannii</i>
Saxitoxina (PSP)	Saxitoxina sintase	Neurotoxina. Bloqueia os canais de sódio nas células neurais	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> e <i>Cylindrospermopsis</i> spp.
Lipopolissacarídeos LPS	-	Dermatotoxina. Irritante, efeito em qualquer tecido exposto	Todas cianobactérias
Lyngbyatoxina	NRPS com organização de domínios: A-NM-PCP-C-A-PCP-Redutase	Citotoxina	<i>Lyngbya majuscula</i> (águas marinhas), <i>Oscillatoria nigro-viridis</i>
β -N-metilamino-L-alanina (BMAA)	-	Neurotoxina	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> e <i>Planktothrix</i> spp. e a maioria de cianobactérias simbiotes testadas.

4.1.4.3.1 Microcistina (MC)

Os gêneros de cianobactérias *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Hapalosiphon* e *Fischerella* são conhecidos por produzirem as hepatotoxinas microcistinas (SIVONEN; JONES, 1999; FIORE et al., 2009). As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos compostos por sete aminoácidos, incluindo diversos D-aminoácidos e dois aminoácidos incomuns, tais como N-metildehidroalanina

(MDHA) e β -aminoácido hidrofóbico, 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (Adda) (BOTES et al., 1985; RAO et al., 2002). Dittmann et al. (1997) identificaram genes envolvidos com a síntese de microcistinas em cepas de cianobactérias tóxicas confirmando a origem não ribossômica da produção de microcistinas. Esses peptídeos não ribossômicos são inibidores de proteínas fosfatases 1 e 2a (PP1/2a) e, mais frequentemente estão associados com hepatotoxicidade em mamíferos e outros vertebrados (DAWSON, 1998; DITTMANN; WIEGAND, 2006).

A estrutura comum de microcistina é representada da seguinte forma: -D-Alap¹-Xaa²-D-MeAsp³-Yaa⁴-Adda⁵-D-Glu⁶- Mdha⁷-, sendo que os aminoácidos Xaa² e Yaa⁴ são altamente variáveis e determinam o sufixo na nomenclatura de microcistinas. Mais de 85 diferentes variantes de microcistinas já foram encontradas (KAASALAINEN et al., 2009). A variante mais comum de microcistinas é a MC-LR, que é caracterizada pela presença de leucina (L) e arginina (R), L-aminoácidos nas posições 2 e 4 (Xaa² = L: Ala, Yaa⁴ = R: Arg) (GULLEDGE et al., 2002) (Figura 4) que podem induzir o estresse oxidativo, resultando em danos indiretos ao DNA (LANKOFF et al., 2004). Foi observado que os efeitos tóxicos de microcistinas são em grande parte dependentes da quantidade de toxina ingerida. Primeiramente, elas afetam hepatócitos onde a toxina se acumula (WANG et al., 2005; LI et al., 2007). Com base na toxicidade aguda a MC-LR é considerada uma das mais potentes hepatotoxinas entre as diferentes variantes (FUNARI; TESTAI, 2008). A função natural dos metabólitos secundários de cianobactérias, por exemplo, na sinalização celular e na sinalização ambiental, ainda não está clara.

Figura 4 - Estrutura química da microcistina-LR mostrando leucina (L:Leu) e arginina (R:Arg) nas posições 2 e 4 respectivamente (Retirado de RASTOGI; SINHA, 2009)

O agrupamento de genes envolvidos na síntese de MC foi primeiramente descrito para a *Microcystis aeruginosa* PCC7806, que contém 55 kb distribuídos em 10 genes, em dois operons opostos (*mcyA-C* e *mcyD-J*) (Figura 5), e também foi sequenciado e caracterizado para os gêneros *Anabaena* e *Planktothrix* (TILLET et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004). Essa descrição permite a realização de inferências evolutivas e análise da biossíntese dessa cianotoxina e tem sido útil como base para métodos de detecção de cianobactérias tóxicas usando a PCR.

Figura 5 - Agrupamento de genes responsáveis pela síntese de microcistina e nodularina. (a) *Nodularia spumigena*, (b) *Microcystis aeruginosa*, (c) *Plankthotrix agardhii* e (d) *Anabaena* sp. Rosa: PKS; Amarelo: PS; Verde: Enzimas de acabamento e finalização (*tailoring enzymes*) e Azul: transportadores ABC (modificado de PEARSON; NEILAN, 2008)

4.1.4.3.2 Saxitoxina (STX)

STX são neurotoxinas também conhecidas como venenos paralisantes de moluscos (PSP, do inglês “*Paralytic Shellfish Poisoning*”). Toxinas PSPs são os únicos alcalóides sendo produzidos tanto por procariotos quanto eucariotos (KELLMANN et al., 2008). Entre as cianobactérias, a sua produção já foi constatada em linhagens dos gêneros: *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis raciborskii* (HUMPAGE et al., 1994). Entre esses quatro gêneros, podemos citar sete espécies isoladas de água doce: *Anabaena circinalis* (Nostocales) na Austrália (BOWLING, 1994; BAKER; HUMPAGE, 1994), *Lyngbya wollei* (Oscillatoriales) nos Estados Unidos (CARMICHAEL et al., 1997), *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales), no Brasil (LAGOS et al., 1999; MOLICA et al., 2002), *Planktothrix* sp. (Oscillatoriales) na Itália (POMATI et al., 2000) e *Aphanizomenon gracile*, *Aph. Issatshenkoi*, e *Aph.* sp. não identificada (Nostocales) nos Estados Unidos, Portugal e China (LI et al., 2000; LIU et al., 2006; PEREIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2000).

Espécies de diferentes reinos são conhecidas pela produção de saxitoxinas, como certas espécies de dinoflagelados marinhos, formadores das “marés vermelhas” (HALLEGRAEFF, 1995). Além disso, há casos em que as toxinas PSP têm sido detectadas em organismos, onde dinoflagelados e cianobactérias foram fontes

improváveis para produção destas toxinas, sendo que nestes casos, incluíram espécies de baiacu de água doce e marinha (NAKASHIMA et al., 2004; SATO et al., 1997; ZAMAN et al., 1997), o anfíbio, *Atelopus zeteki* (YOTSU-YAMASHITA et al., 2004) e as algas vermelhas, *Jania* sp. (KOTAKI et al., 1983; OSHIMA et al., 1984).

STX são substâncias tricíclicas, consistindo de um grupo tetrahidropurina e duas subunidades de guanidina (Figura 6). Constatou-se que saxitoxinas podem bloquear a comunicação neuronal através da ligação aos canais de Na^+ em células nervosas, interrompendo a entrada de fluxo de sódio, o que leva à paralisia dos músculos e morte de mamíferos por parada respiratória (SU et al., 2004; KAO; LEVINSON, 1986). O transporte de STX pela cadeia alimentar e bioacumulação no zooplâncton é um mecanismo importante para a disponibilidade destas toxinas para níveis tróficos superiores (TURNER et al., 2000).

Figura 6 - Estrutura química da saxitoxina. Saxitoxina R=H, Neosaxitoxina R=OH

Kellmann e colaboradores (2008) descrevem um agrupamento de genes candidatos a biossíntese da PSP de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (Figura 7). A via biossintética da saxitoxina é codificada por cerca de 35KB, e por meio de análise comparativa da sequência, os autores atribuíram 30 funções catalíticas a 26 proteínas. A saxitoxina possui mais de 30 análogos que ocorrem naturalmente. A biossíntese de toxinas PSP é única e complexa, envolve reações bioquímicas que são raras em outras vias metabólicas. Elas incluem uma condensação de Claisen de um aminoácido para

um ácido carboxílico, transferência amidino, heterociclizações não-convencionais, e *o*-carbamatos (SHIMIZU, 1993).

Kellmann e colaboradores (2008) sugerem que a origem evolutiva desses genes está em uma cianobactéria ancestral com contribuição genética de diferentes linhagens filogenéticas de bactérias. A distribuição destes genes também fornece suporte ao envolvimento desse agrupamento de genes na produção de STX em diferentes cianobactérias.

Figura 7 - Organização estrutural do agrupamento de genes da STX de *C. raciborskii* T3. IS4: inserção de sequência 4; ompR: regulação da transcrição da família ompR; hisA: dois componentes de histidina quinase; orf24: ORF 4. A escala indica o agrupamento de genes em pares de bases (modificado de KELLMANN et al., 2008)

Kellmann, Mihali e Neilan (2008) propõe que a *o*-carbamoil transferase (OCTASE) é codificada e posteriormente adiciona um grupo carbamoil no lado hidroximetil da cadeia precursora da saxitoxina. Ortólogos de *sxtI* estariam presentes exclusivamente em linhagens tóxicas de cianobactérias e suas sequências apresentariam alta similaridade entre si. Desta forma, oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos pelos autores poderiam ser utilizados em reações de PCR para selecionar linhagens tóxicas de cianobactérias. Os autores relatam que *L. wollei* apresenta naturalmente uma mutação do gene que codifica a *sxtI* produzindo uma enzima inativa que é incapaz de sintetizar análogos de PSP carbamoilado, informação que dá suporte à função proposta para *sxtI*. A análise filogenética revelou que os genes OCTASE são encontrados exclusivamente em organismos procarióticos e foram

caracterizados por uma elevada taxa de transferência horizontal de genes. OCTASE provavelmente evoluiu de *o*-sialoglicoproteína endopeptidase de uma protobactéria ancestral. A filogenia de *sxtI* sugeriu que todo o conjunto de genes necessários para a biossíntese da saxitoxina pode se distribuir por transferência horizontal de genes (KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008).

A possibilidade da transferência lateral de genes entre os organismos sugere a impossibilidade de prever quais espécies irão produzir a toxina em um determinado local (KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008).

Mihali, Kellmann e Neilan (2009) descrevem a identificação, anotação e caracterização bioinformática do agrupamento de genes envolvidos na biossíntese da toxina PSP produzida por *Anabaena circinalis* e *Aphanizomenon* sp isolados da Austrália. O agrupamento de genes possui aproximadamente 28 kb e contém genes envolvidos na biossíntese e exportação da toxina. Os autores propõem a via biossintética para formação da STX e seus análogos nesses organismos.

O controle da transcrição e conhecimento das etapas fisiológicas das PSPs poderá ser utilizado futuramente na prevenção de formação de florações de cianobactérias tóxicas. A caracterização dos genes envolvidos na biossíntese de PSP poderá ser útil na identificação dos agrupamentos desses genes em dinoflagelados, reduzindo mortalidades humanas e significativa perda financeira para o turismo e indústria de mariscos (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009).

4.1.4.3.3 Métodos analíticos para detectar cianotoxinas

Várias técnicas são utilizadas para separação, identificação e quantificação de cianotoxinas. Entre elas podemos citar: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês "*High Performance Liquid Chromatography*"); Cromatografia Líquida acoplada à espectrômetro de massas (LC-MS, do inglês "*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*"), Espectrometria de massas Q-TOF (do inglês "*Quadrupole-Time-Of-Flight*"). Porém, outras técnicas como ensaios com ratos; biossensores moleculares, como ensaio imunológico (ELISA, do inglês "*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*") e métodos moleculares utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. As vantagens e desvantagens de algumas dessas técnicas estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos para detecção de cianotoxinas (HUMPAGE; MAGALHAES; FROSCIO, 2010; JAISWAL; SINGH; PRASANNA, 2008)

Técnicas	Uso	Vantagens	Desvantagens
Bioensaios com ratos ou camundongos	-Primeiros testes de toxicidade usados para detecção e identificação de cianotoxinas	-Método de simples avaliação no laboratório e de baixo custo	-Resultado obtido é uma inferência não específica, não sendo capaz de detectar a produção em baixos níveis. Utilização de animais em testes toxicológicos.
Ensaio imunológico (ELISA)	-Teste imunoquímico que envolve uma enzima, um anticorpo e um antígeno.	-Rápida detecção devido a sua sensibilidade, especificidade e fácil operação	-Apresenta resultados falsos positivos.
HPLC	-Separação de substâncias orgânicas	-Um dos primeiros métodos aplicados para PSPs	- Necessidade de padrões puros e quantificados para todas as toxinas; falta de um cromóforo necessário nos métodos derivatização pós coluna para produzir produtos fluorescentes; possibilidade de conversões químicas da toxina durante preparação da amostra
LC-MS	-Identificação de substâncias desconhecidas, quantificação e elucidação de propriedades química e estrutural de novas moléculas	-Maior sensibilidade, seletividade e precisão na quantificação	- Técnica de custo elevado Requer profissional habilitado com conhecimento detalhado para operar e manter o equipamento
Q-TOF	-Detecção e identificação de cianotoxinas	-Alta sensibilidade, versatilidade e resolução	-Média sensibilidade no “full scan”.
PCR	-Amplificação de genes envolvidos com a síntese de produção de toxinas	-Detecção, especificidade e sensibilidade	-Requer infraestrutura e equipamento especializado

4.1.4.4 Sideróforos

Entre os diferentes produtos naturais produzidos por cianobactérias, podemos citar os sideróforos. Sabe-se que o ferro (Fe) é um elemento essencial para quase todos os seres vivos. Apesar de ser o quarto elemento mais abundante na face da Terra, ele é encontrado formando polímeros insolúveis com baixa biodisponibilidade no meio ambiente. Portanto, para satisfazer as suas necessidades por ferro, muitos micro-organismos desenvolveram a capacidade para produzir e excretar pequenas moléculas com uma elevada afinidade pelo ferro, chamadas sideróforos. (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004; WILHELM; TRICK, 1994; KERRY; LAUDENBACH; TRICK, 2008). Ao quelar-se com o ferro disponível no meio ambiente, o sideróforo é ativamente absorvido pelas células microbianas (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

Estudos demonstraram que as propriedades de substâncias quelantes de ferro são difundidas entre cianobactérias de água doce e marinha (WILHELM; TRICK, 1994; KERRY; LAUDENBACH; TRICK, 2008). No entanto, a disponibilidade de sideróforos produzidos por cianobactérias em cada habitat pode ser limitada devido à diluição. Assim, por muito tempo foi assumido que apenas pequenas e simples moléculas orgânicas como ácidos hidroxâmicos ou citrato foram utilizadas como quelante de ferro (GADEMANN; PORTMANN, 2008). Quelantes de ferro possuindo grupos hidroxamato e catecolatos foram posteriormente isoladas das águas de ressurgência na costa da Califórnia (MACRELLIS et al., 2001).

As cianobactérias apresentam a produção de quelantes específicos de ferro (sideróforos) com baixa massa molecular (400-1200 Da) (TRICK; KERRY, 1992; WILHELM; TRICK, 1994). Schizokinen (Figura 8) foi o primeiro sideróforo derivado de citrato caracterizado, produzido por cianobactéria de água doce, a *Anabaena* PCC 7120 (GOLDMAN et al., 1983). As substâncias synechobactinas (Figura 8) produzidas pela cianobactéria marinha *Synechococcus* PCC 7002 são consideradas como derivadas de schizokinen, em que os ácidos hidroxâmicos foram substituídos por uma longa cadeia de ácidos graxos resultando em um sideróforo (ITO; BUTLER, 2005). Sugere-se que, devido à estrutura anfifílica destes sideróforos, eles podem fixar-se na membrana das cianobactérias e impedir a sua perda por diluição em ambientes marinhos (MARTINEZ et al., 2003). Dois sideróforos complexos, anachelina H contendo um terminal salicilamida e anachelina 1, terminadas por um anel oxazolina (Figura 9) foram isoladas de um biofilme de cianobactéria, *Anabaena cylindrica* 1403-2a (BEIDERBECK et al., 2000). Fish e Codd (1994) isolaram dois sideróforos com atividade antimicrobiana de *Phormidium* sp., linhagem termotolerante isolada de águas termais em Açores. Segundo os autores, os sideróforos isolados desta *Phormidium* apresentam capacidade de interagir com o DNA, porém esse mecanismo de ação ainda é desconhecido.

Figura 8 - Estrutura química de schizokinen (retirado de RASTOGI; SINHA, 2009)

Figura 9 - Estrutura química dos sideróforos (a) anachelina H, e (b) anachelina 1 (Retirado de RASTOGI; SINHA, 2009)

A fotoquímica de sideróforos produzidos por bactérias marinhas, cianobactéria, e de culturas isoladas de *Synechococcus* marinha foi estudada em função da sua característica de ligação ao Fe (III): hidroxamato, catecolatos, e um hidroxí grupo carboxilato. Observou-se que a fotorreatividade do sideróforo é largamente determinada pela natureza dos grupos de ligação ao Fe (III) (BARBEAU et al., 2003). As constantes de estabilidade termodinâmica para a complexação do ferro (III) com sideróforos tipo catecolatos isolados da bactéria marinha, *Alteromonas luteouiolacea* e cianobactérias, *Synechococcus* sp. PCC 7002 foi estimada e foi sugerido que sideróforos catecolatos podem desempenhar um papel na solubilização biológica e na absorção de ferro no ambiente marinho (LEWIS et al., 1995). No entanto, o mecanismo molecular de aquisição de Fe empregados por cianobactérias de oceano aberto ainda deve ser estabelecido. Foi relatado que tanto o Fe (III) inorgânico na presença de oxigênio, quanto o Fe (III) húmico estimulam a peroxidação lipídica, desencadeando ou estimulando a liberação de quelantes de algas verdes (*Scenedesmus*, *Chlorella*), algas vermelhas (*Porphyridium*) e cianobactérias (*Arthronema*, *Arthrospira*) (BENDERLIEV, 1999).

4.1.4.4.1 Vias metabólicas para produção de sideróforos

Muitos sideróforos são biossintetizados por NRPS, por exemplo: micobactina, enterobactina, vibriobactina e yersiniabactina (CROSA; WALSH, 2002). Porém, existe um grupo de sideróforos estruturalmente diverso que é biossintetizado por outra família de sintetases, cujas substâncias não apresentam similaridade de estrutura com aqueles sintetizados por NRPS. Essa via é conhecida como Sideróforo NRPS-independente (NIS, do inglês “*NRPS-independent siderophore*”) (CHALLIS, 2005).

NIS sintetases podem ser classificadas em tipo A, tipo B ou tipo C (CHALLIS, 2005). Um modelo sugere que enzimas do tipo A catalisam a condensação de um dos carbonos dos grupos proquirais em ácido cítrico com aminas e álcoois; enzimas tipo B catalisam a condensação do grupo γ -carboxil do α -cetoglutarado com aminas; e enzimas tipo C catalisam também a condensação da monoamina derivativa do ácido cítrico com uma amina ou álcool, ou a oligomerização e macrociclicação de ácido β -amino-carboxílico que contém um grupo hidroxamato (CHALLIS, 2005; BARONA-

GOMEZ, 2004). Algumas enzimas do tipo C supostamente catalisam múltiplas interações do mesmo tipo de reação de condensação e outros catalisam uma única condensação.

Oves-Costales e colaboradores (2008) caracterizaram a enzima AsbA, um tipo de NIS sintetase que cataliza reações na biossíntese da petrobactina 1 (sideróforo produzido por *Bacillus anthracis*); e a enzima DesD, uma NIS sintetase iterativa do tipo C, que sintetiza a desferrioxaminas B, G₁ e E (sideróforos produzidos por *Streptomyces*) (OVES-COSTALES et al., 2008; KADI et al., 2007). AsbA and DesD foram as primeiras enzimas da família do NIS sintetase bioquimicamente caracterizadas.

4.1.4.4.2 Excesso de ferro para saúde

O excesso de ferro no organismo pode ser derivado de uma grande absorção desse elemento na dieta, sendo que, neste caso, os sintomas demoram a aparecer. A sobrecarga de ferro no organismo também pode ser decorrente de anemia (síndromes de talassemia). Um sideróforo conhecido como desferrioxamina é administrado nesses casos reduzindo mortes cardíacas e prolongando a sobrevivência do paciente (PIPARD, 1997).

Deposição excessiva de ferro nos tecidos parenquimatosos de vários órgãos (por exemplo, fígado, coração, pâncreas, articulações, glândulas endócrinas) resulta em lesão celular e insuficiência funcional. No fígado, as principais manifestações patológicas da sobrecarga crônica de ferro são a fibrose e cirrose. Vários estudos clínicos comprovaram a hepatotoxicidade devido ao excesso de ferro, porém os mecanismos fisiopatológicos específicos de lesão hepatocelular e fibrose hepática em sobrecarga crônica desse elemento ainda não são bem compreendidos. Os mecanismos de lesão hepática em sobrecarga crônica de ferro incluem:

- aumento da fragilidade da membrana lisossomal, talvez mediado por peroxidação lipídica ferro-induzida;
- danos por peroxidação de mitocôndrias e microssomas resultando em disfunção das organelas;
- efeito direto do ferro na biossíntese de colágeno; ou

- combinação de todas as anteriores (BACON; BRITTON, 1989)

4.1.4.4.3 Importância do estudo de sideróforos

O estudo da aquisição de ferro por sideróforos pelos organismos de água doce e marinha é de grande importância na compreensão do mecanismo molecular de absorção desse elemento (GADEMANN; PORTMANN, 2008). Além disso, sideróforos são de particular interesse sendo utilizados como medicamentos no tratamento do excesso de ferro e de condições de toxicidade do metal tanto aguda como crônica em seres humanos (NEILANDS, 1981).

Muitos micro-organismos patógenos dependem de sideróforos para a absorção de ferro para seu crescimento e sobrevivência. O conhecimento do mecanismo molecular da síntese, excreção e absorção de sideróforos por bactérias é importante para o desenvolvimento de novos antibióticos (MIETHKE; MARAHIEL, 2007). Por exemplo, a biossíntese de micobactina de *Mycobacterium tuberculosis* é inibida em baixa concentração de ferro (FERRERAS et al., 2005). Novos antibióticos ativos contra *Bacillus anthracis*, micro-organismo que pode ser usado em bioterrorismo, podem ser desenvolvidos a partir do conhecimento desse mecanismo (OVES-COSTALES et al., 2008).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Culturas de cianobactérias

Foram utilizadas 44 linhagens de cianobactérias isoladas de três pontos (1- próximo ao mar; 2- meio do manguezal, entre mar e floresta; 3 - próximo à floresta, ponto mais distante do mar) e também em locais aleatórios próximo ao mar dos manguezais da Ilha do Cardoso e de Bertioga (Tabela 5). As cianobactérias foram mantidas em meio de cultura líquido SWBG-11 (CASTENHOLZ, 1988) e ASN-III (RIPPKA et al. 1979), sob iluminação fluorescente constante de $40 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP.

As identificações morfológica dos isolados foram realizadas pelo mestrando Diego Bonaldo Genuário (Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, CENA-USP) sob a supervisão dos sistematas Prof. Jiri Komárek e Prof. Jan Kaštovský (Faculdade de Ciências, Universidade Sul da Bohemia, República Tcheca).

Tabela 4 - Linhagens isoladas de manguezais do Estado de São Paulo

Ordem	Linhagem	Identificação	Local de amostragem	Meio de cultura
Chroococcales	CENA136	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (10-20 cm) – ponto 2	SWBG-11
	CENA138	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 3	SWBG-11
	CENA139	<i>Aphanothece</i>	IC - Solo (0-10 cm) – ponto 2	SWBG-11
	CENA140	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA141	<i>Chlorogloea</i>	IC – Água - ponto 2	SWBG-11
	CENA142	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 3	SWBG-11
	CENA143	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA145	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 3	SWBG-11
	CENA146	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA148	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA149	<i>Chlorogloea</i>	IC – Água – ponto 1	SWBG-11
	CENA150	<i>Chlorogloea</i>	B - Solo (20-40 cm) – ponto 3	SWBG-11
	CENA151	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (0-10 cm)*	SWBG-11
	CENA152	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (0-10 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA153	<i>Synechococcus</i>	IC - Perifiton - ponto 1	SWBG-11
	CENA162	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA163	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA164	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) *	SWBG-11
	CENA165	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) *	SWBG-11
	CENA166	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA169	<i>Cyanothece</i>	IC - Solo (10-20 cm) - ponto 2	SWBG-11
	CENA170	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA172	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (0-10 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA174	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA177	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (0-10 cm) - ponto 1	SWBG-11
	CENA178	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA179	<i>Synechococcus</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA180	<i>Synechocystis</i>	IC - Solo (0-10 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA181	<i>Chlorogloea</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 1	SWBG-11
	CENA185	<i>Synechococcus</i>	B - Solo (0-10 cm) – ponto 3	SWBG-11
Oscillatoriales	CENA134	<i>Leptolyngbya</i>	IC- Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA135	<i>Phormidium</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	ASN-III
	CENA137	<i>Leptolyngbya</i>	IC – Perifiton - ponto 2	SWBG-11
	CENA144	<i>Leptolyngbya</i>	IC - Solo (0-10 cm) – ponto 2	SWBG-11
	CENA147	<i>Leptolyngbya</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
	CENA155	<i>Leptolyngbya</i>	IC - Solo (20-40 cm) – ponto 3	SWBG-11
	CENA156	<i>Leptolyngbya</i>	IC - Solo (10-20 cm) – ponto 2	SWBG-11
	CENA167	<i>Leptolyngbya</i>	IC - Solo (0-10 cm) - ponto 3	SWBG-11
	CENA183	<i>Leptolyngbya</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	SWBG-11
Nostocales	CENA158	<i>Nostoc</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	ASN-III
	CENA159	<i>Nostoc</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	ASN-III
	CENA160	<i>Nostoc</i>	IC - Solo (0-10 cm) *	ASN-III
	CENA175	<i>Nostoc</i>	B - Solo (0-10 cm) – ponto 3	SWBG-11
	CENA176	<i>Microchaete</i>	B - Solo (0-10 cm) – ponto 3	SWBG-11

B: coleta realizada em Bertioga; IC: coleta realizada na Ilha do Cardoso. Pontos: 1- próximo ao mar; 2- meio do manguezal; 3 - próximo à floresta; * próximo ao mar em locais aleatórios.

4.2.2 Caracterização molecular dos isolados

4.2.2.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA genômico de 42 culturas puras de cianobactérias usadas neste estudo, uma suspensão de 1,5 mL de células na fase de crescimento exponencial foi coletada e concentrada através de centrifugação a 13.000 rpm, durante 8 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete contendo as células de cianobactérias foi usado para extrair o DNA genômico de acordo com protocolo descrito por Fiore e colaboradores (2000) conforme a seguir. Três mililitros (mL) de cultura na fase de crescimento exponencial foram concentrados (13.000 rpm, 5 min, 20°C) em centrífuga (Hettich, modelo Universal 320 R, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado duas vezes com 1 mL de solução I (50 mM Tris HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl). O pélete foi ressuspensionado em 200 µL de solução II (50 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM EDTA) e 2 µL de Proteínase K (200 µg mL⁻¹) foram acrescentados. Após 10 min em banho-maria à 55°C, 600 µL de tampão de extração preparado na hora foram acrescentados [em 10 mL de solução: 3,0 mL de CTAB 10%; 2,8 mL de NaCl 5 M; 0,4 mL de EDTA 0,5 M; 1,0 mL de Tris-HCl pH 8,0 1 M; 1,0 mL de sarcosyl 10%; 100 µL de β-mercaptoetanol; 1,7 mL de água ultrapura esterilizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA)]. Após 30 min em banho-maria à 55 °C, com agitação por inversão a cada 5 min, esperou-se esfriar por 30 s e acrescentou-se 800 µL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico, 24:1). O microtubo foi invertido trinta vezes e centrifugado (13.000 rpm, 5 min, 20 °C). Transferiu-se 500 µL para um novo tubo e adicionou-se 2 volumes de NaCl 4 M e 50 µL de suspensão de sílica, misturando gentilmente. As amostras foram incubadas em banho-maria (55 °C, 10 min) e depois centrifugadas (10.000 rpm, 30 s, 20 °C) e o sobrenadante descartado. O pélete foi lavado duas vezes com 250 µL de solução de lavagem (em 200 mL: 2,0 mL de NaCl 5 M, 2,0 mL de Tris-HCl 1 M pH 7,5, 1,0 mL de EDTA 0,5 M, 100 mL de etanol). O pélete foi seco à 40 °C em bloco de aquecimento (LabLine Instruments, Illinois, IL, EUA) e reidratado com 30 µL de água ultrapura esterilizada. Após incubado em banho-maria (45 °C, 10 min) foi centrifugado (10.000 rpm, 1 min, 20 °C) e o sobrenadante transferido para novo e esterilizado microtubo. A integridade do DNA extraído foi verificada aplicando alíquotas

contendo 5 µL do produto extraído acrescidos de tampão de carregamento (0,4 g mL⁻¹ de sacarose e azul de bromofenol 0,25%) contendo SYBR[®] Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) em gel de agarose 1,0% após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (1 X TBE: 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). A documentação do gel foi feita usando o fotodocumentador “Kodak Gel logic 212 – Molecular Imaging Software, v. 5,0” (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). A verificação do tamanho dos produtos de PCR foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Promega, Madison, EUA). O material foi armazenado a -20 °C.

4.2.2.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S

Para a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) do gene RNAr 16S de 42 isolados de cianobactérias, foi utilizado o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3') (NEILAN et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada primer; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 95°C/3 min; 30 ciclos 94°C/10 s, 50°C/20 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min. Cinco microlitros (5 µL) dos produtos de PCR foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25% xilenocianol 0,25%) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2% contendo SYBR[®] Green I (Molecular Probes) após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 X (1 X TBE: 44 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). A documentação do gel foi feita através do programa “Kodak Gel logic 212 – Molecular Imaging Software, v. 5,0” (Carestream Health). A verificação do tamanho dos produtos de PCR foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Promega). O material foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento da próxima análise.

4.2.2.3 Clonagem

Na clonagem das sequências de RNAr 16S produzidas na PCR foi utilizado o kit “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega). A clonagem no vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante, presentes no Manual de Instrução do “pGEM®-T Easy Vector Systems”.

4.2.2.4 Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita através de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Alíquotas de 10 µL do produto de ligação e 100 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e deixado por 30 segundos, sem agitar. Em seguida o microtubo foi incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio SOC (BIRNBOIM; DOLY, 1979) à temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 µg.mL⁻¹ de meio. As placas foram incubadas por 15 horas, a temperatura de 37°C.

4.2.2.5 PCR usando colônias

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, uma colônia de cor branca foi utilizada para nova reação de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 µL de reação de PCR utilizando-se os iniciadores: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'); M13R (5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3'). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 3 mM; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore,

Bedford, MA, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 μ L. A reação foi feita em um termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 94°C/5 min; 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. A verificação do tamanho dos produtos de PCR gerados foi feita em gel de agarose 1,2% - 0,5 X TBE conforme descrito no item 4.2.2.1.

4.2.2.6 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5 α que continham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). As colônias brancas que fizeram parte da seleção foram transferidas para 6 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 1,5 mL da cultura de células produzidas e, em seguida, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 segundos. O pélete formado foi ressuspensão em 100 μ L de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Em seguida, 200 μ L de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram adicionados e misturados gentilmente através da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram acrescentados aos microtubos 150 μ L de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 13.000 rpm durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 270 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, misturando-se e centrifugando-se conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pélete foi lavado uma vez com 250 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. O pélete foi então seco e ressuspensão em 30 μ L de água ultrapura esterilizada e 1 μ L de RNase na concentração de 10 mg mL⁻¹. Incubou-se essa mistura a 37°C por 30 minutos. Os plasmídeos assim extraídos foram armazenados a -20°C até a próxima etapa.

4.2.2.7 Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Para a reação utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol de iniciador: M13F(5'- GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA- 3'), SP6 (5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'), 357F (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3'), 357R (5'- CTGCTGCCTCCCGTAGG -3'), 704F (5'- GTAGSGGTGAAATSCGTAGA -3'), 704R (5'- TCTACGSATTTACCCSCTAC -3'), 1114F (5'- GCAACGAGCGMRACCC -3'), 1114R (5'- GGGTYKCGCTCGTTGC -3'), 1 µL de “DYEnamic”, 2 µL de tampão 2,5 X “Save Money” (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing”. Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, para o sequenciamento dos fragmentos de DNA. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

4.2.2.8 Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) através do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional Linux. As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção da árvore filogenética, as sequências de rRNA 16S obtidas neste estudo e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas, editadas e os métodos de distância evolutiva (“Neighbor-Joining”) e máxima parcimônia (“Maximum-

Parsimony”) foram aplicados usando o pacote de programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). O suporte para os nós internos da árvore de distância evolutiva e máxima parcimônia foi estimado usando reamostragem (FELSENSTEIN, 1985) com 1.000 replicações.

4.2.3 Detecção de genes envolvidos com a biossíntese de cianopeptídeos

4.2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico das linhagens de cianobactérias isoladas dos manguezais foi feita conforme já descrito no item 4.2.2.1.

4.2.3.2 Amplificação de sequências conservadas de NRPSs

Para amplificação de sequências conservadas de peptídeos sintetases de 44 linhagens isoladas de manguezais do Estado de São Paulo, utilizou-se o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: MTF (5'- GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC - 3') e MTR (5' - CCNCGDATYTTNACYTG - 3') (NEILAN, 1999). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em um termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94°C/2 min; 5 ciclos de 94°C/1 min, 40°C/1 min, 72°C/1 min; 30 ciclos de 94°C/30 s, 45°C/1 min, 72°C/4 min; extensão final a 72°C/15 min. Os produtos de PCR de tamanho esperados foram purificados com o “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). A verificação do tamanho dos produtos de PCR resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE; Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) em gel de agarose 1,2%. A documentação do gel foi feita usando o sistema de imagem KODAK Gel Logic 212 e o “Kodak Molecular Imaging Software” versão 5.0 (Carestream Health).

4.2.3.3 Amplificação de sequências conservadas de PKSs

Para amplificação de sequências conservadas de policetídeos sintases, utilizou-se o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: KSF (5'-MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG - 3') e KSR (5' - GGRTCICCIARISWIGTI CCIGTICCRTG - 3') (BEYER, 1999). A amplificação por PCR foi realizada nas mesmas condições utilizadas para peptídeos sintetase (MTF/MTR) citadas no item 4.2.3.2, assim como a verificação do tamanho dos produtos de PCR resultantes e a documentação dos géis.

4.2.3.4 Sequenciamento dos genes de NRPS e PKS

Após a amplificação via PCR das sequências de DNA dos genes que codificam para NRPS e PKS, foi realizada a purificação dos fragmentos obtidos utilizando o kit "GFX™PCR DNA and Gel Band Purification" (GE Healthcare). A clonagem, transformação e sequenciamento dos produtos de PCR de 1 NRPS e 19 PKSs foram realizadas conforme os itens 4.2.2.3, 4.2.2.4 e 4.2.2.7 respectivamente. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os seguintes: M13f (5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA- 3') e SP6 (5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'), os quais flanqueiam sequências de nucleotídeos do vetor de clonagem.

A sequência do gene que codifica para NRPS da linhagem *Phormidium* CENA135 foi analisada por meio do endereço eletrônico www.nii.res.in/nrps-pks.html. A sequência obtida foi alinhada com outras sequências previamente depositadas neste banco de dados.

4.2.4 Produção de substâncias bioativas

4.2.4.1 Cultivo de culturas

As linhagens foram selecionadas conforme a análise molecular da presença de regiões NRPSs e/ou PKSs e foram inoculadas em Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio de cultura apropriado e cultivadas a 25° C durante 20 dias, em shaker a 100 rpm sob iluminação fluorescente de 40 $\mu\text{moles f\acute{o}tons. m}^2.\text{s}^{-1}$ em fotoperíodo de 14 h claro:10 h escuro.

4.2.4.2 Extração de substâncias bioativas

As culturas foram centrifugadas a 9.000 rpm por 8 min a 22°C. O sobrenadante, cerca de 280 mL, foi separado em duas frações para a extração de substâncias bioativas extracelulares. Cento e quarenta mililitros do sobrenadante foram extraídos com acetato de etila e cento e quarenta mililitros com clorofórmio. Utilizou-se um funil de separação para separar a fase aquosa do solvente orgânico, e o solvente orgânico contendo as substâncias ativas foi coletado, evaporado e as substâncias ativas concentradas.

Para a extração de substâncias bioativas intracelulares acrescentou-se às células concentradas 5 mL de metanol, agitou-se no shaker a 200 rpm por 1 hora e posteriormente as amostras foram concentradas a 12.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram armazenados em freezer a -20°C para análises posteriores.

4.2.4.3 Análise de bioatividade

Os extratos orgânicos obtidos anteriormente foram usados para os testes de bioatividade contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Paracoccus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus pasteurii* e *Escherichia coli* cultivadas em placas de Petri contendo meio LB ágar e *Candida cruzii* contendo meio YEPD ágar. Os extratos obtidos por extração em acetato de etila, clorofórmio e metanol foram aplicadas em discos de 6 mm de diâmetro de papel filtro Wattman n° 1 esterilizados, 50 µl em cada disco. As placas foram incubadas a 28°C ou 37°C por 24 h. O tamanho, em milímetros, dos halos de inibição foi anotado.

4.2.4.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de todos os extratos que inibiram o crescimento de micro-organismos patogênicos foram adquiridos em um espectrômetro de massas do tipo híbrido quadrupolo tempo de voo (Q-TOF/MS, do inglês “*Quadrupole time-of-flight mass spectrometer*”) (Micromass, Manchester, UK) de alta resolução (7.000) e alta precisão (5 ppm) equipado com ionização electrospray (ESI, do inglês “*electrospray ion source*”). A sua configuração é baseada em um quadrupolo (Q), um hexapolo como célula de colisão e um tubo de voo ortogonal de alta resolução (Q-TOF). O equipamento

híbrido Q-TOF utilizado neste trabalho, devido ao fato de possuir um quadrupolo anterior ao TOF, fica restrito ao corte de massas do quadrupolo que para este equipamento é de 4.000 Da. No entanto, ainda tem-se a vantagem da alta resolução e alta precisão de massas tanto nos experimentos de MS como em MS/MS.

As condições para ESI no modo positivo foram as seguintes: dessolvatação assistida por gás (nitrogênio) aquecido a 80°C, capilar com potencial de 3 kV e a voltagem do cone a 21 V. As amostras eram diluídas em uma mistura de metanol:água:ácido fórmico (50:50:0,1%) e eram introduzidas na fonte a 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ com uma bomba de seringa. Os espectros obtidos foram comparados com os existentes na biblioteca de espectros virtual do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP, visando identificar cianopeptídeos novos daqueles com estruturas já conhecidas (como por exemplo, algumas cianotoxinas ou outro tipo de substância conhecida).

4.2.5 Produção de microcistinas

4.2.5.1 Ensaio Imunológico ELISA

A análise de microcistinas foi realizada para 22 linhagens escolhidas aleatoriamente entre os isolados dos manguezais do Estado de São Paulo. Essa análise foi realizada em triplicada colocando-se 2 mL de cultura de cada linhagem de cianobactéria no final da fase exponencial de crescimento em tubos de ensaio, sendo obtida a lise celular por meio de fervura em micro-ondas por 1 minuto (SILVA-STENICO et al., 2009). Em seguida, o material foi centrifugado e o sobrenadante coletado. Então, procedeu-se a detecção das microcistinas usando o ensaio imunológico ELISA (do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) (Kit placa Microcistina, Beacon Analytical Systems, Inc., Portland, ME, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.5.2 Amplificação por PCR do domínio NMT do gene de microcistinas sintetase (*mcyA*)

A tentativa de amplificação por PCR de sequências de nucleotídeos da região do domínio da NMT, pertencente ao gene *mcyA* das microcistinas sintetases, de 8 isolados

de cianobactérias que apresentaram resultados positivos no ELISA e outros 4 isolados escolhidos aleatoriamente entre as 44 linhagens, foi realizada utilizando os seguintes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores: MSF (5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3') e MSR (5'-TGCAGATAACTCCGCAGTTG-3') (TILLET; PARKER; NEILAN, 2001). A reação da PCR continha: tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador já descrito e diferentes temperaturas de anelamento foram utilizadas nas seguintes condições: 94°C/4 min; 30 ciclos 94°C/10 s, (53, 54 e 55°C)/30 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min. Como controle positivo utilizou-se cultura pura de *Mycrocystis panniformis* SPC702, produtora de microcistina.

4.2.6 Produção de saxitoxinas

4.2.6.1 Ensaio Imunológico ELISA

Esta análise foi feita em triplicata para 37 linhagens. As células usadas foram previamente liofilizadas, misturadas à 2 mL de água ultrapura e sonicadas (Branson, Smithkline Co., Shelton, CT, EUA) por 30 min, em seguida, centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e usado no ensaio ELISA (Kit placa Saxitoxinas, Abraxis LLC, Warminster, PA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.6.2 Amplificação do gene que codifica para O-carbamoil transferase (*sxtI*)

As linhagens que apresentaram resultado positivo no ELISA e outras isoladas de manguezais do Estado de São Paulo foram selecionadas para uma triagem por meio da técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores disponíveis na literatura, na tentativa de amplificar o gene envolvido na síntese de STX. Para tentativa de amplificação por PCR do gene que codifica para O-carbamoil transferase, enzima envolvida com a biossíntese da saxitoxina, de 13 isolados de cianobactérias, foram utilizados os seguintes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores: SxtIF (5'-GCTTACTACACGATAGTGCTGCCG-3') e SxtIR (5'-GTTCGCCGCGGACATTAAA-3');

NodF (5'-ATGGGHHYTRGCHCCHTAYGG-3') e NodR (5'-CCBCGYACRTTTRAAKGABGTRTT-3') (KELLMANN et al., 2008) em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2,5 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 10 pmol de cada primer; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador já descrito, usando as seguintes condições: 94°C/3 min; 30 ciclos 94°C/10 s, 47°C/20 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7min. A amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores NodF/NodR foi feita em solução contendo tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP; 2,5 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 50 ng de DNA; 25 pmol de cada primer; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada usando “touchdown” nas seguintes condições: 94°C/4 min; 10 ciclos 94°C/10 s, 55 e 58°C*(-0,5 °C)/30 s, 72°C/44 s; 30 ciclos 94°C/10 s, 50 e 53 °C/30 s, 72°C/40 s; extensão final a 72°C/5min. A integridade dos mesmos foi verificada conforme item 4.2.2.1. A clonagem, transformação e sequenciamento foram realizados conforme os itens 4.4.4.3, 4.2.2.4 e 4.2.2.7 respectivamente.

4.2.6.3 Análises químicas de saxitoxinas

4.2.6.3.1 Extração de saxitoxinas

Sete métodos de extração foram utilizados para 15 linhagens que apresentaram amplificação por PCR com os primers citados no item 4.2.6.1. As linhagens foram as seguintes: *Chlorogloea* CENA142, CENA139, CENA145, CENA152, CENA174, CENA181, *Synechocystis* CENA180, *Synechococcus* CENA138, CENA163, *Leptolyngbya* CENA137, CENA144, CENA147, *Phormidium* CENA135 e *Nostoc* CENA159, como controle negativo utilizou-se a *Chlorogloea* CENA170 e a linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 foi utilizada como controle positivo para posterior análise em espectrometria de massas.

Cerca de 0,02 g de células liofilizadas de cada cultura foram utilizadas para cada método de extração. Os métodos utilizados foram:

- (1) As células foram adicionadas em 1 ml de água ultrapura esterilizada e a solução foi imersa em nitrogênio líquido por 4 minutos e em seguida mergulhada em banho-maria a 42°C por 4 minutos. Esse procedimento foi repetido 10 vezes para rompimento das células.
- (2) As células foram adicionadas a 1 ml de água ultrapura esterilizada e fervidas por 1 minuto em micro-ondas.
- (3) As células foram sonicadas (Soniprep, EUA) durante 30 minutos em 1 ml de água ultrapura esterilizada.
- (4) As células foram extraídas duas vezes por sonicação (Soniprep) em 1 ml de ácido acético 0,5 M (LAGOS et al., 1999).
- (5) As células foram adicionadas a 6 ml de HCl 0,1 mol L⁻¹ e agitadas por 15 minutos.
- (6) As células foram adicionadas a 5 ml de HCl 0,1 mol L⁻¹ e sonicadas (Soniprep) por 30 minutos (baseado em FANG et al, 2004).
- (7) As células foram extraídas em 6 ml de metanol em agitação durante 20 minutos. Neste caso, utilizou-se a coluna C₁₈ (Applied Separations, Allentown, PA, EUA) para separação das frações da amostra.

Após o procedimento de extração os extratos foram centrifugados a 9.000 rpm por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante para análise em espectrometria de massas.

4.2.6.3.2 Espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR/MS)

Os extratos das linhagens que apresentaram resultado positivo no ELISA para STX ou amplificação para o gene envolvido com a biossíntese da STX, citadas nos itens 4.2.6.1 e 4.2.6.2, respectivamente, foram analisadas por Espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR/MS, do inglês "*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*") (LTQ FT Ultra, ThermoScientific, Alemanha) para confirmação da produção da toxina. As condições de análise no modo positivo para formação dos íons foram as seguintes: os

íons eram acumulados por 60 s, voltagem da fonte 1,5 kV, voltagem do capilar 47,95 V, voltagem do tubo de lentes 154,67 V.

4.2.6.4 Investigação da produção de saxitoxinas por *Leptolyngbya* CENA137

A linhagem *Leptolyngbya* CENA137, inicialmente analisada por espectrometria de massas Q-TOF apresentou o pico correspondente à massa protonada de 316 $[M+H]^+$, correspondente à variante da STX, conhecida como neoSTX. Para confirmar a produção da neoSTX por esta linhagem, outras análises foram realizadas como: Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD, do inglês "*High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection*") (descrito a seguir) e FT-ICR/MS, conforme item 4.2.6.3.2.

4.2.6.4.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLC)

A presença das saxitoxinas (saxitoxina-STX e goniatóxina-GTX) sendo produzidas pela linhagem *Leptolyngbya* CENA137 foi investigada por Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) (Shimadzu 10 AXL, Kyoto, Japão) usando a técnica de derivatização pós-coluna descrita por Oshima (1995) adaptada à extração de células de cianobactéria. As células em cultura (300 mL) da *Leptolyngbya* foram centrifugadas por 10 min a 9.000 rpm e o sobrenadante em seguida descartado, adicionando-se 5 mL de HCl (0,05 N) ao pélete. A mistura foi sonicada (Soniprep) três vezes a 50 Hz por 1 minuto em banho de gelo para romper a parede celular. O lisado celular foi filtrado usando membrana éster celulose com poro tamanho 0,45 μm (Sartorius AG 37070 Goettingen, Alemanha). O filtrado foi usado para análise em HPLC-FLD. Uma coluna C_8 (4.6mm $\times$ 150 mm, tamanho de partícula 5 μm) foi utilizada e a análise foi conduzida em condição isocrática com duas fases móveis: (1) ácido 1-heptenosulfônico 2 mM em tampão fosfato de amônio 30 mM, pH 7,1:acetonitrila (100:6) foi usada em fluxo de 0,7 mL min^{-1} para detecção de STX, neoSTX e dcSTX à temperatura de 40°C; (2) ácido 1-heptenosulfônico 2 mM em tampão fosfato de amônio 10 mM, pH 7,1 foi usado em fluxo de 0,6 mL min^{-1} para detecção de GTX1, GTX2, GTX3, GTX4 e GTX5 à temperatura de 19°C. O eluído da

coluna foi misturado continuamente a $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ com ácido periódico 7 mM em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 9,0, e aquecido a 80 - 85°C e então neutralizado com ácido acético 500 mM em mesmo fluxo antes de entrar no detector fluorescente. O detector fluorescente foi fixado em um comprimento de onda de excitação a 330 nm e emissão em comprimento de onda de 390 nm. A concentração das toxinas foi calculada por comparação das áreas dos picos para cada toxina com seus padrões analíticos fabricado pelo “*National Research Council Canada*” (Institute for Marine BioSciences, Halifax, NS, Canada).

4.2.7 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi analisada para 44 linhagens de cianobactérias. A análise utilizando o reagente cromoazurol S (CAS) líquido foi realizada conforme a seguir:

Preparou-se uma solução contendo 7,5 mL de CAS 2 mM, acrescidos 6 mL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) 10 mM e de 1,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 1 mM. Acrescentou-se esta solução em 4,307 g de piperazina diluída em 50 mL de água e pH 5,6. Em seguida, completou-se com água para um volume final de 100 mL (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

Uma alíquota de 1 mL das culturas cultivadas por 20 dias foi coletada e centrifugada por 6 minutos, 13.000 rpm a 20°C. Foram transferidos 500 μL do sobrenadante para microtubos transparentes e adicionados 500 μL da solução acima. Após uma hora observou-se a mudança de cor. O sideróforo comercial denominado mesilato de desferoxamina (Desferal) (Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça) foi utilizado como controle positivo. Água e meio de cultura foram utilizados como controle negativo.

4.2.8 Análise de sideróforos da linhagem *Phormidium* CENA135 pelos métodos bioquímicos de Csácky e Arnow

Análise de Csácky (1948) identifica sideróforos do tipo hidroxamato. Uma curva padrão foi realizada utilizando hidroxilamina em 9 concentrações de 10 a 400 μM . Algumas modificações foram inseridas ao protocolo conforme a seguir. O sobrenadante

(1 ml) da cultura foi hidrolisado com 1 ml de H_2SO_4 6N. A solução foi tamponada adicionando 3 ml da solução acetato de sódio 35%. Adicionou-se 1 ml da solução de ácido sulfanílico 1% seguido por 0,5 ml de solução de iodina 1,3%. O excesso de iodina foi removido com 1 ml da solução de arsenito de sódio 2%. Adicionou-se 1 ml de α -naftalamina 0,15%. Depois de alguns minutos a absorbância foi lida a 526 nm.

A análise de Arnow (1937) é utilizada para identificar sideróforos da classe catecol. Uma curva padrão foi realizada utilizando ácido hidroxibenzóico em 12 concentrações de 10 a 590 μM . Para 1 ml de sobrenadante ou solução de sideróforo, foi adicionado na seguinte ordem misturando após cada adição: 1 ml de HCl 0,5 N, 1 ml de nitrito-molibdato 10% e 1 ml de NaOH 1 N. A cor é estável por 1 h e a solução tem absorção máxima a 510 nm.

4.2.8.1 Isolamento e caracterização do sideróforo

O sobrenadante da cultura *Phormidium* sp. CENA135 foi purificado por cromatografia de exclusão por tamanho utilizando a resina Sephadex-LH20. O volume de 1 ml do sobrenadante foi injetado sobre a coluna contendo a resina eluída em metanol. Frações de aproximadamente 600 μl foram coletadas a cada 30 segundos. Para identificar as frações que continham o sideróforo, o ensaio colorimétrico com o reagente CAS foi realizado com alíquotas de 200 μl de cada fração conforme citado no item 4.2.7. O solvente metanol das alíquotas de 200 μl retiradas das frações obtidas foi evaporado e as frações foram ressuspensas em água ultrapura para o teste com o reagente CAS. As alíquotas que apresentaram mudança na coloração foram analisadas por Q-TOF/MS e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) descritos a seguir.

4.2.8.2 Análise do sideróforo por Espectrometria de massas Q-TOF

As frações separadas por Sephadex LH-20 que apresentaram resultado positivo no teste colorimétrico com o reagente CAS foram analisadas por Q-TOF/MS. As condições para ESI no modo positivo foram as seguintes: dessolvatação assistida por gás (nitrogênio) aquecido a 80°C, capilar com potencial de 3 kV e a voltagem do cone a 21 V. As frações contendo o sideróforo eram diluídas em uma mistura de

metanol:água:ácido fórmico (50:50:0,1%). As amostras eram introduzidas na fonte a 5 $\mu\text{l min}^{-1}$ com uma bomba de seringa.

4.2.8.3 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se o aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100, 10 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar).

As amostras para análise foram preparadas utilizando-se de solventes deuterados da marca Cambridge Isotopes: dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$). O padrão usado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização molecular dos isolados

4.3.1.1 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias

As extrações de DNA genômico das 44 culturas puras de cianobactérias foram realizadas com sucesso usando o protocolo que foi desenvolvido visando à obtenção de DNA de todos os gêneros deste grupo de organismos conhecidos até o momento (FIORE et al., 2000). A boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR de sequências de interesse.

4.3.1.2 Caracterização molecular usando a sequência de RNAr 16S

Foram obtidas 42 sequências do gene que codifica para RNAr 16S de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo.

Uma das vantagens de se utilizar sequências do gene de RNAr 16S é porque estudos demonstram que dentro do domínio *Bacteria*, dois organismos podem ser considerados da mesma espécie se eles apresentarem reassociação de DNA-DNA de aproximadamente 70% ou maior (WAYNE, 1987) e que linhagens com sequências do gene de RNAr 16S que apresentam valores de identidades inferiores a 97,5% são improváveis de possuírem reassociação de DNA-DNA maior que 60-70% e, portanto, improváveis de pertencerem à mesma espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Disso resulta que, em análise BLAST utilizando o gene de RNAr 16S, dois organismos são considerados do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (LUDWIG et al., 1998) e de mesma espécies se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de similaridade e cobertura das sequências de RNAr 16S dos isolados dos manguezais do Estado de São Paulo obtidas por meio da análise BLASTn.

Tabela 6 - Resultado da análise BLASTn das sequências de RNAr 16S das linhagens utilizadas nesse estudo (continua)

Ordem	Morfolito	Tamanho fragmento RNAr 16S (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Sequências do Genbank com maior similaridade (Nº. de Acesso)
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> CENA136	1300	94	97	<i>Synechococcus</i> sp. MLCB (EF630354)
	<i>Synechococcus</i> CENA138	1398	100	98	<i>Synechococcus</i> PCC7920 (AF216948) <i>Cyanobium</i> sp. Y0011 (AY183114)
	<i>Aphanothece</i> CENA139	1409	100	98	<i>Cyanobium</i> sp. Y0011 (AY183114)
	<i>Synechococcus</i> CENA140	1409	100	98	<i>Synechococcus</i> sp. CENA108 (EF088334)
	<i>Chlorogloea</i> CENA141	1432	97	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Chlorogloea</i> CENA142	1261	98	99	<i>Gloeotheca</i> sp. SK40 (AB067576)
	<i>Synechococcus</i> CENA143	1410	99	97	<i>Synechococcus</i> PCC7920 (AF216948)
	<i>Synechococcus</i> CENA148	1410	100	99	<i>Synechococcus</i> PCC7001(AB015058)
	<i>Chlorogloea</i> CENA149	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> PCC7001(AB015058)
	<i>Chlorogloea</i> CENA150	1414	100	92	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (AB067581)
	<i>Synechococcus</i> CENA151	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> PCC7001(AB015058)
	<i>Chlorogloea</i> CENA152	1414	100	92	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (AB067581)
	<i>Synechococcus</i> CENA153	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Synechococcus</i> CENA162	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Synechococcus</i> CENA163	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Synechococcus</i> CENA164	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Synechococcus</i> CENA165	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Chlorogloea</i> CENA166	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Cyanothece</i> CENA169	1413	100	92	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 (AJ000716)
	<i>Chlorogloea</i> CENA170	1410	99	96	<i>Synechococcus</i> sp. MLCB (EF630354)
	<i>Chlorogloea</i> CENA172	1410	99	97	<i>Synechococcus</i> sp. MLCB (EF630354)
	<i>Chlorogloea</i> CENA174	1410	99	97	<i>Synechococcus</i> sp. MLCB (EF630354)
	<i>Synechococcus</i> CENA177	1410	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Synechococcus</i> CENA178	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)

Tabela 6 - Resultado da análise BLASTn das sequências de RNAr 16S das linhagens utilizadas nesse estudo (conclusão)

Ordem	Morfotipo	Tamanho fragmento RNAr 16S (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Sequências do Genbank com maior similaridade (Nº. de Acesso)
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> CENA179	1410	99	97	<i>Synechococcus</i> PCC7920 (AF216948)
	<i>Synechocystis</i> CENA180	1410	99	97	<i>Synechococcus</i> sp. MLCB (EF630354)
	<i>Chlorogloea</i> CENA181	1409	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
	<i>Synechococcus</i> CENA185	1410	100	99	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7001(AB015058)
Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> CENA134	1417	100	95	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB32S02 (AJ639894)
	<i>Phormidium</i> CENA135	1414	100	91	<i>Phormidium pseudopristleyi</i> ANT.ACEV5.3 (AY493600)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA137	1412	100	98	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB19S12 (AJ639895)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA144	1413	100	97	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB19S12 (AJ639895)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA147	1413	100	98	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB19S12 (AJ639895)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA155	1415	100	94	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB32S02 (AJ639894)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA156	1414	100	95	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB32S02 (AJ639894)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA167	1413	100	98	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB24S04 (AJ639893)
	<i>Leptolyngbya</i> CENA183	1412	100	98	<i>Leptolyngbya</i> sp. 0BB19S12 (AJ639895)
	<i>Nostoc</i> CENA158	1415	100	97	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)
	<i>Nostoc</i> CENA159	1414	100	97	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)
	<i>Nostoc</i> CENA160	1414	100	97	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)
Nostocales	<i>Nostoc</i> CENA175	1413	100	97	<i>Nostoc</i> sp. PCC 8112 (AM711537)
	<i>Microchaete</i> CENA176	1413	100	97	<i>Nostoc</i> sp. PCC 8112 (AM711537)

Este é o primeiro estudo sobre filogenia molecular de espécies de cianobactérias isoladas de áreas de manguezais brasileiros onde 42 sequências inéditas de RNAr 16S foram geradas.

As linhagens *Chlorogloea* CENA150, CENA152, *Cyanothece* CENA169, *Phormidium* CENA135, *Leptolyngbya* CENA155 apresentaram identidade inferior a 95% em relação às sequências depositadas no banco de dados. Esse valor de identidade indica que os organismos analisados podem não pertencer ao mesmo gênero daqueles

a que foram relacionados na análise BLASTn. As linhagens *Chlorogloea* CENA170, *Leptolyngbya* CENA134 e CENA156 apresentam 95-96% de indentidade com sequências do GenBank e *Synechococcus* CENA136, CENA143, CENA179, *Chlorogloea* CENA172, CENA174, *Synechocystis* CENA180, *Leptolyngbya* CENA144, *Nostoc* CENA158, CENA159, CENA160, CENA175 e *Microchaete* CENA176 apresentaram 97% de identidade com as demais sequências depositadas no banco de dados, portanto são improváveis de pertencerem à mesma espécie. As demais linhagens apresentaram identidades superiores a 97% indicando a possibilidade de pertencerem às mesmas espécies a que foram relacionadas na análise BLASTn.

As linhagens *Chlorogloea* CENA141 isolada do meio do manguezal (ponto 2) na Ilha do Cardoso, *Synechococcus* CENA148, CENA151, CENA162, CENA163, CENA177, *Chlorogloea* CENA166 isoladas de solo (0-10 cm), *Chlorogloea* CENA149 de água da região próxima ao mar (ponto 1), *Synechococcus* CENA153 do perifiton da região próxima ao mar (ponto 1), *Synechococcus* CENA164, CENA165, CENA178, *Chlorogloea* CENA181 isoladas do solo (20-40 cm), todas na Ilha do Cardoso e *Synechococcus* CENA185 isolada de solo (0-10 cm) no ponto próximo à floresta (ponto 3) em Bertioxa apresentaram 99% de identidade com *Synechococcus* sp. PCC7001(AB015058) previamente depositada no banco de dados, isolada de lodo formado por influência de marés (HONDA; YOKOTA; SUGIYAMA, 1999). Essas sequências foram alinhadas entre si utilizando ferramenta BLASTn e apresentaram 99% de indentidade umas com as outras. Observa-se que essas linhagens apresentam uma ampla distribuição nesses manguezais. De acordo com Scanlan (2003) e Scanlan e West (2002) as *Synechococcus* marinhas são cianobactérias picoplanctônicas consideradas umas das mais abundantes na Terra, dominando a maior parte das águas oceânicas. Há necessidade de revisão e mais estudos polifásicos para confirmar a classificação das 4 linhagens de *Chlorogloea* (CENA141, CENA149, CENA166 e CENA181) que apresentaram esse alto valor de identidade com o gênero *Synechococcus*.

Leptolyngbya CENA137 isolada de perifiton no meio do manguezal (ponto 2), *Leptolyngbya* CENA147 e CENA183 isoladas de solo (0-10 cm) todas da Ilha do Cardoso apresentaram 98% de identidade com *Leptolyngbya* sp. 0BB19S12

(AJ639895), linhagem isolada de uma bacia na Itália (CASTIGLIONI et al., 2004). Quando alinhadas no BLASTn, as sequências *Leptolyngbya* CENA137, CENA147 e CENA183 apresentaram 99% de identidade entre si. Este alto valor de identidade de umas com as outras sugere que essas linhagens possam pertencer à mesma espécie.

As linhagens de *Nostoc* CENA158, CENA159 e CENA160 isoladas de solo (0-10 cm) da Ilha do Cardoso apresentaram 97% de identidade com *Nostoc* sp. Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207) (O'BRIEN; MIALDLIKIWSKA; LUTZONI, 2005).

Observa-se que apenas 4 linhagens foram isoladas do manguezal de Bertioga, contaminado com petróleo. Segundo Howarth (1991), pequenas quantidades de petróleo podem ter efeitos de longo prazo diminuindo a diversidade de espécies em um sistema. Entre essas linhagens isoladas, *Chlorogloea* CENA150 apresentou apenas 92% de identidade com outra linhagem disponível no banco de dados, *Nostoc* CENA175 e *Microchaete* CENA176 apresentam 97% de identidade com outras *Nostoc* no GenBank. Esses resultados apontam a possibilidade da ocorrência de especiação devido à contaminação por petróleo do ambiente no qual essas espécies foram encontradas.

A árvore filogenética do gene de RNAr 16S construída usando o método da distância ("Neighbor-joining") (Figura 9) mostra as relações evolutivas entre as sequências das cianobactérias isoladas e outras sequências escolhidas do GenBank. A árvore filogenética foi enraizada usando como grupo externo uma sequência de nucleotídeos retirada do GenBank, referente ao RNAr 16S existente na bactéria *Escherichia coli* K12 (NC 000913). O método máxima parcimônia também foi utilizado para construir uma árvore filogenética (árvore não mostrada) e os resultados estão de acordo com os obtidos pelo método Neighbor-joining.

Nessa análise filogenética observa-se que as espécies unicelulares formaram dois agrupamentos distintos, mostrando sua origem polifilética. A maioria das linhagens de *Chlorogloea* e todas as *Synechococcus* isoladas de manguezais do Estado de São Paulo agruparam-se em um mesmo clado com reamostragem de 99%. Um clado com reamostragem de 70% foi formado pelas linhagens que apresentaram 99% de identidade em análise BLASTn com a *Synechococcus* PCC7001. A *Synechococcus elongatus* PCC7942, que apresenta seu genoma completo sequenciado, agrupou-se

com esse clado em uma reamostragem de 75%. De acordo com Scanlan e colaboradores (2009), as *Synechococcus* marinhas são as mais antigas e geneticamente é o mais diverso grupo de cianobactérias, que desenvolveu adaptações para sobreviver a um gradiente horizontal de nutrientes. Baseado nas sequências de RNAr 16S, estas linhagens podem ser divididas dentro de três subgrupos, com o maior deles sendo subdividido dentro de pelo menos 10 clados geneticamente distintos, incluindo isolados com uma vasta gama de pigmentação (AHLGREN; ROCAP, 2006; FULLER et al., 2003; MÜHLING et al., 2006; PENNO; LINDELL; POST, 2006; ROCAP et al., 2002; SIX et al., 2007). De acordo com Waterbury e Rippka (1989), as *Synechococcus* poderiam ser separadas em seis agrupamentos diferentes. Honda, Yokota e Sugiyama (1999) sugerem que os organismos classificados do gênero *Synechococcus* poderiam ser reclassificados em diversas unidades taxonômicas independentes. De acordo com Komárek (2010) no banco de dados há registro de 12 diferentes agrupamentos filogenéticos designados por *Synechococcus*. Entre os isolados dos manguezais do Estado de São Paulo, as *Synechococcus* agruparam-se todas em um mesmo clado.

Um agrupamento monofilético, contendo *Cyanothece* CENA169, *Chlorogloea* CENA150 e CENA152 foi formado com reamostragem de 88%. Esse mesmo clado agrupou-se com *Cyanothece* SKTU126 isoladas de águas costeiras ao redor de Cingapura (OHKI et al., 2008); *Cyanothece* WH8904, linhagem diazotrófica, isolada do mar da Arábia (MAZARD et al., 2004); *Aphanocapsa* HBC6 isolada de estromatólitos das Bahamas (FOSTER et al., 2009); e a *Chlorogloea* CENA142, em reamostragem de 76%. A *Chlorogloea* CENA142 agrupou-se com *Cyanothece* SKTU126 em reamostragem de 99%. Não há sequências de RNAr 16S do gênero *Chlorogloea* depositadas no GenBank até o momento.

Os membros da ordem Oscillatoriales são caracterizados por forma filamentosa e ausência do heterocito (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Todas as linhagens de *Leptolyngbya* sequenciadas neste trabalho agruparam-se em um clado onde também se agruparam *Leptolyngbya* PCC7104 isolado de solo de Long Island, Nova York, EUA e *Leptolyngbya* OBB24S04, linhagem isolada da bacia Bubano, Imola, Itália (CASTIGLIONI et al., 2004). Outras linhagens de *Leptolyngbya* selecionadas no

GenBank, incluindo as *Leptolyngbya boryana* e *Leptolyngbya boryanum* agruparam-se em outro clado mostrando a origem polifilética deste gênero. A criação do gênero *Leptolyngbya* (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1988) foi o resultado da mudança de muitas espécies com filamentos finos para esse gênero. Assim, a simplicidade morfológica deste grupo pode ter gerado dois ou mais grupos ecológicos. *Phormidium* CENA135 agrupou-se com *Phormidium pseudopristleyi* ANT.ACEV5.1 isolada da Antártica (TATON et al., 2006) em reamostragem de 81%.

Análises filogenéticas de cianobactérias baseados em RNAr 16S foram realizadas por diversos grupos de pesquisa (NELISSEN et al., 1996, ISHIDA et al., 1997, HONDA; YOKOTA; SUGIYAMA, 1999; TURNER et al., 1999, GARCIA-PICHEL et al., 2001) e indicaram que as ordens Chroococcales e Oscillatoriales são polifiléticas.

As linhagens pertencentes à família Nostocales formaram um agrupamento monofilético. A sequência de RNAr 16S da linhagem *Microchaete* CENA176 agrupou-se com linhagens de *Calothrix* retiradas do banco de dados. A classificação das cianobactérias heterocitadas dentro de um grupo monofilético (agrupando as ordens Nostocales e Stigonematales) tem sido amparado constatada por diversos estudos filogenéticos sobre o gene RNAr 16S (TURNER, 1997; WILMOTTE, 1994). As análises filogenéticas usando outros genes, como *nifH* (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997), *gyrB*, *rpoC1* e *rpoD1* (SEO; YOKOTA, 2003) também mostram que essas duas ordens formam um grupo monofilético que está de acordo com a classificação sugerida por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005). Dessa forma, pode-se afirmar que as linhagens heterocitadas teriam um ancestral comum.

Os estudos combinados utilizando dados moleculares, morfológicos, ecológicos, citomorfológicos e bioquímicos são também indispensáveis para a identificação das cianobactérias (KOMÁREK, 2010). Novos estudos são sempre necessários para corrigir e atualizar o sistema de classificação. Essas sequências serão depositadas em bancos de dados públicos contribuindo para aumentar as informações sobre cianobactérias de manguezais do Estado de São Paulo.

Figura 9 - Análise filogenética de sequências do gene de rRNA 16S de isolados de manguezais do Estado de São Paulo usando o método “Neighbour-joining”. As sequências analisadas nesse estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó. Em vermelho estão clado formado por Chroococcales, em verde, Oscillatoriales e amarelo, Nostocales. (Sequências disponíveis em Anexo A)

4.3.2 Detecção de genes envolvidos com a biossíntese de cianopeptídeos

Neste estudo, fragmentos do domínio A de NRPS putativo foram amplificados com sucesso em 23% (10 de 44) das linhagens analisadas, com representantes das ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales (Tabela 7, Figura 10). Os resultados de amplificação negativos foram confirmados por subseqüentes amplificações com gradiente na temperatura de anelamento.

De acordo com estudos realizados por Christiansen e colaboradores (2001), foi possível detectar a presença de genes que codificam para NRPS em 75% de 146 linhagens de culturas axênicas da Coleção de Culturas Pasteur. Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005) relataram que 54% de 24 cianobactérias investigadas apresentaram os fragmentos de genes que codificam para NRPS. Em outro trabalho realizado com 55 culturas isoladas em regiões brasileiras, Silva-Stenico e colaboradores (2010) constataram a presença desses genes em 92% das culturas estudadas. Barrios-Llerena, Burja e Wright (2007) encontraram amplificação para os genes de NRPS e PKS em 71% (17 de 24) das linhagens testadas por eles.

No trabalho de Christiansen e colaboradores (2001) não foram identificados genes que codificam para NRPSs em vários gêneros, principalmente dentro da ordem Chroococcales (em linhagens de *Cyanothece*, *Gloeobacter*, *Synechococcus* e *Synechocystis*). Entre as linhagens isoladas de manguezais do Estado de São Paulo foi possível amplificar esses genes em linhagens pertencentes à ordem Chroococcales, como *Chlorogloea* (CENA150, CENA152, CENA170) e também em uma linhagem pertencente ao gênero *Cyanothece* (CENA169).

Tabela 7 - Distribuição de genes NRPS e PKS em cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo

Ordem	Linhagem	NRPS	PKS
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> CENA136	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA138	-	+
	<i>Aphanothece</i> CENA139	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA140	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA141	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA142	+	+
	<i>Synechococcus</i> CENA143	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA145	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA146	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA148	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA149	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA150	+	+
	<i>Synechococcus</i> CENA151	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA152	+	+
	<i>Synechococcus</i> CENA153	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA162	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA163	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA164	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA165	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA166	-	+
	<i>Cyanothece</i> CENA169	+	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA170	+	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA172	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA174	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA177	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA178	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA179	-	+
	<i>Synechocystis</i> CENA180	-	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA181	-	+
	<i>Synechococcus</i> CENA185	-	+
Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> CENA134	-	+
	<i>Phormidium</i> CENA135	+	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA137	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA144	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA147	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA155	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA156	-	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA167	+	+
Nostocales	<i>Leptolyngbya</i> CENA183	-	+
	<i>Nostoc</i> CENA158	-	+
	<i>Nostoc</i> CENA159	+	+
	<i>Nostoc</i> CENA160	-	+
	<i>Nostoc</i> CENA175	+	+
	<i>Microchaete</i> CENA176	+	+

(+) presença; (-) ausência de produtos de PCR.

Figura 10 - Distribuição de genes NRPS em cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo

Outra família de enzimas envolvidas na produção de metabólitos secundários são as PKSs e, portanto, a detecção de genes envolvidos na sua biossíntese pode fornecer informações a respeito de cianobactérias sintetizantes de produtos naturais. Nesse caso, oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados tendo como alvo regiões da sequência codificadora do domínio da cetossintase (KS) das PKSs têm sido utilizados. Sequências desse domínio KS, amplificadas com o conjunto de iniciadores KSF/KSR, foram encontradas em 100% de 44 linhagens analisadas (Tabela 7, Figura 11).

Figura 11 - Distribuição de genes PKS em cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo

Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005) relataram que 92% de 24 cianobactérias investigadas apresentaram os fragmentos de genes que codificam para PKS. Silva-Stenico et al. (2010) constataram a presença de genes de PKS em 80% de 55 linhagens de cianobactérias isoladas em regiões brasileiras com representantes das ordens Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales.

Nesta pesquisa foi confirmado o notável potencial das cianobactérias para a produção de produtos naturais. Verificou-se que os genes de NRPS e PKS estão distribuídos entre as linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo. A técnica de PCR juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores degenerados constituíram uma eficiente estratégia para detecção desses genes e possíveis produtores de metabólitos secundários dentro de uma ampla diversidade desses micro-organismos.

A prevalência e diversidade de sequências de NRPS e PKS nos estudos de Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005) sugerem que esses genes deveriam estar presentes em um ancestral comum de cianobactérias. Outra interpretação para a variabilidade da presença de NRPS e PKSs dentro dos gêneros de cianobactérias é a possibilidade desses genes terem sido adquiridos recentemente por meio de transferência lateral. Para as linhagens que não apresentaram a amplificação do gene de interesse pode-se sugerir que tenham perdido esses genes durante o processo de evolução. A heterogeneidade na presença de genes NRPS e PKS pode representar uma variação natural ou perda desses genes durante cultura em laboratório.

Os genes que codificam para NRPS e PKS envolvidos na biossíntese de produtos naturais de cianobactérias são amplamente distribuídos entre os diferentes gêneros. Como exemplos são citados anabaenopeptina produzido por *Anabaena flos-aquae* (HARADA et al., 1995); microviridina (MURAKAMI et al., 1997), nostoginina e nostopeptina (PLOUTNO; CARMELI, 2002), nostociclina (KAYA et al., 1996), todos produzidos pelo gênero *Nostoc*; curacina A, jamaicamida, lyngbyatoxina (JONES et al., 2009) produzidos pelo gênero *Lyngbya*. O gênero *Microcystis* foi mais estudado devido à produção de cianotoxinas altamente tóxicas (MC), mas um vasto leque de outras substâncias bioativas interessantes têm sido relatadas, incluindo aeruginopeptinas (HARADA et al., 2001), aeruginosinamida, aeruginosina e microcistilida (WELKER et al.,

2004), microginina, cianostatina, cianopeptolina, microviridina e micropeptina (CZARNECKI et al., 2006), *Microcystis aeruginosa* produz micropeptina (ISHIDA et al., 1995), anabaenopeptina (ERHARD; VON DÖHREN; JUNGBLUT, 1999), radiosumina (COLEMAN; WRIGHT, 2001) microcistilida (TSUKAMOTO et al., 1993) e aeruginosina (PLOUTNO; CARMELI, 2002), entre outras substâncias.

A investigação de produtos naturais bioativos sintetizados por cianobactérias também tem sido conduzida em genomas já sequenciados, onde as buscas de agrupamentos de genes envolvidos na biossíntese desses produtos (“*genome mining*”) têm permitido encontrar novas substâncias ou descrever novas vias biossintéticas. O conhecimento das sequências de genes que codificam os eventos envolvidos em uma montagem de moléculas não somente permitem reprogramações precisas de sistemas NRPS e PKS, mas também fornecem estruturas químicas preditivas de produtos desconhecidos (KALAITZIS; LAURO; NEILAN, 2009).

Os conhecimentos sobre a formação das estruturas de produtos naturais de cianobactérias, bem como o envolvimento das vias NRPS e PKS modulares em suas biossínteses está sendo revelado e as investigações bioquímicas estão em progresso. Diversas vias de montagem com processos biossintéticos definidos têm sido descritas. Enquanto esses estudos estão tendo rápido progresso, as tecnologias de manipulação de genes, assim como a compreensão da regulação, armazenamento e excreção desses metabólitos necessitam de mais investimentos (JONES et al., 2009).

4.3.2.1 Sequenciamento dos genes que codificam para NRPS

O fragmento do domínio A de NRPS obtido da linhagem *Phormidium* CENA135 foi sequenciado. A sequência de NRPS obtida foi traduzida para aminoácidos e apresentou identidade com outras sequências previamente depositadas no banco de dados para NRPSs, confirmando ser esta uma sequência de um domínio de adenilação.

A sequência de aminoácidos do fragmento de NRPS da linhagem CENA135 foi analisada pelo endereço eletrônico www.nii.res.in/nrps-pks.html. Algumas sequências de aminoácidos depositadas no banco de dados que apresentaram similaridade superior a 50% com a sequência de aminoácidos da NRPS da *Phormidium* CENA135 estão relatadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Substâncias que apresentaram similaridade com sequência de aminoácidos de NRPS de *Phormidium* CENA135

Nº de acesso	Substância	Organismo	Identidade(%)
AAC44129	SafA-M1-3h4mPhe / saframicina Ms1 sintetase A	<i>Myxococcus xanthus</i> DM504/15	75
AAF17280	NosC-M2-Gly/Nostopeptolida sintetase	<i>Nostoc</i> GSV224	62
CAB15186	DhbF-M1-Gly/sideróforo2,3-dihidroxibenzoato(DHB)	<i>Bacillus subtilis</i>	62
CAB38517	Cda2-M2-Gly/CDA peptideo sintetase II	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3	62
CAB03756	MbtB-M1-Ser/Thr / Exoquelina sintetase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37v	50

Saframicina A é uma substância natural com a propriedade de inibir o crescimento de tumores (ARAI et al., 1980). Sideróforos solubilizam Fe(III) formando quelatos que são transportados para o interior da célula (DRECHSEL; JUNG, 1998). Nostopeptolida são depsipeptídeos com função biológica desconhecida (HOFFMANN et al, 2003). CDA peptideo sintetase II, tem a função de antimicrobiano. Exoquelina sintetase está envolvido na biossíntese de hidroxifeniloxazolina, dos sideróforos micobactinas.

Na tentativa de atribuir funções para a sequência de NRPS da *Phormidium* CENA135 e para posteriormente explorar suas potencialidades, inferências filogenéticas entre a sequência de peptídeo identificada e outras selecionadas do banco de dados foram realizadas por meio da construção de árvore filogenética (Figura 12).

Para a construção da árvore filogenética algumas sequências de aminoácidos descritas na literatura foram utilizadas, tais como: NcpA, que sintetiza 4-metilprolina; NosC, que sintetiza nostopeptolida; AnaA, envolvida na síntese da neurotoxina anatoxina A; OciB e McnC, envolvidos na síntese de cianopeptolina, substância inibidora de quimiotripsina.

Observa-se na Figura 12 que a sequência de aminoácidos de NRPS da linhagem *Phormidium* CENA135 agrupou-se com a *Spirulina* sp. PCC 6313 e *Planktothrix rubescens* NIVA-CYA 98 com reamostragem de 50%. A *Spirulina* sp. PCC 6313 é conhecida pela produção de algicida e sideróforos (EHRENREICH; WATERBURY; WEBB, 2005). A *Phormidium* CENA135 encontra-se no mesmo clado que NcpA da *Nostoc* ATCC 53789 e NosC da *Nostoc* GSV224 apresentando reamostragem de 97%. Esse agrupamento pode trazer informações sobre o produto

natural produzido pela *Phormidium* CENA135, é possível que haja produção de sideróforo, algicida, nostopeptolida ou 4-metilprolina por esta linhagem.

Figura 12 - Árvore filogenética de sequências de aminoácidos do domínio de adenilação de NRPSs. Valores superiores a 50% na reamostragem de 1.000 árvores são indicados nos clados. As substâncias naturais produzidas pelas linhagens estão indicados ao lado direito da figura. Em negrito está a sequência obtida neste trabalho (Sequência disponível em ANEXO B)

Após o sequenciamento dos fragmentos do domínio A obtidos das cianobactérias investigadas por Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005), foi feita análise filogenética das sequências comparando com sequências de outros grupos de bactérias e esses autores concluíram que existem domínios A comuns a diversas bactérias e outros específicos de cianobactérias. Eles também conseguiram associar algumas das sequências obtidas com determinados metabólitos descritos na literatura. Dessa mesma forma, o sequenciamento dos produtos de PCR gerados no presente estudo possivelmente trará informações a respeito do metabólito secundário produzido pelas linhagens examinadas.

O agrupamento filogenético da sequência do domínio A da *Phormidium* CENA135 com linhagens produtoras tanto de sideróforos, quanto de nostopeptolida

está de acordo com os resultados obtidos pela análise pelo endereço eletrônico www.nii.res.in/nrps-pks.html, em que essa sequência apresentou identidade com sequências relacionadas à produção dessas mesmas substâncias.

4.3.2.2 Sequenciamento dos genes que codificam para PKS

Sequências do domínio KS, amplificadas com o conjunto de iniciadores KSF/KSR, foram sequenciadas em 19 linhagens, dentre as 44 analisadas. As sequências foram traduzidas para aminoácidos e a análise BLASTp foi realizada conforme Tabela 9. Todas as sequências de aminoácidos que apresentaram identidade com as sequências isoladas de manguezal eram de domínio da cetossintase.

Observa-se que pela análise BLASTp, a maioria das sequências de aminoácidos das linhagens isoladas dos manguezais do Estado de São Paulo apresentaram identidade com domínio da cetossintase da *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (YP_325326), conhecida pela produção de sideróforos (TRICK; KERRY, 1992).

Tabela 9 - Resultado da análise BLASTp das sequências de aminoácidos de PKS das linhagens utilizadas nesse estudo

Linhagem	Identidade (%)	Linhagem do GenBank com maior similaridade (n.º de acesso)
<i>Synechococcus</i> CENA136	85	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335 (ZP_05034942)
<i>Aphanothece</i> CENA139	96	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Synechococcus</i> CENA140	92	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Chlorogloea</i> CENA141	90	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Chlorogloea</i> CENA142	96	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Synechococcus</i> CENA143	86	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Chlorogloea</i> CENA145	97	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335 (ZP_05037594)
<i>Chlorogloea</i> CENA146	96	<i>Scytonema hofmanni</i> PCC 7110 (AAX44132)
<i>Synechococcus</i> CENA148	87	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Chlorogloea</i> CENA149	87	<i>Synechococcus</i> sp. CC9311 (YP_729393)
<i>Chlorogloea</i> CENA150	97	<i>Gloeotheca</i> sp. PCC 6909 (AAX44107)
<i>Chlorogloea</i> CENA170	89	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Phormidium</i> CENA135	82	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Leptolyngbya</i> CENA134	95	<i>Scytonema hofmanni</i> PCC 7110 (AAX44132)
<i>Leptolyngbya</i> CENA137	95	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Leptolyngbya</i> CENA144	98	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Leptolyngbya</i> CENA147	97	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (YP_325326)
<i>Leptolyngbya</i> CENA 167	94	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424 (YP_002377174)
<i>Nostoc</i> sp. CENA159	89	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801 (YP_002373161)

Na tentativa de atribuir funções para essas sequências de aminoácidos que codificam para PKS e para posteriormente explorar suas potencialidades, inferências filogenéticas entre 19 sequências de aminoácidos identificadas foram realizadas por

meio da construção de árvore filogenética (Figura 13). Genes descritos na literatura foram utilizados para a construção da árvore, incluindo *CrpA*, envolvido na síntese do depsipeptídeo criptoficina A, agente anticâncer (MAGARVEY et al., 2006); *BarE*, envolvido na síntese da toxina barbamida; *JamM* e *JamP* envolvidos na síntese de jamaicamida, neurotoxina produzida por *Lyngbya majuscula*; *CurG*, envolvidos na síntese do agente antimitótico isolado de *Lyngbya majuscula*, conhecido por Curacina D (MARQUEZ, 1998); *NosB*, envolvido na síntese de nostopeptolida; proteína *MicA* produzida por *Planktothrix rubescens* e envolvida na síntese de microginina e oscillaginina B (ROUNGE et al, 2009), *HctD*, envolvido na síntese de hectoclorina, com ação antifúngica e citotóxica produzido por *Lyngbya majuscula* (RAMASWAMY; SORREL; GERWICK, 2007).

Um agrupamento monofilético com reamostragem de 100% foi obtido entre a maioria das sequências que codificam para PKSs das linhagens isoladas de manguezais, como: *Leptolyngbya* CENA137, CENA144, CENA147, *Chlorogloea* CENA142, CENA141, CENA170, *Synechococcus* CENA148, CENA143, *Aphanothece* CENA139 e *Phormidium* CENA135 (Figura 13). *Anabaena viridula* ATCC29413 conhecida pela produção de sideróforos (TRICK; KERRY, 1992) e *Nostoc punctiforme* PCC 73102 que na ausência de nitrogênio é capaz de produzir scytonemina, um pigmento que desempenha importante papel na proteção de cianobactérias contra raios ultravioleta (FLEMING; CASTENHOLZ, 2008), agruparam-se numa reamostragem de 100% e formaram um agrupamento monofilético com as sequências que codificam para PKSs das linhagens isoladas de manguezais com reamostragem de 91% (Figura 13). As sequências de aminoácidos das linhagens *Chlorogloea* CENA149 e *Synechococcus* CENA136 formaram um agrupamento monofilético com as sequências de PKSs das linhagens *Pleurocapsa* sp. PCC7319 e *Synechococcus* sp. CC9311 em reamostragem de 82%. Segundo Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005), *Pleurocapsa* sp. PCC7319 apresenta atividade algicida. As sequências que codificam para PKSs das linhagens *Leptolyngbya* CENA134, *Nostoc* CENA159 e *Chlorogloea* CENA146 formaram um agrupamento monofilético com reamostragem de 100%. *Synechococcus* PCC 7002 que é conhecida por produzir múltiplos sideróforos (WILHELM; TRICK, 1994), agrupou-se com *Leptolyngbya* CENA167, porém em reamostragem baixa, inferior a 50%.

Chlorogloea CENA150 formou um clado com reamostragem de 54% com as linhagens *Planktothrix rubescens* NIVA-CYA 98, produtora da proteína MicA, envolvida na síntese de microginina e oscillaginina B (ROUNGE et al, 2009) e *Lyngbya majuscula* (HctD), produtora de hectoclorina que tem função antifúngica e citotóxica. A linhagem *Chlorogloea* CENA150 apresentou genes que codificam tanto para NRPS quanto para PKS, o que indica a possibilidade dessa linhagem possuir sistema híbrido NRPS/PKS que também está envolvido na síntese de muitos desses metabólitos secundários. As PKSs aumentam a diversidade de produtos de NRPS e vice-versa, quando combinados em sistemas híbridos NRPS/PKS como os envolvidos nas sínteses de toxinas como microcistinas e nodularinas. (MOFFITT; NEILAN, 2004; TILLET et al., 2000).

Figura 13 - Árvore filogenética de seqüências de peptídeos do domínio de cetossintase de PKS. Valores superiores 50% na reamostragem de 1.000 árvores são indicados nos clados. As substâncias naturais produzidas pelas linhagens estão indicadas ao lado direito da figura. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. (Seqüências disponíveis em ANEXO B)

As informações de sequências de PKSs envolvidas com a síntese de produtos naturais ainda são escassas, por isso é difícil sugerir funções a esses genes. A análise filogenética de sequências do domínio de KS das PKSs precisa ser mais explorada. Outros testes são necessários para confirmar o envolvimento dessas sequências com a produção dos metabólicos secundários. Kalaitzis, Lauro e Neilan (2009) utilizam como ferramenta de bioinformática, a análise BLAST, para investigar a função de agrupamentos de genes contendo NRPSs e PKSs e predizer a estrutura da molécula sintetizada por eles, além de empregar técnicas químicas e moleculares para elucidar as estruturas dos produtos naturais.

A caracterização da capacidade biossintética das cianobactérias é crucial para compreender os impactos e os nichos ecológicos desses organismos uma vez que elas são globalmente importantes produtores primários que podem alterar os componentes de seus habitats, tais como densidade de competidores ou predadores ou a disponibilidade de nutrientes críticos como os micronutrientes, por meio da síntese de produtos naturais. Adicionalmente, a exploração dos produtos naturais de cianobactérias pode resultar na descoberta de substâncias com aplicações práticas para a sociedade.

Os conhecimentos ganhos com a caracterização molecular e a distribuição de NRPS e PKS das cianobactérias isoladas de manguezais contribuem para uma melhor compreensão da diversidade desses organismos, do seu potencial de síntese de produtos naturais e também para comprovar a utilidade das técnicas moleculares na descoberta de novos produtos naturais.

4.3.3 Atividade antimicrobiana

Os extratos intra e extracelulares das cianobactérias foram analisados com relação à inibição do crescimento de bactérias gram positivas, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. Pasteuri*, *Micrococcus luteus*; bactérias gram negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Paracoccus* sp.; levedura *Candida cruzii* e fungos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Phytium* sp. por meio de testes de bioatividade.

Os solventes utilizados para as extrações intra e extracelulares de metabólitos com atividade antimicrobiana: metanol, clorofórmio e acetato de etila, respectivamente, mostraram-se eficientes para algumas linhagens de cianobactérias. O metanol é utilizado na extração de óleos vegetais e também consegue extrair com eficiência substâncias antimicrobianas (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999; CHAIKLAHAN et al., 2008). O acetato de etila é capaz de dissolver um grande número de substâncias, como por exemplo, gorduras, óleos e resinas devido a sua baixa polaridade (MUNDT; KREITLOW; JANSEN, 2003; BIONDI et al., 2008). O clorofórmio também é um bom solvente por ser miscível na maioria dos líquidos orgânicos e ser convenientemente volátil, extraíndo alcalóides (GANTAR et al., 2008).

Os testes de bioatividade foram realizados com as 44 linhagens das quais foram obtidas 132 extratos intra e extracelulares. Foi possível observar que 39% (17) das linhagens utilizadas produziram substâncias com atividade antimicrobiana (Tabela 10). Entre os 132 extratos obtidos 26% (34) inibiram o crescimento dos micro-organismos. Essa investigação mostrou que 50% dos extratos eram ativos contra bactérias gram positivas e 27% contra bactérias gram negativas e 17% contra levedura (Figura 14). Diversos extratos mostraram atividade contra *Salmonella typhimurium*, *Micrococcus luteus*, *Candida cruzii* (Figuras 15-17), *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. Pasteuri* e *Escherichia coli*. Nenhum dos extratos apresentou efeito inibitório ao crescimento dos fitopatógenos *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Phytium* sp e à bactéria gram negativa *Paracoccus* sp. (Tabela 10).

Tabela 10 - Teste de bioatividade

Cianobactéria	Extratos orgânicos	Bioatividade (halo de inibição em mm)							
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. pasteurii</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Candida cruzii</i>
<i>Synechococcus</i> CENA 136	extracelulares AE	-	-	-	-	8	-	-	-
<i>Chlorogloea</i> CENA142	intracelulares	-	-	7	7	-	-	-	-
	extracelulares CL	-	-	-	7	-	-	-	7
	extracelulares AE	-	-	6	7	-	-	-	7
<i>Chlorogloea</i> CENA149	extracelulares CL	-	-	7	7	-	-	-	7
	extracelulares AE	-	-	-	7	-	7	7	-
<i>Chlorogloea</i> CENA152	extracelulares CL	-	-	7	7	-	-	-	7
	extracelulares AE	-	-	-	7	-	7	7	-
<i>Synechococcus</i> CENA153	intracelulares	-	-	-	7	6	-	8	7
	extracelulares CL	-	-	8	7	-	-	-	8
<i>Synechococcus</i> CENA165	intracelulares	-	7	7	-	-	-	-	-
	extracelulares CL	-	7	-	-	-	-	7	7
	extracelulares AE	-	-	-	-	-	-	7	10
<i>Cyanothece</i> CENA169	intracelulares	-	-	-	-	-	-	-	-
	extracelulares CL	-	-	-	-	-	-	-	10
	extracelulares AE	-	7	-	-	-	-	-	-
<i>Chlorogloea</i> CENA170	intracelulares	-	-	-	7	-	7	-	-
	extracelulares CL	-	8	7	-	-	7	-	12
	extracelulares AE	-	7	-	-	7	7	-	9
<i>Synechocystis</i> CENA180	intracelulares	-	-	-	8	-	-	-	-
<i>Synechococcus</i> CENA 185	intracelulares	-	-	8	7	-	-	-	8
	extracelulares CL	-	-	-	-	6	-	-	8
	extracelulares AE	-	8	-	-	7	-	7	11
<i>Leptolyngbya</i> CENA 134	intracelulares	-	-	-	-	-	7	9	-
<i>Phormidium</i> CENA135	extracelulares CL	-	-	-	-	-	-	8	-
<i>Leptolyngbya</i> CENA 137	intracelulares	-	-	-	-	-	-	-	8
<i>Leptolyngbya</i> CENA147	intracelulares	-	-	-	8	-	8	-	-
<i>Nostoc</i> CENA158	extracelular AE	-	-	10	9	-	-	-	-
<i>Nostoc</i> CENA159	intracelular	-	-	-	10	-	10	10	-
	extracelulares CL	-	-	8	7	9	7	4	-
	extracelulares AE	-	-	8	7	10	7	6	-
<i>Nostoc</i> CENA160	intracelular	-	-	-	10	10	7	-	-
	extracelulares CL	7	-	-	9	8	8	-	-
	extracelulares AE	8	-	-	8	10	10	-	-

AE: extração com acetato de etila; CL: extração com clorofórmio

Figura 14 - Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos das linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo contra bactérias Gram+, Gram- e levedura

Figura 15 - Halo de inibição dos extratos extracelulares de *Chlorogloea* CENA141 contra *Candida cruzii*. 1. extração com acetato de etila; 2. extração com clorofórmio

Figura 16 - Halo de inibição dos extratos extracelulares de *Chlorogloea* CENA142 contra *Candida cruzii*. 1. extração com clorofórmio; 2. extração com acetato de etila

Figura 17- Halo de inibição dos extratos extracelulares de *Leptolyngbya* CENA137 contra *Candida cruzii*. 1. extração com acetato de etila; 2. extração com clorofórmio

Os extratos obtidos neste trabalho não apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatógenos utilizados, porém diferentes estirpes de fungos poderão ser testadas para verificar a capacidade de inibição desses extratos.

Jaki e colaboradores (1999) realizaram investigação semelhante em cianobactérias isoladas de rochas, argila, lagoa, parede de tijolos, blocos de granito, ruínas, entre outros. Os autores constataram que 48,8% (21 de 43) das cianobactérias investigadas por eles apresentavam atividade antimicrobiana, resultado superior ao encontrado entre as cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo. Entre 86 extratos obtidos por Jaki e colaboradores (1999), 20,9% (18) apresentaram atividade contra bactérias gram positivas, enquanto 5,8% (5 de 86) inibiram o crescimento de bactérias gram negativas e 10,5% (9 de 86) apresentaram atividade antifúngica. Silva-Stenico e colaboradores (2010) também constataram que 48% (24 de 50) das cianobactérias brasileiras por eles investigadas estavam aptas a inibir o crescimento de micro-organismos.

De Caire e colaboradores (1993) testaram extratos extracelulares de 36 cianobactérias de arrozal contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Como resultados eles encontraram 20 linhagens inibindo o crescimento de *S. aureus* e 12 de *C. albicans* sendo que apenas 5 inibiram o crescimento de ambos os patógenos humanos.

Ostensvik e colaboradores (1998) comprovaram que os extratos obtidos de cianobactérias possuem diferentes substâncias antimicrobianas, devido à variedade de metabólitos secundários produzidos. Além disso, mostraram que as substâncias solúveis em metanol combinado com ácido acético foram as mais eficientes na inibição do crescimento das bactérias testadas.

A atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados indica a possibilidade dessas linhagens produzirem substâncias bioativas conhecidas e desconhecidas com potencial para serem utilizadas em bioprospecção. As cianobactérias são organismos que requerem meios de cultura simples para se desenvolverem, o que os torna candidatos à produção de antimicrobianos em larga escala.

4.3.4 Espectrometria de massas

Os extratos de cianobactérias com atividade antimicrobiana foram analisados por espectrometria de massas para confirmar a presença de peptídeos não ribossômicos. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química, UNICAMP – Laboratório Thomson (Campinas, SP). As massas protonadas $[M+H]^+$ obtidas dos extratos foram comparadas com uma biblioteca de substâncias já conhecidas e descritas na literatura.

Entre os extratos analisados de 15 linhagens de cianobactérias, foi possível identificar 34 substâncias putativas conhecidas e registradas na literatura (Tabela 11). Diversos peptídeos não conhecidos também foram encontrados nos espectros das amostras.

Tabela 11 - Substâncias putativas identificadas em extratos de cianobactérias usando Q-TOF/MS ou FT-ICR/MS

Linhagens	Extrato	Equipamento	M+H	Substância Putativa
<i>Aphanotece</i> CENA139	Celular	Q-TOF/MS	304	12-epi-fischerindol U isonitrila
		Q-TOF/MS	751	Microginina
<i>Chlorogloea</i> CENA142	Celular	FT-ICR/MS	637	Aeruginosina 89 ^a
		Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A ou Antanapeptina D
<i>Chlorogloea</i> CENA145	Celular	Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A ou Antanapeptina D
		Q-TOF/MS	751	Microginina FR9
	AE	FT-ICR/MS	917	Microginina 51-A
<i>Chlorogloea</i> CENA149		Q-TOF/MS	691	Aeruginosida
		Q-TOF/MS	579	Nostoginina
		Q-TOF/MS	445	Radiosumina B
	Celular	Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A
		Q-TOF/MS	691	Aeruginosida
		Q-TOF/MS	623	Aeruginosina
		Q-TOF/MS	609	Microginina
<i>Synechococcus</i> CENA153	Celular	Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A ou Antanapeptina D
<i>Chlorogloea</i> CENA170	Celular	Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A ou Antanapeptina D
		AE	Q-TOF/MS	917
<i>Chlorogloea</i> CENA174	Celular	FT-ICR/MS	637	Aeruginosina 89 ^a
<i>Synechocystis</i> CENA180	Celular	FT-ICR/MS	607	Microginina AL584
<i>Chlorogloea</i> CENA181	Celular	FT-ICR/MS	799	Simplostatina-1
<i>Leptolyngbya</i> CENA134	Celular	Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A ou Antanapeptina D
		Q-TOF/MS	305	12-epi-hapalindol J isonitrila
<i>Phormidium</i> CENA135	Celular	Q-TOF/MS	851	Anabaenopeptina F
		Q-TOF/MS	937	Cianopeptolina
		Q-TOF/MS	1013	Microcistina-L-MeSer-Leu LR
<i>Leptolyngbya</i> CENA137	Celular	Q-TOF/MS	653	Aeruginosina 102 ^a
		Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A ou Antanapeptina D
<i>Leptolyngbya</i> CENA144	Celular	FT-ICR/MS	392	2,4-dimetoxi-6-heptadecilfenol
		FT-ICR/MS	686	Ulongamida E
<i>Leptolyngbya</i> CENA147	Celular	Q-TOF/MS	305	12-epi-haplindol J isonitrila
		Q-TOF/MS	723	Trungapeptina A
<i>Nostoc</i> CENA159	Celular	Q-TOF/MS	1134	Oscillapeptina G
		Q-TOF/MS	937	Cianopeptolina
		Q-TOF/MS	791	Nostocyclopeptide A2

AE: extrato extracelular obtido por extração em acetato de etila

Aphanothece CENA139 exibiu espectro relacionado ao fungicida conhecido como 12-epi-fischerindol U isonitrila (STRATMANN et. al., 1994). Nos testes de atividade antimicrobiana não foi possível observar a inibição do crescimento dos fungos testados por esse extrato. Alguns motivos podem ser citados, como: 1) a quantidade da substância ativa produzida e extraída foi insuficiente para inibir o crescimento dos fungos, 2) a substância ativa não foi capaz de inibir o crescimento dos fungos testados, ou 3) houve possível degradação da substância ativa durante a extração.

Leptolyngbya CENA134 apresentou espectro correspondente à 12-epi-hapalindol J isonitrila, um alcalóide com função algicida, isolado de *Fischerella* sp. CENA19 (ETCHEGARAY, et al., 2004a).

Chlorogloea CENA142, CENA174 e *Leptolyngbya* CENA137 apresentaram espectro equivalente ao inibidor de protease conhecido como aeruginosina, já detectado em *Planktothrix* e *Microcystis aeruginosa* (WELKER; CHRISTIANSEN; VON DÖHREN, 2004; WELKER et al., 2006), assim como *Phormidium* CENA135 apresentou espectro referente ao inibidor de protease anabaenopeptina F, isolado de *Microcystis aeruginosa* W61 e *Anabaena* sp. 90 (ERHARD; VON DÖHREN, 1997). Os inibidores de protease se ligam a um sítio ativo de uma enzima viral impedindo o amadurecimento dos vírus e a sua infecção em novas células (NELSON; COX, 2004). Essas drogas, por exemplo, podem agir no último estágio na formação do vírus HIV, impedindo a ação da enzima protease (MONINI et al, 2003). *Aphanothece* CENA139, *Chlorogloea* CENA145, CENA149, CENA170 e *Synechocystis* CENA180 apresentaram picos que correspondem à massa protonada de microginina, substância conhecida pela ação inibidora de aminopeptidase e enzima conversora de angiotensina (ISHIDA et al., 2000). As microgininas são pequenos lipopeptídeos lineares com efeitos inibitórios na enzima conversora de angiotensina que pode ser usada no tratamento da hipertensão e doenças associadas com falhas crônicas no coração e diabetes nefropática (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

Nostoc CENA159 apresentou espectro referente a inibidor de tirosina conhecido por oscillapeptina G (SANO; KAYA, 1996). Tirosina é um aminoácido natural que apresenta efeito estimulante. É importante para produção de neurotransmissores responsável por aumento da transmissão nervosa do cérebro para o músculo. A mesma

linhagem apresentou pico referente à cianopectolina, inibidor de quimiotripsina, enzima digestiva secretada pelo pâncreas e inibidor de serina protease. Muitos vírus codificam serinas proteases essenciais para sua replicação. A inibição dessa substância consequentemente impede a replicação viral.

No extrato extracelular da linhagem *Chlorogloea* CENA149 foram encontrados picos referentes às substâncias nostoginina isolada de *Nostoc* sp., que apresenta ação inibitória de aminopeptidase, além de apresentar estrutura e função parecidas com microginina (PLOUTNO; CARMELI, 2002). Esse mesmo extrato apresentou pico referente a radiosumina B, um inibidor da tripsina, enzima digestiva secretada pelo pâncreas responsável pela digestão de proteínas (MATSUDA, et al., 1996).

Espectros referentes ao depsipeptídeo citotóxico, denominado ulongamida E (LUESCH et. al., 2002) produzidas pelo gênero *Lyngbya* foram encontrados no extrato celular de *Leptolyngbya* CENA144. Esse mesmo extrato apresentou pico referente ao antimalárico 2,4-dimetoxi-6-heptadecilfenol produzido por *Phormidium ectocarpi* (PAPENDORF et. al., 1998).

Os picos referentes a outros peptídeos como aeruginosida e depsipeptídeos como trunapeptina A, ulongamida E, antanapeptina D e Nostociclopeptídeo A2 também foram encontrados sendo produzidos por diferentes linhagens. Depsipeptídeos são peptídeos, cíclicos ou acíclicos, que possuem ligações do tipo éster além das usuais ligações amídicas.

Se a presença desses produtos naturais produzidos pelas linhagens de manguezal for confirmada estes serão resultados com aplicação na farmacologia.

Os espectros apontaram diversos picos que correspondem a peptídeos ainda não conhecidos. Essas substâncias deverão ser isoladas e novos ensaios deverão ser realizados para identificá-los, bem como a determinação de suas funções.

As substâncias encontradas nos extratos extra e intracelulares, bem como aqueles da literatura, estão sendo utilizados para elaboração de uma biblioteca de espectros de cianobactérias no CENA/USP, que irá contribuir para identificar substâncias com estruturas novas.

4.3.5 Produção de microcistinas

4.3.5.1 Ensaio imunológico ELISA

A detecção das microcistinas foi realizada por meio do ensaio imunológico ELISA. O teste para detecção de microcistinas foi realizado em 23 linhagens isoladas e 16 apresentaram resultado positivo (Tabela 12).

Tabela 12 - Ensaio Imunológico ELISA para microcistinas

Ordem	Linhagem	Microcistinas
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> CENA136	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA142	+
	<i>Synechococcus</i> CENA143	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA145	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA146	+
	<i>Synechococcus</i> CENA148	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA149	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA150	-
	<i>Synechococcus</i> CENA153	+
	<i>Synechococcus</i> CENA162	-
	<i>Synechococcus</i> CENA165	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA166	+
	<i>Cyanothece</i> CENA169	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA170	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA172	+
	<i>Chlorogloea</i> CENA174	+
	<i>Synechococcus</i> CENA185	+
Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> CENA134	+
	<i>Phormidium</i> CENA135	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA183	+
Nostocales	<i>Nostoc</i> CENA158	-
	<i>Nostoc</i> CENA159	-
	<i>Nostoc</i> CENA175	-

(+) presença; (-) ausência

Mais estudos são necessários para confirmar esses resultados, pois imunoensaios baseados em reconhecimento molecular de anticorpos podem produzir resultados incorretos reagindo com diferentes membros da família das microcistinas e outras substâncias que podem estar presentes nos extratos (CHU, et al., 1989; LAWRENCE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005).

4.3.5.2 Detecção do domínio NMT do gene *mcyA*

As tentativas de amplificação por PCR da sequência do domínio único da *N*-metiltransferase (NMT) do gene *mcyA*, usando DNA extraído de 14 cianobactérias foram realizadas em gradiente de temperatura. As seguintes linhagens foram utilizadas: *Synechococcus* CENA136, CENA143, CENA153, CENA185, *Chlorogloea* CENA142, CENA146, CENA152, *Cyanothece* CENA169, *Leptolyngbya* CENA134, CENA137, CENA156, *Phormidium* CENA135, *Nostoc* CENA158, CENA160. A linhagem *Microcystis panniformis* SPC702 foi utilizada como controle positivo, por ser uma linhagem conhecida pela produção de microcistinas. O tamanho esperado de 1.300 pares de bases para o conjunto de iniciadores MSF/MSR foi obtido para o controle positivo e para as linhagens *Synechococcus* CENA136, *Phormidium* CENA135, *Chlorogloea* CENA142, *Chlorogloea* CENA146, e *Nostoc* CENA160. Os resultados de ELISA obtidos para as linhagens *Synechococcus* CENA136, *Phormidium* CENA135, *Chlorogloea* CENA142, *Chlorogloea* CENA146 estão de acordo com os resultados obtidos por PCR. Porém, *Synechococcus* CENA143 apresentou resultado positivo no ELISA e nas condições de amplificação utilizadas não foi possível obter o fragmento de gene correspondente ao domínio NMT do gene *mcyA*. Neste caso é possível que o teste ELISA tenha gerado falsos positivos, ou as condições de amplificação, mesmo utilizando gradiente de temperatura de anelamento, não foram adequadas para essa linhagem. Segundo Genuário e colaboradores (2010), não foi possível obter o fragmento de interesse com a utilização dos mesmos iniciadores para amplificação do domínio NMT do gene *mcyA* da linhagem *Nostoc* CENA88, produtora de MCs. A perda do grupo N-metil em microcistina têm sido relatada como uma consequência da ausência do gene completo que possui o domínio NMT em algumas linhagens de *Planktothrix* (KURMAYER et al., 2005) e *Anabaena* (FEWER et al., 2008). Pontos específicos de mutação no domínio NMT de linhagens de *Microcystis* também têm sido relatadas como possível causa da produção de microcistinas desmetiladas (TOOMING-KLUNDERUD et al., 2008). Desta forma a utilização de oligonucleotídeos iniciadores que amplifiquem outros fragmentos de genes envolvidos na biossíntese da microcistina será necessária para investigar a produção dessas toxinas pela linhagem que apresentou resultado positivo no ELISA e não apresentou amplificação por PCR.

A *Nostoc* CENA158 apresentou resultado negativo no ELISA e não foi possível amplificar o gene de interesse nesta linhagem.

O teste ELISA mostrou resultado positivo para diversas linhagens unicelulares, pertencentes aos gêneros *Chlorogloea* e *Synechococcus* e os resultados moleculares apontaram a presença dos genes NMT do *mcyA* nas linhagens *Synechococcus* CENA136, *Chlorogloea* CENA142 e *Chlorogloea* CENA146. O único relato na literatura sobre o possível envolvimento de cianobactérias picoplanctônicas produzindo microcistinas foi feito por Carmichael e Li (2006), porém a produção da hepatotoxina pelas *Synechococcus* não foi confirmada. Os autores utilizaram tecidos de aves mortas encontradas em um corpo de água na Califórnia, chamado “Salton Sea”, para uma triagem com Elisa confirmando que as mortes foram causadas pela microcistina. Além do ELISA, os autores confirmaram os resultados por meio de LC/MS. A identificação das espécies de cianobactérias dominantes no local (picoplanctônicas *Synechococcus* e a filamentosa bentônica *Oscillatoria*) foi feita por isolamento e caracterização molecular por meio do sequenciamento do RNAr 16S. A partir desses dados levantaram a hipótese de que as *Synechococcus* encontradas no local poderiam estar envolvidas com a produção de microcistinas. Porém, os autores não utilizaram métodos moleculares para confirmar o envolvimento das *Synechococcus* com a produção de MCs. Os fragmentos do domínio NMT amplificados nas linhagens isoladas de manguezal deverão ser sequenciados para confirmação deste resultado e outros genes envolvidos com a síntese dessa toxina também serão utilizados nesta investigação. A produção de microcistinas pelo gênero *Synechococcus*, uma das cianobactérias picoplanctônicas mais abundantes em ambientes marinhos, pode representar um grande risco à saúde de animais e humanos. As microcistinas podem ser uma ocorrência mais comum em ambientes marinhos do que se imagina. Mais pesquisas deverão ser realizadas para definir a distribuição dessas toxinas por cianobactérias marinhas.

De acordo com Copp e colaboradores (2007) e Koksharova e Wolk (2002), *Synechococcus* e *Synechocystis* não produzem metabólitos secundários. Kalaitzis, Lauro e Neilan (2009) afirmam que a biossíntese de metabólitos secundários está associada a cianobactérias cujo genoma apresenta tamanho superior a 4 Mb. As

informações até 2005 sobre a maioria dos genomas de cianobactéria sequenciados de *Synechococcus* e *Prochlorococcus* possuem genomas menores de 4 Mb e aparentemente perderam os genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários. Para Donadio (2007) os genomas pequenos são desprovidos de genes com domínios e módulos associados a PKSs e NRPSs, informação que está de acordo com Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005) que afirmam que existe uma correlação significativa entre o número de domínios A e KS e o tamanho do genoma. Desta forma, mais estudos seriam necessários para confirmar a produção de microcistinas por essas linhagens e se a presença desses genes for confirmada, esses resultados serão inéditos para esses gêneros.

A amplificação por PCR de genes envolvidos na biossíntese de toxinas não significa necessariamente que estes genes estão sendo expressos nas células. Assim outros testes (biológicos, bioquímicos ou químicos) são requeridos para confirmação de que o gene presente está sendo expresso. Alguns trabalhos mostram que em espécies de cianobactérias onde os genes essenciais envolvidos na biossíntese destas toxinas são detectados, eles também estão sendo expressos nas células (BAKER et al, 2001, 2002; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; KURMAYER et al., 2002; KURMAYER; CHRISTIANSEN; CHORUS, 2003; NEILAN et al., 1999; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001).

4.3.6 Produção de saxitoxinas

4.3.6.1 Ensaio imunológico ELISA

O teste para detecção de saxitoxinas por meio do ensaio imunológico ELISA foi realizado em 37 linhagens, onde 3 apresentaram resultado positivo (Tabela 13).

Tabela 13 - Ensaio Imunológico ELISA para saxitoxinas

Ordem	Linhagem	Saxitoxinas
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> CENA136	-
	<i>Synechococcus</i> CENA138	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA141	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA142	+
	<i>Synechococcus</i> CENA143	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA145	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA146	-
	<i>Synechococcus</i> CENA148	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA150	-
	<i>Synechococcus</i> CENA151	-
	<i>Synechococcus</i> CENA153	-
	<i>Synechococcus</i> CENA162	-
	<i>Synechococcus</i> CENA164	-
	<i>Synechococcus</i> CENA165	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA166	-
	<i>Cyanothece</i> CENA169	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA170	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA172	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA174	-
	<i>Synechococcus</i> CENA177	+
	<i>Synechococcus</i> CENA178	-
	<i>Synechococcus</i> CENA185	-
Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> CENA134	-
	<i>Phormidium</i> CENA135	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA147	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA155	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA156	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA167	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA183	-
Nostocales	<i>Nostoc</i> CENA158	-
	<i>Nostoc</i> CENA159	-
	<i>Nostoc</i> CENA160	-
	<i>Nostoc</i> CENA175	-
	<i>Microchaete</i> CENA176	-

(+) presença; (-) ausência

4.3.6.2 Amplificação do gene que codifica para O-carbamoil transferase

Na tentativa de amplificar o gene *sxtI* com os iniciadores SxtIF/SxtIR utilizou-se a linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 como controle positivo e investigou-se a presença desse gene nas linhagens *Microchaete* CENA176, *Leptolyngbya* CENA137, *Leptolyngbya* CENA147, *Chlorogloea* CENA142, *Chlorogloea* CENA181, *Cyanothece* CENA150, *Synechocystis* CENA180, *Synechococcus* CENA163 e *Aphanothece* CENA139. A temperatura de anelamento utilizada foi de 47°C e o fragmento amplificado apresentou aproximadamente 1.600 pares de bases, porém o resultado do

sequenciamento desses fragmentos obtidos não mostrou identidade com o gene *sxtI* envolvido na síntese da saxitoxina. Outros produtos de PCR também foram clonados e sequenciados, mas somente o controle positivo apresentou similaridade com a OCTASE. Segundo resultados obtidos por Kellmann, Mihali e Neilan (2008), esses iniciadores amplificam os fragmentos de 1.669 pares de bases somente nas linhagens tóxicas produtoras de saxitoxinas, sendo que as linhagens não tóxicas não devem apresentar o fragmento do gene de interesse. Os oligonucleotídeos iniciadores degenerados não foram capazes de amplificar o fragmento que corresponde a *sxtI* nos gêneros investigados isolados de manguezais do Estado de São Paulo.

Os oligonucleotídeos iniciadores degenerados (NodF/NodR) foram desenvolvidos baseados nas sequências do gene OCTASE de cianobactérias disponíveis no banco de dados. A linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 foi utilizada como controle positivo na amplificação do gene que codifica para a enzima OCTASE. O produto de amplificação esperado apresenta aproximadamente 900 pares de bases, porém as linhagens *Phormidium* CENA135, *Aphanothece* CENA139, *Chlorogloea* CENA142, CENA152 e *Nostoc* CENA159 apresentaram amplificação de uma banda única de aproximadamente 1.900 pb. A linhagem *Leptolyngbya* CENA137 também foi testada e nessas condições não apresentou amplificação. Com temperatura de anelamento de 50°C obteve-se um fragmento de 900 pb para a linhagem *Synechococcus* CENA138. Nesta mesma temperatura as linhagens *Synechococcus* CENA136, CENA166, *Chlorogloea* CENA152, CENA165, CENA172, CENA174, CENA181 e *Synechocystis* CENA180 foram testadas e não apresentaram amplificação. As sequências de 1.900 pares de bases obtidas das linhagens *Chlorogloea* CENA152, *Nostoc* CENA159 e de 900 pares de bases da linhagem *Synechococcus* CENA138 foram clonadas e o iniciador M13F foi utilizado para sequenciamento.

As sequências obtidas foram analisadas por BLASTx e foi possível observar que os produtos de PCR obtidos consistiam em sequências com homologia ao gene da OCTASE, porém as identidades com as sequências produtoras de saxitoxinas foram inferiores a 90%.

A análise BLASTx da sequência de OCTASE da linhagem *Chlorogloea* CENA152 revelou 57% de identidade com a *sxtI* de *Anabaena circinalis* AWQC283A (ACC69012).

Em relação à sequência da proteína de nodulação de *Lyngbya* sp. PCC 8106 (01619109) e também à OCTASE de *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 (ACC69006) apresentou 67% e 54% de identidade, respectivamente. Em relação à proteína de nodulação de *Rhizobium* sp. NGR234 (002823406) apresentou 78% de identidade. A sequência da linhagem *Nostoc* CENA159 apresentou identidade de 70% com OCTASE de *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 (ACC69006) e também de *Anabaena circinalis* AWQC323A (ACC69009). A sequência da *Synechococcus* CENA138 apresentou 74% de identidade com a *sxtI* de *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 e *Anabaena circinalis* AWQC323A. De acordo com Kellmann, Mihali e Neilan (2008) o fragmento esperado para amplificação com os primers NodF/NodR possui o tamanho de 900 pares de bases nas linhagens de *Anabaena* estudadas por ele. As identidades entre os fragmentos dos genes que codificam para OCTASE das linhagens de *A. circinalis* amplificados por NodF/NodR eram de pelo menos 99,8% entre si. Observa-se que as sequências amplificadas nas linhagens isoladas de manguezais apesar de apresentarem identidade com outras sequências de OCTASE, podem não estar relacionadas com a produção dessas toxinas, devido aos seus baixos valores de identidade em relação ao gene da *sxtI* e ao tamanho do fragmento amplificado (1.900 pb) maior que o tamanho esperado (900 pb). Embora a linhagem *Synechococcus* CENA138 apresente o tamanho do fragmento amplificado de 900 pares de bases, a sua identidade com o gene da *sxtI* também é baixa (inferior a 90%). No metabolismo secundário, o grupo carbamoil está presente em uma variedade de antimicrobianos (COQUE et al, 1995), além de estar relacionado a enzimas envolvidas na produção de fatores de nodulação (JABBOURI et al. 1998). Há ainda genes que codificam para OCTASEs com função desconhecida.

O PSI-BLAST realizado por Kellmann, Mihali e Neilan (2008) com a sequência *sxtI* da *C. raciborskii* resultou em 269 entradas homólogas no banco de dados. Destas, 6 sequências eram de archaea, 3 de bacteriófagos, e a grande maioria eram de bactérias. A maioria das sequências era de proteobactéria e a maior similaridade (70,6 a 71,2%) foi encontrada com uma OCTASE hipotética de *Trichodesmium erythraeum*. Já os genes de *sxtI* de *A. circinalis* AWQC131C, *Aph. Flos-aquae* NH-5 e *C. raciborskii* T3 (1.839 pares de bases) apresentaram entre 90% a 97% de identidade entre si.

Os iniciadores utilizados neste trabalho foram desenhados baseados nas poucas sequências dos genes de OCTASE de cianobactérias existentes no banco de dados (*Prochlorococcus*, *Crocosphaera*, *Synechocystis*, *Trichodesmium*), sendo que a produção de saxitoxina até o momento foi confirmada em poucos gêneros de cianobactérias (*Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Lyngbya*). Desta forma, os gêneros testados aqui podem conter modificações em seus genomas e isso pode ter impedido a amplificação do fragmento do gene relacionado à produção da saxitoxina utilizando esses iniciadores. A construção de novos oligonucleotídeos iniciadores por meio da identificação de sequências conservadas entre um maior número de gênero e/ou espécie de cianobactérias acarretará em maior facilidade para amplificação por PCR de sequências dos genes envolvidos na síntese da saxitoxina.

A possibilidade da transferência lateral de genes entre os organismos sugere a impossibilidade de prever quais as espécies irão produzir a toxina em um determinado local (KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008). Recentemente foi relatada a produção de saxitoxinas por uma linhagem do gênero *Microcystis* (SANT'ANNA et al., 2010).

Assim como os agrupamentos de genes que estão envolvidos na síntese de microcistinas apresentam uma arquitetura variável em diferentes gêneros de cianobactérias (TILLET et al., 2000), é possível que o mesmo ocorra com os agrupamentos de genes envolvidos na síntese de saxitoxinas. Segundo Kalaitzis, Lauro e Neilan (2009), essa arquitetura variável pode ser um resultado de rearranjos de genes mediados por transposições.

Outra hipótese para as linhagens isoladas dos manguezais do Estado de São Paulo é a de que esses gêneros não possuem os genes relacionados à síntese de saxitoxinas, por isso OCTASEs relacionadas a outras substâncias foram encontradas. Kellmann, Mihali e Neilan (2008) relataram que entre 64 linhagens que possuem genoma completo sequenciado, somente 11 apresentaram genes OCTASE (2 Oscillatoriales, 4 Chroococcales e 5 membros de Prochlorales). A *Prochlorococcus* fago P-SSM2 tem dois genes OCTASE no seu genoma, porém a função desses genes não é conhecida.

4.3.6.3 Análises químicas de saxitoxinas

Por meio do FT-ICR/MS, constatou-se que as saxitoxinas produzidas pela linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3, utilizada como controle positivo, foram extraídas com sucesso por três dos sete métodos utilizados. Nas extrações com HCl (método 5, descrito no item 4.2.6.3) e nas extrações em metanol quando separada por coluna C_{18} (método 7) não foi possível visualizar os picos referentes à STX e neoSTX. Foi possível visualizar os picos de interesse nas extrações realizadas com metanol (método 7 sem purificação pela coluna C_{18}), nitrogênio líquido (método 1) e um dos picos foi visualizado na extração por meio de fervura em micro-ondas (método 2) (Figuras 18-22). A técnica de espectrometria de massas utilizada é apenas qualitativa, portanto não foi possível quantificar qual dos métodos foi mais eficiente na extração. Verificou-se que a neoSTX é termorresistente, pois mesmo após a fervura das células da cianobactéria em micro-ondas foi possível detectar a presença da toxina por espectrometria de massas. O método utilizando metanol apresentou o pico de massa 316 $[M+H]^+$ da neoSTX mais evidentes quando visualmente comparado aos outros métodos de extração (Figuras 18-22). Pelo método de fervura no micro-ondas foi possível visualizar apenas o pico correspondente à neoSTX. Isso pode ter ocorrido por diferentes motivos, como: 1) extração ineficiente, com possível degradação da STX pela temperatura; 2) conversão de análogos de uma forma para outra; ou 3) supressão do sinal da STX por outros interferentes que estivessem em maior concentração na amostra, como por exemplo, clorofila.

As STX possuem até 30 variantes estruturais conhecidas e análogos que ainda poderão ser descobertos, os análogos possuem diferentes estados de carga em sua estrutura que podem ser afetados pelo pH, como carbamoil, N-sulfocarbamoil, hidroxila e sulfato; análogos que podem ser convertidos quimicamente de uma forma para outra, alterando a toxicidade do meio e análogos sujeitos à biotransformação, fatores que são desafios ao analisar uma amostra (HUMPAGE; MAGALHAES; FROSCIO, 2010).

Figura 18 - Espectro obtido em FT-ICR/MS do extrato intracelular de *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 obtido por extração em nitrogênio líquido em m/z de 299 a 301. Pico correspondente à STX = massa 300 $[M+H]^+$

Figura 19 - Espectro obtido em FT-ICR/MS do extrato intracelular de *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 obtido por extração em metanol em m/z de 299 a 301. Pico correspondente à STX = massa 300 $[M+H]^+$

Figura 20 - Espectro obtido em FT-ICR/MS do extrato intracelular de *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 obtido por extração em nitrogênio líquido em m/z de 315 a 317. Pico correspondente à neoSTX = massa 316 $[M+H]^+$

Figura 21 - Espectro obtido em FT-ICR/MS do extrato intracelular de *Cy lindropermopsis raciborskii* 339-T3 obtido por extração em metanol em m/z de 315 a 317. Pico correspondente à neoSTX = massa 316 $[M+H]^+$

Figura 22 - Espectro obtido em FT-ICR/MS do extrato intracelular de *Cy lindropermopsis raciborskii* 339-T3 obtido por extração por fervura em micro-ondas em m/z de 315 a 317. Pico correspondente à neoSTX = massa 316 $[M+H]^+$

Nos espectros referentes aos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração (Figuras 18-22), observa-se que em todos eles, os picos da neoSTX estão visualmente mais evidentes que os da STX, fato este que pode estar relacionado à conversão de uma forma da toxina para outra, provavelmente influenciada pelas condições das extrações.

As amostras extraídas em metanol analisadas para presença de saxitoxinas por FT-ICR/MS foram as seguintes: *Chlorogloea* CENA142, CENA139, CENA145, CENA170, CENA152, CENA174, CENA181, *Synechocystis* CENA180, *Synechococcus* CENA138, CENA163, *Leptolyngbya* CENA137, CENA144, CENA147, *Phormidium* CENA135 e *Nostoc* CENA159. Como controle positivo utilizou-se *Cy lindropermopsis raciborskii* 339-T3. Os parâmetros utilizados para as análises detectaram a presença de

saxitoxina e neosaxitoxina no controle positivo, porém em todas as outras amostras esses picos não estavam presentes.

A hipótese de que as linhagens estariam produzindo as toxinas e a extração não estivesse sendo eficiente poderia ser questionada, porém a eficiência na extração utilizando os diferentes métodos já citados foi comprovada. A presença do controle positivo e eficiente detecção dos picos de interesse mostram que as condições do equipamento eram ideais para a análise das toxinas. Se as linhagens forem produtoras de neurotoxinas e a produção for muito baixa, o equipamento apresenta alta sensibilidade, alto poder de resolução e exatidão de massa, portanto seria provável que houvesse detecção. FT-ICR permite a medição de massa de pequenas moléculas em concentrações menores que 1 ppm (SLENO; WINDUSTER; VOLMER, 2004).

Foi utilizado um total de três métodos analíticos para detecção da STX e suas variantes em 42 linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo (Tabela 14). Não foi possível confirmar a produção dessa substância em nenhuma das linhagens utilizadas, embora resultados de PCR tenham amplificado fragmentos que correspondem ao gene da OCTASE, a relação desses fragmentos obtidos com o gene *sxtI* não foi confirmada. Estudos adicionais serão necessários para confirmar os resultados aqui obtidos.

Tabela 14 - Métodos analíticos utilizados para detectar produção de saxitoxinas nas linhagens isoladas de manguezais do Estado de São Paulo

Linhagem	ELISA	PCR	FT-ICR/MS
<i>Cylindrospermopsis</i> 339-T3	+	+	+
<i>Synechococcus</i> CENA136	-	-	nd
<i>Synechococcus</i> CENA138	-	+	-
<i>Aphanothece</i> CENA139	nd	+	-
<i>Chlorogloea</i> CENA141	-	nd	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA142	+	+	-
<i>Synechococcus</i> CENA143	-	nd	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA145	-	nd	-
<i>Chlorogloea</i> CENA146	-	nd	nd
<i>Synechococcus</i> CENA148	-	nd	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA150	-	nd	nd
<i>Synechococcus</i> CENA151	-	nd	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA152	nd	+	-
<i>Synechococcus</i> CENA153	-	nd	nd
<i>Synechococcus</i> CENA162	-	nd	nd
<i>Synechococcus</i> CENA163	nd	nd	-
<i>Synechococcus</i> CENA164	-	nd	nd
<i>Synechococcus</i> CENA165	-	-	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA166	-	-	nd
<i>Cyanothece</i> CENA169	-	nd	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA170	-	nd	-
<i>Chlorogloea</i> CENA172	-	-	nd
<i>Chlorogloea</i> CENA174	-	-	-
<i>Synechococcus</i> CENA177	+	nd	nd
<i>Synechococcus</i> CENA178	-	nd	nd
<i>Synechocystis</i> CENA180	nd	nd	-
<i>Chlorogloea</i> CENA181	nd	nd	-
<i>Synechococcus</i> CENA185	-	nd	nd
<i>Leptolyngbya</i> CENA134	-	nd	nd
<i>Phormidium</i> CENA135	+	+	-
<i>Leptolyngbya</i> CENA137	nd	-	-
<i>Leptolyngbya</i> CENA144	nd	nd	-
<i>Leptolyngbya</i> CENA147	-	nd	-
<i>Leptolyngbya</i> CENA155	-	nd	nd
<i>Leptolyngbya</i> CENA156	-	nd	nd
<i>Leptolyngbya</i> CENA167	-	nd	nd
<i>Leptolyngbya</i> CENA183	-	nd	nd
<i>Nostoc</i> CENA158	-	nd	nd
<i>Nostoc</i> CENA159	-	+	-
<i>Nostoc</i> CENA160	-	nd	nd
<i>Nostoc</i> CENA175	-	nd	nd
<i>Microchaete</i> CENA176	-	nd	nd

(nd) não determinado; (+) positivo; (-) negativo

4.3.7 Análises químicas do extrato celular de *Leptolyngbya* CENA137 (HPLC-FLD, Q-TOF/MS e FT-ICR/MS)

Utilizando-se o extrato intracelular da linhagem *Leptolyngbya* CENA137 para análise em Q-TOF/MS foi possível observar em seu espectro a presença de um pico de 316 $[M+H]^+$, que corresponde ao valor de massa protonada da variante da saxitoxina conhecida como neo-saxitoxina. Os espectros de ionização por electrospray (ESI) da amostra intracelular da *Leptolyngbya* CENA137 e a fragmentação da substância de massa 316 $[M+H]^+$ estão representadas nas Figuras 23 e 24. Observa-se que os picos resultantes da fragmentação da substância não correspondem aos picos referentes à fragmentação da neo-saxitoxina (Tabela 15). O único fragmento presente tanto na amostra da linhagem isolada de manguezal quanto na fragmentação descrita para neoSTX é de massa m/z 298, que corresponde à substância de massa 316 $[M+H]^+$ tendo perdido uma molécula de água (H_2O).

Figura 23 - Espectro obtido em Q-TOF/MS do extrato intracelular de *Leptolyngbya* CENA135 obtido por extração em metanol em m/z de 50 a 350. Pico similar à neoSTX = massa 316 $[M+H]^+$

Figura 24 - Fragmentação por Q-TOF MS/MS do pico de massa 316 $[M+H]^+$

Tabela 15 - Comparação entre os fragmentos encontrados na substância de massa 316 [M+H]⁺ produzida por *Leptolyngbya* CENA137 e fragmentos da neo-saxitoxina analisados por Q-TOF/MS

316 [M+H]⁺ da <i>Leptolyngbya</i> CENA137	Neo-STX (SLENO; WINDUSTER;VOLMER, 2004)
83	-
108	-
118	-
-	138
150	-
-	187
-	192
-	195
219	-
-	220
-	225
-	237
-	238
251	-
-	255
-	263
266	-
-	280
-	281
284	-
298	298

O extrato dessa linhagem foi também analisado por HPLC-FLD para confirmar possível produção da neoSTX. Foi possível observar no cromatograma a presença de quatro picos (Figura 25A). Um deles apresentou o mesmo tempo de retenção do padrão para GTX, podendo ser considerado variante da GTX1. Nenhum pico foi observado correspondendo a variantes de GTX2, GTX3, GTX4 e GTX5, mostrando que a linhagem *Leptolyngbya* CENA137 não apresenta esses análogos da saxitoxina. Um pico com o mesmo tempo de retenção do padrão de neoSTX foi encontrado e comparado com os padrões analíticos (Figura 26B). Todavia, variantes de STX e dc STX não foram visualizados. Podemos afirmar que no extrato da linhagem *Leptolyngbya* CENA137 estão presentes duas substâncias que apresentaram o mesmo tempo de retenção que a GTX1 e da neoSTX.

Figura 25 - Cromatogramas de HPLC-FDL. (A) Extrato extracelular de *Leptolyngbya* CENA137 analisado sob condições para detecção de GTXs. (B) Extrato extracelular de *Leptolyngbya* CENA137 analisado sob condições para detecção de neoSTX, Dc STX e STX

Sleno, Volmer e Marshall (2005) fazem uma comparação entre o instrumento de alta resolução FT-ICR e de média resolução Q-TOF, e conclui que o Q-TOF geralmente

não é suficiente para atribuir massas com precisão dos espectros MS/MS de picos muito complexos. Para os espectros mais complexos, que requerem tanto poder de alta resolução quanto exatidão de massa são necessários instrumentos como FT-ICR.

A *Leptolyngbya* CENA137 foi então analisada em FT-ICR/MS. O espectro apresentou o pico de 316,32 $[M+H]^+$ anteriormente encontrado por Q-TOF/MS (Figura 26). Foi possível gerar a fórmula provável da substância a partir do pico correspondente à massa 316,32 $[M+H]^+$ e compará-la com o pico correspondente à neoSTX da *Cylindrospermopsis raciborskii* (316,14 $[M+H]^+$). O pico de massa 316,21 $[M+H]^+$ também foi observado e analisado (Tabela 16).

Figura 26 - Espectro obtido em FT-ICR/MS do extrato intracelular de *Leptolyngbya* CENA137 em m/z de 315 a 317

Tabela16 - Resultado de espectrometria de massas FT-ICR/MS dos extratos intracelulares de *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 e *Leptolyngbya* CENA137

Amostras	Massa $[M+H]^+$	Fórmula elementar	Erro Δ (ppm)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> 339T3	316,14	$C_{10}H_{18}N_7O_5$	0,115
<i>Leptolyngbya</i> CENA137	316,32	$C_{19}H_{41}NO_2$	0,264
<i>Leptolyngbya</i> CENA137	316,21	$C_{16}H_{29}NO_5$	0,285

Apesar do Q-TOF/MS e HPLC-FLD indicarem a presença da neoSTX, o FT-ICR/MS mostrou com exatidão a fórmula molecular da substância produzida pela *Leptolyngbya* CENA137 de massa muito próximo à neurotoxina investigada, porém, revelando a diferença entre as substâncias.

Instrumentos TOF são frequentemente descritos pela capacidade de permitir a exata medição de massa de pequenas moléculas em concentrações menores que 10 ppm. FT-ICR permite a medição de massa de pequenas moléculas em concentrações

menores que 1 ppm. Diversos artigos reportam que as incertezas de massas por Q-TOF são muito próximas às do FT-ICR (COLOMBO; SIRTORI; RIZZO, 2004; ECKERS et al., 2000; CHARLES, 2003; PELANDER et al., 2003). Neste trabalho, somente após a análise realizada no FT-ICR/MS foi possível comprovar que a substância investigada como neoSTX tratava-se de outro produto natural.

O dicionário de produtos naturais (DNP, do inglês “*Dictionary of Natural Products*”) (dnp.chemnetbase.com) foi consultado para encontrar substâncias conhecidas que apresentam a mesma massa e fórmula elementar que das substâncias encontradas sendo produzidas pela cianobactéria *Leptolyngbya* CENA137. Para a substância com fórmula $C_{19}H_{41}NO_2$ de massa semelhante à da neoSTX (316,32 $[M+H]^+$) há um registro no DNP denominado 2-amino-1,3-nonadecanediol como produto de hidrólise de 2-amino-1,3-octadecanediol que são componentes de ceramidas produzidas por *Porphyromonas gingivalis*, bactéria anaeróbica, relacionada a periodontites em adultos (NICHOLS, 1994) (Figura 27). As linhagens *Aphanothece* CENA139, *Chlorogloea* CENA142 e até mesmo a *Cylindrospermopsis raciborskii* 339-T3 apresentaram pico de 316,32 $[M+H]^+$.

Figura 27 - Fórmula estrutural da 2-amino-1,3-nonadecanediol

A *Leptolyngbya* CENA137 também apresentou um pico de massa 316,21 $[M+H]^+$ que por FT-ICR/MS indicou ter a fórmula $C_{16}H_{29}NO_5$. No DNP esta substância corresponde a um alcalóide denominado curassavina N-óxido produzido pela planta *Heliotropium spathulatum* encontrada no México e Estados Unidos (ROEDER et al, 1990) (Figura 28). Matias e Nunes (2000) relatam que em um levantamento florístico de área de proteção ambiental de manguezal em Jericoacoara, Ceará, *Heliotropium*

lanceolatum era uma das vegetações presentes. O pico correspondente à massa protonada de 316,21 $[M+H]^+$ foi encontrado no extrato das linhagens *Chlorogloea* CENA170 e *Nostoc* CENA159. Se a produção dessa substância for confirmada sendo sintetizada pelas linhagens de cianobactérias isoladas de manguezal, torna-se questionável os resultados obtidos por Roeder e colaboradores. Esses autores poderiam ter caracterizado o alcalóide produzido por uma cianobactéria vivendo em simbiose com a planta e não necessariamente pela planta. Cianobactérias pertencentes aos gêneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Fischerella*, *Synechocystis*, *Aphanocapsa* e *Microcystis* já foram encontradas vivendo em simbiose com plantas, diatomáceas marinhas, briófitas e cianoliquens (RAI; SODERBACK; GERGMAN, 2000). Bergman, Rasmussen e Rai (2007), De Luca e colaboradores (2002), Raven (2002), relatam a presença de cianobactérias simbiotes entre plantas terrestres como briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. Desta forma, a substância identificada sendo produzida pela planta *Heliotropium*, pertencente ao grupo das dicotiledôneas, poderia ter sido produzida por alguma linhagem de cianobactéria simbiote que se encontrava na parte aérea da planta utilizada para análise. Para identificar as substâncias indicadas nas análises por espectrometria de massas será necessário realizar RMN.

Figura 28 - Fórmula estrutural da curassavina N-óxido

4.3.8 Produção de sideróforos

Linhagens de cianobactérias foram analisadas quanto a presença de sideróforos utilizando-se do reagente Cromoazurol-S. Essa análise indicou a produção de sideróforos apenas na linhagem *Phormidium* CENA135 (Tabela 17, Figura 29). A sequência de NRPS obtida e analisada conforme resultados mostrados no item 4.3.2.1 também indica que esta linhagem pode possuir gene envolvido na síntese de sideróforos. Para as demais linhagens analisadas, o teste não indicou produção.

Tabela 17 - Análise da presença de sideróforos produzidos pelas linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo utilizando o reagente Cromoazurol-S

Ordem	Morfotipo	Análise de Cromoazurol-S
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> CENA136	-
	<i>Synechococcus</i> CENA138	-
	<i>Aphanothece</i> CENA139	-
	<i>Synechococcus</i> CENA140	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA141	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA142	-
	<i>Synechococcus</i> CENA143	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA145	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA146	-
	<i>Synechococcus</i> CENA148	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA149	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA150	-
	<i>Synechococcus</i> CENA151	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA152	-
	<i>Synechococcus</i> CENA153	-
	<i>Synechococcus</i> CENA162	-
	<i>Synechococcus</i> CENA163	-
	<i>Synechococcus</i> CENA164	-
	<i>Synechococcus</i> CENA165	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA166	-
	<i>Cyanothece</i> CENA169	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA170	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA172	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA174	-
	<i>Synechococcus</i> CENA177	-
	<i>Synechococcus</i> CENA178	-
	<i>Synechococcus</i> CENA179	-
	<i>Synechocystis</i> CENA180	-
	<i>Chlorogloea</i> CENA181	-
	<i>Synechococcus</i> CENA185	-
Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> CENA134	-
	<i>Phormidium</i> CENA135	+
	<i>Leptolyngbya</i> CENA137	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA144	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA147	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA155	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA156	-
	<i>Leptolyngbya</i> CENA167	-
Nostocales	<i>Leptolyngbya</i> CENA183	-
	<i>Nostoc</i> CENA158	-
	<i>Nostoc</i> CENA159	-
	<i>Nostoc</i> CENA160	-
	<i>Nostoc</i> CENA175	-
	<i>Microchaete</i> CENA176	-

Figura 29 - Teste de cromazurol S (CAS). 1) controle negativo: água; 2) controle negativo: meio de cultura ASN-III; 3) controle positivo: desferal; 4) Sobrenadante de cultura de *Phormidium* CENA135; 5) Sobrenadante de cultura de *Nostoc* CENA159; 6) Sobrenadante de cultura de *Nostoc* CENA160

4.3.9 Análise do sideróforo da linhagem *Phormidium* CENA135 pelos métodos bioquímicos de Csácky e Arnow

O teste de Csácky foi utilizado para a detecção de sideróforos do tipo hidroxamato (Tabela 18, Figura 30) e o teste de Arnow para detecção de sideróforos do tipo catecol (Tabela 18, Figura 31) diretamente do sobrenadante da cultura de células cultivadas em meio ASN-III.

Tabela 18 - Produção de sideróforos do tipo catecol e hidroxamato pela linhagem *Phormidium* CENA135

Amostra	Ácido benzóico equivalente (μM) (catecol)	Hidroxilamina equivalente (μM) (hidroxamato)
ASN-III	0	0
CENA135	0	0,245

Figura 30 - Reação de Arnow para detecção do grupo catecol. 1- meio ASN-III; 2, 3 e 4- Sobrenadante da cultura de *Phormidium* CENA135

Figura 31 - Reação de Csácky para detecção do grupo hidroxamato. 1- meio ASN-III; 2, 3 e 4- Sobrenadante da cultura de *Phormidium* CENA135

Observa-se que o sideróforo produzido pela *Phormidium* CENA135 pertence ao grupo hidroxamato (Tabela 18, Figura 31).

4.3.9.1 Isolamento e caracterização do sideróforo

Tentativas anteriores de purificação deste sideróforo indicaram que o mesmo apresenta característica anfifílica. Pela cromatografia de exclusão por tamanho utilizando a resina Sephadex LH-20 foram obtidas 60 frações de 600 μ l cada, resultantes de 1 ml de sobrenadante do meio de cultura concentrado da *Phormidium* CENA135. As frações de 24 a 42 apresentaram resultado positivo no teste colorimétrico utilizando o reagente CAS, indicando a presença do sideróforo. As frações 24, 33 e 42 foram então analisadas por Q-TOF, onde foi possível observar a presença do íon molecular (ou da molécula protonada) de m/z 561,32. Foi realizada uma busca em bancos de dados e de acordo com o DNP a massa/carga observada coincide com sideróforo synechobactina A, isolado de uma linhagem de *Synechococcus* marinha (ITO; BUTLER, 2005) (Figura 32). De acordo com Armstrong e van Baalen (1979), synechobactinas A, B e C são sideróforos anfifílicos produzidos por *Synechococcus* sp. PCC 7002. Estes são os três primeiros sideróforos estruturalmente elucidados produzidos por cianobactérias marinhas e são relacionados à schizokine, um sideróforo já identificado anteriormente produzido por *Anabaena variabilis* NIES-23 (ITO; BUTLER, 2005). A estrutura do sideróforo synechobactina revela que esta substância é sintetizada pela via NIS. Desta forma, a NRPS caracterizada e relacionada à produção de sideróforos pela linhagem *Phormidium* CENA135 não estaria envolvida na síntese da substância isolada.

Outros sideróforos anfifílicos são conhecidos, como marinobactinas produzidas por *Marinobacter* spp. DS40M6, aquachelinas por *Halomonas aquamarina* (MARTINEZ et al., 2000) e amphibactinas por *Vibrio* sp. R-10 (MARTINEZ et al., 2003). Esses sideróforos contêm apêndices de ácidos graxos agrupados em seu peptídeo hidrofílico que coordenam o Fe (III). Experimentos de partição de membrana artificial com bicamada lipídica indicam que a associação do sideróforo anfifílico marinho com as células depende da natureza da cauda lipídica (XU et al., 2002; MARTINEZ et al., 2003). Em contraste à predominância relativa de sideróforos anfifílicos produzidos por

bactérias marinhas, sideróforos anfífilos contendo ácidos graxos são relativamente raros entre os sideróforos terrestres (ITO; BUTLER, 2005).

Embora as estruturas das synechobactinas e schizokine sejam parecidas, as primeiras são anfífilas e a segunda não. Outros dois tipos de sideróforos anfífilos produzidos por bactérias terrestres relacionados à schizokine foram descritos, como acinetoferrina de *Acinetobacter haemolytis* e a rhizobactina de *Rhizobium meliloti* 1021 (PERSMARK et al., 1993).

Várias espécies de cianobactérias são reportadas por produzirem sideróforos, porém suas estruturas não são caracterizadas (WILHELM; TRICK, 1994).

Figura 32 - Espectro obtido em Q-TOF/MS do sideróforo produzido pela *Phormidium* CENA135 em m/z de 100 a 2800 e fórmula estrutural da synechobactina A que apresenta o mesmo valor m/z

4.3.9.2 RMN do sideróforo produzido por *Phormidium* CENA135

Kalaitzis, Lauro e Neilan (2009) afirmam que espectrometria RMN foi utilizada como ferramenta preferencial de análise da estrutura de metabólitos secundários por cianobactérias desde Moore e colaboradores no início dos anos 1990, que investigaram a biossíntese de anatoxina A em *Anabaena flos-aquae* NRC525-17 e paracyclofanos, nostocyclofana D e cylindrocyclofana D em *Nostoc linkia* e *Cylindrospermum licheniforme*, respectivamente.

Para determinação estrutural do sideróforo obtido a partir dos extratos extracelulares de *Phormidium* CENA135 análise de RMN foi realizada. Os valores de deslocamentos químicos ^1H de RMN do sideróforo produzido por *Phormidium* CENA135 são apresentados e comparados com os valores de synechobactina A na Tabela 19.

Tabela 19 - Dados de RMN- ^1H de synechobactina A (ITO; BUTLER, 2005) e sideróforo produzido por *Phormidium* CENA135

Posição	$^1\text{H } \delta$ (m, Hz)	
	Synechobactina	Sideróforo CENA135
3, 10	2,48 (d, J = 14,5)	-
4, 11	2,55 (d, J = 14,5)	2,5737
5, 12	3,02	3,0020
6, 13	1,62 (m)	-
7, 14	3,48 (t, J = 6,9)	3,4780
9	1,97 (m)	1,9618
16	2,32	-
17	1,46 (m)	-
18-23	1,24 (m)	1,2290
24	1,24 (m)	1,2290
25	1,24 (m)	1,2290
26	0,85 (t, J = 6,9)	-
Ni, iii	7,94	-
Nii, iv-OH	9,65 ou 9,78	-
-	-	7,8193
-	-	3,4910
-	-	3,4493
-	-	3,3689
-	-	2,9877
-	-	2,7506
-	-	2,2657
-	-	1,5123
-	-	1,4930
-	-	1,3951
-	-	1,3773
-	-	1,3583
-	-	1,2087

d: dubleto; m, multiplete; t: tripleto; J: constante de acoplamento.

Observa-se que alguns sinais obtidos do extrato da *Phormidium* CENA135 são muito próximos aos sinais da synechobactina A. Porém, outros sinais apresentados indicam a possibilidade destes serem substâncias parecidas, mas não idênticas. Provavelmente o sideróforo isolado da *Phormidium* CENA135 seja uma estrutura nova, ainda não caracterizada. Os demais espectros de ^{13}C e os bidimensionais de RMN desta amostra estão sendo gerados para elucidar a estrutura dessa substância.

A produção de sideróforos por *Phormidium* foi relatada por Fish e Codd (1994) e Zimmerman, Soliman e Rosen (1995). Fish e Codd (1994) utilizando o extrato extracelular de uma *Phormidium* termotolerante, isolada de Açores, detectaram por cromatografia Sephadex G-15 a presença de duas substâncias (massa molecular de 424 e 762) com resposta positiva no ensaio de sideróforos. Essas mesmas substâncias apresentaram atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os autores sugerem que os sideróforos isolados por eles tenham também a capacidade de interagir com DNA. Zimmerman, Soliman e Rosen (1995) demonstraram a produção de sideróforo por linhagem de *Phormidium* sp. LM689 isolada do lago Matheuws, na Califórnia. Os dois trabalhos citados relatam a presença de sideróforos por este gênero, mas não determinam suas estruturas. Este é o primeiro trabalho onde um sideróforo anfifílico é produzido por uma linhagem de *Phormidium* marinha isolada de ecossistema manguezal.

5 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo sobre filogenia molecular de espécies de cianobactérias isoladas de áreas de manguezais brasileiros onde 42 sequências inéditas de RNAr 16S, com representantes das ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales foram geradas. Algumas dessas sequências não tiveram identidade com sequências descritas anteriormente, indicando que são inéditas dentro do grupo de cianobactérias. Todas essas sequências serão depositadas em bancos de dados públicos e além de contribuir para aumentar as informações sobre cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo, contribuem também com estudos combinados que são indispensáveis para o conhecimento da diversidade de cianobactérias e para a constante correção e atualização do sistema de classificação desses organismos. Na análise filogenética as cianobactérias da ordem Nostocales formaram um grupo monofilético, enquanto as cianobactérias pertencentes às ordens Chroococcales e Oscillatoriales formaram agrupamentos polifiléticos confirmando as informações encontradas em estudos anteriores relatados por diferentes autores.

Nesta pesquisa foi confirmado o potencial das cianobactérias para a produção de produtos naturais bioativos. Os genes de NRPS e PKS estão distribuídos nas linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo. A técnica de PCR juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores degenerados constituíram uma eficiente estratégia para detecção desses genes e possíveis produtores de metabólitos secundários dentro de uma ampla diversidade desses micro-organismos. A análise filogenética de sequências do domínio de A da NRPS produziu resultados que permitiram verificar a relação entre a presença desses genes e a possível produção de substâncias conhecidas, como por exemplo, sideróforos sintetizados pela *Phormidium* CENA135. As sequências do domínio KS das PKSs geradas podem estar envolvidas com a síntese de diversos outros produtos naturais, porém as informações disponíveis sobre o gene que codifica para NRPS e PKS e os produtos finais por eles sintetizados ainda são escassas. Os conhecimentos sobre a formação das estruturas de produtos naturais de cianobactérias, bem como o envolvimento das vias NRPS e PKS modulares em suas biossínteses estão em progresso. Diversas vias de montagem com processos biossintéticos definidos têm sido descritas. Porém, grandes avanços ainda são

necessários para atribuir função a muitas NRPSs e PKSs já identificadas nos genomas de cianobactérias. Os dados apresentados aqui destacam a necessidade de estudos futuros mais aprofundados para cada uma das linhagens, no sentido de definir o elo entre a ecologia de cianobactérias, os fatores que norteiam a diversificação e a manutenção de genes de NRPS e de PKS, e o papel fisiológico das substâncias produzidas. Os conhecimentos ganhos com a caracterização molecular e a distribuição de NRPS e PKS das cianobactérias contribuem para uma melhor compreensão da diversidade desses organismos, do seu potencial de síntese de metabólitos secundários e também para comprovar a utilidade das técnicas moleculares na descoberta de novos produtos naturais.

Muitas linhagens investigadas apresentaram atividade antimicrobiana, o que comprova que esses organismos são promissores para sua utilização em bioprospecção. Da mesma forma, os resultados obtidos por espectrometria de massas também revelam a possibilidade da produção de diversas substâncias com atividade biológica comprovada para aplicação na farmacologia. A maioria dessas substâncias apresenta potencial para aplicações biotecnológicas, o que propicia novas possibilidades futuras de pesquisa.

A investigação da produção de microcistinas em linhagens unicelulares, como *Synechococcus*, gênero que apresenta genoma pequeno, portanto considerada improvável de produzir metabólitos secundários, mostrou resultados inéditos. O gene envolvido na biossíntese de microcistinas foi amplificado nas linhagens *Synechococcus* CENA136, *Chlorogloea* CENA142, *Chlorogloea* CENA146, *Phormidium* CENA135 e *Nostoc* CENA160. A produção de microcistinas pelo gênero *Synechococcus*, uma das cianobactérias picoplanctônicas mais abundantes em ambientes marinhos, se for comprovado em pesquisas futuras, pode representar risco à saúde de animais e humanos. As microcistinas podem ser uma ocorrência mais comum em ambientes marinhos do que se imagina. Mais pesquisas deverão ser realizadas para definir a distribuição dessas toxinas por cianobactérias marinhas. Os resultados moleculares obtidos por PCR do gene envolvido na síntese de microcistinas apontaram a possibilidade da produção dessa toxina por cianobactérias encontradas nos manguezais estudados. O envolvimento das linhagens isoladas dos manguezais do

Estado de São Paulo com a produção de saxitoxinas não pode ser confirmado. As técnicas empregadas para detecção da saxitoxina não foram conclusivas. Nas linhagens investigadas não foi possível detectar a produção desta toxina.

Foi possível isolar uma substância inédita, conhecida como sideróforo, que possui atividade de interesse para aplicação farmacológica. O sideróforo caracterizado produzido pela *Phormidium* CENA135 ainda terá sua estrutura determinada, porém é possível afirmar que ele apresenta mesma massa molecular e estrutura similar com outro sideróforo denominado synechobactina A. Várias espécies de cianobactérias são reportadas por produzirem sideróforos, porém suas estruturas não foram caracterizadas. Este é o primeiro trabalho onde um sideróforo anfifílico é produzido por uma linhagem de *Phormidium* marinha isolada de ecossistema manguezal.

A caracterização da capacidade biossintética das cianobactérias é crucial para compreender os impactos e os nichos ecológicos desses organismos uma vez que elas são globalmente importantes produtores primários que podem alterar os componentes de seus habitats, tais como densidade de competidores ou predadores ou a disponibilidade de nutrientes críticos como os micronutrientes, por meio da síntese de produtos naturais. Adicionalmente, a exploração dos produtos naturais de cianobactérias pode resultar na descoberta de substâncias com aplicações práticas para a sociedade.

REFERÊNCIAS

- ADMI, V.; AFEK, U.; CARMELI, S. Raocyclamides A and B, Novel Cyclic Hexapeptides Isolated from the Cyanobacterium *Oscillatoria raoi*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.59, p.396-399, 1996.
- AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterium species from the genus *Brasilonema* causing damage to Eucalyptus leaves. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 44, p. 1322-1334, 2008.
- AHLGREN, N.A.; ROCAP, G. Culture isolation and culture-independent clone libraries reveal new marine *Synechococcus* ecotypes with distinctive light and N physiologies. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.72, p.7193–7204, 2006.
- ALONGI, D.M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**, New York, v.15, p.59-79, 1988.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p.403-410, 1990.
- AN, J.; CARMICHAEL, W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. **Toxicon : Official Journal of The International Society on Toxinology**, New York, v.32, p.1495–507, 1994.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 1- Introduction. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.38/39, p.291-302, 1985.
- _____. Modern approach to the classification system of cyanophytes. Teil 3- Oscillatoriales. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.50/53, p.327-472. 1988.
- _____. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 5- Stigonematales. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.
- ANANDA, K.; SRIDHAR, K.R.. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, p.871-878, 2002.
- ANDRADE, M.A.B.; LAMBERTI, A. A vegetação. In: AZEVEDO, A. **A baixada santista: aspectos geográficos**. São Paulo: EDUSP, 1965. p.151-178.

ARAI, T.; TAKAHASHI, K.; ISHIGURO, K.; MIKAMI, Y. Some chemotherapeutic properties of two new antitumor antibiotics, saframycins A and C. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington v.71, n.6, p.790–796, 1980.

ARMSTRONG, J.E.; VAN BAALEN, C.. Iron transport in microalgae: The isolation and biological activity of a hydroxamate siderophore from the blue-green alga *Agmenellum quadruplicatum*. **Journal of General Microbiology**, London, v.111, p.253–262, 1979.

ARNOW, L.E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.118, p. 531-537, 1937.

BACON, B.R.; BRITTON, R.S. Hepatic injury in chronic iron overload. **Role of Lipid Peroxidation Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.70, n.3-4, p.183-226, 1989.

BAETA-NEVES, M.H.; TRIBUZI, D. Lês Cyanophycées de la mangrove de la “Pnta do Pai Vitório” de la région de Cabo Frio (RJ, Brésil). **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v.14, p.29-52, 1992.

BAKER, J.M.; BUZMAN, L.; BARTLETT, P.D.; LITTLE, D.I.; WILSON, C.M. Long-term fate and effects of untreated thick oil deposits on salt marshes. In: INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE. Washington: American Petroleum Institute Publication, 1993. p.395-399.

BAKER, J.A.; ENTSCH, B.; NEILAN, B.A.; MCKAY, D.B. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.12, p.6070-6076, 2002.

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

BAKER, P.D.; HUMPAGE, A.R. Toxicity associated with commonly occurring cyanobacteria in surface waters of the Murray-Darling Basin, Australia. **Australian Journal of Marine & Freshwater Research**, v.45, p.773–786, 1994.

BANO, N.; NISA, M. U.; KHAN, N.; SALEEM, M.; HARRISON, P. J.; AHMED, S. I.; AZAM, F. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indusriver delta, Pakistan. **Marine Ecology Progress Service**. v. 157, p. 1-12, 1997.

BARBEAU, K.K.; RUE, E.L.; TRICK, C.G.; BRULAND, K.W.; BUTLER, A. Photochemical reactivity of siderophores produced by marine heterotrophic bacteria and cyanobacteria based on characteristic Fe(III) binding groups. **Limnology and Oceanography**, Waco, v.48, p.1069–1078, 2003.

BARONA-GOMEZ, F.; WONG, U.; GIANNAKOPOULOS, A.; DERRICK, P.J.; CHALLIS, G.L. Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.126, p.16282–16283, 2004.

BARRIOS-LLERENA, M.E.; BURJA, A.M.; WRIGHT, P.C. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v.34, n.6, p.443–456, 2007.

BEIDERBECK, H.; TARAZ, K.; BUDZIKIEWICZ, H.; WALSBY, A.E. Anachelin, the siderophore of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* CCAP 1403/2A. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v.55, p.681–687, 2000.

BENDERLIEV, K. Algae and cyanobacteria release organic chelators in the presence of inorganic Fe(III) thus keeping iron dissolved. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v.25, p.65–75, 1999.

BERGMAN, B.; RASMUSSEN, U.; RAI, A.N. Cyanobacterial associations. In: Elmerich, C.; Newton, W.E. (Ed.) **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Dordrecht: Kluwer Acad. 2007, p.257–301.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.B.; KUPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, v. 294, p. 1534–1447, 2001.

BERNARDES, M.E.C.; dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.

BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B.; MÜLLER, R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1445, p.185–195, 1999.

BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; TATON, A.; WILMOTTE, A.; HODGSON, D. A.; LOSIS, D.; MARINELLI, F. Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 105, n. 1, p. 105–115, 2008.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v.7, p.1513–1523, 1979.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, Amsterdam, p.51–60, 2003.

BLUMENTHAL, K.M.; SEIBERT, A.L. Voltage-gated sodium channel toxins: poisons, probes, and future promise. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v.38, p.215–238, 2003.

BODE, H.B.; MÜLLER, R. The impact of bacterial genomics on natural product research. **Angewandte Chemie**, New York, v.44, p.6828-6846, 2005.

BOTES, D.P.; WESSELS, P.L.; KRUGER, H.; RUNNEGAR, M.T.C.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.J.; BARNA, J.C.J.; WILLIAMS, D.HI. Structural studies on cyanoginosins-LR, YR, YA, and YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society**, London, v.1, p.2747–2748, 1985.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W.F. Ribosomal RNA homologies and the evolution of the filamentous blue-green bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 10, p. 283-291, 1978.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: the Archaea and deeply branching and phototrophic Bacteria. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v. 1, 721 p.

BOWLING, L.C. Occurrence and possible causes of a severe cyanobacterial bloom in Lake Cargelico, New South Wales. **Australian Journal of Marine & Freshwater Research**, v.45, p.737–745, 1994.

BRANCO, L.H.Z.; SILVA, S.M.F.; SANT'ANNA, C.L. Stichosiphon mangle sp. nova, a new Cyanophyte form mangrove environments. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.72, p.1-7, 1994.

BRANCO, L.H.Z.; MOURA, A.N.; SILVA, A.C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Biodiversidade e considerações biogeográficas das cianobactérias de uma área de manguezal do Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.17, n.4, 585-596, 2003.

BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo State, Brazil. 1. Chroococcales. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.80, p.101-113, 1996a.

BRANCO, L.H.Z.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.84, p.39-52, 1996b.

BRANCO, L.H.Z.; HOFFMANN, L.; TEIXEIRA, J.P.; FERREIRA, V.; MORAIS FILHO, J.C. Aerophytic cyanoprokaryotes from the Atlantic rainforest region of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. **Cryptogamie Algologie**, Paris, v. 30, p. 135-152, 2009.

BRENNER, D.J.; STALEY, J.T.; KRIEG, N.R. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ R.W. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2 ed. New York, Springer-Verlag, 2001. p.27-31.

BUNYAJETPONG, S.; YOSHIDA, W.Y.; SITACHITTA, N.; KAYA, K. Trunapeptins A-C, Cyclodepsipeptides from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.69, p.1539-1542, 2006.

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

BURNS, B.P.; SEIFERT, A.; GOH, F.; POMATI, F.; JUNGBLUT, A.D.; SERHAT, A.; NEILAN, B.A. Genetic potential for secondary metabolite production in stromatolite communities. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.243, p.293-301, 2005.

CARMICHAEL, W.W.; LI, R.H. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. **Saline Systems**, London, v.2, n.5, p.1-13, 2006.

CARMICHAEL, W.W.; EVANS, W.R.; YIN, Q.Q.; BELL, P.; MOCZYDLOWSKI, E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.3104-3110, 1997.

CARMO, T.M.S. do; MELO, R.M.S.; OLIVEIRA, A.R.de; AKAHORI, L.; ALMEIDA, R.de; LOVAT, T.J.C. **Conhecendo o manguezal**: material didático. Vitória: Editora Fundação Celciliano Abel de Almeida, 1994, 25p.

CARR, N.G.; WHITTON, B.A. **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1973. 676 p.

CASTENHOLZ, R.W. The effect of sulfide on the blue-green algae of hot springs. 1. New Zealand and Iceland. **Journal of Phycology**, Baltimore, v.12, p.54-68, 1976.

_____. Culturing methods for cyanobacteria. In: PACKER, L., GLAZER, A.N. **Methods Enzymology**, v.167, p.68-95, 1988.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria, group 1, cyanobacteria. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNIG, N.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1989. p.1710-1728.

CASTIGLIONI, B.; RIZZI, E.; FROSINI, A.; SIVONEN, K.; RAJANIEMI, P.; RANTALA, A.; MUGNAI, M.A.; VENTURA, S.; WILMOTTE, A.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, CONSOLANDI, C.; BORDONI, R.; MEZZELANI, A.; BATTAGLIA, C.; DE BELLIS, G. Development of a Universal Microarray Based on the Ligation Detection Reaction and 16S rRNA Gene Polymorphism To Target Diversity of Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, n.12, p.7161-7172, 2004.

CHAGANTY, S.; GOLAKOTI, T.; HELTZEL, C.; MOORE, R.E.; YOSHIDA, W.Y. Isolation and Structure Determination of Cryptophycins 38, 326, and 327 from the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.67, p.1403-1406, 2004.

CHAIKLAHAN, A.R.; CHIRASUWAN, A.N.; LOHA, V.; BUNNAG, B. Lipid and fatty acids extraction from the cyanobacterium *Spirulina*. **Science Asia**, Bangkok, v. 34, p. 299-305, 2008.

CHALLIS, G.L. A Widely Distributed Bacterial Pathway for Siderophore Biosynthesis Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. **ChemBiochem**, v.6, p.601-611, 2005.

CHANG, Z.; FLATT, P.; GERWICK, W.H.; NGUYEN, V.-A.; WILLIS, C.L.; SHERMAN, D.H. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving and unusual trichloroleucyl starter unit. **Gene**, Amsterdam, v.296, p.235-247, 2002.

CHARLES, L. Flow injection of the lock mass standard for accurate mass measurement in electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry coupled with liquid chromatography. **Rapid Communications In Mass Spectrometry : RCM**, London, v.17, p.1383-1388, 2003.

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

CHRISTIANSEN, G.; DITTMANN, E.; ORDORIKA, L.V.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; BÖRNER, T. Nonribosomal peptide synthetase genes occur in most cyanobacterial genera as evidenced by their distribution in axenic strains of the PCC. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.176, p.452-458, 2001.

CHU, F.S.; HUANG, X.; WEI, R.D.; CARMICHAEL, W.W. Production and characterization of antibodies against microcystins. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.55, p.1928-1933, 1989.

CLARKE, P.J.; WARD, T.J. The response of southern hemisphere saltmarsh plants and gastropods to experimental contamination by petroleum hydrocarbons. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v.175, p.43-57, 1994.

CODD, G.A.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, p. 264-272, 2005.

COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 147-167, 2005.

COHEN, Y.; JORGENSEN, B.B.; REVSBECK, N.P.; PAPLAWSKI, R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.51, p.398-407, 1986.

COLEMAN, J.E.; WRIGHT, J.L. Radiosumin B, an unusual dipeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.64, p.668-670. 2001.

COLOMBO, M.; SIRTORI, F.R.; RIZZO, V. A fully automated method for accurate mass determination using high-performance liquid chromatography with a quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, London, v.18, p.511–517, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro; Imprensa Nacional, 1984. v.5, 687p.

COPP, J.N.; ROBERTS, A.A.; MARAHIEL, M.A.; NEILAN, B.A. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, p.3133-3139. 2007.

COQUE, J.J.; PEREZ-LLARENA, F.J.; ENGUITA, F.J.; FUENTE, J.L.; MARTIN, J.F.; LIRAS, P. Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 30-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. **Gene**, Amsterdam, v.162, n.21, p.27, 1995.

CONSTANZA, R.; ARGE, R.D.; DE GROOT, R.; FARBERK, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R.V.; PARUELO, J.; RASKIN, R.G.; SUTTONKK, P.; VAN DEN BELT, M. The value of the world's ecosystem services and nature capital. **Nature**, London, v.387, p.253-260, 1997.

CROSA, J.H.; WALSH, C.T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.66, p.223–249, 2002.

CSÁKY, T.Z. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v.2, p. 450-454, 1948.

CZARNECKI, O.; HENNING, M.; LIPPERT, I.; WELKER, M. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). **Environmental Microbiology**, Oxford, v.8, n.1, p.77–87, 2006.

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon : Official Journal of The International Society on Toxinology**, New York, v.36, p.953–62, 1998.

DE CAIRE, G.Z.; DE CANO, M.S.; DE MULÉ, M.C.Z.; DE HALPERIN, D.R. Screening of cyanobacterial bioactive compounds against human pathogens. **Phyton-International Journal of Experimental Botany** v.54, p.59-65, 1993.

DE LUCA, T; ZACKRISSON, O; NILSSON, M-C.; SELLSTEDT, A. Quantifying nitrogen-fixation in feather moss carpets of boreal forests. **Nature**, London, v.419, p.917–920, 2002.

DELAUNE, R.D.; PATRICK, W.H.; BURESH, R.J. Sedimentation rates determined by ¹³⁷Cs dating in a rapidly accreting salt marsh. **Nature**, London, v.275, p.532-533, 1978.

DELWICHE, C.F.; KYHSEL, M.; PALMER, J.D. Phylogenetic analysis of *tufA* Sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. San Diego, v.4, n.2, p.110-128, 1995.

DIERSTEIN, R.; KAISER, I.; WECKESSER, J.; MATERN, U.; KÖNIG, W.A.; KREBBER, R. Two closely related peptide toxins in axenically grown *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.13, p.86-91, 1990.

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

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

DITTMANN, E.; NEILAN, B.A.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for heptatoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Molecular microbiology**, Oxford, v.26, p.779–787. 1997.

DITTMANN, E.; CHRISTIANSEN, G.; NEILAN B.A.; FASTER, J.; RIPPKA, R.; BÖRNER, T. Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria. In: PESCHEK, G.A.; LÖFFELHARDT, W.; SCHEMETTERER, G. **The Phototrophic Prokaryotes**. New York: Kluwer Academic, 1999. p.615-621.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Product Reports**, London, v.24, p.1073-1109, 2007,

DOOLITTLE, W.F. Phylogenetic classification and the universal tree. **Science**, Washington, v. 284, p. 2124-2129, 1999.

DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 83, p. 197-206, 1996.

DRECHSEL, H.; JUNG, G. Peptide siderophores. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v.4, p.147-181, 1998.

DU, L.; SÁNCHEZ, C.; SHEN, B. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. **Metabolic Engineering**, San Diego, v.3, p.78-95, 2001.

ECKERS, C.; WOLFF, J.C.; HASKINS, N.J.; SAGE, A.B.; GILES, K.; BATEMAN, R. Accurate mass liquid chromatography/mass spectrometry on orthogonal acceleration time-of-flight mass analyzers using switching between separate sample and reference sprays. 1. Proof of concept. **American Chemical Society**, Washington, v.72, p.3683–3688, 2000.

EDWARDS, D.J.; GERWICK, W.H. Lyngbyatoxin Biosynthesis: Sequence of Biosynthetic Gene Cluster and Identification of a Novel Aromatic Prenyltransferase. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.126, p.11432–11433, 2004.

EDWARDS, D.J.; MARQUEZ, B.L.; NOGLE, L.M.; MCPHAIL, K.; GOEGER, D.E.; ROBERTS, M.A.; GERWICK, W.H. Structure and Biosynthesis of the Jamaicamides, New Mixed Polyketide-Peptide Neurotoxins from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Chemistry & Biology**, Tokyo, v.11, p.817–833, 2004.

EHRENREICH, I.M.; WATERBURY, J.B.; WEBB, E.A. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, p.7401-7413, 2005.

ERHARD, M.; VON DÖHREN, P. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, New York, v.15, p.906-909, 1997.

ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; JUNGBLUT, P.R. Rapid identification of the new anabaenopeptin G from *Planktothrix agardhii* HUB 011 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry: RCM**, London, v.13, p.337-343, 1999.

ETCHEGARAY, A. Biossíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.393-419.

ETCHEGARAY, A.; SILVA-STENICO, M.E.; MOON, D.H.; TSAI, S.M. In silico analysis of nonribosomal peptidesynthetase of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: identification of putative siderophore and lipopeptide biosynthetic genes. **Microbiological Research**, Amsterdam, v.159, p.425-437, 2004b.

ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D.H.; FIORE, M.F.; VON DÖHREN, H.; TSAI, S.M.; NEILAN, B.A. Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.16, p.237-243, 2004a.

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

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

FANG, X.; FAN, X.; TANG, Y.; CHEN, J.; LU, L. Liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for determination of saxitoxin and decarbamoylsaxitoxin in shellfish. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1036, p.233–237, 2004.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, p.340-373, 1992.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v.39, p.783–791, 1985.

FERRERAS, J.A.; RYU, J.-S.; DI LELLO, F.; TAN, D.S.; QUADRI, L.E.N. Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. **Nature Chemical Biology**, New York, v.1, p.29–32, 2005.

FEWER, D.P.; JOKELA, J.; ROUHIAINEN, L.; WAHLSTEN, M.; KOSKENNIEMI, K.; STAL, L.J.; SIVONEN, K. The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* mm_6816 924. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.73, n.5, p.924–937, 2009.

FEWER, D.P., TOOMING-KLUNDERUD, A., JOKELA, J., WAHLSTEN, M., ROUHIAINEN, L., KIRSTENSEN, T., ROHRLACK, T., JAKOBSEN, K.S., SIVONEN, K. Natural occurrence of microcystin synthetase deletion mutants capable of producing microcystins in strains of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria). **Microbiology**, Washington, v.154, p.1007–1014, 2008.

FIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Microorganismos e Agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v. 1, p. 69-96.

FIORE, M.F.; MOON, D.H.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.39, p.159-169, 2000.

FIORE, M.F.; GENUÁRIO, D.B.; SILVA, C.S.P.; SHISHIDO, T.K.; MORAES, L.A.B.; NETO, R.C.; SILVA-STENICO, M.E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.53, n.7-8, p.754-761. 2009.

FISH, S.A.; CODD, G.A. Antimicrobial and cytotoxic activity produced by an isolate of the thermotolerant cyanobacterium (blue-green alga) *Phormidium* sp. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.5, p. 351-356, 1994.

FLOODGATE, G.D. Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v.9, p.3-11, 1995.

FOGG, G.E.; STEWART, W.D.P.; FAY, P.; WALSBY, A.E. **The blue-green algae**. London: Academic Press, 1973. 459 p.

FOSTER, J.S.; GREEN, S.J.; AHRENDT, S.R.; GOLUBIC, S.; REID, R.P.; HETHERINGTON, K.L.; BEBOUT, L. Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas. **The ISME Journal**, London, v.3, n.5, p.573-587, 2009.

FRANGEUL, L.; QUILLARDET, P.; CASTETS, A.M; HUMBERT, J.F.; MATTHIJS, H.C.P; CORTEZ, D.; TOLONEN, A.; ZHANG, C.C.; GRIBALDO, S.; KEHR, J.C; ZILLIGES, Y.; ZIEMERT, N.; BECKER, S.; TALLA, E.; LATIFI, A; BILLAULT, A.; LEPELLETIER, A.; DITTMANN, E.; BOUCHIER, C.; DE MARSAC, N.T. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. **BMC Genomics**, London, v.9, p.274, 2008.

FULLER, N.; MARIE, J.D.; PARTENSKY, F.; VAULOT, D.; POST, A.F.; SCANLAN, D.J. Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, p.2430–2443, 2003.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. Disponível em: www.informaworld.com/smpp/title~content=t713401167. Acesso em: 1 Set. 2009).

GADEMANN, K.; PORTMANN, C. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. **Current Organic Chemistry**, v.12, p.326–341, 2008.

GALLON, J.R. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. **New Phytologist**, Malden, v. 122, p. 571-609, 1992.

GANTAR, M.; BERRY, J. P.; THOMAS, S.; WANG, M.; PEREZ, R.; REIN, K. S.; KING, G. Allelopathic activity among cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 64, n. 1, p. 55-64, 2008.

GARCIA-PICHEL, F.; LÓPEZ-CORTÉS, A.; NÜBEL, U. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.67, p.1902–1910, 2001.

GENUÁRIO, D.B.; SILVA-STENICO, M.E.; WELKER, M.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.55, p.846–854, 2010.

GERWICK, W.H.; TAN, L.T.; SITACHITTA, N. Nitrogen-containing metabolites from marine cyanobacteria. In: CORDELL, G.A. (Ed.), **The alkaloids: chemistry and biology**, v.57. Academic Press: San Diego, 2001. pp. 75–184.

GETTER, C.D.; CINTRONG, G.; DICKS, B.; LEWIS, R.R.; SENECA, E.D. The recovery and restoration of salt marshes and mangrove following an oil spill. In: CAIRNS, J; BUIKEMA, A.L. (Ed.) **Restoration of habitats impacted by oil spills**. Boston: Butterworth, 1984, p.65-113.

GOLAKOTI, T.; OGINO, J.; HELTZEL, C.E.; LE HUSEBO, T.; JENSEN, C.M.; LARSEN, L.K.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E.; MOOBERRY, S.L.; THOMAS H. CORBETT, T.H.; VALERIOTES, F.A. Structure Determination, Conformational Analysis, Chemical Stability Studies, and Antitumor Evaluation of the Cryptophycins. Isolation of 18 New Analogs from *Nostoc* sp. Strain GSV 224. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.117, p.12030-12049, 1995.

GOLDMAN, S.J.; LAMMERS, P.J.; BERMAN, M.S.; SANDERS-LOEHR, J. Siderophore-mediated iron uptake in different strains of *Anabaena* sp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.156, p.1144–1150, 1983.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v.8, p.195-202, 1998.

GUGGER, M.; LYRA, C.; HENRIKSEN, P.; COUTE, A.; HUMBERT, J. F.; SIVONEN, K. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.1867–1880, 2002.

GULLEDGE, B.M.; AGGEN, J.B.; HUANG, H.B.; NAIRN, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.9, p.1991–2003, 2002.

HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: a global overview, In: HALLEGRAEFF, G.M.; ANDERSON, D.M.; CEMBELLA, A.D. (Ed.) **Manual on harmful marine microalgae**. UNESCO, Paris, France. (In French.) 1995. p.1–22.

HAN, B.; MCPHAIL, K. L.; LIGRESTI, A.; DI MARZO, V.; GERWICK, W.H. Semiplenamides A G, Fatty Acid Amides from a Papua New Guinea Collection of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya semiplena*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.66, p.1364-1368, 2003.

HARADA, K.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: Chorus, I; Bartram, J. (Ed.) **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E. & F.N. Spon, 1999. p.369–405.

HARADA, K.; FUJII, K.; SHIMADA, T.; SUZUKI, M. Two Cyclic Peptides, Anabaenopeptins, A Third Group of Bioactive Compounds from the Cyanobacterium *Anabaena flos.aquae* NRC 525-17. **Tetrahedron letters**, Oxford, v.36, n.9, p.1511-1514, 1995.

HARADA, K.; MAYUMI, T.; SHIMADA, T.; FUJII, K.; KONDO, F.; PARK, H.D.; WATANABE, M.F. Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom. **Environmental Toxicology**, New York, v.16, p.298-305, 2001.

HOFFMANN, L. Geographic distribution of freshwater blue-green algae. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.336, p.33-39, 1996.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 95-115, 2005.

HOFFMANN, D.; HEVEL, J.M.; MOORE, R.E.; MOORE, B.S. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. **Gene**, Amsterdam, v.311, p.171-180, 2003.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.33, p.265-278, 2001.

HONDA, D.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Detection of Seven Major Evolutionary Lineages in Cyanobacteria Based on the 16S rRNA Gene Sequence Analysis with New Sequences of Five Marine *Synechococcus* Strains. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.48, n.6, p.723-39, 1999.

HOWARTH, R.W. Assessing the ecological effects of oil pollution from outer continental shelf oil development. **Transactions of American Fisheries Society**, New York, v.11, p.1-8, 1991.

HUMPAGE, A.R.; MAGALHAES, V.F.; FROSCIO, D.M. Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins. Disponível em: www.springerlink.com/content/c321155r12447q50/fulltext.pdf. Acesso em: 12 Fev. 2010.

HUMPAGE, A.R.; ROSITANO, J.; BREITAG, A.H.; BROWN, R.; BALER, P.D.; NICHOLSON, W.C.; STEFFENSEN, D.A. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. **Australian Journal of Marine & Freshwater Research**, v.45, p.761–777, 1994.

HUSSAIN, M.I.; KHOJA, T.M. Intertidal and subtidal blue-green algal mats of open and mangrove areas in the Farasab archipelago (Saudi Arabia) Red Sea. **Botanica Marina**, Berlin, v.36, p.377-388, 1993.

ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Kawaguchipeptin B, an Antibacterial Cyclic Undecapeptide from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.60, p.724-726, 1997.

_____. Micropeptin 90, a plasmin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-90). **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.36, p.3535-3538, 1995.

ISHIDA, K.; KATO, T.; MURAKAMI, M.; WATANABEB, M.; WATANABEC, M. Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.56, p.8643-8656, 2000.

ISHITSUKA, M.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H. Microviridin: A Novel Tricyclic Dipeptide from the Toxic Cyanobacterium *Microcystis viridis*. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.112, n.8, p.180-182, 1990.

ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; MARSAC, N.T.; HERDMAN, M. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 481–496, 2002.

ITO, Y.; BUTLER, A. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Limnology and oceanography**, Waco, v.50, p.1918–1923, 2005.

JABBOURI, S.; RELIC, B.; HANIN, M.; KAMALAPRIJA, P.; BURGER, U.; PROME, D.; PROME, J.C.; BROUGHTON, W.J. *noI*O and *noel* (HsnIII) of *Rhizobium* sp. NGR234 are involved in 3-O-carbamoylation and 2-O-methylation of Nod factors. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.273, p.12047–12055, 1998.

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

JAKI, B.; ORJALA, J.; BÜRGI, H.R.; STICHER, O. Biological Screening of Cyanobacteria for Antimicrobial and Molluscicidal Activity, Brine Shrimp Lethality, and Cytotoxicity. **Pharmaceutical Biology**. London, v.37, n.2, p.138–143, 1999.

JENKE-KODAMA, H.; SANDMANN, A.; MULLER, R.; DITTMANN, E. Evolutionary implications of bacterial polyketide synthases. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.22, p.2027-2039, 2005.

JONES, A.C; GU, L.; SORRELS, C.M.; SHERMAN, D.H.; GERWICK, W.H. New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.13, p.216–223, 2009.

JÜTTNER, F.; TODOROVA, A. K.; WALCH, N.; VON PHILIPSBORN, W. Nostocyclamide M: a cyanobacterial cyclic peptide with allelopathic activity from *Nostoc* 31. **Phytochemistry**. New York, v.57, p.613-619, 2001.

KAASALAINEN, U.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Microcystin Production in the Tripartite Cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, n.6, p.695–702, 2009.

KADI, N.; OVES-COSTALES, D.; BARONA-GOMEZ, F.; CHALLIS, G.L. **Nature Chemical Biology**, New York, v.3, p.652–656, 2007.

KALAITZIS, J.A.; LAURO, F.M.; NEILAN, B.A. Mining cyanobacterial genomes for genes encoding complex biosynthetic pathways. **Natural Product Reports**, London, v.26, p.1447-1465, 2009.

KAO, C.Y.; LEVINSON, S.R. Tetrodotoxin, saxitoxin, and the molecular biology of the sodium channel. New York: Academy of Sciences, 1986. v.479, p.1–445.

KATHIRESAN, K; BINGHAM, B.L. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v.40, p.81-251, 2001.

KAYA, K.; SANO, T.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A.. Nostocyclin, a novel 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone containing cyclic depsipeptide from the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.37, p.6725-6728, 1996.

KEATING, T.A.; WALSH, C.T. Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.3, p.598-606, 1999.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; NEILAN, B.A. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v.67, p.526–538, 2008.

KELLMANN, R.; MIHALI, T.K.; JEON, Y.J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B.A. Biosynthetic Intermediate Analysis And Functional Homology Reveal a saxitoxin Gene Cluster in Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.74, n13, p.4044–4053, 2008.

KERRY, A.; LAUDENBACH, D.E.; TRICK, C.G. Influence of iron limitation and nitrogen source on growth and siderophore production by cyanobacteria. **Journal of Phycology**, New York, v.24, p.566–71, 2008.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.236, p.335-351, 1996.

KOKSHAROVA, .A.; WOLK, C.P. Genetic tools for cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.58, p.123-137, 2002.

KOMÁREK, J. Problem of the taxonomic category “species” in cyanobacteria. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.109, p.281-297, 2003.

_____. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept) **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.639, p.245–259, 2010.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern Approach to the Classification System of Cyanophytes 4. Nostocales. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 82, p. 247-345, 1989.

_____. Cyanoprokaryota, **1. Teil: Chroococcales**. In: ETTL, H; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

_____. Cyanoprokaryota. **2.Teil: Oscillatoriales**. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Ed.). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Munique: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1-759.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.; SANT’ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; SENNA, P.A.C. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, *M. panniformis* sp. Nov. **Cryptogamie/Algologie**, v.23, n.2, p.159-177, 2002.

KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 2567-2572, 2005b.

_____. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 6258-6264, 2005a.

KOTAKI, Y.; TAJIRI, M.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T. Identification of a calcareous red alga as the primary source of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and gastropods. **Nippon Suisan Gakkai Shi. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v.49, p.283–286, 1983.

KREITLOW, S.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. Cyanobacteria – a potential source of new biologically active substances. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.70, p.61-63, 1999.

KRISHNAMURTHY, K.; KATHIRESAN, K.; KANNAN, L.; GODHANTARAMAN, N.; DAMODARA NAIDU, W. Cyanobacteria. In: Plankton of Parangipettai (Poroto Novo), India. **Memoirs of the CAS in Marine Biology**, Parangipettai: Annamalai University, 1995. 27 p.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; CHORUS, I. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. And determines its microcystin net production in lake Wannsee. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, n.2; p.787-795, 2003.

KURMAYER, R.; DITTMAN, E.; FASTNER, J.; CHORUS, I. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Myrocystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). **Microbial Ecology**, New York, v.43, p.107–118, 2002.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; GUMPENBERGER, M.; FASTNER, J. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. **Microbiology**, Washington, v.151, p.1525–1533, 2005.

KUTNER, M. B.. Seasonal variation and phytoplankton distribution in Cananéia region, Brazil In: WALSH, G.; SNEDAKER, S.; TEAS, H. (Ed.), **Biology and Management of Mangroves**. , Florida: Univ. Florida, 1975. p.153-169.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.37, p.1359–1373, 1999.

LANKOFF, A.; KRZOWSKI, L.; GLAB, J.; BANASIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. **Mutation Research**, Amsterdam v.559, p.131–42, 2004.

LEWIS, B.L.; HOLT, P.D.; TAYLOR, S.W.; WILHELM, S.W.; TRICK, C.G.; BUTLER, A.; Luther, G.W. Voltammetric estimation of iron(III) thermodynamic stability constants for catecholate siderophores isolated from marine bacteria and cyanobacteria. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v.50, p.179–188, 1995.

LAWRENCE, J.F.; NIEDZWIADK, B.; MENARD, C.; LAU, B.P.; LEWIS, D.; KUPER-GOODMAN, T.; CARBONE, S.; HOLMES, C. Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.84, p.1035–1044, 2001.

LI, R.; CARMICHAEL, W.W.; LIU, Y.; WATANABE, M.M. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA sequences. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.438, p.99–105, 2000.

LI, X.Y.; WANG, J.; LIANG, J.B.; LIU, Y.D. Toxicity of microcystins in the isolated hepatocytes of common Carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.67, p.447–451, 2007.

LIU, Y.M.; CHEN, W.; LI, D.H.; SHEN, Y.W.; LIU, Y.D.; SONG, L.R. Analysis of paralytic shellfish toxins in *Aphanizomenon* DC-1 from Lake Dianchi, China. **Environmental Toxicology**, New York, v.21, p.289–295, 2006.

LUDWIG, W.; KLENK, H.P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, D.R. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2001. p. 49-65.

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; KLUGBAUER, N.; WEIZENEGGER, M.; NEUMAIER, J.; BACHLEITNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v.19, p.554-568, 1998.

LUESCH, H.; WILLIAMS, P.G.; YOSHIDA, W.Y.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J. Ulongamides A F, New β -Amino Acid-Containing Cyclodepsipeptides from Palauan Collections of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.65, p.996-1000, 2002.

MACRELLIS, H.M.; TRICK, C.G.; RUE, E.L.; BRULAND, K.W. Collection and detection of natural Fe-binding ligands from seawater. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v.76, p.175–187, 2001.

MAGARVEY, N.A.; BECK, Z.Q.; GOLAKOTI, T.; DING, Y.; HUBER, U.; HEMSCHIEDT, T.K.; ABELSON, D.; MOORE, R.E.; SHERMAN, D.H. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from *Nostoc* cyanobionts. **ACS Chemical Biology**, Washington, v.1, n.12, 2007.

MAHASNEH, I.A.; GRAINGER, S.L.J.; WHITTON, B.A. Influence of salinity on hair formation and phosphatase activities of the blue-green alga (Cyanobacterium) *Calothrix viguieri* D253. **British Phycological Journal**, v.25, n.1, p.25-32, 1990.

MANN, F.D.; STEINKE, T.D. Biological nitrogen- fixation (acetylene reduction) associated with blue-green algal (cyanobacterial) communities in the Beachwood Mangrove Nature Reserve II. Seasonal variation in acetylene reduction activity. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.59, n.1, p.1-8, 1993.

MANN, N.H.; CARR N.G. Photosynthetic prokaryotes. In: **Biotechnology Handbooks**. London: Plenum Press, 1992. 275p.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Baltimore, v.97, p.2651-2673, 1997.

MARQUEZ, B.; VERDIER-PINARD, P.; HAMEL, E.; GERWICK, W.H. Curacin D, an antimitotic agent from the marine cyanobacterium *Lynbya majuscula*. **Phytochemistry**, New York, v.49, n.8, p.2387-2389, 1998.

MARTINEZ, J.S.; CARTER-FRANKLIN, J.N.; MANN, E.L.; MARTIN, J.D.; HAYGOOD, M.G.; BUTLER, A. Structure and membrane affinity of a suite of amphiphilic siderophores produced by a marine bacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.100, p.3754–3759, 2003.

MARTINEZ, J.S.; ZHANG, G.P.; HOLT, P.D.; JUNG, H.T.; CARRANO, C.J.; HAYGOOD, M.G.; BUTLER, A. Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria. **Science**, Washington, v.287, p.1245–1247, 2000.

MATIAS, L.Q.; NUNES, E.P. Levantamento florístico da área de proteção ambiental de Jericoacoara, Ceará. **Acta Botanica Brasilica**, v.15, n.1, p.35-43, 2001.

MATSUDA, H.; OKINO, T.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Radiosumin, a trypsin inhibitor from the blue-green alga *Plectonema radiosum*. **The Journal of Organic Chemistry**, Easton, v.61, p.8648–8650, 1996.

MAZARD, S.L.; FULLER, N.J.; ORCUTT, K.M.; BRIDLE, O.; SCANLAN, D.J. PCR Analysis of the Distribution of Unicellular Cyanobacterial Diazotrophs in the Arabian Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore v.70, n.12; p.7355–7364, 2004.

MICHEL, J. Adverse effects from oil. Disponível em: www.darcnw.noaa.gov/iad_apd.pdf. Acesso em: 16 Abr. 2002).

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M.A. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.71, p.413–451, 2007.

MIHALI, T.K.; KELLMANN, R.; NEILAN, B.A. Characterisation of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. **BMC Biochemistry**, London, v.10, p.8, 2009.

MILLIGAN, K.E.; MARQUEZ, B.; WILLIAMSON, R.T.; DAVIES-COLEMAN, M.; GERWICK, W.H. Two New Malyngamides from a Madagascan *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.63, p.965-968, 2000.

MITA, A.C; HAMMOND, L.A.; BONATE, P.L.; WEISS, G.; MCCREERY, H.; SYED, S.; GARRISON, M.; CHU, Q.S.; DEBONO, J.S.; JONES, C.B.; WEITMAN, S.; ROWINSKY, E.K.; Phase I and pharmacokinetic study of tasidotin hydrochloride (ILX651), a third-generation dolastatin-15 analogues, administered weekly for 3 weeks every 28 days in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.12, p.5207–5215, 2006.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, p. 6353-6362, 2004.

_____. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.56, p.446-457, 2003.

MOHANRAJU, R.; NATARAJAN, R. Methanogenic bacteria in mangrove sediments. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.247, p.187-193, 1992.

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

MONINI, P.; SGADARI, C.; BARILLARI, G.; ENSOLI, B. HIV protease inhibitors: antiretroviral agents with anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-tumour activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.51, p.207–211, 2003.

MOORE, R.E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.16, p.134-143, 1996.

MOORE, R.E.; CHEN, J.L.; MORRE, B.S.; PATTERSON, G.M.L.; CARMICHAEL, W.W. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.113, p.5083-5084, 1991.

MÜHLING, M.; FULLER, N.J.; SOMERFIELD, P.J.; POST, A.F.; WILSON, W.H.; SCANLAN, D.J.; JOINT, I.; MANN, N.H.. High resolution genetic diversity studies of marine *Synechococcus* isolates using *rpoC1*-based restriction fragment length polymorphism. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v.45, p.263–275, 2006.

MÜLLER, D.; KRICK, A.; KEHRAUS, S.; MEHNER, C.; HART, M.; KUPPER, F.C.; SAXENA, K.; PRINZ, H.; SCHWALBE, H.; JANNING, P.; WALDMANN, F.; KONIG, G.M. Brunsvicamides A C: Sponge-Related Cyanobacterial Peptides with Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitory Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v.49, p.4871–4878, 2006.

MUNDT, S.; KREITLOW, S.; JANSEN, R. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 15, p.263-267, 2003.

MURAKAMI, M.; ISHIDA, K.; OKINO, T.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; YAMAGUCHI, K. Aeruginosins 98-A and B, Trypsin Inhibitors from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98) **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.36, n.16, p.2785-2788, 1995.

MURAKAMI, M.; SUN, Q.; ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; OKINO, T.; YAMAGUCHI, K. Microviridins, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum* (NIES-26). **Phytochemistry**, New York, v.45, p.1197-1202, 1997.

NAGLE, D.G.; PAUL, V.J.; ROBERTS, M.A. Ypaoamide, a New Broadly Acting Feeding Deterrent from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.37, n.35, p.6263-6266, 1996.

NAKASHIMA, K.; ARAKAWA, O.; TANIYAMA, S.; NONAKA, M.; TAKATANI, T.; YAMAMORI, K.; FUCHI, Y.; NOGUCHI, T. Occurrence of saxitoxins as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum*. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.43, p.207–212, 2004.

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

NEILAN, B.A.; DITTMANN, E.; ROUHIAINEN, L.; BASS, R.A.; SCHAUB, V.; SIVONEN, K.; BÖRNER, T. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, p.4089-4097, 1999.

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

NEILANDS, J.B. Iron absorption and transport in microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.1, p.27-46, 1981.

NELISSEN, B.; DEBAERE, R.; WILMOTTE, A.; DEWACHTER, R. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rRNA sequence analysis. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v.42, p.194–200, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger. **Principles of biochemistry**. 4. ed. San Francisco: W. H. Freeman, 2004. 221 p.

NICHOLS, F.C. Distribution of 3-hydroxy iC17:0 in subgingival plaque and gingival tissue samples: relationship to adult periodontitis. **Infection and Immunity**. v.62, p.3753-3760, 1994.

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

NOGUEIRA, N.M.C.; FERREIRA-CORREIA, M.M. Cyanophyceae; Cyanobacteria in red mangrove forest at Mosquitos and Coqueiros estuaries, São Luís, State of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.61, p.347-356, 2001.

NRPS-PKS: A knowledge based resource for analysis of Non-ribosomal Peptide Synthetases and Polyketide Synthases. Disponível em: www.nii.res.in/nrps-pks.html. Acesso em: 15 Jun. 2009.

O'BRIEN, H.E.; MIADLIKOWSKA, J.; LUTZONI, Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera* F. **European Journal of Phycology**, v.40, p.363–378, 2005.

ODUM, E.P. **Ecologia**. 3.ed México: Nueva Editorial Interamericana, 1972. 639p.

OGINO, J.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L.; SMITH, C.D. Dendroamides, New Cyclic Hexapeptides from a Blue-Green Alga. Multidrug-Resistance Reversing Activity of Dendroamide A. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.59, p.581-586, 1996.

OHKI, K.; KAMIYA, M.; HONDA, D.; KUMAZAWA, S.; HO, K.K. Morphological and phylogenetic studies on unicellular diazotrophic cyanobacteria (Cyanophytes) isolated from the coastal waters around Singapore. **Journal of Phycology**, Baltimore, v.44, p.142-151, 2008.

OKINO, T.; MURAKAMI, M.; HAQUCHI, R.; MUNELTATA, H.; MATSUDA, H.; YAMAGUCHI, H. Mieropectins A and B, Plasmin and Trypsin Inhibitors from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.34, n.31-J, p.8131-8134, 1993.

OLIVEIRA, A.C.P.; MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Influence of drinking water composition on quantitation and biological activity of dissolved microcystin (cyanotoxin). **Environmental Toxicology**, New York, v.20, p.126-130, 2005.

OLIVEIRA, M.F. de; RIBEIRO NETO, F.B. Estratégias de sobrevivência de comunidades litorâneas em áreas ecológicametne degradadas: caso da Baixada Santista. São Paulo. Programa de Pesquisa e Conservação de Áreas Úmidas do Brasil. 132p., 1989.

OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The Ecology of Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 149-194.

OSHIMA, Y. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.78, p.528–532, 1995.

OSHIMA, Y.; KOTAKI, Y.; HARADA, T.; YASUMOTO, T. Paralytic shellfish toxins in tropical waters. In: RAGELIS, E. (Ed) Seafood toxins. **American Chemical Society**, Washington, DC, p 160–170. 1984.

OSTENSVIK, O.; SKULBERG, O.M.; UNDERDAL, B.; HORMAZABAL, V. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria – a comparative study of bacterial bioassays. **Journal of Applied Microbiology**, Baltimore, v.84, p.1117–1124, 1998.

OVES-COSTALES, D.; KADI, N.; FOGG, M.J.; SONG, L.; WILSONB, K.S.; CHALLIS, G.L. Petrobactin biosynthesis: AsbB catalyzes condensation of spermidine with N8-citryl-spermidine and its N1-(3,4-dihydroxybenzoyl) derivative. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.129, p.8416–8417, 2008.

PALANISELVAM, V. **Epiphytic cyanobacteria of mangrove**: ecological, physiological & biochemical studies and their utility as biofertilizer and shrimp feed. 1998. 141 f. Tese (Doutorado), Annamalai University, India. 1998.

PALENIK, B.; SWIFT, H. Cyanobacterial evolution and prochlorophyte diversity as seen in DNA-dependent RNA polymerase gene sequences. **Journal of Phycology**, Baltimore v.32, p.638–646, 1996.

PAPENDORF, O.; KONIG, G.M.; WRIGHT, A.D. Hierridin B and 2,4-dimethoxy-6-heptadecyl-phenol, secondary metabolites from the cyanobacterium *Phormidium ectocarp*i with antiplasmodial activity. **Phytochemistry**, New York, v.49, n.8, p.2383-2386, 1998.

PEARSON, L.A.; NEILAN, B.A. The Molecular Genetics of Cyanobacterial Toxicity as a Basis for Monitoring Water Quality and Public Health Risk. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v.19, p.281–288, 2008.

PELANDER, A.; OJANPERA, I.; LAKS, S.; RASANEN, I.; VUORI, E. Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **American Chemical Society**, Washington, v.75, p.5710–5718, 2003.

PENNO, S.; LINDELL, D.; POST, A.F. Diversity of *Synechococcus* and *Prochlorococcus* populations determined from DNA sequences of the N-regulatory gene *ntcA*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.8, p.1200–1211, 2006.

PEREIRA, P.; LI, R.H.; CARMICHAEL, W.W.; DIAS, E.; FRANCA, S. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile*. LME-CYA40. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v.39, p.361–368, 2004.

PEREIRA, P.; ONODERA, H.; ANDRINOLO, D.; FRANCA, S.; ARAUJO, F.; LAGOS, N.; OSHIMA, Y. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.38, p.1689–1702, 2000.

PERSMARK, M.,P.; PITTMAN, J.S.; BUYER, B.; SCHWYN, P.R. GILL, J.R.; NEILANDS, J.B. Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore form the alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.115, p.3950–3956, 1993.

PIPARD, M.J. Detection of iron overload. **The Lancet**, v.349, p.73, 1997.

PLOUTNO, A.; CARMELI, S. Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.58, p.9949–9957, 2002.

PONTE, A.C.E.; FONSECA, I.A.Z.; CLARO, S.M.C.A. Impacto causado por petróleo no manguezal do Canal de Bertioga – Estrutura da Vegetação. In: Simpósio Sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: Síntese de Conhecimento, Cananeia, 1987. **Anais**. São Paulo: ACIESP, 1987. v.2, p.138-147.

POMATI, F.; SACCHI, S.; ROSSETTI, C.; GIOVANNARDI, S.; ONODERA, H.; OSHIMA, Y.; NEILAN, B.A. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. **Journal of Phycology**, Baltimore, v.36, p.553–562, 2000.

PRINSEP, M.R.; PATTERSON, G.M.L.; LARSEN, L.K.; SMITH, C.D. J. Tolyporphins J and K, Two Further Porphinoid Metabolites from the Cyanobacterium *Tolypothrix nodosa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.61, p.1133-1136, 1998.

RAI, A.N. Cyanobacterial fungal symbiosis: The cyanolichens. In: **CRC Handbook of symbiotic cyanobacteria**. (Ed.) CRC Press: Boca Raton.1990. p.9–41.

RAI, A.N.; SODERBACK, E.S.; BERGMAN, B. Cyanobacterium±plant symbioses. **The New Phytologist**, London, v.147, p.449±481, 2000.

RAJANIEMI-WACKLIN, P. **Biodiversity and phylogeny of planktic cyanobacteria in temperate freshwater lakes**. 2006. 69 p. Dissertação (mestrado em Microbiology) - Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, 2006.

RAJANIEMI-WACKLIN, P.; HROUZEK, P.; KAŠTOVSKÁ, K.; WILLAME, R.; RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.55, p.11–26, 2005.

RAMAMURTHY, T.; RAJU, R.M.; NATARAJAN, R. Distribution and ecology of methanogenic bacteria in mangrove sediments of Pitchavaram, east coast of India. **Indian Journal of Marine Sciences**, v.19, n.4, p.269-273, 1990.

RAMASWAMY, A.V.; SORRELS, C.M.; GERWICK, W.H. Cloning and Biochemical Characterization of the Hectochlorin Biosynthetic Gene Cluster from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.70, p.1977–1986, 2007.

RAO, P.V.; GUPTA, N.; BHASKAR, A.S.; JAYARAJ, R. Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. **Journal of Environmental Biology**, Muzaffarnagar, v.23, p.215–224, 2002.

RASTOGI, R.P.; SINHA, R.P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.27, p.521–539, 2009.

RAVEN, J.A. The evolution of cyanobacterial symbioses. **Proceedings of the Royal Irish Academy**, Dublin, v.102B, p.3–6, 2002.

RAVEH, A.; CARMELI, S. Antimicrobial Ambiguines from the Cyanobacterium *Fischerella* sp. Collected in Israel. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.70, n.2, p.196-201, 2007.

RESHEF, V.; CARMELI, S. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.57, p.2885-2894, 2001.

RICKARDS, R.W.; ROTHSCCHILD, J.M.; WILLIS, A.C. Calothrixins A and B, Novel Pentacyclic Metabolites from Calothrix Cyanobacteria with Potent Activity against Malaria Parasites and Human Cancer Cells. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.55, p.13513-13520, 1999.

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

RIZZINI, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e florísticos**. São Paulo, HUCITEC-EDUSP. 2v. 1979.

ROCAP, G.; DISTEL, D.L.; WATERBURY, J.B.; CHISHOLM, S.W. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S -23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.1180–1191, 2002.

ROEDER, E.; BREITMAIER, E.; BIRECKA, H.; FROHLICH, M.W.; BADZIES-CROMBACH, A. Pyrrolidizidine alkaloids of heliotropium spathylatum. **Phytochemistry**, New York v.30, n.5, p.1703-1706, 1991.

RONNBACK, P. The ecological basis for economic value of seafood production supported by mangrove ecosystems. **Ecological economics : the journal of the International Society for Ecological Economics**, Amsterdam, v.29, p.235-252, 1999.

ROSSI, M.; MATTOS, I.F. O ecossistema mangue – Uma análise dos solos e da vegetação no Estado de São Paulo. In: Congresso Nacional Sobre Essências Nativas: **Conservação da biodiversidade**, São Paulo, 1992. Anais. São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p.930-936.

_____. Solos De Mangue Do Estado De São Paulo: Caracterização Química E Física. **Revista do Departamento de Geografia**, v.15, p.101–113, 2002.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.70, p.686-92, 2004.

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

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

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

SANO, T.; KAYA, K. Oscillapeptin G, a Tyrosinase Inhibitor from Toxic *Oscillatoria agardhii*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.59, p.90-92, 1996.

SANO, T.; TAKAGI, H.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.; CODD, J.A.; KAYA, K. Leucine aminopeptidase M inhibitors, cyanostatin A and B, isolated from cyanobacterial water blooms in Scotland. **Phytochemistry**, New York, v.66, p.543–548, 2005.

SANT'ANNA, C.; CARVALHO, L.R.; FIORE, M.F.; SILVA-STENICO, M.E.; LORENZI, A.S.; RIOS, F.R.; KONNO, K.; GARCIA, C.; LAGOS, N. Highly Toxic *Microcystis aeruginosa* Strain, Isolated from São Paulo—Brazil, Produce Hepatotoxins and Paralytic Shellfish Poison Neurotoxins. **Neurotoxicity Research**, Mountain House (in press).

SANTOS, L.C.M.; CUNHA-LIGNON, M.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Impacto de petróleo no manguezal do Rio Iriri (baixada santista, São Paulo): diagnóstico da cobertura vegetal com base em fotografias aéreas digitais (1962 - 2003). In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade Brasileira de Ecologia, 2007. p.1-3.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Diretoria de Assuntos Metropolitanos. **Projeto DEPRN**: estudo preliminar. Disponível em: www.unisantos.com.br/~metropms/caruara/matatlan.htm. Acesso em: 26 Nov. 2000.

SATO, S.; KODOMA, M.; OGATA, T.; SAITANU, K.; FURUYA, M.; HIRAYAMA, K.; KAKINUMA, K. Saxitoxin as a toxic principle of a freshwater puffer *Tetraodon fugi* in Thailand. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.35, p.137–140, 1997.

SCANLAN, D. J. Physiological diversity and niche adaptation in marine *Synechococcus*. **Advances In Microbial Physiology**, London, v.47, p.1–64, 2003.

SCANLAN, D. J.; WEST, N.J. Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.40, p.1–12, 2002.

SCANLAN, D.J.; OSTROWSKI, M.; MAZARD, S.; DUFRESNE, A.; GARCZAREK, L.; HESS, W.R.; POST, A.F.; HAGEMANN, M.; PAULSEN, I.; PARTENSKY, F. Ecological Genomics of Marine Picocyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.73, n.2, p. 249-299, 2009.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal**: conhecer para conservar. Ecologia do Ecosistema Manguezal. São Paulo: Instituto Oceanográfico, 1994. 45p.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; LIMA-MESQUITA, H.; CINTRON-MOLERO, G. The Cananea lagoon estuarine system, SP, Brazil. **Estuaries**, Columbia, v.13, n.2, p.193-203, 1990.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M.L.G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v.3, n.4, p.561-570, 2000.

SCHAIBLE, U.E.; KAUFMANN, S.H.E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.946–953, 2004.

SCHERRER, P; MILLE, G. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.20, n.9, p.430-432, 1989.

SCHMIDT, E.W.; NELSON, J.T.; RASKO, D.A.; SUDEK, S.; EISEN, J.A.; HAYGOOD, M.G.; RAVEL, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.102, p.7315-7320, 2005.

SCHOPF, J. W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Nova Hedwigia**, Weinheim, v.112, p.13±32, 1996.

SCHOPF, W. Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, p.6735-6742, 1994.

SCHWARZER, D.; FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Nonribosomal peptides: from genes to products. **Natural Product Reports**, London, v.20, p.275–287, 2003.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47-56, 1987.

SEO, P.-S.; YOKOTA, A. The phylogenetic relationships of cyanobacteria inferred from 16S rRNA, *gyrB*, *rpoC1* and *rpoD1* gene sequences. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.49, p.191–203, 2003.

SHERIDAN, R.P. Epicaulous, nitrogen-fixing microepiphytes in a tropical mangal community, Guadeloupe, French West Indies. **Biotropica** v.23, p.530-541, 1991.

SHERIDAN, P.F. Comparative habitat utilization by estuarine macrofauna within the mangrove ecosystem of Rookery Bay, Florida. **Bulletin of Marine Science**, Miami, v.50, n.1, p.21-39, 1992.

SHERMAN, R.E.; FAHEY, T.J.; HOWARTH, R.W. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: Iron, phosphorus and sulfur dynamics. **Oecologia**, Berlin, v.115, n.4, p.553-563, 1998.

SHIADAH, M.M.A. Heavy metals in mangrove sediments of the United Arab Emirates shoreline (Arabian Gulf). **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.116, p.523-534, 1998.

SHIMIZU, Y. Microalgal metabolites. **Chemical Reviews**, Washington, v.93, p.1685–1698, 1993.

SILAKOWSKI, B.; SCHAIRER, H.U.; EHRET, H.; KUNZE, B.; WEINIG, S.; NORDSIEK, G.; BRANDT, P.; BLÖCKER, H.; HÖFLE, G.; BEYER, S.; MÜLLER, R. New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.274, p.37391-37399, 1999.

SILVA-STENICO, M.E.; NETO, R.C.; ALVES, I.R.; MORAES, L.A.B.; SHISHIDO, T.K.; FIORE, M.F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.20, n.3, p.535-542, 2009.

SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Non-Ribosomal Peptides Produced by Brazilian Cyanobacterial Isolates with Antimicrobial Activity. **Microbiological Research**. 2010. (in press)

SIMPSON, T.J. Polyketide biosynthesis. **Chemistry & Industry**, London, v.5, p.407-415, 1995.

SIVONEN, K.; BÖRNER, T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: HERRARO, A., AND FLORES, E. (Ed.) **The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution**. Norfolk: Caister Academic Press. 2008.p. 159–197.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water. **A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p.41-111.

SIVONEN, K.; KONONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; DAHLEM, A.M.; RINEHART, K.L.; KIVIRANTA, J.; NIEMELÄ, S.I. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.55, p.1990–1995, 1989.

SIX, C.; THOMAS, J.C.; GARCZAREK, L.; OSTROWSKI, M.; DUFRESNE, A.; BLOT, N.; SCANLAN, D.J.; PARTENSKY, F. Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: a comparative genomics study. **Genome Biology**, London v.8, p.R259, 2007.

SKULBERG, O.M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. (Ed.) **Hydrogen energy system: production and utilization of hydrogen and future aspects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 95-110.

SLENO, L.; VOLMER, D.A.; MARSHALL, A.G. Assigning Product Ions from Complex MS/MS Spectra: The Importance of Mass Uncertainty and Resolving Power. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v.16, p.183-198, 2005.

SLENO, L.; WINDUST, A.J.; VOLMER, D.A. Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry—Part II. Characterization of unknown spirolides and related compounds in cultured phytoplankton extract. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.378, p.977–986, 2004.

SLOAN, N.A. **Oil Impacts on cold-water marine resources**: a review relevant to Parks Canada's evolving marine mandate. Disponível em : [//parksanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasional_paper11_e.PDF](http://parksanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasional_paper11_e.PDF). Acesso em: 16 Abr. 1999.

SMITH, A.B.; ADAMS, C.M.; KOZMIN, S.A.; PAONE, D.V. Total Synthesis of (-)-Cylindrocyclophanes A and F Exploiting the Reversible Nature of the Olefin Cross Metathesis Reaction. **Journal of The American Chemical Society**, Washington, v.123, p.5925–5937, 2001.

SMITH, V.H. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. **Science**, Washington, v.221, p.669–671. 1983.

STAL, L.J. Physiological ecology of Cyanobacteria in microbial mats and other communities. **New Phytologist**, Malden, v. 131, n. 1, p. 1–32, 1995.

STAL, L.J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p.179–211, 1997.

STALEY, J.T. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 361, n. 1475, p. 1899–1909, 2006.

STANIER, R.Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p.225–274, 1977.

STANIER, R.Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 35, p. 171–205, 1971.

STANIER, R.Y.; SISTROM, W.R.; HANSEN, T.A.; WHITTON, B.A.; CASTENHOLZ, R.W.; PFENNING, N.; GORLENKO, V.N.; KONDRATIEVA, E.N.; EIMHJELLEN, K.E.; WHITTENBURY, R.; GHERNA, R.L.; TRUPER, H.G. Proposal to place nomenclature of Cyanobacteria (Blue-green-algae) under rules of International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.28, p.335–336, 1978.

STACKEBRANDT, P.H.A.; GOEBEL, B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, p.846–849, 1994.

STENROOS, S.; HÖNABRA, F.; MYLLYS, L.; HYVÖNEN, J.; THELL, A. High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. **Cladistics**, Oxford, v.22, p.230-238, 2006.

STEWART, R. Oxidation by permanganate. In: WIBERG, K. (Ed.) **Oxidation in organic chemistry**. New York: Academic Press, 1973.

STRATMANN, K.; MOORE, R.E.; BONJOUKLIAN, R.; DEETER, J.B.; PATTERSON, G.M.L.; SHAFFER, S.; SMITH, C.D.; SMITKAT, T.A. Welwitindolinones, Unusual Alkaloids from the Blue-Green Algae *Hapalosiphon welwitschii* and *Westiella intricata*. Relationship to Fischerindoles and Hapalindoles. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.116, p.9935-9942, 1994.

SU, Z.; SHEETS, M.; ISHIDA, H.; LI, F.; BARRY, W.H. Saxitoxin blocks L-type ICa. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v.308, p.324–329, 2004.

SUCHANEK, T.H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. **American Zoologist**, Utica, v.33, p.510-523, 1993.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAN, L.T. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. **Phytochemistry**, New York, v.68, p.954–979, 2007.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A.; PICARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains **Journal of Phycology**, Baltimore, v.42, n.6, p.1257-1270, 2006.

TAYLOR & FRANCIS GROUP (2009). **Dictionary of Natural Products**. Disponível em: [//dnp.chemnetbase.com/](http://dnp.chemnetbase.com/). Acesso em: 28 Set. 2009.

TERUYA, T.; KOBAYASHI, K.; SUENAGA, K.; KIGOSHI, H. Phormidinines A and B, novel 2-alkylpyridine alkaloids from the cyanobacterium *Phormidium* sp. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.46, p.4001–4003, 2005.

THIEL, T.; WOLK, C. P. Metabolic activities of isolated akinetes of the cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 156, p. 369–74, 1983.

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

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

TOLEDO, G., BASHAN, Y. AND SOELDNER, A. In vitro colonization and increase in nitrogen-fixation of seedling roots of black mangrove inoculated by a filamentous cyanobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.1, n.11, p.1012-1020, 1995.

TOOMING-KLUNDERUD, A.; MIKALSEN, B.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S.; The mosaic structure of the *mcvABC* operon in *Microcystis*. **Microbiology**, Washington, v.154, p.1886–1899, 2008.

TRICK, C.G.; KERRY, A. Isolation and purification of siderophores produced by cyanobacteria, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Current Microbiology**, v.24, p.241–245, 1992.

TSUKAMOTO, S.; PAINULY, P.; YOUNG, K.A.; YANG, X.M.; SHIMIZU, Y.; CORNELL, L. Microcystilide-A – a novel cell-differentiation-promoting depsipeptide from *Microcystis aeruginosa*. **Journal of American Chemical Society**, Washington, v.115, p.11046-11047, 1993.

TURNER, J.Y.; DOUCETTE, G.J.; POWELL, C.L.; KULIS, D.M.; KEAFER, B.A.; ANDERSON, D.M. Accumulation of red tide toxins in larger size fractions of zooplankton assemblages from Massachusetts Bay, USA. **Marine Ecology Progress Series**, Halstenbek, v.203, p.95-107, 2000.

TURNER, S. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. **Plant Systematic and Evolution**, v.11, p.13-52, 1997.

TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.W.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v.46, p.327–338, 1999.

VAN APELDOORN, M.E.; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.A.; BAKKER, G.J.I. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v.51, p.7–60, 2007.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v.60, p.407-438, 1996.

VELOSO, H.P; GOES-FILHO, L. **Fitogeografia brasileira**: classificação fisionomica-ecológica. Ecologia da vegetação neotropical. Salvador: RADAMBRASIL, 1982. 80p. (Boletim Técnico).

VON DÖHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J.; ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Reviews**, Washington, v.97, p.2675-2705, 1997.

WALSH, C.T.; GEHRING, A.M.; WEINREB, P.H.; QUADRI, L.E.; FLUGEL, R.S. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v.1, p.309-315, 1997.

WALSH, G.E. Mangroves; a review. In: REINOLD, R.J.; QUEEN, W.H. (Ed.) **Ecology of Halophytes**. New York: Academic Press, 1974. p.51-154.

WANG, P.J; CHIEN, M.S.; WU, F.J.; CHOU, H.N.; LEE, S.J. Inhibition of embryonic development by microcystin-LR in zebrafish, *Danio rerio*. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.45, p.303–308, 2005.

WATANABE, J.; MINAMI, M.; KOBAYASHI, M.; Antitumor activity of TZZ-1027 (soblidotin). **Anticancer Research**, Athens, v.26, p.1973–1981, 2006.

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRUPER, H.G. Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 463-464, 1987.

WELKER, M.; ERHARD, M. Consistency between chemotyping of single filaments of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) by MALDI-TOF and the peptide patterns of strains determined by HPLC-MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v.42, p.1062–1068, 2007.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature’s own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, 2006. Disponível em : www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x. Acesso em: 08 Mai. 2006.

WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; VON DÖHREN, H. Diversity of coexisting *Planktothrix* (Cyanobacteria) chemotypes deduced by mass spectral analysis of microcystins and other oligopeptides. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.182, p.288–298, 2004.

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

- WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 669 p.
- WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.203, p.201–218, 2005.
- WILHELM, S.W.; TRICK, C.G. Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response. **Limnology and Oceanography**, Waco, v.39, p.1979–1984, 1994.
- WILLIAMS, P.G.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J. Isolation and Structure Determination of Lyngbyastatin 3, a Lyngbyastatin 1 Homologue from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Determination of the Configuration of the 4-Amino-2,2-dimethyl-3-oxopentanoic Acid Unit in Majusculamide C, Dolastatin 12, Lyngbyastatin 1, and Lyngbyastatin 3 from Cyanobacteria. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.66, p.1356–1363, 2003.
- WILLIAMS, P.G.; YOSHIDA, W.Y.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J. Micromide and Guamamide: Cytotoxic Alkaloids from a Species of the Marine Cyanobacterium *Symploca*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.67, n.1, p.49–53, 2004.
- WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 1–25.
- WILMOTTE, A.; GOLUBIĆ, S. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.64, p.1–24, 1991.
- WILSON, K.M.; SCHEMBRI, M.A.; BAKER, P.D.; SAINT, C.P. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.66, p.332–338, 2000.
- WIPF, P.; REEVES, J.T.; BALACHANDRAN, R.; DAY, B.W.; Synthesis and biological evaluation of structurally highly modified analogues of the antimitotic natural product curacin A. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v.45, p.1901–1917, 2002.
- WOESE, C.R. A new biology for a new century. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, p. 173–186, 2004.
- _____. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, v.51, p.221–271, 1987.
- WOESE, C.R.; SOGIN, M.L.; BONEN, L.; STAHL, D. Sequence studies on 16S ribosomal RNA from blue-green alga. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.4, p.307–315, 1975.

WOODWELL, G.M.; WHITNEY, D.E.; HALL, C.A.S.; HOUGHTON, R.A. The flax pond ecosystem study: Exchange of carbon in water between a salt marsh and Long island Sound. **Limnology and Oceanography**, Waco, v.22, n.5, p.833-838, 1977.

XU, G.; MARTINEZ, J.S.; GROVES, J.T.; BUTLER, A. Membrane affinity of the amphiphilic marinobactin siderophores. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.124, p.13408–13415, 2002.

YOTSU-YAMASHITA, M.; KIM, Y.H.; DUDLEY, S.C.JR.; CHOUDHARY, G.; PFAHNL, A.; OSHIMA, Y.; DALY, J.W. The structure of zetekitoxin AB, a saxitoxin analog from the Panamanian golden frog *Atelopus zeteki*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, p.4346–4351, 2004.

ZAINUDDIN, E.N.; MENTEL, R.; WRAY, V.; JANSEN, R.; NIMTZ, M.; LALK, M.; MUNDT, S. Cyclic Depsipeptides, Ichthyopeptins A and B, from *Microcystis ichthyoblabe*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.70, n.7, p.1084-1088, 2007.

ZAMAN, L.; ARAKAWA, O.; SHIMOSU, A.; ONOUE, Y. Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, New York, v.35, p.423–431, 1997.

ZIMMERMAN, W.J.; SOLIMAN, C.M.; ROSEN, B.H. Growth and 2-methylisoborneol production by the cyanobacterium *Phormidium* LM689. **Water Science and Technology**, Oxford, v.31, n.11, p.181-186, 1995.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; HIORNS, W.D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. **Microbiology**, Washington, v.143, p.1443–1450, 1997.

ANEXOS

ANEXO A

Sequências de RNAr 16S das linhagens isoladas de manguezais do Estado de São Paulo.

>Synechococcus CENA136 (1300 bp)

```
CCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCGCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGC
TGGCGGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATCCTTCGGGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTG
CCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGTCATCGCCTCGG
GATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAA
AGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGAC
GGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACCTCATATCGGCAGTGG
AAACTGTAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAAC
ACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATCACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAC
CCCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCCCTCGGTGTCTGAGCCAACGCGTTA
GGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTAT
GTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCAACCCCTGAGAGATCGGGGGGTGCC
TTCGGGAACGCGGAGACAGCTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCGCAACGA
GCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTG
TGGATGGCGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAAG
CTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGC
```

>Synechococcus CENA138 (1398 pb)

```
GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GGGAATCTGCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAATTT
CGCCTGAGGATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAA
GATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTA
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTAAGTCCGTTGTTAAAGCGTGGAGCTCAACTCCATTTT
AGCAATGGAAACTATGAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCG
GGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGA
TTAGATACCCCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCCCTCGGTGTCTGAGCCA
ACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGAAACGAG
GGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAG
GAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGG
CAGCGAGCTCGCGAGAGTCAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAA
GGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACAC
CATGGAAGTTGGCCATGCCCAGTCTGTTACTCCAACCCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATG
```

>Aphanothece CENA139 (1409 pb)

```
GATGAACGCTGGCG
GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTCAGGAGGGGGATAACGGCTGGAA
ACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAATTTTCGCTGAG
GATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGG
CGACGATCAGTACTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATG
GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGC
TGTAACCTCTTTTCTCGAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAA
GCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGC
```

GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTAAGTC
 CGTTGTTAAAGCGTGGAGCTCAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTATGAG
 GCTTGAGTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGATATCGGGAAGAACACCACTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAA
 CTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCT
 GTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCC
 CTCGGTGTCTGAGCCAAACGCGTTAAGTGTTCGCCCTGGGGAGTACGCACG
 CAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGT
 ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGGAGAACCTTACCAGGGTTTGACATC
 CTGCGAATCCCTTGGAACGAGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGG
 TGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTC
 TAGAGAGACCGCCGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGT
 CATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTGCACACGTACTACAATGCTACGGAC
 AAAGGGCAGCGAGCTCGCGAGAGTCAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCA
 GTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTA
 ATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACAC
 CGCCCGTTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
 CTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA140 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCCCTTCGGGACAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGAATCTGCCCTTAGGAGGGGGATAACGTTTGGAACGACCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAAAT
 CGCCTGAGGATGAGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCT
 GAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAA
 GATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCTGTCAGCAGCCGCGGTAAATACGGGAGTGGCAAGCGTTA
 TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTT
 AGCAATGGAACTACAAGGCTGGAGTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCG
 GGAAGAACACCACTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGA
 TTAGATACCCCTGTAGTCTCGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCTGAGCCA
 ACCGCTTAAGTGTTCGCCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGG
 TGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAACCCTTGAGAAATCGG
 GGGGTGCCTTCGGGAACGCAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGTGATAAACCGGAG
 GAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTACATCCTGGACTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAAGG
 CAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTTACAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAA
 GGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTTCACAC
 CATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTGCGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGG
 GTGAA

>Chlorogloea CENA141 (1432)

GAATTCAGTAGTATTTGGCTCAGGATGAGCGCTGGCGGCGTGCTTAACA
 CATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
 GTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAAT
 ACCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGGGATGAGCTCGCG
 TCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTA
 GCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
 CTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTG
 ACGGAGCAACGCCGCTGAGGGATGAAGGCCCTCTGGGCTGTAAACCTCTT
 TTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAAT
 TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAAT
 TATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAAAGTCTGTTGTTAAAGC
 GTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTACAAGGCTAGAGTGTGG
 TAGGGGAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGG
 AAGAACACCACTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATG
 GACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCTGGCC

GTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGACCCCCCTCGGTGTCGTA
 GCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAT
 TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAACCCCT
 TGGAAACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGGCGCATGGCT
 GTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCGCAACGAGCGCA
 ACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGC
 CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCT
 TACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCAA
 ACTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTA
 GGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAG
 CATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC
 CATGGAAGTTGGCCACGCCGAAGTCGTTACTCCAACCCCTTGTGGAGGAG
 GACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA142 (1261 pb)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTGAACGAAGTCTTCGGACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
 GTGAGAACCTACCTCTAGGTTGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCCAATGTGCCGCAAGGTGAAAGATTT
 ATCGCCTGGAGAAGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGGCCACCAAGGCAGCGATCAGTAGCTGGT
 CTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
 AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAG
 AAGATCTGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGT
 TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTTTTCAAGTCTGCTGTTAAAGACTGGAGCTCAACTCCGGA
 AAGGCAGTGGAACTGGAAGACTAGAGTTCCGTAGGGGTAGCGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
 TGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGCGCTACTGGACCGAGACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGG
 GATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGAACTAGGTGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGC
 TAACGCGTTAAGTTTCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGC
 GGTGGAGTATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGTGCGCAACTTCTGTGAAAGC
 GGAAGGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCGACACACGTACTACAATGGTTGGGACAAAG
 GGCAGCGACCCCGGAGGGAGAGCGAATCTCATCAAACCCAGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGAAT
 CACTAGTGAATTC

>Synechococcus CENA143 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGCGTGTCTTAACACATGCAAGTGAACGATCCTTCGGGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGAATCTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGGAACGCGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAGTCA
 TCGCCTCAGGATGAGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGCATCAGTAGCTGGTC
 TGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCA
 ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGA
 AGACATGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTT
 ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTAAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAATCCATAT
 CGGCAGTGGAACTGTAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC
 GGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATCACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGG
 ATTAGATACCCCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACCCCCCTCGGTGTGCTAGCC
 AACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCG
 GTGGAGTATGTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCGAACCCCTGAGAAATCG
 GGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCACGTCCTTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCCCGGTGATAAACCGGA
 GGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGG
 GCAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGA
 AGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
 CCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGG
 GGTGAA

>Synechococcus CENA148 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTA
 TCGCCTTGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTC
 TGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCA
 ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGA
 AGAACTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGCCAAGCGTT
 ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGGCGGCCCTTGAAAGTCTGTTGTTAAAGCGTGAGGCTTAACTCCATTT
 CAGCAATGGAAACTAGAAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCGAGGGGAATTCGCCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC
 GGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAAGG
 ATTAGATACCCCTGTAGTCTTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCTAGACC
 AACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
 GTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGAATCCCTTGAAACTT
 GGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
 CGAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGA
 GGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAAG
 GCAGCAAACTCGCGAGAGCTAGCAAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGA
 AGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTCACA
 CCATGGAAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCCTTGTTGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGG
 GGTGAA

>Chlorogloea CENA149 (1409)

GATGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGG
 AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTT
 GGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAA
 GGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCCTCTGG
 GCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGACCTGACGGTACTTGAGGAAT
 AAGCCACGGCTAATTCGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAA
 GCGTTATCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGACGGCGGCCCTTGAAAG
 TCTGTTGTTAAAGCGTGAGGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAGTACA
 AGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCGAGGGGAATTCGCCGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCAT
 AACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCC
 CTGTAGTCTTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACC
 CCCTCGGTGTCTGAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGCA
 CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
 GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACA
 TCCTGCGAACCCTTGGAACGAGGGGGTGCCCTTCGGGAACGCAGAGACA
 GGTGGTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCAC
 TCTAGAGAGACCGCCGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
 GTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG
 ACAAGGGCAGCAAACTCGCGAGAGCTAGCAAAATCCCATAAACCGTGGCT
 CAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAG
 TAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAAC
 ACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCAGGTCGTTACTCCA
 CCCTTGTTGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA150 (1414 pb)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGGTAGCAATACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
 GTGAGAATCTACCTCTAGAACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCCGAAAGGTAAAAGATTT
 ATCGTCTAGAGATGAGCCCGCTCAGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGT
 CTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
 AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAG

AAGTACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGT
TATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGATTGGTAAGTCTGCTGTCAAAGGACGGAGCTCAACTCCGTA
AAGGCGGTGGAACTGCCAGACTAGAGGCTGGTAGGGGTAGAGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
TGGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGACCAGAACTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGG
GATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGACACTAGGCGTAGCTTGTATCGACCCGAGCTGTGCCGAAGC
AAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGCAATCTCCTTGAAAGG
GGAGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGGGACAAAG
GGCAGCCAACTCGCAAGAGAGAGCGAATCTCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGATTGCCGGCTGCAACTCGCCGGCAT
GAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGAATACTGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCA
CACCATGGGAGCTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTTTTGGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTGA
CTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA152 (1414 pb)

GATGAACGCTGGCGGTCTGCCTAA

CACATGCAAGTCGAACGGGGTAGCAATACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGA
ATCTACCTCTAGAACGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCCGAAG
GGTAAAAGATTTATCGTCTAGAGATGAGCTCGCGTCAGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAG
AGCGCACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAG
CCTGACGGAGCAAGACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCT
GGGTAGAAGTACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTG
GATTGGTAAGTCTGCTGTCAAAGGACGGAGCTCAACTCCGTAAAGGCGGTGGAACTGCC
AGACTAGAGGCTGGTAGGGGTAGAGGGAATTTCCAGTGTACCGGTGAAATGCGTAGAGAT
TGGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGACCAGAACTGACACTCAGGGACGAA
AGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACT
AGGCGTAGCTTGTATCGACCCGAGCTGTGCCGAAGCAAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGG
GGAGTACGCACGAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTGCGCAAT
CTCCTTGAAAGAGGAGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTC
AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTT
GCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGG
ATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGGG
ACAAAGGGCAGCCAACTCGCAAGAGAGAGCGAATCTCAGCAAACCCGGCCTCAGTTCAGA
TTGCCGGCTGCAACTCGCCGGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGAATAC
TGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTACACCATGGGAGCTGGCCA
CGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTTTTTGGGAGGAGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTGA
CTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA153 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCG

GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAA
ACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGG
GATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGG
CATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATG
GGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGC
TGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAA
GCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAAGTC
TGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTACAAG
GCTAGAGTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTTCCGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAA

CTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCT
 GTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGACCCC
 CTCGGTGTCTGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGCACG
 CAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGT
 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATC
 CTGCGAACCCCTTGGAACGAGGGGGTGCCCTTCGGGAACGCAGAGACAGG
 TGGTGCGATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTC
 TAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGT
 CATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGAC
 AAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCA
 GTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGGAGGAGGAATCGCTAGTA
 ATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACAC
 CGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
 CTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGCGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA162 (1409 pb)

GATGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGG
 AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTT
 GGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAA
 GGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCGCAA
 TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGG
 GCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAAT
 AAGCCACGGCTAATTCGCTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGGAGTGGCAA
 GCGTTATCCGGAATTATTTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCCTTGAAA
 TCTGTTGTTAAAGCGTGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTACA
 AGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGAGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCAT
 AACTGACGCTCATGCGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCC
 CTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGACC
 CCCTCGGTGTCTGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGCA
 CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGA
 GTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACA
 TCCTGCGAACCCCTTGGAACGAGGGGGTGCCCTTCGGGAACGCAGAGACA
 GGTGGTGCGATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCAC
 TCTAGGGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
 GTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG
 ACAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCT
 CAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAG
 TAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACAC
 ACCGCCCCTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAA
 CCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA163 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGC
 TAAACACATGCAAGTCGAGCGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACGGGTGAG
 TAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCC
 GCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGGGATGAG
 CTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCATCGA
 TCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCGCAATGGGCGCA
 AGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGCTGTAAA
 CCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGCACTTGAGGAATAAGCCACG

GCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATC
 CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAAGTCTGTTGT
 TAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTACAAGGCTAGA
 GTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
 ATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACG
 CTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTC
 CTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCCTCGGT
 GTCGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTG
 TGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGG
 TTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATCCTGCGA
 ACCCTTGGAAACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGGTGGTGC
 ATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
 AGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAGAGA
 GACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCATCAT
 GCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGG
 CAGCAAACTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAG
 ATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCA
 GGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCGCCCG
 TCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTGACTCCAACCCCTGTG
 GAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA164 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACG
 GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAA
 ACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGG
 GATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGG
 CATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATG
 GCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGC
 TGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAA
 GCCACGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGC
 GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAAGTC
 TGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTACAAG
 GCTAGAGTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAA
 CTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCT
 GTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACCCC
 CTCGGTGTCTGATGCAACGCGTAAAGTGTTCGCCTGGGGAGTACGCACG
 CAAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGT
 ATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACATC
 CTGCGAACCCCTTGGAACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGG
 TGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
 GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTC
 TAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGT
 CATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGAC
 AAAGGGCAGCAAACTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCA
 GTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTA
 ATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACAC
 CGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
 CTTGTGGAGGAGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA165 (1409 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACG
 GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAA
 ACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTTGG

GATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGG
CATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATG
GGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGGC
TGTA AACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAA
GCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCCTTGAAAGTC
TGTTGTTAAAGCGTGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAACTACAAG
GCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATCGGGAAGAACACCACTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAA
CTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCT
GTAGTCTTGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACCCC
CTCGGTGTCTGAGCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCACG
CAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGT
ATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACATC
CTGCGAACCCCTTGGAACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACAGG
TGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTC
TAGAGAGACCGCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGT
CATCATGCCCCCTTACATCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGAC
AAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCA
GTTAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTA
ATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACAC
CGCCCGTCAACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACC
CTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA166 (1409 pb)

GATGAACGCTGG
CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGG
AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTT
GGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAA
GGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGG
GCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAAT
AAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCCTTGAAAG
TCTGTTGTTAAAGCGTGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAACTACA
AGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATCGGGAAGAACACCACTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCAT
AACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCC
CTGTAGTCTTGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACC
CCCTCGGTGTCTGAGCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCA
CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGACA
TCCTGCGAACCCCTTGGAACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACA
GGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCAC
TCTAGAGAGACCGCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCCCTTACATCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG
ACAAAAGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCT
CAGTTAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAG
TAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAAC
ACCGCCCGTCAACCATGGAAGTTGGCCACTCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
CCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Cyanothecae CENA169 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GTATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTGTAGCAATACATAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTGCCTTCAGGATGGGGATAACAGTGGG
 AAACACTGCTAAAACCCAATGTGCCGAGAGGTGAAATATTAATAGCCTG
 AAGATGAGCTTGCCTCTGATTAGCTAGTTGGTAGTGTAAGGGACTACCAA
 GGCAACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTTGG
 GTTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAAAAATGACGGTACTTGAGGAA
 TAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCA
 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGTCCGTAGGCGGTTGTTCAA
 GTCTGCTGTCAAAGAATGGAGCTTAACTCCATAGAGGCGGTGGAACTGA
 AGAAGTAGAGTCTAGGAGGGGTAGAGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGAGATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGACTA
 GAACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACC
 CCTGTAGTCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTAGCTTGTATCGAC
 CCGAGCTGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGC
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGACAAAGCGGTGG
 AGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAACTTGAC
 ATCCGGCGAATCCTGCTGAAAAGTGGGAGTGCCTTAGGGAGCGCCGTGAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGAA
 CTCTAGGGAGACTGCCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AGTCAGCATGCCCCCTTACGTTTTGGGCTACACACGTACTACAATGGTCGG
 GACAAAGAGCAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCGAATCTCAGCAAACCCGGC
 CTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCT
 AGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGATC
 ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCC
 AACCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGCAGGGCTAGTGACTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA170 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA
 CACATGCAAGTCGAACGATCCTTTCGGGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAAT
 CTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGG
 TGAAAGGAGTCATCGCCTCGGGATGAGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGA
 GCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGC
 CTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGGGAAGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAA
 GGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGG
 CCTGAAAATTCTGGTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATATCGGCAGTGGAACTGTAA
 GGCTTGAGTGTGGTAGGGGACAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC
 GGGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATCACTGACGCTCATGGACGAAA
 GCCAGGGGAGCGAAGGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTGCCGTAAACGATGAACACTA
 GGTGTGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTGCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGG
 GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAG
 TATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCGAACC
 CCTGAGAGATCGGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCA
 GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTG
 CCAGCATTCAGTTGGGCACCTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGA
 TGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGA
 CAAAGGGCAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATC
 GTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTG
 CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATG
 CCCGAAGTCGTTACTCCAACCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGG
 GGTGAA

>Chlorogloea CENA172 (1410 pb)

GATGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATCCCTTCGGGATAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGG
 AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGTCATCGCCT
 CGGGATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCA
 AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGAGAATTTTCCGCA
 ATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTCTG
 GGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAA
 TAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCA
 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTA
 GTCTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATATCGGCAGTGGAACTGT
 AAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCA
 TCACTGACGCTCATGGACGAAAAGCCAGGGGAGCGAAAAGGGATTAGATACC
 CCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGAC
 CCCCTCGGTGTCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCCTGGGGAGTACGC
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGAC
 ATCCCGCAACCCCTGAGAGATCGGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCA
 CTCTAGAGAGACCCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCA
 AGTCATCATGCCCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTAATAATGCTACG
 GACAAAGGGCAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGC
 TCAGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCTACGTGAAGGAGGAATCGCTA
 GTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACTCCA
 ACCCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA174 (1410 pb)

GATGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATCCCTTCGGGATAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGG
 AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGAGTCATCGCCT
 CAGGATGAGCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCA
 AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
 GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTTCCGCA
 ATGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTCTG
 GGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGACCTGACGGTACTTGAGGAA
 TAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCA
 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGTA
 GTCTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATATCGGCAGTGGAACTGT
 AAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCA
 TCACTGACGCTCATGGACGAAAAGCCAGGGGAGCGAAAAGGGATTAGATACC
 CCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCGGGGGAATCGAC
 CCCCTCGGTGTCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCCCTGGGGAGTACGC
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
 AGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGAC
 ATCCCGCAACCCCTGAGAAAATCGGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCA
 CTCTAGAGAGACCCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCA
 AGTCATCATGCCCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTAATAATGCTACG

GACAAAGGGCAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGC
 TCAGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTA
 GTAATCGCAGGTTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGCTCACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCCGAAGTCGTTACTCCA
 ACCCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA177 (1410 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGACG
 GGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGGAA
 ACGGCCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTATCGCCTTG
 GGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAG
 GCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
 GACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAAT
 GGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGGG
 CTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAACTGACGGTACTTGAGGAATA
 AGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAG
 CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAAGT
 CTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTAGAA
 GGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
 CGTAGATATCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATA
 ACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCC
 TGTAAGTCTGCGCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACCC
 CCTCGGTGTGCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCAC
 GCAAGTGTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
 TATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACAT
 CCTGCGAATCCCTTGGAACCTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAG
 GTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACT
 CTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAG
 TCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGA
 CAAAGGGCGCAAAACTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTC
 AGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGT
 AATCGCAGGTTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
 CCGCCCGCTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
 CCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA178 (1409 pb)

GATGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGG
 AAACGGCCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCTT
 GGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAA
 GGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCGAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGG
 GCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAAT
 AAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAA
 GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGCGGCCTTGAAAG
 TCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAAACTACA
 AGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
 GCGTAGATATCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCAT
 AACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCC
 CTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACC
 CCCTCGGTGTGCTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGCA
 CGCAAGTGTGAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
 GTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACA

TCTCTGCGAACCCCTTGGAAACGAGGGGGTGCCTTCGGAACGCAGAGACA
GGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCAC
TCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG
ACAAAGGGCAGCAAACTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCT
CAGTTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAG
TAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAA
CCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synchococcus CENA179 (1410 pb)
GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA
CACATGCAAGTCGAACGATCCTTCGGGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGCGGAAT
CTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGGAAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGG
TGAAACGAGTCATCGCCTCAGGATGAGCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGG
GCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGC
CTGACGGAGCAACGCCGCTGAGGGGAAGAAGGCCTCTGGGCTGTAAACCTCTTTTCTCAA
GGAAGAAGACATGACGGTACTTGAGGAATAAGCCACGGCTAATTCGTCGCCAGCGCCG
GGTAATACGGGAGTGGCAAGCTGTATTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGACGGCGG
CCTTGTAAGTCTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACCTCCATATCGGCAGTGGAACCTGTAA
GGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATC
GGGAAGAACACCAGCGGCGAAGGCCTCTGCTGGGCCATCACTGACGCTCATGGACGAAA
GCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTA
GGTGTCTGGGGGAATCGACCCCTCGGTGTCTGTAGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCTGGG
GAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG
TATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCGAACCC
CCTGAGAAATCGGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCA
GCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTG
CCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGA
TGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGA
CAAAGGGCAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTCAGTTCAGATC
GTAGGTGTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTG
CCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCATG
CCCGAAGTCGTTACTCCAACCCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGG
GGTGAA

>Synechocystis CENA180 (1410 pb)
GATGAACGCTGGCG
GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATCCTTCGGGATAGTGGCGGACG
GGTGAGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTGAGGAGGGGGATAACGGCTGGAA
ACGCCCGCTAATAACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAGGAGTCATCGCCTCG
GGATGAGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAG
GCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAAT
GGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTCTGGG
CTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAATA
AGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAG
CGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCCTTGTAAGT
CTGCTGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATATCGGCAGTGGAAACTGTAA
GGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATCGGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATC
ACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCC
TGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTGCGGGGAATCGACCC
CCTCGGTGTCTGATGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGCAC

GCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG
TATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACAT
CCCGCGAACCCCTGAGAGATCGGGGGGTGCCTTCGGGAACGCGGAGACAG
GTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACT
CTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAG
TCATCATGCCCCCTTACGCCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGA
CAAAGGGCAGCAAGCTCGCGAGAGTTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCTC
AGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAGT
AATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCCGTACACCATGGAAGTTGGCCATGCCCCGAAGTCGTTACTCCAAC
CCTCTGGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Chlorogloea CENA181 (1409 pb)

GATGAACGCTGG
CGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGG
AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTTCGCCTT
GGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAA
GGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
TGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTGG
GCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGATCTGACGGTACTTGAGGAAT
AAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAAG
TCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTACA
AGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCAT
AACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCC
CTGTAGTCTTGCCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGACC
CCCTCGGTGTCTGATGCCAACGCGTTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGCA
CGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGA
GTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGTTTGACA
TCCTGCGAACCCCTTGGAACGAGGGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGACA
GGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCAC
TCTAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAA
GTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGG
ACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCCATAAACCGTGGCT
CAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTAG
TAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
ACCGCCCGTACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAA
CCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Synechococcus CENA185 (1410 pb)

GATGAACGCTGG
CGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGCACCTTCGGGTGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCCCAAGGAGGGGGATAACGGCTGG
AAACGGCCGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAAAGAGTTATCGCCT
TGGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCA
AGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCA
ATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTCTG
GGCTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGAACTGACGGTACTTGAGGAA
TAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGAAA
GTCTGTTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTTCAGCAATGGAACTAG

AAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAA
 TCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCA
 TAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACC
 CCTGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGAACACTAGGTGTCTGGGGGAATCGAC
 CCCCTCGGTGTCTAGTCCAACGCGTTAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGC
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGG
 AGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGTTTGAC
 ATCCTGCGAATCCCTTGGAACCTTGGGAGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCACGTCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCA
 CTCCAGAGAGACCGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCA
 AGTCATCATGCCCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACG
 GACAAAGGGCAGCAAACCTCGCGAGAGCTAGCAAATCCATAAACCGTGCG
 TCAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGAGGAATCGCTA
 GTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCCA
 ACCCTTGTGGAGGAGGACGCCGAAGGTGGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA134 (1417 bp)

GATGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTGAACGGAATGCTTTCGGGCATTTAGTGGCGGACGGGTGAGTA
 ACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGAACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATGCCCCATATGCCGAGAGGTGAAAT
 GTTTTATCGCCTAAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAG
 CTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTT
 TCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTG
 GGAAGAAGAACTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCA
 AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGAGGCGGCTAATTAAGTCTGCTGTCAAAGACCACAGCTCAACT
 GTGGGCAGGCAGTGGAACTGGTTAGCTAGAGAGCGGTAGGGGTAGAGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCG
 AAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGGCCGTATCGACCCGGTCAGTACC
 GAAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCA
 CAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATCCTGCGAATCCTCTTG
 AAAGGGGGAGTGCCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGGTGATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTTGACAA
 ACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGA
 CAGAGGGCAGCTACCTCGCGAGAGCAAGCAAATCCCATAAACCGTGCGACAGTTTACAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCT
 GCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
 GTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGA
 TGACTGGGGTGAA

>Phormidium CENA135 (1414 bp)

GATGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTGAACGGACTTCCTCGGAAGTCAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC
 GCGTGAGAATCTACCTGAAGGATGGGGATAACTGTTGGAAACGACAGCTAATACCCAATGAGCCGAGAGGTAAAAAGG
 AAACCGCCTACAGAAGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGGAGGGTAAAGCCTACCAAGGCAACGATCGGTAGCTG
 GTCTGAGAGGACGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTTCC
 GCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAAGACCGCGTGGGGGAGGAAGGCCCTTGGGTTGTAACTCCTTTTCTCGGGGA
 AGAAGAACTGACGGTACCCGAGGAAAAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGC
 GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTCCGAGGTGGCCATTCAAGTCTGCAGTCAAAGGTTCGGGGCTCAACCCCG
 AAAAGGCTGTGAAACTGAAAGGCTAGAGTACGGTAGGGGCAGAGGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
 ATTGGGAAGAACCCTGGTGGCAAGCGCTCTGCTAGGCCGAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAA
 GGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGAGACTAGGTGTGGCCTGTATCGACCCGGGCCGTGCCGGA
 GCTAACGCGTTAAGTCTCCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAA
 GCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGGCTTGACATGTGCGGAACCCCGGGGAAA
 CCTGGGGGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTAGTTGCCAGCACGAAGGTGGGAACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGGAAGGACAA
 AGAGCAGCAAGCGCGCAAGTGCAAGCGAATCTCGAAAACCTTGCCCCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA
 TGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCATAACGGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC

ACACCATGGAAGTTGGCCAGGCCCCGAAGTCATTACCCTAACCGTAAAAGGAGGGGGATGCCGAAGGCCGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA137 (1412 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTGAACGGACCCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
GTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACTTTT
TTGGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGAGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGT
CTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
AATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAG
AAGATCTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTGTTGTCAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGA
TCGGCAATGGAACCTGGAGAGCTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT
CGGGAAGAACACCCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAG
GATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGCAGTACCGTAGC
TAACGCGTTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGAGGATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTGCGGAATCTTTTCAGAGATG
AGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGGGACAACCTCGG
AGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCTTACAATGCTACAGACAGAG
GGCAGCGAGCGCGCAGTGCAAGCAAATCCCATAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATG
AAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACT
GGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA144 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTGAACGGACCCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
GTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAACGATT
TTTCGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCGGG
TCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCG
CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCCTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAA
GAAGATCTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAAGTCCGTCAGCAGCCGCGGTAAAGACAGGAGGAGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGTTGTCAAAGCCCACAGCTCAACTGTGG
ATCGGCAATGGAAACTGGGAGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAG
GGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGCAGTACCGTAG
CTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAG
CGGTGGAGGATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCCGGAATCTTCTGAAAG
GGGAGAGTGCCTTCGGGAACCGGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCGGGGACAACCTCG
GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCTTACAATGCTACAGACAGA
GGGCAGCGAGCGCGCAGTGCAAGCAAATCCCATAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT
GAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGAC
TGGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA147 (1413pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTGAACGGACCCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGC
GTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAAATGTTT
TTTCGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGAGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGG
TCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCG
CAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAA
GAAGATCTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTTTTTAAGTCTGTTGTCAAAGCCCACAGCTCAACTGTGG
ATCGGCAATGGAAACTGGAGAGCTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TCGGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAG
GGATTAGATACCCCTGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGCAGTACCGTAG
CTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAG

CGGTGGAGGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTTCAGAGAT
 GAGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTTTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGGGACAACCCG
 GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCTTACAATGCTACAGACAGA
 GGGCAGCGAGCGCGAGTGAAGCAAATCCCATAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAT
 GAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGAC
 TGGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA155 (1415 pb)

GATGAACGCTGG
 CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCG
 GACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGAGGGGGACAACAGTT
 GGAAACGACTGCTAATACCCCATATGCTGAGAGGTGAAACGTTTTTCCG
 CCTGAGGATGAACCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCA
 CCAAGGCGGCGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCC
 GCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGGGAGGAAGGTTT
 TTGGACTGTAAACCCCTTTTCTCAGGGAAGAAGAAAGTGACGGTACCTGA
 GGAATAAGCCTCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGA
 GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTAA
 TCAAGTCTGTTGTCAAAGCGTGGGGCTCAACCTCATAACAGGCAATGGAAA
 CTGATTGACTAGAGTATGGTAGGGGTAGCGGGAATTCCAGGTGTAGCGGT
 GAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGG
 GCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGA
 TACCCCTGTAGTCTTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTAT
 CGACCCGTGCAGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGT
 ACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCG
 GTGGAGGATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
 TGACATCCTGCGAACCTCTCTGAAAGGAGAGGGTGCTTCGGGAACGCAG
 AGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCCCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTG
 GGCACTCTGGGGAGACTGCCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGAC
 GTCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCTTACAATGC
 TACAGACAGAGGGCAGCGAGACCGCGAGGTTAAGCAAATCCCATAAACTG
 TGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATC
 GCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
 TACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTAC
 TCTAACCGTTTCGCTGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGT
 GAA

>Leptolyngbya CENA156 (1414 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTCCTTTTGGACTTAGTGGCG
 GACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCTTCAGGTCTGGGACAACAGTT
 GGAAACGACTGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGCTTGCTGCC
 TGAAGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGGACCACC
 AAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGC
 AATGGGGGCAACCCCTGACGAGCAACGCCGCGTGCGGGAGGACGGCCTTA
 GGGTTGTAAACCGCTTTTCTCTGGGAAGAAGTTCTGACGGTACCAGAGGA
 ATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGC
 AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTGTTA
 AGTCTGTTGTCAAAGCCACAGCTCAACTGTGGAACGGCAATGGAAACTG
 ATGGACTTGAGAGCGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAA
 ATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTACTGGGCC
 CGCACTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATAC

CCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGACACTAGGTGTTGGGCGTATCGA
 CCCGTTTCAGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACG
 CACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
 GAGGATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGA
 CATCCTGCGAACCTTCGGGAAACCGAAGGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGA
 CAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAG
 TCCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCCTTAGTTGCCATCATTGAGTTGGGC
 ACTCTAGGGGAGACTGCCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC
 AAGTCATCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTGC
 GGACAGAGGGGAGCGAGCGTGCGAACGCAAGCAAATCCCATAAACCGCGG
 CCCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCT
 AGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
 ACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCT
 AACCGTTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA167 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAACCCTTCGGG
 GTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGCCCTTAGGGGGGAACAACAGTT
 GGAAACGACTGCTAATGCCCCATATGCCGAGAGGTGAAATGATTTTTTCGCCTGAGGATGA
 ACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCT
 GGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
 CAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGA
 GGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAGAAGATCTGACGGTACCAGAGG
 AATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGGCAAGCGTTAT
 CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGTTGTCAAAGCCCA
 CAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAACTGGGAGACTTGAGTGTGGTAGGGGTAGAGGG
 AATTCGCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGC
 TCTACTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA
 CCCCTGTAGCCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTTGGACGTATCGACCCGTGCAG
 TACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCA
 AAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGGATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCG
 AAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTGCGCAATCTTTTCAGAGATGAGAGAGTGCCCTTCGG
 GAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTGGGG
 AGACTGCCGGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTAC
 GTCTTGGGCTACACACGTCCTACAATGCTACAGACAGAGGGCAGCAAGCGCGCGAGTGCA
 AGCAAATCCCATAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG
 GCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
 CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCCTTCG
 CGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAA

>Leptolyngbya CENA183 (1412 pb)

GATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATG
 CAAGTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGATCTGC
 CCTTAGGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCCATATGCCGAGAGGTGAA
 ACTTTTTTGGCCTGAGGATGAACTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAAGAGCTCA
 CCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTAAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGAC
 GGAGCAACGCGCGTGAGGGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCTGGGAAG
 AAGATCTGACGGTACCAGAGGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 GACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCTTTT
 TAAGTCTGTTGTCAAAGCCCACAGCTCAACTGTGGATCGGCAATGGAACTGGAGAGCTT
 GAGTGTGGTAGGGGTAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAA
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTATTGGGCCACAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAG
 GGGAGCGAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGT
 TGGACGTATCGACCCGTGCAGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTA
 CGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGGATGT

GGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTCGCGAATCTTTCA
 GAGATGAGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
 TGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTTTAGTTGCCAGC
 ATTCAGTTGGGCACTCTAAAGAGACTGCCGGGACAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGACG
 TCAAGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTCTTACAATGCTACAGACAGAG
 GGCAGCGAGCGCGAGTGCAAGCAAATCCCATAACTGTGGCTCAGTTCAGATTGCAGG
 CTGCAACTCGCCTGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTG
 AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCCGA
 AGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTG
 AA

>Nostoc CENA158 (1415pb)

GATGAACGCTGGCG
 GTATGCTTAACACATGCAAGTCAACGGGCTCTTCGGAGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTA
 ACGCGTGAGAATCTGGCTTTAGGTTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGA
 TGTGCCGCAAGGTAAAAAGGCTTGCCGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAG
 GTAGTGTAAGGACTACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAAACC
 TCTTTTCTCAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGC
 GTCCGCAAGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAG
 TGGAAGTACATGGCTAGAGTGCCTTCGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACAC
 TGAGGGACGAAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCCTAGCCGTAAA
 CGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGT
 ATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
 CAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGAC
 ATGTCGCGAATTTTCTGAAAGGGAAAAAGTGCCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCA
 TGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCT
 CGTTTTTAGTTGCCAGCACTTAGGGTGGGCACCTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCG
 GAGGAAGTGTGGGATGACGTCAGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTAC
 TACAATGCTACGGACAAAAGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCAAAATCTCAGAAAACCGTA
 GCTCAGTTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGC
 AGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
 GGAAGCTGGTAGTGCCCGAAGTCATTACCCCAACTTTTCGGAGAGGGGGATGCCTAAGGC
 AGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>Nostoc CENA159 (1414 pb)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTT
 AACACATGCAAGTCAACGGGCTCTTCGGAGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
 GAATCTGGCTTTAGGTTCGGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGC
 AAGGTAAAAAGGCTTGCCGCCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTAGTGTA
 AAGGACTACCTAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAA
 AGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTAAACCTCTTTTCT
 CAGGGAAGAACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAG
 GTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGTGGAAGT
 ACATGGCTAGAGTGCGTTTCGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
 TATCAGGAAGAACAACCGGTGGCGAAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGAC
 GAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCCTAGCCGTAAACGATGGAT
 ACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCC
 TGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
 GGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCG
 AATTTTCTGAAAGGGAAAAAGTGCCCTTCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTCGTTTTTA

GTTGCCAGCACTTAGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCT
 ACGGACAAAGGGCAGCTACACAGCAATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTC
 AGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCA
 TACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGG
 TAGTGCCCGAAGTCATTACCCCAACTTTTCGGAGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGT
 GACTGGGGTGAA

>Nostoc CENA160 (1414 pb)

GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCA
 AGTCGAACGGGCTCTTCGGAGCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCT
 TTAGGTTCGGGGACAACCACTGGAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGCAAGGTAAAAG
 GCTTGCCCGCTGAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTAGTGTAAGGACTACC
 TAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG
 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGG
 AGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAA
 CACAATGACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 ACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCTATGT
 AAGTCTGCTGTAAAGAGTGAGGCTCAACCTCATAAGAGCAGTGGAACTACATGGCTAG
 AGTGCGTTTCGGGGTAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAG
 AACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGG
 GGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTG
 GCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTAC
 GCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTG
 GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACATGTCGCGAATTTTCTCTG
 AAAGGGAAAAGTGCCTTCCGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTTTTTAGTTGCCAGCA
 CTTAGGGTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAG
 GGCAGCTACACAGCAATGTGATGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGG
 CTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTG
 AATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTAGTGCCCGA
 AGTCATTACCCCAACTTTTTCGGAGAGGGGGATGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGGTG
 AA

>Nostoc CENA175 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCACTTAGGTGATAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTAGCTCTAGGTTCGGGGACAACCACTGG
 AAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGGAAGGTGAAAGATTTATTGCCTA
 GAGAAGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCTA
 GGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGG
 GTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAATAAGAAAGTGAAGGTAAGGTAAGGAA
 TAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCACGGTAATACGGAGGATGCA
 AGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCCGCAGGTGGCACTGAAA
 GTCTGCTGTAAAGAGTCTAGCTCAACTAGATAAAAGCAGTGGAACTAC
 AGAGCTAGAGTACGTTTCGGGGTAGCAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTAGGCCG
 TAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACC
 CCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGAC
 CCGAGCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGC
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
 AGTATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGAC
 ATGTCGCGAATCCTTCTGAAAGGGAGGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGT

CCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTCTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGAA
 CTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACG
 GACAAAGGGCAGCTACACAGCGATGTGATGCTAATCTCGGAAACCGTAGC
 TCAGTTCAGATCGAAGGCTGCAACTCGCCTTCGTGAAGGAGGAATCGCTA
 GTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCGCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTCATTACCTCA
 ACCATTTCGTGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>Microchaete CENA176 (1413 pb)

GATGAACGCTGGCG
 GTATGCTTAACACATGCAAGTCAACGGGATCTTCGGATTTAGTGGCGGA
 CGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTTCTGGGACAACCACTGG
 AAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCTTTGGGTGAAAGATTAATTGCCTG
 GAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAGAGCGCACCTA
 GGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAA
 TGGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGGAAGAAGGCTTTTGG
 GTTGTAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAAAAATGACGGTACTTGAGGAA
 TAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCA
 AGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTCTGTAA
 GTCTGCTGTTAAAGCGTGAGGCTTAACCTCATAACGGCGGTGAAAACCTAC
 AGGACTAGAGTACGTTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAAGCGCTCTGCTAGGCCG
 TAACTGACACTGAGGGACGAAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACC
 CCAGTAGTCCCTAGCTGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGTCTGTATCGAC
 CCGGACAGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGC
 ACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
 AGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGAC
 ATGTCGCGAATCTTGGGGAAACTCGAGAGTGCCTTCGGGAGCGCGAACAC
 AGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCA
 CTCTAGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AGTCATCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGCTATA
 GACAGAGGGCAGCCAGACAGCGATGTGCGAGCAAATCTCAGAAACTATGGC
 TCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTA
 GTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATTCGTTCGCCGGGCCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGAAGTAGTTACCCTA
 ACCGTTTCGCGGGGGGGGACTCCGAAGGCAGGGCTGGTGACTGGGGTGAA

ANEXO B

Sequências de NRPS e PKS traduzidas para aminoácidos

Sequência de NRPS

```
>Phormidium CENA135 - NRPS
AYVPLDPGYFVERIEYMVADSEARIIITDARSADALGSLSVTTMMLAETSAATDQGPSVN
HGPDDLAYIIYTSGSTGKPKGVEVTHRTAVNFLCSMQREPGITDTDVLLAVTTICFDISV
LEIFLPLVSGATVVIASGDEVVDGSSLVSRIEENDVSVMQATPATWRLMLAADWAGSSNL
KALCGGEAMPAELIQELYPRAGGLWNMYGPTETTVWSSTYKLQSAEERPLIGRPIANTR
MYVLDSGMQPMPAGVPGELYIAGEGVVRGYHNRPDLTAEFFVDFPVEGGRMYRTGDVAR
YCTDGNIEYLHRIDNQESNSRG
```

Sequências de PKS

```
>Leptolyngbya CENA167 - PKS
GRGNSIREA-AMDPQQRLLEVSWEALEYAGVAPTSIAKTNTGVFVGISSNDYSQQLKY
GTPVNAYAGTGNASHIAANRLSYILDLRGPSLSVNTACSSSLVAVHLAANSLKQGECELA
IAAGVNLILSPELTQTFTTEAGMMAADGRCKTFDSDADGYVRGEGCGVIIILKPLTKAIADG
DNILALIKGSAINQDGRSNGLTAPNGISQEEVIYQALNNANIQQPDLNYIEAHGTGTCLG
DPWHRHLLRRPNH--I
```

```
>Leptolyngbya CENA134 - PKS
GRGNSIREALPMDPQQRLFLEVVWEALEDAGIAPRQLGDTLTGVFAGASTLDYGQVLLQG
TDAVGTYTTTTGLASTMVANRVSYLLNLRGPSLTVDTACSSSLVAVHLACQSLWSRESDLA
LAGGVNLILTPALTGVGFSKLTALSPDGRCKAFDAEANGFVRSEGVGVVVLKRLSQALAAG
DRIYALLRGSANVDGRTNGLTAPNREAQEAQLQAAYDRAGIPLAQVDYIEAHGTGTTFG
D
```

```
>Leptolyngbya CENA137 - PKS
GRGNSIREA-PMDPQQSKFLEISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HEATEIFGNQVMSLNEKDYVASRVAFQLNLTGPAVSVYTACSTSLAVAQAVMSIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDQAQIKPEQISYVETHGT
GTCLGDPWHRHQPRRS
```

```
>Synechococcus CENA140 - PKS
GNSIREALEMDPQQSKFLPVSLLEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYIRNIVFDHE
ATEIFGLYQAMSLNEKDYVASRVAFQLNLTGPAVSVYTACSTSLAVAQAVMSIRSGQCT
AAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQAVK
DGDGKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVKGEASAIRDAILDQAQIKPEQISYVETHGTGT
SLGDLRHRHQPRRPTAPAPPSAI
```

```
>Chlorogloea CENA141 - PKS
GRGNSIREALQMDPQQRKFLFLEISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HEATEIFGNQVMSLNEKDYVASRVAFQLNLTGPAVSVYTACSTSLAVAQAVMSIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDQAQIKPEQISYVETHGT
GTTLGDTNRHRLPRRSTAPAPASATHGTG
```

```
>Chlorogloea CENA142 - PKS
GRGNSIREAMPMDPQQSKFLEISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HEATEIFGNQVMSLNEKDYVASRVAFQLNLTGPAVSVYTACSTSLAVAQAVMSIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDQAQIKPEQISYVETHGT
```

GTCLGDPWHRHHLRR

>Synechococcus CENA143 - PKS

GRGNSIREALQMDPQQRKFLFISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HEATEIFGPNQVMSLNEKDYVASRVAFLNLTGPAVSVYTACSTSLLAHAHVMISIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKGIGISNDGSEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDAQIKPEQISYVETHGT
GTSFGDPWHRHHPRRPTAPAPPSATHGTGTS LGDPITSEF

>Leptolyngbya CENA144 - PKS

RGNSIREALAMDPQQRKFLFISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFDH
GATEIFGPNQVMSLNEKDYVASRVAFLNLTGPAVSVYTACSTSLLAQAQVMSIRSGQC
TAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPSDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQAV
KDGDKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDAQIKPEQISYVETHGTG
TTLGDPRHRH

>Chlorogloea CENA145 - PKS

GRGNSIREALQMDPQQRIIMELAWHGLEDAGLSATQLAGSPTGVFVGASGSDYQRAIDAA
GLPVQAHHSTGTAASVIANRISYFLDFTGPSLVVDTACSSSLVALHQAVAALRDGTCDLA
LAAGINLILHPATSLAYQAAGMLSPSGLCRSFGAGADGYVRSEGAVVLVLKPLAQALAE
CRIHAVIRGSACNHGGLTNGLTVPNPDQAE LLNAAWRADLEDGGLDYLEAHGTGTTFG
APITSEF

>Leptolyngbya CENA147 - PKS

GRGNSIREAQMDPQQRKFLFISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HEATEIFGPNQVMSLNEKDYVASRVAFLNLTGPAVSVYTACSTSLLAQAQVMSIRSGP
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDEKKIFAVIKGKGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILNAQIKPEQISYVETHGT
GTCFGDPRHRHL

>Chlorogloea CENA150 - PKS

PREFDLDPQQRLLEVAWEALENAGIAPDKVAGTATGVFMGISSSDYQIVHNPDISAY
SGTGNASHSIAANRLSYLFDLRGPSLSIDACSSSLVAVHLAVKSLQQGECQCALVGGVNL
MLSPELTRTFAQAGMMSHRRCKTFDASADGYVRGEGCGKIVLKLPLSHALRDGDNVLALI
KGSAINQDGRSNGLTAPSGVAQQAVIQQALLNAGLNPQDIDYVEAHGTGTCFGD

>Chlorogloea CENA170 - PKS

GRGNSIREALQMDPQQRKFLFISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HEATEIFGPNQVMSLNEKDYVASRVAFLNLTGPAVSVYTACSTSLLAQAQVMSIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDAQIKPEQISYVETHGT
GTSFGDPWHRHHLRRPTAPAPPSATHGTG

>Phormidium CENA135 - PKS

EAMAMDPQQRKFLFISHEVLEKAGRIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFDHEATEIF
GPNQVMSLNEKDYVASRVAFLNLTGPAVSVYTACSTSLLAQAQAVISIRSGQCTAAIAG
GSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQAVKDGDKI
FAVIKIGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDAQIKPEQISYVETHGTGTTLGDP
RHRHLPRRPMAPAPPSATHGTGTSFGDPWHRHQPRRPTAPAPASAIQNSNRG

>Aphanothece CENA139 - PKS

GRGNSIREALQMDPQQRKFLFISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HKATEIFGPNQVMSLNEKDYVASRVAFLNLTGPAVSVYTACSTSLLAQAQVMSIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKGIGISNDGFEEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDAQIEPEQISYVETHGT
GTCLGDPHRHQLRR

>Chlorogloea CENA146 - PKS

GRGNSIREALAMDPQQRFLFLETVWEALEDAGIVPQTLGGQSVGVFAGASTLDYGQMLMQG
PEVVGYTYTATGLASTMVANRVSYLLNLQGPSLTVDTACSSSLVAVHLACQSLWNGGSTLA
LAGGVNLMLTPTLTVGFSLTALSPEGRCKTFDAEANGFVCSEGVGTVVLLKPLNQALADG
DRIYALIRGSATNQDGRTNGLTAPNPAAQEAVVKAAYGRAGIPLSQVEYIEAHGTGTS

>Synechococcus CENA148 - PKS

GRGNSIREALPMDPQQRKFLEISHEVLEKAGWIANRPDFRIGVFAGTNNNTYYNRNIVFD
HKATEIFGPNQVMSLNEKDYVASRVAFQLNLTGPAVSVYTACSTSLAVAQAVMSIRSGQ
CTAAIAGGSSITFPANSGQRYQEGAIIFSIDGHCKPFDSEATGTMFCDGAGAVLLKDYEQA
VKDGDKIFAVIKIGISNDGFEKASFTSPSVRGEASAIRDAILDQIKPEQISYVETHGT
GTTFGDPRHRHLPRRPTAPAPPSATHGTGTCFGDP

>Chlorogloea CENA149 - PKS

GRGNSIREA-PMDPQQRMMLEVTRAMEDANIPLQFKSKSVGVFVGTSSNDYGSLLWAN
EKGYPALPNNEPFVLPNGTGCITANRISYIFDLKGPSFTVDTACSSSLVAVHLACQSLLRG
ESDMALVGGVQVLVHPGVQALFARPGLLSPDGRCKSFDARANGYVRSEGAGVLLKPLSK
AIQDNDQIYSVILGSAVNSDGRSNGMVAPNYRSQVECVRSFAFKSAGVSPSATQYVEAQGT
GTTLGDPHRHLPRRPTAPAPPSATHGTGTCFGDPITSE

>Nostoc CENA159 - PKS

GRGNSIREALQMDPQQRPFLEVWEALEDAGIAPRQLGDTLTGVFAGASTLDYGQVLLQG
TDAVGTYTTTGLASTMVANRVSYLLNLRGPSLTVDTACSSSLVAVHLACQSLWSRESDLA
LAGGVNLILTPALTGVGFSLTALSPDGRCKAFDAEANGFVRSEGVGVVLLKRLSQALAAG
DRIYALLRGSAVNQDGRTNGLTAPNREAQEAVALQAAYDRAGISLA-VDYIEAHGTGTSFG
DPWHRHQPRRSTAPAPASAIHGTGTC

>Synechococcus CENA136 - PKS

AAGIRLGKRRRWIRNRE-C-R-PASLGDPWHRHHLRRPTEFLRPREALAMDPQQRMMLEV
TRAMEDANIPLQFKS-SVGVFVGTSSNDYGSLLWANEEKGYALPNNEPFVLPNGTGCIT
ANRISYIFDLKGPSFTVDTACSSSLVAVHLACQSLLRGESDMALVGGVQVLVHPGVQALF
CKAGLLSPDGRCKSFDARANGYVRSEGAGVLLKPLSKAIQDNDQIYSVILGSAVNSDGR
SNGMVAPNYRSQVECVRSFAFKSAGVSPSATQYVEAHGTGTT