UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Análise fenotípica, genética e de bioatividade de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon*

Tânia Keiko Shishido

Piracicaba
2009

Tânia Keiko Shishido

Análise fenotípica, genética e de bioatividade de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon*

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba
2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Shishido, Tânia Keiko

Análise fenotípica, genética e de bioatividade de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon* / Tânia Keiko Shishido; orientador Marli de Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2009.

134 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agentes antimicrobianos 2. Biologia molecular 3. Filogenia 4. Microbiologia 5. Toxicologia ambiental I. Título

CDU 575.86+577.127

Aos meus pais, Sonia e Mário,
e ao tio Joaquim (*in memoriam*),

Pelas oportunidades oferecidas, apoio e carinho

DEDICO.

Aos meus queridos irmãos, Nara e Fábio,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo;

À FAPESP pelo auxílio financeiro no projeto;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), pela oportunidade e apoio fornecidos;

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai, pelo suporte fornecido;

À Profa. Dra. Célia Leite Sant´Anna e ao Prof. Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda pela disponibilização do microscópio;

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago (Departamento de Genética - UFRJ) pelas análises filogenéticas e auxílio fornecido;

Ao Dr. Yan Kaštovský pela confirmação da classificação dos gêneros;

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin (Instituto Thompson-UNICAMP) pela disponibilização do Q-TOF;

À doutoranda Elaine C. Cabral (Instituto Thompson-UNICAMP) e ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (Instituto de Química-USP) pelo auxílio nas análises do Q-TOF;

Ao Dr. Martin Welker (Universidade Técnica de Berlin – Alemanha) e Dr. Jouni Jokela (Universidade de Helsinki-Finlândia) pelo auxílio com a identificação dos metabólitos secundários;

À Dra. Kaarina Sivonen e ao Dr. David Fewer (Universidade de Helsinki-Finlândia) pelas sugestões e auxílio fornecido;

À Dra. Estela Maria Silva-Stenico, pelo auxílio nas análises químicas e na revisão da dissertação;

Ao Dr. Ricardo Yukio Honda, pelo auxílio nas análises morfológicas e na revisão da dissertação;

À Dra. Adriana Sturion Lorenzi pelo apoio e revisão da dissertação;

À Mestre Karla Nishiyama Marques e o mestrando Diego Bonaldo Genuário pelo fornecimento de linhagens isoladas de cianobactérias;

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

Aos colegas e amigos, Carol H., Carol P., Jana, Victor, e em especial ao Danillo e Elaine, do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA) pelo companheirismo e auxílio fornecido;

Aos meus queridos amigos, que próximos ou distantes, estão sempre presentes.

“Nada em Biologia faz sentido exceto à luz da evolução.”

Theodosius Dobzhansky

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

RESUMO

SHISHIDO, T. K. **Análise fenotípica, genética e de bioatividade de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon*.** 2009. 134f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

A afiliação genérica de *Fischerella* e *Hapalosiphon* é problemática devido à instabilidade dos caracteres morfológicos. Os gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon* são diferenciados pela presença de tricoma multisseriado e uni ou bisseriado, respectivamente. Porém, geneticamente esses caracteres não se mostraram diacríticos para diferenciar gêneros. Estudos moleculares de linhagens isoladas de ecossistemas brasileiros são escassos para *Fischerella* e inexistentes para *Hapalosiphon*. Neste estudo, oito linhagens de cianobactérias, pertencentes à família Hapalosiphonaceae, isoladas de água doce e solos brasileiros foram caracterizadas morfologicamente e geneticamente e analisadas para a produção de substâncias bioativas. As análises morfológicas identificaram cinco morfotípos de *Fischerella* (CENA19, CENA161, CENA212, CENA213, CENA214) e três de *Hapalosiphon* (CENA63, CENA71, CENA72). As análises filogenéticas do RNAr 16S usando neighbor-joining (NJ) e máxima verossimilhança (MV) colocaram todas as linhagens isoladas em um agrupamento com alto suporte (reamostragens de 99% NJ e MV) contendo membros da ordem Nostocales. Além disso, as linhagens de *Fischerella* selecionadas para o estudo agruparam-se em um clado interno com alto valor de reamostragem (100% NJ e 86% MV), com exceção da *Fischerella* CENA19. A posição dessa estirpe na árvore filogenética indica que necessita de revisão taxonômica. As linhagens de solo *Hapalosiphon* CENA71 e CENA72 também formaram um clado interno separado (99% NJ e 98% MV), mas a linhagem de água doce CENA63 foi colocada em um clado diferente (com valores de reamostragens de 99% NJ e MV), juntamente com linhagens do gênero *Hapalosiphon* e *Westielopsis prolífica* SAG 16.93, oriundas de solo. A comparação das análises filogenéticas individuais de regiões dos genes RNAr 16S, *rpoC1*, *rbcL*, *tufA*, e *cpcBA*-IGS das três linhagens de *Hapalosiphon* e de duas linhagens de *Fischerella*, CENA19 e CENA161, mostrou resultados incongruentes devido as diferentes taxas evolutivas desses genes. No entanto, a análise filogenética concatenada desses genes, mostrou que a *Fischerella* CENA19 agrupou com as duas linhagens de *Hapalosiphon* CENA71 e CENA72, com alto valor de reamostragem (100%), enquanto que a *Fischerella* CENA 161 e a *Hapalosiphon* CENA63 posicionaram-se cada uma em clados separados. Os resultados indicam que a nomenclatura das linhagens de cianobactérias da família Hapalosiphonaceae necessita de revisão. Os extratos intra e extracelulares das linhagens *Fischerella* sp. CENA161 e CENA19 e *Hapalosiphon* sp. CENA71 e CENA72 mostraram efeitos inibitórios no crescimento de bactérias patogênicas. As análises em espectrômetro de massas Q-TOF MS/MS indicaram a putativa presença de aeruginopeptina, cianopeptolina, fischerelina, aeruginosina, oscilapeptilida, microcistinas e ácido tumonóico nos extratos. No extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA161 identificou-se três ou quatro variantes de microcistinas, –LR, –LL, –FR e/ou –M(O)R. Fragmentos dos genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyG* e *mcyI* dessa linhagem foram seqüenciados. Nas duas análises filogenéticas realizadas com sequências de aminoácidos de McyE e sequências concatenadas de McyD, McyE e McyG, as enzimas da microcistina sintetase ficaram agrupadas de acordo com os gêneros de cianobactérias indicando um padrão de evolução.

Palavras-chave: filogenia, RNAr 16S, *rpoC1*, *rbcL*, *tufA*, *cpcAB*-IGS, produtos naturais, microcistina, microcistina sintetase, análise concatenada, Q-TOF

ABSTRACT

SHISHIDO, T. K.. 2009. **Phenotypic, genetic and bioactivity analyses of Brazilian cyanobacterial isolates from the genera *Fischerella* and *Hapalosiphon*.** 134f. Dissertation (Master of Science) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

The generic affiliation of *Fischerella* and *Hapalosiphon* is problematic due to instability of morphological characters. The *Fischerella* and *Hapalosiphon* genera are differentiated by the presence of trichome multisseriate and uni or bisseriate, respectively. However, genetically these characters were not diacritical to distinguish genera. Molecular studies of strains isolated from Brazilian ecosystems are scarce for *Fischerella* and absent for *Hapalosiphon*. In this study, eight cyanobacterial strains, belonging to Hapalosiphonaceae family, isolated from Brazilian freshwater and soil were morphologically and genetically characterized and analyzed for bioactive compound productions. The morphological analyses identified five *Fischerella* (CENA19, CENA161, CENA212, CENA213, CENA214) and three *Hapalosiphon* (CENA63, CENA71, CENA72) morphotypes. The neighbor-Joining (NJ) and maximum likelihood (ML) phylogenetic analyses of 16S rRNA placed all isolated strains in high supported (99% NJ and ML of bootstrap) cluster containing members of the order Nostocales. Furthermore, the *Fischerella* strains studied were grouped in an internal clade with high bootstrap value (100% NJ and 86% ML), with exception of *Fischerella* CENA19. The position of this strain in the phylogenetic tree indicates that it needs taxonomical revision. The soil *Hapalosiphon* strains CENA71 and CENA72 also formed a separated tight internal clade (99% NJ and 98% ML), but the freshwater strain CENA63 was placed in a different clade (99% NJ and ML of bootstrap value) together with *Hapalosiphon* strains genera and *Westielopsis prolifica* SAG 16.93, originated from soil. The comparison of the phylogenetic analyses of individual regions of the genes 16S rRNA, *rpoC1*, *rbcL*, *tufA*, and *cpcBA*-IGS from the three *Hapalosiphon* strains and the two *Fischerella* strains CENA19 and CENA161 showed incongruent results due to different evolutionary rates of these genes. However, the concatenated phylogenetic analysis of these genes, showed that *Fischerella* CENA19 grouped with the two *Hapalosiphon* strains CENA71 and CENA72 with high bootstrap value (100%), while *Fischerella* CENA 161 and *Hapalosiphon* CENA63 were positionated each one in separate clades. The results indicate that the nomenclature of cyanobacterial strains from the family Hapalosiphonaceae needs revision. The intra and extracellular extracts of the *Fischerella* sp. strains CENA161 and CENA19 and *Hapalosiphon* sp. strains CENA71 and CENA72 showed inhibitory effects on the growth of pathogenic bacteria. The analysis in the mass spectrometer Q-TOF MS/MS indicated the presence of aeruginopeptin, cyanopeptolin, fischerellin, aeruginosin, oscillapeptilide, microcystins and tumonoic acid in the extracts. In the intracellular extracts of *Fischerella* sp. CENA161, three or four variants of microcystins, –LR, –LL, –FR and/or –M(O)R, were identified. Fragments of genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyG* and *mcyI* of this strain were sequenced. In both phylogenetic analyses performed with amino acid sequences of McyE and concatenated sequences of McyD, McyE and McyG, the microcystin synthetase enzymes were grouped according to the cyanobacterial genera, indicating a pattern of evolution.

Keywords: phylogeny, 16S rRNA, *rpoC1*, *rbcL*, *tufA*, *cpcAB*-IGS, natural products, microcystin, microcystin synthetase, concatenated analysis, Q-TOF

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**
2 REVISÃO DE LITERATURA **17**
2.1 Cianobactérias **17**
2.2 Taxonomia de cianobactérias **18**
2.2.1. Ordem Stigonematales **21**
2.3 Sistemática molecular de cianobactérias **25**
2.3.1 Genes utilizados para detecção de cianobactérias **25**
2.3.1.1 Subunidade 16S do RNAr **25**
2.3.1.2 RuBisCO (*rbcLXS*) **26**
2.3.1.3 *rpoC1* **27**
2.3.1.4 *tufA* **27**
2.3.1.5 Ficocianina (*cpcBA*) **28**
2.3.2 Análise filogenéticas **28**
2.3.2.1 MLST e MLSA **30**
2.4 Metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias **31**
2.4.1 Síntese de enzimas pela via não-ribossômica **31**
2.4.2 Toxinas produzidas pelas cianobactérias (cianotoxinas) **33**
2.4.2.1 Microcistinas **35**
2.4.3 Métodos para detecção de microcistinas **39**
2.4.3.1 Agrupamento de genes envolvidos na biossíntese de microcistinas **42**
3 MATERIAIS E MÉTODOS **47**
3.1 Linhagens de cianobactérias **47**
3.2. Análise fenotípica dos isolados **48**
3.3 Análise genética **49**
3.3.1 Extração de DNA genômico **49**
3.3.2 Amplificação por PCR dos genes selecionados **50**
3.3.3 Clonagem e transformação de produtos de PCR **51**
3.3.4 Sequenciamento dos genes clonados **53**
3.3.5 Análise filogenética **53**
3.4 Ensaio Imunoenzimático para detecção de microcistinas **55**
3.5 Análise de bioatividade **55**
3.6. Análise de cianopeptídeos produzidos pela *Fischerella* sp. CENA161 e detecção de genes envolvidos na síntese de microcistina **56**
3.6.1. Curva de Crescimento **56**

3.6.2. ELISA **57**
3.6.3. Bioatividade **57**
3.6.4 Detecção de genes envolvidos na biossíntese de microcistina **57**
3.6.4.1 Extração de DNA e amplificação de genes envolvidos na síntese de microcistina **57**
3.6.4.2 Sequenciamento e análise dos genes da microcistina **59**
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **61**
4.1 Caracterização morfológica dos gêneros **61**
4.2 Análises Filogenéticas **66**
4.3 Ensaio Imunoenzimático para detecção de microcistinas **77**
4.4 Análise de bioatividade **78**
4.4.1 Extração de metabólitos secundários **78**
4.4.2 Identificação dos cianopeptídeos bioativos **82**
4.5 Análise de cianopeptídeos produzidos pela *Fischerella* sp. CENA161 e detecção de genes envolvidos na síntese de microcistina **86**
4.5.1 Curva de crescimento da cianobactéria *Fischerella* sp. CENA161 ..... **86**
4.5.2 Identificação das variantes de microcistina **89**
4.5.3 Análise dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina **93**
CONCLUSÕES **99**
REFERÊNCIAS **101**
ANEXO A **121**
ANEXO B **128**
ANEXO C **133**

1 INTRODUÇÃO

O progresso nas pesquisas com cianobactérias nas últimas décadas trouxe um grande aumento de conhecimento desse grupo de microrganismos. Entretanto, dois códigos de nomenclatura (Código Internacional de Nomenclatura Botânica e Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica) são aplicáveis atualmente para as cianobactérias, mas nenhum deles sem obstáculos. A partir desta situação e do esforço para chegar a um consenso entre as abordagens bacteriológicas e botânicas, várias propostas têm sido publicadas na tentativa de encontrar procedimentos compatíveis nomenclaturais utilizando tanto o código bacteriológico como o botânico. Na proposta de Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005), as cianobactérias heterocitadas estão classificadas dentro da ordem Nostocales, enquanto que no Manual de Bergey de Bacteriologia elas pertencem a Subseção IV e V (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). A classificação anterior à proposta por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) foi proposta por Anagnostidis e Komárek (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989), que classificavam as cianobactérias heterocitadas em Nostocales e Stigonematales. A ordem Nostocales era composta pelas cianobactérias com ramificação falsa ou sem ramificação e a ordem Stigonematales pelas cianobactérias com ramificação verdadeira. As análises filogenéticas mostraram que os representantes de ambas as ordens formam agrupamento monofilético e foram unidos em uma única ordem, ou seja, Nostocales (GUGGER; HOFFMANN, 2004; HOFFMANN, KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). As cianobactérias dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon* formam ramificações verdadeiras, mas apresentam dificuldade na sua classificação devido à instabilidade dos caracteres morfológicos. Kaštovský e Johansen (2008) sugerem que as cianobactérias termais com ramificação verdadeira sejam classificadas dentro do gênero *Mastigocladus* e que seja realizada uma revisão para as linhagens dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon* originadas de ambientes aquáticos e terrestres não termais. Os principais caracteres diacríticos utilizados para diferenciar esses dois gêneros são a presença de tricoma multisseriado e diferenciação entre tricoma e ramificação em *Fischerella*, e tricoma unisseriado e sem diferenciação entre tricoma e ramificação em *Hapalosiphon* (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990). No entanto, as análises filogenéticas mostram que alguns morfotipos de ambos os gêneros estão posicionados dentro de um mesmo clado (GUGGER; HOFFMANN, 2004).

As cianobactérias são conhecidas por sintetizarem uma grande variedade de metabólitos secundários que apresentam potencial farmacêutico, nutricional, agrícola e outras aplicações (BARRIOS-LLERENA; BURJA; WRIGHT, 2007). Há um interesse crescente por

parte das indústrias farmacêuticas e agroquímicas na busca de novas substâncias. Linhagens do gênero *Fischerella* são conhecidas pela produção de substâncias bioativas como o hapalindol T que apresenta atividade contra as bactérias patogências *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* (ASTHANA et al., 2006). A maioria dos metabólitos bioativos isolados das cianobactérias são sintetizados pelas enzimas policetídeos sintases (PKS), peptídeos sintetases não ribossômicas (PS) ou um híbrido das duas (PS/PKS). A síntese não ribossômica de peptídeos é uma rota alternativa da síntese de peptídeos de baixo massa molecular altamente especializados, com diversas estruturas e grande espectro de atividade biológica (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). A hepatotoxina microcistina também é sintetizada pela via não ribossômica. Os agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de microcistina foram sequenciados e caracterizados para os gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (TILLETT et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004). As microcistinas produzidas por esses gêneros são sintetizadas por PSs, PKSs e enzimas envolvidas no acabamento, finalização (*tailoring enzymes*) e no transporte da toxina. A identificação do agrupamento gênico tem sido utilizada para inferências evolutivas e para análise da biossíntese de microcistina entre as cianobactérias e tem servido como base para os métodos de detecção de cianobactérias tóxicas usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Recentemente, uma linhagem brasileira de *Fischerella* sp. (CENA161) produtora da microcistina-LR foi caracterizada molecularmente e a sequência de um gene envolvido na síntese de microcistina foi sequenciado (FIORE et al., 2009).

No presente estudo, linhagens dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon* isoladas de ambientes tropicais brasileiros foram caracterizadas por meio de análises morfológicas e análises filogenéticas dos genes de RNAr 16S, *rpoC1*, *rbcLX*, *tufA* e *cpcBA*-IGS. A produção de substâncias bioativas por essas linhagens foi avaliada usando bioensaios e espectrometria de massas. O isolado *Fischerella* sp. CENA161 foi avaliado mais detalhadamente, buscando identificar as variantes de microcistinas produzidas e os genes envolvidos na sua biossíntese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cianobactérias

As cianobactérias são os únicos organismos capazes de realizar fotossíntese oxigênica e fixação de nitrogênio atmosférico simultaneamente. Globalmente, a fixação de CO_2 é o mais importante processo, seguido pela fixação de N_2. Acredita-se que as cianobactérias foram os primeiros fotoautotróficos oxigênicos a emergirem na atmosfera primitiva da Terra, contribuindo para a mudança do meio anaeróbico para o aeróbico. A origem antiga, calculada em mais de 3,5 bilhões de anos (SCHOPF; WALTER, 1982), e a grande diversidade metabólica possibilitaram sua adaptação às mais diversas condições ambientais e habitats. A possível origem dos cloroplastos tem sido atribuída às cianobactérias por meio do processo de endossimbiose (MARGULIS, 1970).

A fotossíntese oxigênica 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. Algumas espécies são heterotróficas facultativas, podendo crescer no escuro na presença de certos substratos orgânicos (STAL; MOEZELAAR, 1997; SMITH, 1983) e outras podem crescer sob condições anaeróbicas, utilizando o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986). Já a fixação de nitrogênio ocorre em células diferenciadas, denominadas heterócitos (WOLK; ERNST; ELHAI, 1994; GOLDEN; YOON, 2003; THIEL, 2004), que possuem um envoltório celular espesso que evita a entrada de O_2 capaz de inativar a enzima nitrogenase, ou em células especializadas, os diazocitos (BERMAN-FRANK et al., 2001). Em algumas linhagens de cianobactérias filamentosas, a fixação de nitrogênio ocorre em células vegetativas em condições anóxicas e em várias linhagens unicelulares a fixação de nitrogênio ocorre no escuro (FAY, 1992; GALLON, 1992). As cianobactérias podem desenvolver outras células especializadas que auxiliam na adaptação em diversos ambientes, como os acinetos, células mais resistentes que desempenham o papel de “esporos” (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 (filamentos modificados) atua como elemento de dispersão e infecção no estabelecimento da associação cianobionte-hospedeiro (FIORE; HONDA, 2008). Os aerótopos (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).

Ecologicamente, as cianobactérias estão situadas na base da cadeia alimentar nos ecossistemas (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973) e colonizam diferentes locais, dentre eles ambientes de água doce, salobra e marinha, podendo também ser encontradas em locais sob condições extremas, como areias e rochas de desertos, águas termais (*hot springs*), lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1976; SKULBERG, 1995; DOR; DANIN, 1996; WHITTON; POTTS, 2000). No meio ambiente estão presentes em vida livre, nas florações planctônicas ou densas turfas, ou associação com outros organismos como plantas, fungos, algas e bactérias formando liquens e mantos microbianos (STAL, 1995; OLIVER; GANF, 2000; STENROOS et al., 2006; FIORE; HONDA, 2008). Elas podem também ser encontradas em solos e ambientes aerofíticos, tais como troncos e folhas de árvores e rochas (WHITTON, 2000; AGUIAR et al., 2008; BRANCO et al., 2009).

2.2 Taxonomia de cianobactérias

A sistemática das cianobactérias atualmente envolve duas escolas, a tradicional botânica e a bacteriológica, representadas, respectivamente, pelos Sistemas de Classificação propostos por Anagnostidis e Komárek (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989, 1999, 2005) e Boone, Castenholz e Garrity (2001). Devido ao seu aparato fotossintético semelhante ao das plantas, as cianobactérias foram inicialmente classificadas junto às algas e chamadas de algas verde-azuladas ou cianofíceas (STANIER et al., 1971). Iniciada no século XIX pelos trabalhos de levantamento de biodiversidade, a sistemática botânica tem sido baseada nas descrições fenotípicas, incluindo a morfologia da célula e bainha, formação de colônia, pigmentação, modo de reprodução, fisiologia e bioquímica. Assim, cada espécie é descrita segundo as normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica, incluindo a descrição do material tipo em latim e sua inclusão em coleção de herbário. Thuret (1875), Gomont (1892) e Bornet e Flahaut (1886a,b, 1887, 1888) foram os primeiros a usar esse enfoque na taxonomia das famílias Oscilatoriaceae, Nostocaceae e Stigonemataceae. Desde então, mais de 1.300 espécies de

cianobactérias foram descritas utilizando o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (GEITLER, 1932).

Após a confirmação da origem procariótica das cianobactérias, a sistemática destes organismos recebeu um enfoque bacteriológico proposto inicialmente por Stainer et al. (1978), com base nos estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares (STANIER et al, 1971; WOESE et al., 1975; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; BONEN; DOOLITLE, 1978). Nesses estudos ficou evidente 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. Diferentemente do enfoque botânico, o material em cultivo, mantido em coleção de cultura como linhagem referência, passou a ser pré-requisito para descrição dos gêneros de cianobactérias. Isso pode ser verificado na tentativa de designar linhagem referência para cada gênero-forma dentro do Filo Cyanobacteria na última atualização do Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). O gene *rrs* que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (RNAr 16S) tem provado ser um marcador útil para investigar as relações filogenéticas e é mais comumente utilizado para diferenciação em nível de gênero. Apesar dos esforços dos cianobacteriologistas em gerar informações, ainda são poucas as cianobactérias caracterizadas e publicadas validamente sob o Código de Nomenclatura Bacteriológica (CASTENHOLZ, 2001).

Na sistemática atual, o Filo Cyanobacteria pertencente ao domínio *Bacteria* (BOONE, CASTENHOLZ, GARRITY, 2001) é caracterizado com base no enfoque da taxonomia polifásica, cujo objetivo é integrar de forma consensual informações genotípicas, fenotípicas e filogenéticas (VANDAMME et al., 1996). Assim, devido ao aumento de informações taxonômicas das cianobactérias gerados pelas técnicas modernas como o sequenciamento genético, ultraestrutura e caracterização ecofisiológica, uma série de revisões da taxonomia em cianobactéria está sendo realizada, principalmente pelos autores da escola botânica (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Esse sistema é baseado principalmente em critérios taxonômicos botânicos, mas tentando integrar caracteres bioquímicos, ultraestruturais e moleculares, e sempre que possível de culturas isoladas. 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). As informações sobre os diferentes gêneros estão disponíveis em um banco de dados (KOMÁREK, J.; HAUER, 2004) disponível na internet. A

Tabela 1 mostra comparativamente o Sistema de Classificação Bacteriológico (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001) e o sistema proposto por Komárek e Anagnostidis (1989, 1999, 2005) e Anagnostidis e Komárek (1985, 1990) que reuniu informações morfológicas com ultraestrutura e fisiologia, e o sistema mais recente proposto por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) que agrupam todas as informações possíveis, incluindo as moleculares.

Tabela 1 – Classificação das cianobactérias de acordo com os sistemas bacteriológico e botânico (modificado de RAJANIEMI-WACKLIN, 2006)

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 Kaštovský** (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005)
Subseção I (Chroococcales): unicelular ou colonial, divisão por fissão binária em 1 a 3 planos ou por *budding* Ex: Gênero-Forma *Gloeobacter, Microcystis* **Subseção II (Pleurocapsales):** unicelular ou colonial, divisão por fissão múltipla ou em conjunto com fissão binária Ex: Subgrupo I - *Cyanocystis*	**Chroococcales:** unicelular ou colonial Ex: Família Gloeobacteraceae *Gloeobacter* Família Synechococcaceae *Aphanothece* Família Microcystaceae *Microcystis*	**Gloeobacterales:** cocóide, sem tilacóides Família Gloeobacteraceae **Synechococcales:** tilacóides paralelos à superfície da célula, unicelular ou colonial Ex: Famílias Synechococcaceae *Aphanotece* **Chroococcales:** arranjo radial dos tilacóides, unicelular ou colonial Ex: Família Microcystaceae *Microcystis*
Subseção III (Oscillatoriales): filamentoso, não heterocitado Ex: Gênero-Forma *Geitlerinema, Planktothrix*	**Oscillatoriales:** filamentoso, não heterocitado Ex:Família Pseudanabaenaceae *Geitlerinema* Família Phormidiaceae *Arthrospira, Phormidium, Planktothrix*	**Oscillatoriales:** arranjo radial dos tilacóides, filamentos largos Ex: Família Phormidiaceae *Planktothrix* **Pseudoanabaenales:** tilacóides paralelos à superfície da célula, filamentos finos Ex: Família Pseudanabaenaceae *Geitlerinema*
Subseção IV (Nostocales): filamentoso, heterocitado, não ramificado Ex: SubgrupoI Gênero-Forma *Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Nodularia, Nostoc,* Subgrupo II Gênero-Forma*, Microchaete, Rivularia*	**Nostocales:** filamentoso, heterocitado, acinetos, ramificação falsa Ex: Família Microchaetaceae *Microchaete* Família Rivulariaceae *Rivularia* Família Nostocaceae Subfamília Anabaenoideae *Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis* Subfamília Nostocoideae *Nodularia, Nostoc*	**Nostocales:** filamentoso, heterocitado Ex: Família Symphyonemataceae *Mastigocladopsis, Symphyonemopsis, Symphyonema, Umezakia* Família Rivulariaceae *Rivularia* Família Microchaetaceae *Microchaete* Família Nostocaceae *Anabaena*, *Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Nodularia, Nostoc*
Subseção V (Stigonematales): filamentoso, heterocitado, ramificado Ex: Gênero-Forma *Chlorogloeopsis, Fischerella, Westiella*	**Stigonematales:** filamentoso. heterocitado, acinetos, ramificação verdadeira Ex: Família Chlorogloeopsaceae *Chlorogloeopsis* Família Fischerellaceae *Fischerella, Westiellopsis* Família Mastigocladaceae *Hapalosiphon,, Mastigocladus*	Família Chlorogloeopsidaceae *Chlorogloeopsis* Família Hapalosiphonaceae *Fischerella, Hapalosiphon, Mastigocladus, Westiellopsis,*

2.2.1. Ordem Stigonematales

As espécies da Ordem Stigonematales pelo código botânico ou subseção V pelo código bacteriológico, estão distribuídas ao redor do mundo, mas principalmente em ambientes mais raros e restritos (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990), como as águas termais. Como poucas cianobactérias com ramificação verdadeira foram estudadas de acordo com o sistema bacteriológico, somente seis gêneros foram incluídos na subseção V do Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey (HOFFMANN; CASTENHOLZ, 2001). A ordem Stigonematales, segundo o Sistema de Classificação Botânico, compreende 48 gêneros, muitos ainda não bem definidos, e estão classificados dentro de oito famílias (Tabela 2) (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990). A mudança de família dos gêneros antes considerados da ordem Stigonematales no Sistema de Classificação Botânico proposto por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) está apresentada na Tabela 2.

Morfologicamente, as linhagens que eram consideradas da ordem Stigonematales são muito diferenciadas e caracterizadas pela presença de heterócito e ramificação verdadeira. As principais características diacríticas usadas na classificação taxonômica são: tipo de ramificação (unisseriado/bisseriado/multisseriado); plano de divisão (longitudinal/oblíquo/perpendicular); bainha mucilaginosa; ramificação verdadeira (regular/não regular/lateralmente irregular); heterócito (geralmente presente); reprodução (hormogônio/hormocito); e eventualmente acinetos (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990). Na Tabela 3 observam-se as características morfológicas diacríticas utilizadas na classificação em nível de família, mas os gêneros são heterogêneos e tais características não estão tão bem definidas. Em nível específico, os principais critérios para a classificação são tamanho da célula, largura e comprimento do tricoma, tipo de ramificações - primária e secundária - unisseriado, bisseriado e multisseriado, diâmetro dos filamentos, tipo de bainha e tamanho do hormocisto (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990).

Tabela 2 - Classificação dos gêneros dentro de família da ordem Stigonematales/Nostocales e subseção V, segundo o sistema de classificação de Anagnostidis e Komárek (1990), da ordem Nostocales, segundo o sistema de Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005) e subseçãoV de Hoffmann e Castenholz (2001) .

Classificação pelo Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (HOFFMANN; CASTENHOLZ, 2001)	**Classificação por Komárek e Anagnostidis** (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK ,1985, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; 1999; 2005)	**Classificação por Hoffmann, Komárek e Kaštovský** (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005)
Subseção V	**Stigonematales**	**Nostocales**
Gênero-Forma I: *Chlorogloeopsis*	Família Chlorogloeopsaceae *Chlorogloeopsis, Heterocyanococcus*	Família Chlorogloeopsidaceae *Chlorogloeopsis, Heterocyanococcus*
Gênero-Forma II: *Fischerella*	Família Fischerellaceae *Doliocatella, Fischerella, Fischerellopsis, Leptopogon, Parthasarathiella, Westiellopsis* Família Mastigocladaceae *Hapalosiphon, Mastigocladus* Família Mastigocladaceae Sub-Família Mastigocladoideae *Adrianema, Chondrogloea, Hapalosiphon, Mastigocladus, Symphyonema, Thalpophila, Umezakia, Voukiella, Westiella*	Família Hapalosiphonaceae *Albrightia, Baradlaia*, Brachytrichiopsis, Chondrogloea, Fischerella, Fischerellopsis, Hapalosiphon, Leptopogon, Loefgrenia, Mastigocladus, Mastigocoleopsis, Mastigocoleus, Matteia, Nostochopsis, Parthasarathiella, Thalpophila, Westiella, Westiellopsis*
	Família Borzinemataceae *Borzinema, Handeliella, Schmidleinema, Seguenzaea, Spelaeopogon*	Família Borzinemataceae *Borzinema, Handeliella, Schmidleinema, Seguenzaea, Spelaeopogon*
Gênero-Forma III: *Geitleria*	Família Loriellaceae *Albrightia, Brachytrichiopsis, Colteronema, Geitleria, Loefgrenia, Loriella, Mastigocoleopsis Matteia*	Família Loriellaceae *Colteronema, Geitleria, Hyphomorpha, Loriella*
Gênero-Forma IV: *Lyengariella*	Família Mastigocladaceae Sub-Família Brachytrichioideae *Brachytrichia, Herpyzonema, Lyengariella, Parenchymorpha, Symphyonemopsis*	Família Symphyonemataceae *Adrianema, Brachytrichia, Herpyzonema, Lyengariella, Mastigocladopsis, Parenchymorpha, Symphyonema, Symphyonemopsis, Umezakia, Voukiella*
Gênero-Forma V: *Nostochopsis*	Família Nostochopsaceae *Nostochopsis* Família Nostochopsaceae *Baradlaia, Mastigocladopsis, Mastigocoleus, Nostochopsis*	
Gênero-Forma VI: *Stigonema*	Família Stigonemataceae *Homoeoptyche, Pulvinularia, Stigonema* Família Capsosiraceae *Capsosira, Desmosiphon, Hyphomorpha, Letestuinema, Nematoplaca, Stauromatonema*	Família Stigonemataceae *Capsosira, Desmosiphon, Doliocatella, Homoeoptyche, Letestuinema, Nematoplaca, Pulvinularia, Stauromatonema, Stigonema*

*ALGAEBASE

Tabela 3 - Principais características diacríticas das famílias da ordem Stigonematales (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990).

Característica		Família							
		(1) Chlorogloeopsaceae	(2) Capsosiraceae	(3) Stigonemataceae	(4) Fischerellaceae	(5) Borzinemataceae	(6) Loriellaceae	(7) Nostochopsaceae	(8) Mastigocladaceae
Diferenciação no tricoma principal e secundário (Heterotriquia)		-	-	+	+	+	-	-	-
Tricoma multisseriado		+ (pequena, irregular)	+	+	+	+	- (unisseriada)	- (unisseriada)	- (unisseriada)
Ramificações multisseriadas				+	-	-			
Morfologia do tricoma		Cilíndrico, irregular, moniliforme	Irregular, moniliforme	± moniliforme	± moniliforme	moniliforme	Moniliforme, cilíndrico	± cilíndrico	Moniliforme ou cilíndrico
Morfologia das ramificações secundárias				Moniliforme (cilíndrico)	Moniliforme até cilíndrico	cilíndrico			
Reprodução	Monócitos		+		(+)				
	Hormocitos			+	+	+			+
	Hormogônio	+		+	+	+	+	+	+
Heterócito	Terminal	+						(+)	
	Intercalar	+	(+)	(+)	(+)	+	(+)		(+)
	Lateral							+	
	Ausente		(+)	(+)	(+)		(+)		(+)
Ramificação	Irregular	+	+	+					
	Lateral	+	+	+	+	+	(+)	+	+
	Pseudo		+	+	(+)		+	(+)	(+)
	Reverso				(+)		(+)	(+)	+
Célula apical afilada		-	-	-	-	-	(+)	-	(+)

Segundo Anagnostidis e Komárek (1990), os principais problemas relacionados à identificação das Stigonematales estão relacionados aos critérios taxonômicos, estabelecidos há mais de um século, e da instabilidade dos caracteres (por exemplo, presença de ramificação verdadeira no tricoma). Além disso, a tipificação das espécies é difícil devido ao seu baixo número conhecido, a variação das características não está clara e há certa dificuldade em cultivar essas linhagens em laboratório. Por serem encontradas mais facilmente em ambientes restritos, poucas espécies foram revisadas não havendo muitos dados literários como os que existem para os outros grupos.

O talo dos representantes de Stigonematales é geralmente composto por um ramo principal e ramificações secundárias eretas. A célula no ponto de ramificação está em contato com outras três diferentes células, exibindo um alto grau de complexidade morfológica e diferenciação dentro das cianobactérias. Há três principais tipos de ramificação verdadeira, chamados tipo –T, -V e –Y (Figura 1). A ramificação tipo-T é formada pela ramificação perpendicular às células do ramo principal, originada pela mudança do plano de divisão de transversal para longitudinal. Ramificações em –V consistem em uma bifurcação dicotômica ou pseudodicotômica originada de uma mudança do plano de divisão no tricoma ou perto dele. Ramificação verdadeira em –Y surge a partir do deslocamento de uma célula intercalar de um ponto do ramo envolta por crescimento meristemático. Algumas vezes a ramificação falsa também pode ser concomitantemente observada em alguns gêneros. Além disso, a posição do heterócito pode ser terminal, lateral (séssil ou pedicelado) ou intercalar (ANAGNOSTIDIS; KOMAREK, 1990).

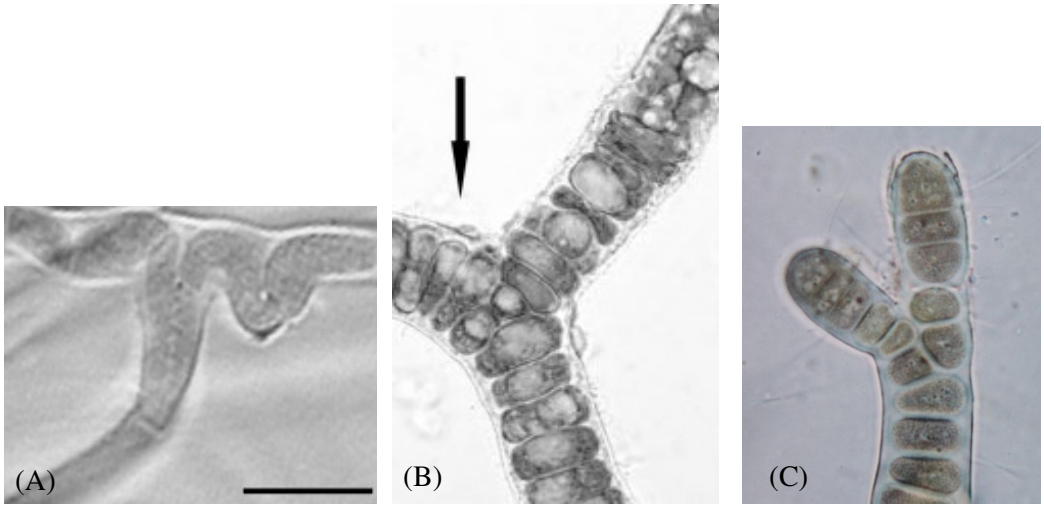


Figura 1 - Tipos de ramificações verdadeiras. (A) Tipo-Y em *Symphyonema* sp. 1517; (B) Tipo-T em *Stigonema ocellatum* SAG 48.90; (C) Tipo-V em representante de Capsosiraceae. A e B retirado de Gugger e Hoffmann (2004) e C Luis Henrique Branco (Disponível em: http://galerie.sinicearasy.cz/galerie).

Segundo a classificação sugerida por Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005), estudos moleculares baseados nos genes de RNAr 16S, *nifH*, *gyrB*, *rpoC1* e *rpoD1* suportam a monofilia das cianobactérias heterocitadas (Nostocales e Stigonematales), ou seja, todas as cianobactérias heterocitadas possuem um ancestral em comum e foram classificadas na ordem Nostocales. Dados também foram corroborados pela análise do tipo de arranjo dos tilacóides (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Gugger e Hoffmann (2004), por meio de análises moleculares, também mostraram que a divisão entre Nostocales e Stigonematales parece não ser válida, demonstrando uma tendência à divisão dos grupos por presença e tipo de ramificação.

2.3 Sistemática molecular de cianobactérias

A bacteriologia tem utilizado a região da subunidade 16S do RNAr para a maioria dos estudos de inferências filogenéticas, sendo que similaridade acima de 97% entre os genes *rrs* indica que as linhagens pertencem a uma mesma espécie (VANDAMME et al., 1996). Porém, quando se estuda um grupo com filogenia problemática, a utilização de outros genes, é recomendada. Em cianobactérias os genes que também têm sido utilizados para análises filogenéticas são: *cpcBA*, *gyrB*, *hetR*, *rbcLX*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoD1* e *tufA* (NEILAN;JACOBS; GOODMAN, 1995; JANSON; GRANÉLI, 2002; SEO; YOKOTA, 2003; RAJANIEMI-WACKLIN et al., 2005; FEWER et al., 2007; HALINEN et al., 2008; HAN; FAN; HU, 2009).

2.3.1 Genes utilizados para detecção de cianobactérias

2.3.1.1 Subunidade 16S do RNAr

Normalmente, utiliza-se o gene *rrs* que codifica para a subunidade 16S do RNAr (RNAr 16S) como marcador genético para inferir relações ficogenéticas e identificar bactérias. 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; 2005b). Essas correlações

suportam a robustez da filogenia bacteriana baseada no gene da RNAr 16S (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005b). O gene de RNAr 16S tem uma distribuição universal entre os procariotos, consistência funcional, regiões variáveis e conservadas, tamanho grande e conteúdo de informação alto – características para ser um bom marcador genético (WOESE, 1987; LUDWIG; KLENK, 2001). Além disso, as sequências do gene de RNAr 16S são relativamente fáceis de se alinhar, e contém grande banco de dados (mais de 6.000 sequências de cianobactérias), permitindo a comparação entre linhagens (LUDWIG; KLENK, 2001). Tem sido sugerido que genes conservados como o de RNAr 16S são recalcitrantes para a transferência na natureza, e assim o impacto da transferência lateral de genes sobre a filogenia baseada nesses genes é limitada (DOOLITTLE 1999; PHILIPPE; DOUADY, 2003; WOESE 2004; COENYE et al., 2005). Contudo, o poder de resolução do gene de RNAr 16S é até nível intragenérico ou acima (STALEY, 2006). Além disso, o genoma cianobacteriano pode conter 5 cópias do gene de RNAr 16S (ITEMAN et al., 2002; RAJANIEMI-WACKLIN et al., 2005). A análise filogenética usando a subunidade 16S do RNAr é uma ferramenta robusta, mas pode não refletir a evolução do genoma inteiro de cada organismo (SEO; YOKOTA, 2003), assim existe a necessidade de utilizar outros loci do genoma.

2.3.1.2 RuBisCO (*rbcLXS*)

A ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (RuBisCO) catalisa o primeiro passo na fixação do carbono presente na atmosfera. Esta enzima é transcrita por três genes, representados pela subunidade maior mais conservada (*rbcL*) e pela subunidade menor com região menos conservada (*rbcS*) e o gene *rbcX,* entre os genes *rbcL* e *rbcS*, com função similar a uma chaperonina (EMLYN-JONES et al., 2006). Um estudo incluindo plantas terrestres, algas vermelhas e marrons, diatomácias, euglenas e cianobactérias, encontrou evidências para seleção positiva no *rbcL* de plantas terrestres, mas não para as algas e cianobactérias (KAPRALOV, 2007). Acredita-se que a seleção positiva do *rbcL* que ocorre nas plantas terrestres é um fenômeno comum que seria explicado pelas condições mais estáveis encontradas nos ambientes aquáticos comparados aos terrestres, por isso as cianobactérias, algas e plantas aquáticas apresentaram uma seleção positiva menos proeminente neste estudo (KAPRALOV, 2007).

Mes et al. (2006) mostrou que o gene *rbcX* está sob seleção positiva, e não foram encontradas evidências do tipo de evolução para o gene *rbcL.* Outro estudo relata que as

substituições para o gene *rbcL* são na maioria sinônimas, ou seja, não resultam em mudanças de aminoácidos, e para o gene *rbcX*, é relativamente alta a taxa de substituição não-sinônima (HAN; FAN; HU, 2009). Assim, o gene *rbcL* estaria sob seleção negativa, na qual as mutações sinônimas são favorecidas, e o gene *rbcX* sob seleção positiva, na qual as novas mutações não sinônimas são mantidas. No entanto, os genes *rbcLX* devem ser utilizados com cuidado para inferências filogenéticas porque foram detectados eventos de recombinação nesses genes (HAN; FAN; HU, 2009).

Rudi, Skulberg e Jacobsen (1998) encontraram similaridade nas sequências do gene *rbcX* dentro dos grupos *Microcystis*, *Planktothrix*, *Tychonema* e *Nostoc*, mas não entre eles, o que suporta a teoria de que o gene *rbcX* está sob alta frequência de transferência de material genético, comparado ao de RNAr 16S. Teoria também suportada pelo fato do gene de RNAr 16S ter várias cópias e interagir macromolecularmente, assim ele é mais resistente à mudanças do gene do que um operon (*rbcLXS*) sozinho.

2.3.1.3 *rpoC1*

O gene *rpoC1*, que codifica para a subunidade γ da RNA polimerase dependente de DNA, possui apenas uma cópia, corresponde à porção amino-terminal da subunidade β´ (BERGSLAND; HASELKORN, 1991; SEO; YOKOTA, 2003), e é mais comum na RNA polimerase de cianobactérias. Em 1991, Palenik e Haselkon sugeriram a utilização do gene *rpoC1* como ferramenta para auxiliar o de RNAr 16S no esclarecimento das relações filogenéticas de linhagens de cianobactérias distantemente relacionadas. Porém, esse gene tem sido utilizado para discriminar espécies (PALENIK; HASELKORN, 1992; WILSON et al., 2000; SEO; YOKOTA, 2003). O gene *rpoC1* é considerado altamente conservado, sendo a maioria das substituições de bases sinônimas. (SEO; YOKOTA, 2003, 2003; MES et al., 2006; HAN; FAN; HU, 2009).

2.3.1.4 *tufA*

O gene *tufA* codifica o fator de elongação Tu (EF-Tu), essencial na síntese de proteínas, responsável pela ligação do aminoacil-tRNA ao ribossomo. Este gene é um bom

candidato para estudos filogenéticos porque é universal nos organismos, sendo relativamente conservado, com estrutura e função conhecidas (DELWICHE; KUHSEL; PALMER, 1995).

2.3.1.5 Ficocianina (*cpcBA*)

O aparato fotossintético de uma cianobactéria contém a clorofila *a* e pigmentos acessórios específicos (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina). A ficocianina e ficobiliproteínas são as principais antenas captadoras de luz no fotossistema de cianobactérias, rodofíceas e criptofíceas (BRYANT, 1982; GLAZER 1989; ERNST, 1991; APT; COLLIER; GROSSMAN, 1995; GLAZER; WEDEMAYER 1995). Os gene *cpcA* e *cpcB* estão envolvidos na codificação das cadeias da ficocianina, C-PC α e C-PC β respectivamente. A expressão desses genes é regulada pela luz, no qual baixa intensidade de luz estimula a síntese de ficocianina e outros pigmentos e alta intensidade inibe a síntese (ERIKSEN, 2008). O espaço intergênico (IGS) situado entre os dois genes *cpcB* e *cpcA* do operon da ficocianina é uma região altamente variável e, portanto, útil na identificação de cianobactérias em nível de linhagem (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). Acinas et al. (2009) sugerem que a heterogeneidade e variabilidade no comprimento das sequências IGS revelam um padrão geográfico na árvore filogenética. Estudos baseados na região *cpcBA*-IGS comprovam sua utilidade em estudos filogenéticos entre grupos próximos e em estudos de diversidade (ROBERTSON; TEZUKA; WATANABE, 2001; KIM et al., 2006; ACINAS et al., 2009).

2.3.2 Análise filogenéticas

As análises filogenéticas são usadas para estimar as relações evolutivas das bactérias. As análises de sequências geralmente incluem alinhamento das sequências, construção de árvore filogenética e teste de confiança da construção da árvore, por exemplo, utilizando reamostragem (LUDWIG; KLENK, 2001). No alinhamento, as sequências de diferentes linhagens são organizadas pela inserção de *gaps* assim que posições homólogas das sequências são localizadas na mesma coluna na matriz de dados (ClustalW, THOMPSON; HIGGINS, GIBSON, 1994). As relações das sequências alinhadas são geralmente mostradas como uma árvore em que o tipo de ramificação da árvore (topologia) exibe as relações filogenéticas das linhagens (NEI; KURMAR, 2000).

Os métodos de construção de árvores mais comumente utilizados são os de distância, máxima parsimônia (MP- *Maximum Parsimony*) e máxima verossimilhança (MV- *Maximum Likelihood*) (NEI; KURMAR, 2000; LUDWIG; KLENK 2001). Nos métodos de distância, como o *neighbor joining* (NJ) de Saitou e Nei (1987), as distâncias evolutivas são computadas para todos os pares de táxons analisados (*pairwise*) e uma árvore filogenética é construída considerando as relações entre esses valores de distância (NEI; KURMAR, 2000). O NJ é baseado no princípio da evolução mínima, e não examina todas as topologias de árvore possíveis, sendo um método rápido para a construção de árvores filogenéticas e pode ser utilizado para analisar uma ampla gama de dados (NEI; KURMAR, 2000).

O método de máxima parsimônia (MP) foi inicialmente desenvolvido para caracteres morfológicos, mas Eck e Dayhoff, em1966, foram os primeiros a utilizarem com sequências de aminoácidos (NEI; KURMAR, 2000). Nesse método, quatro ou mais sequências de nucleotídeos são alinhadas e a sequência do táxon ancestral é inferida separadamente para cada sítio fornecendo uma topologia, sugerindo que mudanças mutacionais podem ocorrer em todas as direções. Assim, aceita-se que o menor número de substituições nucleotídicas (ou aminoácidos) pode explicar melhor o processo evolutivo. A topologia da árvore pode ser explicada com um número mínimo de transformações de um único estado de caráter para outro (NEI; KURMAR, 2000). O método de MP é uma boa escolha quando não há substituições *backward* e paralelas e o número de nucleotídeos é alto. Porém, o que geralmente ocorre é o inverso.

No método de máxima verossimilhança (MV) os parâmetros utilizados não são as topologias, mas os comprimentos dos ramos para cada topologia. A MV pode ser utilizada para estimar valores de recombinação e frequência alélica em populações. O problema desse método é a reconstrução da topologia, sendo escolhida a topologia com maior valor MV, pressupondo que a melhor suposição para estimar o comprimento dos ramos é a melhor árvore filogenética. Porém, é o método que estima a probabilidade da topologia da árvore, construída com base no modelo de evolução fornecido, ser a verdadeira (NEI; KURMAR, 2000).

Os métodos de MP e MV analisam todas as possíveis topologias para encontrar a melhor árvore, e conforme maior o número amostral, maior a quantidade de topologias a serem analisadas e maior a dificuldade para o método. NJ e MV são os métodos que melhor

estimam o comprimento dos ramos, diferentemente da MP que tende a subestimar este parâmetro.

No entanto, o melhor critério para definir o melhor método de construção de árvore é a probabilidade de se obter a topologia verdadeira, o que requer o conhecimento da melhor árvore. Conhecimento que apenas pode ser simulado em computadores.

2.3.2.1 MLST e MLSA

A análise multilocus de tipificação (MLST- *Multilocus Sequence Typing*) é um procedimento utilizado para caracterizar isolados de espécies bacterianas usando sequências concatenadas de fragmentos internos de genes essenciais à manutenção dos microrganismos (constitutivos), livres de pressão seletiva vigorosa, e que devam estar espalhados ao redor do cromossomo, refletindo toda a evolução do genoma (MAIDEN et al., 1998). Este método tem a vantagem de minimizar as consequências de uma recombinação local que pode afetar as verdadeiras relações filogenéticas, o que ocorre quando a filogenia é baseada em um ou poucos genes (HANAGE et al., 2005).

Tanabe, Kasai e Watanabe (2007) utilizaram o MLST com sete locus de genes constitutivos para caracterizar 164 isolados de *M. aeruginosa*, mostrando a alta diversidade genética na espécie. Teoricamente, alta diversidade genética não é esperada em organismos clonais como as bactérias (TANABE; KASAI; WATANABE, 2007). Para explicar a alta variação genética em *M. aeruginosa* sugere-se que a espécie contenha ecotipos, ou seja, várias populações distintas ecologicamente. Assim, a alta divergência ecológica é acompanhada por alta divergência genética, se mais ecotipos existem dentro de uma espécie, então alta diversidade genética é mantida dentro dela. Os resultados de Tanabe, Kasai e Watanabe (2007) sugerem que a recombinação é uma importante força evolutiva para a geração e mantém a diversidade genética em *M. aeruginosa*. Análises filogenéticas dos genes individualmente utilizados para o MLST geralmente falharam nas relações filogenéticas. A pior resolução possivelmente é devido ao pouco sinal filogenético dentro das sequências de genes individuais, demonstrando a melhor resolução do MLST também utilizado para distinguir linhagens tóxicas de não-tóxicas.

Uma alternativa ao MLST, que geralmente envolve o sequenciamento de sete genes (MAIDEN, 2006) buscando resolver as incongruências em nível infraespecífico é o MLSA

(*Multilocus Sequence Analysis*). O MLSA e o genoma são os melhores métodos para classificação de bactérias, desde Domínio à subespécie (Tabela 4). No MLSA as sequências dos genes são concatenadas e utilizadas para diferenciação em níveis genérico ou supragenérico (GEVERS et al., 2005). A análise concatenada dos genes de RNAr 16S, *rpoC1*, *rpoB*, *tufA* e *rbcL* (3586 pb) demonstrou que a topologia da árvore filogenética apresentada era a mesma dos genes da microcistina *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* concatenados, diferenciando bem as linhagens testadas (FEWER et al., 2007). As técnicas de análise em multilocus (MLST/MLSA) representam ferramentas importantes para diferenciação de bactérias, e buscam minimizar os problemas de diferentes trajetórias evolutivas dos genes e da não evolução clonal nas populações (TABOADA et al., 2008).

Tabela 4 - Sensibilidade para discriminar táxons de técnicas usadas na classificação de *Bacteria* e *Archaea* (STALEY, 2006).

Taxon	Propriedades fenotípicas	Sequência de RNAr 16S	Hibridização DNA-DNA	Genoma	MLSA
Domínio	+	+	-	+	+
Reino	+	+	-	+	+
Filo	+	+	-	+	+
Classe	+	+	-	+	+
Ordem	+	+	-	+	+
Família	+	+	-	+	+
Gênero	+	±	±	+	+
Espécie	+	-	+	+	+
Subespécie	±	-	-	+	+

+ sensível, ± mais ou menos sensível, – insensível

2.4 Metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias

2.4.1 Síntese de enzimas pela via não-ribossômica

Há um grande interesse no estudo das cianobactérias como fonte de metabólitos secundários, entre eles, lipopetídeos lineares e cíclicos, ácidos graxos, alcalóides e outras

substâncias químicas orgânicas (BARRIOS-LLERENA; BURJA; WRIGHT, 2007). Muitos destes possuem potencial farmacêutico, nutricional, agrícola e outras aplicações (BARRIOS-LLERENA; BURJA; WRIGHT, 2007). A maioria dos metabólitos bioativos isolados das cianobactérias são sintetizados pelas policetídeo sintases (PKS), peptídeos sintetases não ribossômicas (PS) ou um híbrido dos dois (PS/PKS).

A síntese não ribossômica de peptídeos é uma rota alternativa da síntese de peptídeos de baixa massa molecular altamente especializados, com diversas estruturas e grande espectro de atividade biológica (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). Enquanto na via ribossômica de síntese de peptídeos e proteínas pode haver a incorporação de 21 aminoácidos proteinogênicos, na via não ribossômica há mais de 300 precursores conhecidos (KLEINKAUF et al., 1990), incluindo pseudo-, não-proteinogênico-, hidroxi-, N-metilado- e D-aminoácidos. A síntese de peptídeos não ribossômicos envolve um mecanismo multienzimático (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). As PSs e PKSs exigem a modificação pós-traducional para tornar-se cataliticamente ativas (PFEIFER et al., 1995; STACHELHAUS; SCHNEIDER; MARAHIEL, 1996; LAMBALOT et al., 1996).

As PKSs do tipo I e as PSs estão exclusivamente envolvidas na biossíntese de produtos naturais (NISHIZAWA et al., 2000; TILLETT et al., 2000). As PSs possuem uma estrutura modular, onde cada módulo funciona como um bloco responsável pela incorporação e/ou modificação de uma unidade de aminoácido. Os módulos, embora atuem independentemente, trabalham juntos durante a extensão do peptídeo. A ordem e número de módulos em uma PS definem a sequência e o comprimento do peptídeo sintetizado. Um típico módulo de PS consiste minimamente de um domínio de adenilação (A), responsável pela ativação do aminoácido; um domínio de tiolação (T) ou proteína carreadora de peptídeos (PCP), responsável pela tioesterificação do aminoácido ativado; e um domínio de condensação (C), responsável pela transpeptidação entre o peptidil e aminoacil tioésteres alinhados resultando na extensão da cadeia de peptídeo e água (VON DÖHREN et al., 1997; CANE; WALSH, 1999; KONZ; MARAHIEL, 1999). Os domínios de consensação estão localizados antes (*upstream*) da maioria dos domínios de adenilação internos e parecem estar associados com a reação de extenção do peptídeo. Domínios funcionais, como por exemplo, o de epimerização ou *N*-metilação, podem ser adicionados. As epimerases catalizam a inversão do composto – estereoquímico – ao redor do átomo de carbono assimétrico, em um substrato tendo mais de um centro de assimetria. A finalização da síntese do peptídeo não ribossômico é iniciada pela ação das tioesterases, pela transferência da cadeia do peptídeo para outro grupo

funcional ou pela ciclização (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). O domínio de adenilação e tiolação podem estar separados pelo domínio de *N*-metilação, que é capaz de ativar aminoácidos *N*-metilados (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997).

Já os policetídeos podem ser divididos em três classes. As PKSs do tipo I são enzimas multifuncionais, organizadas em módulos, responsável por um ciclo de extensão da cadeia e são representativas das PKSs cianobacterianas isoladas até hoje (STAUNTON; WEISSMAN, 2001). As PKSs do tipo II são complexos multienzimáticos cíclicos, tipicamente envolvidos na biossíntese de antibióticos aromáticos em outras bactérias. E as PKSs do tipo III são enzimas de condensação homodiméricas responsáveis pela variedade incomum de substâncias flavonóides e chalconas. As PKSs do tipo I contêm no mínimo três domínios por módulo, uma cetoacil sintase (KS), uma aciltransferase (AT) e uma proteína carreadora de acila (ACP), que seleciona, ativa e cataliza uma condensação de Claisen entre a unidade extensora e a cadeia policetídica, gerando um intermediário cetoacil-S-ACP. Domínios opcionais também podem ser encontrados entre a aciltransferase e a proteína carreadora de acila. A ordem dos módulos na PKS dita a sequência do evento biossintético, e a variação dos domínios dentro dos módulos reflete na diversidade estrutural observada nos produtos naturais resultantes (BARRIOS-LERENA; BURJA; WRIGHT, 2007).

Também podem ser encontradas enzimas híbridas de PS e PKS resultando em moléculas contendo elementos de ambas como, por exemplo, curacina A, microcistina e barbamida (DITTMANN et al., 1997; CHANG et al., 2002, 2004; NISHIZAWA et al., 2000; TILLETT et al., 2000).

2.4.2 Toxinas produzidas pelas cianobactérias (cianotoxinas)

As cianotoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas cianobactérias e podem ser classificadas em categorias que refletem seus efeitos biológicos nos sistemas e órgãos que eles afetam mais fortemente (CODD; MORRISON; METCALF, 2005). A Tabela 5, modificada de Funari e Testai (2008), mostra as principais informações sobre as cianotoxinas.

Tabela 5 - Cianobactérias produtoras de toxinas de ambiente de água doce, salobra e marinha. (Modificado de FUNARI; TESTAI, 2008; JAISWAL; SINGH; PRASANNA, 2008).

Cianotoxina	Efeitos	L_{50}	Principais cianobactérias produtoras
Microcistina	Hepatotoxinas. Inibe fosfatases (PP1 e PP2A)	50≥1200	Maioria das *Microcystis* spp e *Planktothrix* spp. Algumas *Anabaena*, *Nostoc, Synechocystis, Cyanobium bacillare*, *Arthrospira fusiformis, Limnothrix redekei, Phormidium formosum, Hapalosiphon hibernicus*
Nodularina	Hepatotoxinas.	30-50	*Nodularia spumigena*
Cilindrospermopsina	Inibidor da biossíntese protéica, dano citogenético (DNA).	2100 em 1 dia 200 em 5/6 dias	*Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Rhaphidiopsis curvata*, *Anabaena lapponica, Anabaena bergii*
Anatoxina-a	Neurotoxinas. Liga-se irreversivelmente aos receptores de acetilcolina.	250	Maioria das *Anabaena* spp., algumas *Aphanizomenon* (*A.flos-aquae, A. issatschenkoi*), *Cylindrospermum, Microcystis* e *Planktothrix* spp. e *Raphidiopsis mediterrânea*
Homoanatoxina-a	Neurotoxinas.	250	*Oscillatoria formosa*, *Raphidiopsis mediterrânea*
Anatoxina-a(s)	Neurotoxinas. Inibe atividade da acetilcolinesterase	40	*Anabaena flos-aquae* e *A. lemmermannii*
Saxitoxina (PSP)	Neurotoxinas. Liga e bloqueia os canais de sódio nas células neurais	10-30	*Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya* e *Cylindrospermopsis* spp.
Lipopolissacarídeos LPS	Dermatotoxinas. Potente irritante, efeito em qualquer tecido exposto	-	Todas cianobactérias
Aplysiatoxina, Lyngbyatoxina Debromoaplisiatoxina		-	*Lyngbya majuscula*, *Oscillatoria nigro-vridis*
Microviridina J		-	*Microcystis* spp.
β-N-methylamino-Lalanina (BMAA)	Neurotoxinas.	-	*Microcystis, Anabaena*, *Nostoc* e *Planktothrix* spp. e maioria das cianobactérias simbiontes testadas

O papel dos fatores ambientais na produção das cianotoxinas ainda não está suficientemente entendido. A produção das cianotoxinas pelas cianobactérias tem sido confirmada 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).

2.4.2.1 Microcistinas

As microcistinas (MCYSTs) são produzidas por várias linhagens de gêneros planctônicos (*Microcystis, Planktothrix e Anabaena*), bentônicos ou terrestres (*Nostoc e Hapalosiphon*, *Fischerella*) e são as mais prevalentes cianotoxinas (SIVONEN; JONES, 1999; FIORE et al., 2009). As MCYSTs pertencem a uma família de heptapeptídeos monocíclicos com um β-aminoácido não usual característico, o Adda (ácido 2S, 3S, 8S, 9S-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4E, 6E-dienoico) (TILLETT et al., 2000). As MCYSTs são sintetizadas por uma via envolvendo uma mistura de peptídeos sintetases e policetídeos sintases (DITTMANN; BORNER, 2005). Existem mais de 70 variantes de MCYSTs conhecidas que possuem em comum a estrutura cíclica [-D-alanina^1-L-X^2-ácido D-eritro-β-metilaspartico^3-L-Y^4-Adda^5-D-glutamato^6-*N*-metildehidroalanina^7] (Figura 2) (TILLETT et al., 2000; SPOOF et al., 2003; CODD; MORRISON; METCALF, 2005). As principais variações estruturais são observadas nos resíduos de L-aminoácidos designados "X" e "Z" (Tabela 6).

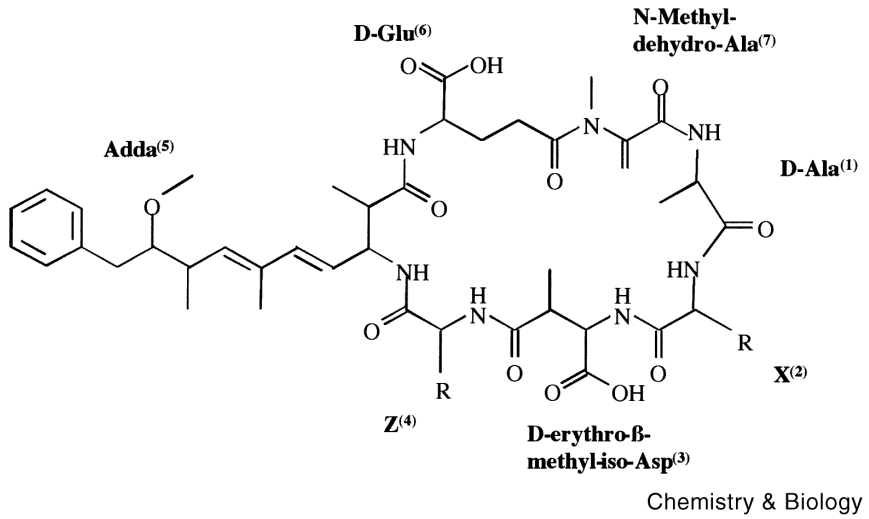


Figura 2 - Estrutura da microcistina (TILLETT et al., 2000).

Tabela 6 - Exemplos de variantes da posição X e Z da MCYST e suas respectivas massas (BABICA et al., 2005).

Microcistina	X	Z	*m/z*
MCYST-LA	Leu	Ala	910
MCYST-LL	Leu	Leu	953
MCYST-AR	Ala	Arg	953
MCYST-YA	Tyr	Ala	960
MCYST-LM	Leu	Met	970
MCYST-VF	Val	Phe	972
MCYST-YM	Tyr	Met	972
MCYST-LF	Leu	Phe	986
MCYST-LR	Leu	Arg	995
MCYST-LY	Leu	Tyr	1002
MCYST-LW	Leu	Trp	1025
MCYST-FR	Phe	Arg	1029
MCYST-RR	Arg	Arg	1038
MCYST-YR	Tyr	Arg	1045
MCYST-WR	Trp	Arg	1068

MCYSTs são extremamente tóxicas para animais e estão envolvidas em numerosos incidentes de intoxicações humanas e envenenamento animal (KUIPER-GOODMAN et al., 1999; DUY et al., 2000). A presença de MCYSTs em águas potáveis ou recreacionais ocasionam riscos para a saúde humana (CODD; MORRISON; METCALF, 2005) e os efeitos hepatotóxicos agudos e a carcinogênese crônica hepática têm sido intensivamente estudados em mamíferos (DAWSON, 1998; DIETRICH; HOEGER, 2005).

A MCYST-LR, caracterizada pela presença de uma leucina (L) e uma arginina (R) como L-aminoácidos na posição 2 (X) e 4 (Z) (CARMICHAEL et al., 1988) é considerada a mais potente hepatotoxina (FUNARI; TESTAI, 2008). O mecanismo de ação dessa toxina está associado com a inibição da proteína fosfatase de serina/treonina (PP1 e PP2A), alterando a fosforilação de proteínas celulares envolvidas na transdução de sinais (GEHRINGER, 2004). A intoxicação aguda decorre da exposição a níveis altos de MCYST-LR, ocorrendo uma cascata de eventos (alterações no citoesqueleto, peroxidação lipídica, estresse oxidativo, apoptoses) conduzindo para uma hemorragia intrahepática devido aos danos nos capilares sinusóides. Em exposições a baixos níveis a longo prazo, a inibição da fosfatase induz a proliferação celular e ocorre hipertrofia hepática (GEHRINGER, 2004). Estudos evidenciam a genotoxicidade carcinogênica da MCYST-LR, demonstradas em camundongos após exposição por 24 horas à cianotoxina, verificando a elevada expressão hepática dos genes p53, p21, gadd45 e bax, genes alvos envolvidos na resposta ao dano no DNA, regulação do

ciclo celular e apoptose (CHEN et al., 2005). A MCYST-LR é capaz de induzir estresse oxidativo e apoptose em células de humanos (BOTHA et al., 2004). O grau de severidade da indução da toxicidade da MCYST-LR depende do nível e duração da exposição, determinado pelo balanço entre a absorção da MCYST, detoxificação e excreção (FUNARI; TESTAI, 2008). A MCYST-LR é altamente hidrofílica e não consegue penetrar nas membranas celulares pelo transporte passivo. Ela é ativamente absorvida pela mucosa intestinal, devido ao sistema de transporte de ânion orgânico (OATP), penetrando nos hepatócitos (FISHER et al., 2005). Esse transporte ativo também ocorre nos rins e na barreira entre vasos sanguíneos e cérebro, o que poderia explicar algumas desordens neurológicas observadas em humanos durante o acidente fatal ocorrido em Caruaru, Pernambuco (AZEVEDO et al., 2002).

A toxicidade aguda da MCYST-LR, após administração intraperitonial (ip) em ratos resultou em uma DL_{50} = 50 μg kg^{-1} massa corporal, e quando pela rota oral, ela é menos tóxica, LD_{50} = 5.000 μg kg^{-1} massa corporal (FAWELL; JAMES; JAMES, 1994; FAWELL et al., 1999). A toxicidade é altamente variável entre as variantes de MCYSTs. As variantes MCYST-LA, -YR e -YM mostraram, após administração ip, DL_{50} similar à –LR, enquanto que outras variantes apresentaram valores de DL_{50} altamente variáveis (de 50 a 1.200 μg kg^{-1}) (Tabela 7) (FUNARI; TESTAI, 2008).

Tabela 7 - Diferenças na toxicidade das variantes de MC (FUNARI; TESTAI, 2008).

Toxina	i.p. DL_{50} (μg kg^{-1})	MM	Estrutura*
MCYST-LR	50	994	ciclo-(D-Ala-**L-Leu**-D-MeAsp-**L-Arg**-Adda-D-Glu-Mdha-)
[D-Asp^3]MCYST-LR	50	970	ciclo-(D-Ala-L-Leu-D-**Asp**-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
[L-MeLan^7]MCYST-LR	1000	1115	ciclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-**L-MeLan**-)
[6(Z)-Adda^5]MCYST-LR	>1200	994	ciclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-L-Arg-**6(Z)Adda**-D-Glu-Mdha)
MCYST-LA	50	909	ciclo-(D-Ala-L-Leu-D-MeAsp-**L-Ala**-Adda-D-Glu-Mdha-)
MCYST-RR	500	1037	ciclo-(D-Ala-**L-Arg**-D-MeAsp-L-Arg-6(Z)Adda-D-Glu-Mdha)
[Dha^7]MCYST-RR	180	980	ciclo-(D-Ala-**L-Arg**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-**Dha**-)
[6(Z)-Adda^5]MCYST-RR	>1200	1037	ciclo-(D-Ala-**L-Arg**-D-MeAsp-L-Arg-**6(Z)Adda**-D-Glu-Mdha)
MCYST-YR	150-200	1044	ciclo-(D-Ala-**L-Tyr**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MCYST-YA	60-70	959	ciclo-(D-Ala-**L-Tyr**-D-MeAsp-**L-Ala**-Adda-D-Glu-Mdha-)
MCYST-AR	250	952	ciclo-(D-Ala-**L-Ala**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)
MCYST-M(O)R	700-800	1028	ciclo-(D-Ala-**L-Met(O)**-D-MeAsp-L-Arg-Adda-D-Glu-Mdha-)

* Em negrito está destacada as diferenças em relação à MC-LR

Como exemplo, a MCYST-RR contém aminoácidos polares na posição 2 e 4, sua DL_{50} é 10 vezes maior que a variante –LR (KOTAK et al., 1993; WOLF; FRANK, 2002), no entanto, a presença de aminoácidos hidrofóbicos, como alanina e fenilalanina, não afeta na sua toxicidade (ZURAWELL et al., 2005). O Adda e sua configuração de duplo ligante são cruciais para a indução da inibição das fosfatases PP1 e PP2A pela MCYST, devido a ligação covalente entre a proteína cisteína e o grupo Adda-glu (HARADA et al., 1990). No entanto, somente o Adda não é capaz de inibir as fosfatases, e ele isolado não é tóxico, mesmo se injetado em grandes quantidades (FUNARI; TESTAI, 2008).

As funções fisiológicas e ecológicas destas substâncias, porém, não são bem esclarecidas (KAEBERNICK; NEILAN, 2001). A biossíntese da MCYST demanda um gasto energético grande. Há estudos que evidenciam que a MCYST pode ter um efeito sobre a estrutura populacional do zooplâncton (cladóceros e rotíferos), resultando em um sucesso ecológico para as cianobactérias. Assim, a produção da toxina auxilia na sobrevivência no meio aquático. Porém, culturas em laboratórios não têm sua produção de toxina reduzida.

Muitas florações exibem um crescimento ótimo de cianobactérias na presença de bactérias heterotróficas. A *Pseudomonas aeruginosa* é atraída quimiotaticamente pelo heterócito da *Anabaena oscillarioides*, que compartilha o N_2 fixado (PAERL; GALLUCCI, 1985). Similarmente, a *Microcystis aeruginosa* exibe grandes níveis de fixação de CO_2 quando em associação com bactérias e protozoários (PAERL; MILLIE, 1996). A produção e excreção das cianotoxinas podem ter um papel na atração de hospedeiros benéficos, enquanto repelem outros organismos antagonistas (PAERL; MILLIE, 1996). Uma função alelopática também tem sido sugerida, tal como a inibição de crescimento de algas dos gêneros *Chlamydomonas*, *Haematococcus*, *Navícula* e *Cryptomonas* (KEATING, 1978).

A afinidade da MCYST por ferro e outros cátions, como cobre, cálcio e zinco, indica propriedades de sideróforos para esta molécula (HUMBLE;GADD; CODD, 1994), e sugere um papel putativo como quelante de ferro (UTKILEN; GJØLME, 1995). O sideróforo extracelular liga-se aos íons de Fe^{2+} do meio ambiente e favorece o crescimento celular em ambientes com baixa disponibilidade desse cátion (LUKAC; AEGERTER, 1993). Porém, no meio intracelular, as propriedades de sideróforo competem com os metabólitos primários pelo ferro, limitado nesse meio. Alternativamente, sob condições com grande disponibilidade de ferro, a MCYST agiria como um quelante de ferro, formando complexos MCYST-ferro, mantendo baixo o nível de radicais livres (UTKILEN; GJOLME, 1995). Os complexos

MCYST-ferro seriam mantidos até o nível de ferro diminuir e o ferro poder ser aproveitado por processos celulares. Contudo, a MCYST ou complexos MCYST-ferro não foram identificados como substâncias de estoque em inclusões celulares, e são mais comumente encontradas em tilacóides e membranas plasmáticas (SHI; CARMICHAEL; MILLER., 1995; YOUNG et al., 2005). Acredita-se que o Adda liga-se ao tilacóide, deixando o anel polar do peptídeo ligar-se com metais do citoplasma (ORR; JONES, 1998). Essa associação com o aparato fotossintético da célula também indica uma função putativa na absorção de luz e mecanismos de adaptação cromática exibidos em algumas cianobactérias (PEARSON; NEILAN, 2008).

Uma última teoria seria a MCYST atuar como uma molécula de sinalização intraespecífica (DITTMANN et al. 2001) e que pode estar associada com um mecanismo de sensibilidade a luz em *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (DITTMANN et al., 1997; DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001). Um estudo identificou proteínas expressas somente na linhagem tóxica de *Microcystis*, homólogas a proteínas de *Rhizobium leguminosarum* que desenvolvem um papel na nodulação e são reguladas via mecanismo "*quorum-sensing*" (DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001).

2.4.3 Métodos para detecção de microcistinas

A presença das cianobactérias no meio ambiente não significa que toxinas estão sendo liberadas. Muitas cianobactérias não produzem toxinas e mesmo dentro das espécies tóxicas existem genótipos que não sintetizam toxinas. Por exemplo, o gênero *Microcystis* que frequentemente desenvolve florações em ambientes aquáticos é composto por diferentes genótipos produtores e não produtores de MCYSTs (KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003). Esses dois tipos de genótipos podem ser encontrados na mesma floração (VÉZIE et al. 1998; SIVONEN; JONES 1999) e a proporção dessas duas populações mudam com o tempo (KURMAYER; KUTZENBERGER, 2003; JANSE et al 2004). Diversos métodos podem ser utilizados para a detecção e identificação das cianotoxinas. Ensaios em ratos foram os primeiros testes de toxicidade usados para detecção de produção de cianotoxinas, o que possibilitou estabelecer as doses letais medianas (DL_{50}) destas. É um método de simples avaliação em laboratório e barato, mas o resultado obtido é uma inferência não específica porque não é capaz de detectar a produção em baixos níveis e as toxinas homólogas. Além disso, cada vez mais a oposição à utilização de animais para testes toxicológicos tem crescido

em muitos países. Testes com *Daphnia* sp., *Artemia salina*, mosquitos, *Drosophila melanogaster* e crustáceos foram testados, mas alguns organismos são de difícil manipulação e outros são insensíveis à algumas cianotoxinas (TURELL; MIDDLEBROOK, 1988; KIVIRANTA; SIVONEN; NIEMELA, 1991; SWOBODA; DOW, 1994; MCELHINEY et al., 1998).

Ensaios bioquímicos como a inibição da fosfatase é um método sensível na detecção de MCYSTs e nodularinas. A desvantagem desse método era a utilização de compostos químicos radioativos, mas Carmichael (1994) elaborou um ensaio baseado na colorimetria da inibição da fosfatase resolvendo o problema. Porém, o ensaio imunológico (ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se tornou a técnica mais promissora para uma rápida detecção de cianotoxinas devido sua sensibilidade, especificidade e fácil operação (JAISWAL; SINGH; PRASANNA, 2008).

As propriedades físico-químicas das cianotoxinas podem ser utilizadas para detecção e identificação. A cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC) é uma técnica utilizada na separação das cianotoxinas, mas não é muito sensível e específica. A Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAR ou HPLC) usando uma coluna de sílica C_{18} de fase reversa e gradiente de acetonitrila e água, ambos com 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA), separa bem as MCYST s. É um método muito sensível e que pode estar acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS/MS), o que torna o equipamento capaz de separar as toxinas e depois identificá-las pela sua fragmentação e produção de fragmentos característicos (JAISWAL; SINGH; PRASANNA, 2008). No entanto, o uso do HPLC ou LC-MS se baseia no tempo de retenção para identificação da toxina e são necessários padrões (HARADA, 1996).

O Espectrômetro de massas Q-TOF (*Quadrupole-Time-Of-Flight*) também pode ser utilizado na detecção e identificação de cianotoxinas com alta sensibilidade, versatilidade e resolução. A amostra aplicada é ionizada por ESI (*Electrospay ionization*), um método de ionização/vaporização de moléculas polares para a forma $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ (GRIFFITHS et al., 2001). No TOF-MS cada íon tem a mesma energia cinética inicial, mas uma velocidade que varia com a massa. Um refletor (*reflectron*), usado para compensar diferenças mínimas na energia cinética inicial, redireciona o íon para o detector (Figura 3). Cada íon tem a velocidade dependente da massa, assim determina-se a massa pelo tempo de voo (*time-of-flight*) dos íons (PERKEL, 2001). Os dois hexapolos e o quadrupolo atuam como focalizadores do feixe de íons, o que permite a análise por TOF ortogonal com resolução de

5.000 ppm e com alta sensibilidade característica de analisadores TOF. Os quadrupolos consistem em quatro bastões paralelos arranjados como um quadrado, no qual um campo elétrico oscilatório é aplicado. Os íons viajam através do espaço vazio no centro do quadrado, mas somente íons com uma específica *m/z* (razão massa/carga) podem alcançar o detector, baseada no campo gerado pela carga aplicada nos bastões (MANN; HENDRICKSON; PANDEY, 2001). Pela variação do campo elétrico diferentes íons podem ser analisados. O sistema de espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) geralmente apresenta três funções: seleção do íon, fragmentação do íon e análise da massa (PERKEL, 2001). Portanto, é possível selecionar o íon de interesse e fragmentá-lo.

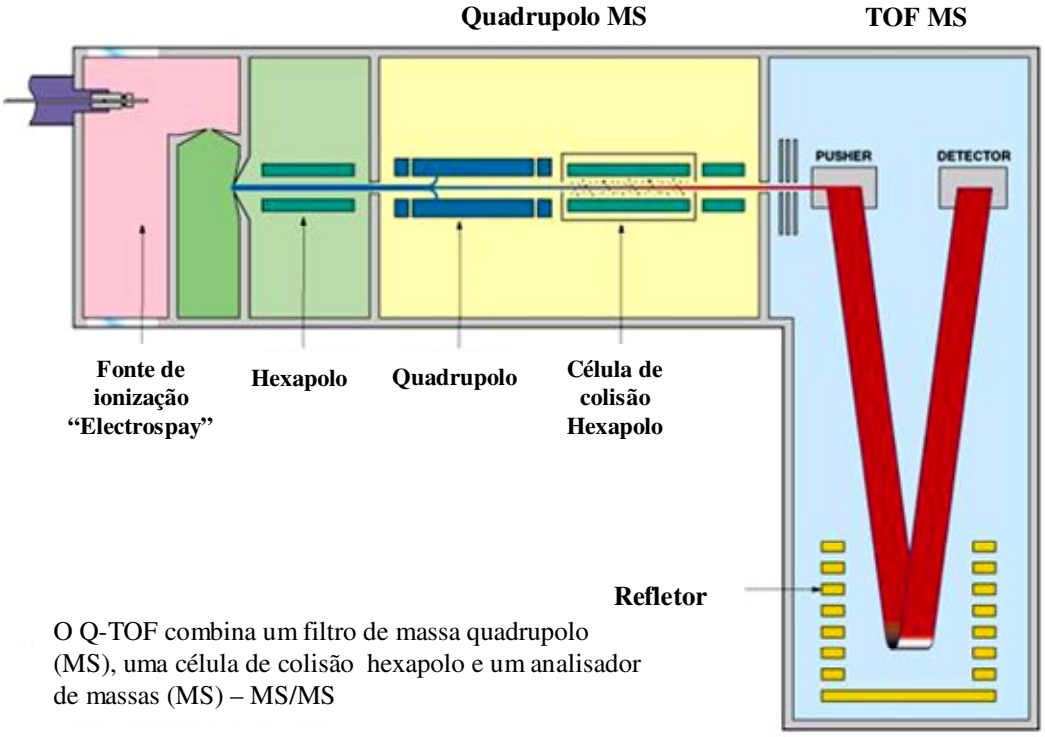


Figura 3 – Esquema do espectrômetro de massas Q-TOF.

Métodos moleculares estão sendo desenvolvidos visando diferenciar os grupos capazes de produzirem as cianotoxinas dos grupos não tóxicos (NEILAN et al., 1995, BLOCH et al., 1996; ROUHIAINEN et al., 2004). Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenvolvidos para regiões dos genes das toxinas analisadas (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995, BLOCH et al., 1996; FERGUSSON; SAINT, 2000; WILSON et al., 2000; BAKER et al., 2001; ROUHIAINEN et al., 2004). A recente utilização da PCR em

tempo real (*real-time* PCR) para identificação e quantificação da produção de toxina tem sido promissora, mas ainda requer novos estudos.

2.4.3.1 Agrupamento de genes envolvidos na biossíntese de microcistinas

Vários agrupamentos de genes envolvidos na síntese de metabólitos bioativos em cianobactérias já foram descritos, tais como microcistina, nodularina, anabaenopeptilideos, nostopeptolideos, barbamida, jamaicamida, curacina A e lyngbyatoxina (ROUHIAINEN et al, 2000; TILLETT et al., 2000; CHANG et al., 2002; HOFFMANN et al., 2003; CHANG et al., 2004; EDWARDS et al., 2004; MOFFITT; NEILAN 2004). O agrupamento de genes envolvidos na síntese de MCYST foi sequenciado e caracterizado para os gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (TILLETT et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004). O agrupamento de genes envolvidos na síntese de nodularina, uma toxina semelhante em estrutura, síntese e ação à microcistina, foi também sequenciado, caracterizado e comparado ao agrupamento de genes da microcistina (Figura 4) (MOFFITT; NEILAN, 2004).

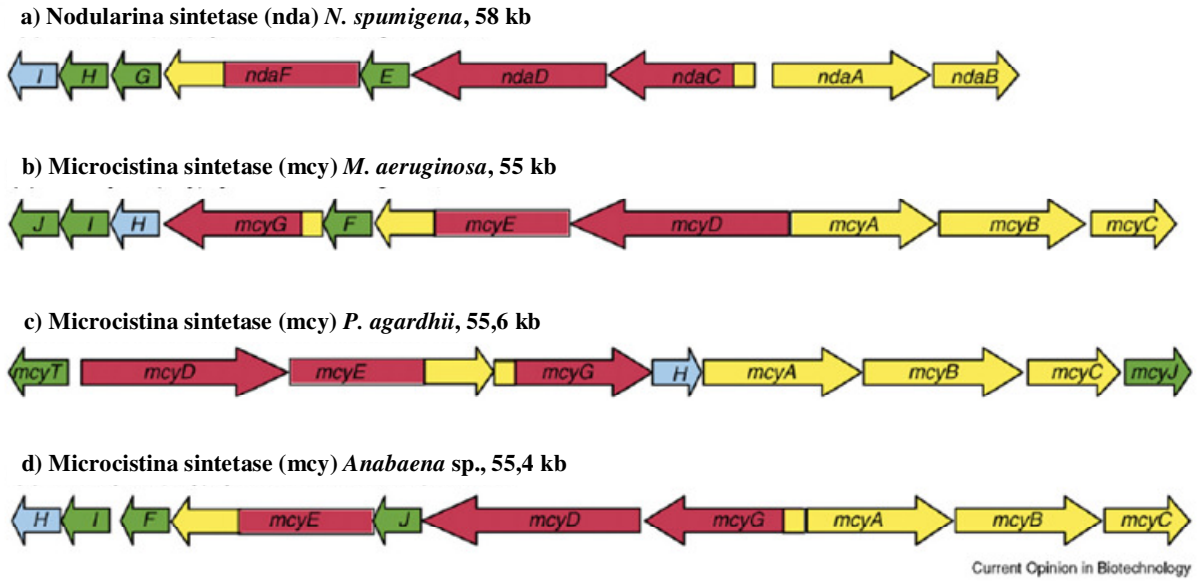


Figura 4 - Agrupamento de genes responsáveis pela síntese de microcistina e nodularina. (a) *Nodularia spumigena*, (b) *Microcystis aeruginosa*, (c) *Plankthotrix agardhii* e (d) *Anabaena* sp. Rosa: PKS; Amarelo: PS; Verde: Enzimas de acabamento e finalização (*tailoring enzymes*) e Azul: transportadores ABC (retirado de PEARSON; NEILAN, 2008).

A identificação do agrupamento de genes da MCYST tem sido essencial para inferências evolutivas e para análise da biossíntese dessa cianotoxina e tem servido como base para os métodos de detecção de cianobactérias tóxicas usando a PCR. O agrupamento de genes envolvidos na síntese de MCYST 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 4). O operon maior (*mcyD-J*), codifica uma PKS (McyD), dois híbridos PS/PKS (McyE e McyG), e enzimas envolvidas no acabamento e finalização (*tailoring enzymes*) (McyJ, F e I) e transporte da toxina (McyH). O operon menor (*mcyA-C*) codifica três PSs (McyA, B e C) (Figura 5). A formação do Adda putativamente envolve enzimas codificadas pelos genes *mcyG*, *D*, *E* e *J* (Figura 5). O sistema híbrido de PS/PKS, McyG, constitui o primeiro passo na síntese do Adda, ou seja, a ativação do fenilpropanóide catalizado pelo domínio de adenilação (A) da PS. O fenilpropanóide ativado é transferido para o cofator fosfopanteteína do primeiro domínio carreador. Até hoje, o mecanismo de descarboxilação da ligação PCP-fenilpropanóide para fenilacetato, que aparece na estrutura final, não é bem conhecido e pode ocorrer tanto antes como depois do primeiro passo de elongação do policetídeo catalizado pela McyG. Subsequente extensão por vários passos de elongação do malonil-CoA e modificação pela *C*-metilação, redução e dehidratação, são todos catalizados por módulos de PKS das McyD e McyE. O domínio da aminotransferase da McyE converte o policetídeo para um β-aminoácido no passo final da síntese do Adda. O módulo de PS da segunda enzima híbrida de PS/PKS, McyE, acredita-se estar envolvida na ativação e condensação do D-Glu com o Adda. O quadro aberto de leitura (ORF) *mcyF* foi originalmente predito como codificador de uma glutamato racemase (as racemases catalizam a inversão do composto – estereoquímico – ao redor do átomo de carbono assimétrico, em um substrato tendo somente um centro de assimetria), responsável pela epimerização do resíduo de L-Glu da MCYST (TILLETT et al., 2000; NISHIZAWA et al., 2000). Mas em estudo posterior contestou-se esta teoria e há evidências de que o *mcyF* atue exclusivamente como uma Asp racemase para formar o resíduo D-eritro β-metilaspartato (D-MeAsp) (Figura 5, SIELAFF et al., 2003). Foi proposto que o resíduo de D-Glu é fornecido por uma L-Glu racemase externa ao agrupamento de genes. Contudo, experimentos anteriores com substratos isotópicos determinaram que o resíduo D-Me-Asp é formado por uma nova via (MOORE et al., 1991) que poderia ser consistente com a McyF atuando como uma glutamato racemase.

Experimentos de mutagênese em *Planktothrix agardhii* mostraram que a produção do Adda também envolve um passo de *O*-metilação catalizado pela enzima putativa

monofunctional McyJ para acabamento e finalização (CHRISTIANSEN et al., 2003). O ácido 2-hidroxi dehigrogenase, McyI, está putativamente envolvido na produção do D-metilaspartato na posição 3 entre a estrutura cíclica da MCYST via conversão do 3-metilmalato para 3-metiloxalacetato. Há a hipótese que uma aminotransferase aspartato converta o 3-metiloxalacetato em metilaspartato (PEARSON; BARROW; NEILAN,2007). As enzimas restantes (PSs) estão putativamente envolvidas em ativação, modificação e condensação específica do substrato de aminoácido em uma cadeia peptídica linear que é então ciclizada para produzir a MCYST.

Em *M. aeruginosa* PCC7806, inicialmente, McyA adiciona L-Ser para a elongação da cadeia, seguido por D-Ala. Esse passo é seguido pela adição de L-Arg (McyC), e finalmente pela ciclização e tioesterificação (TILLETT et al., 2000). A produção do resíduo de *N*-metildehidroalanina (MeDha) foi originalmente designado como papel da McyI, no entanto, foi recentemente contestado (PEARSON; BARROW; NEILAN,2007). O gene *mcyH* codifica o transportador ABC, que acredita-se estar envolvido no transporte da MCYST (PEARSON et al., 2004). Este transportador pode ser responsável pela localização da toxina no tilacóide (SHI; CARMICHAEL; MILLER, 1995; YOUNG et al., 2005) ou pela extrusão da toxina sob certas condições de crescimento, incluindo a exposição a intensidade de luz elevada e vermelha (KAEBERNICK et al., 2000).

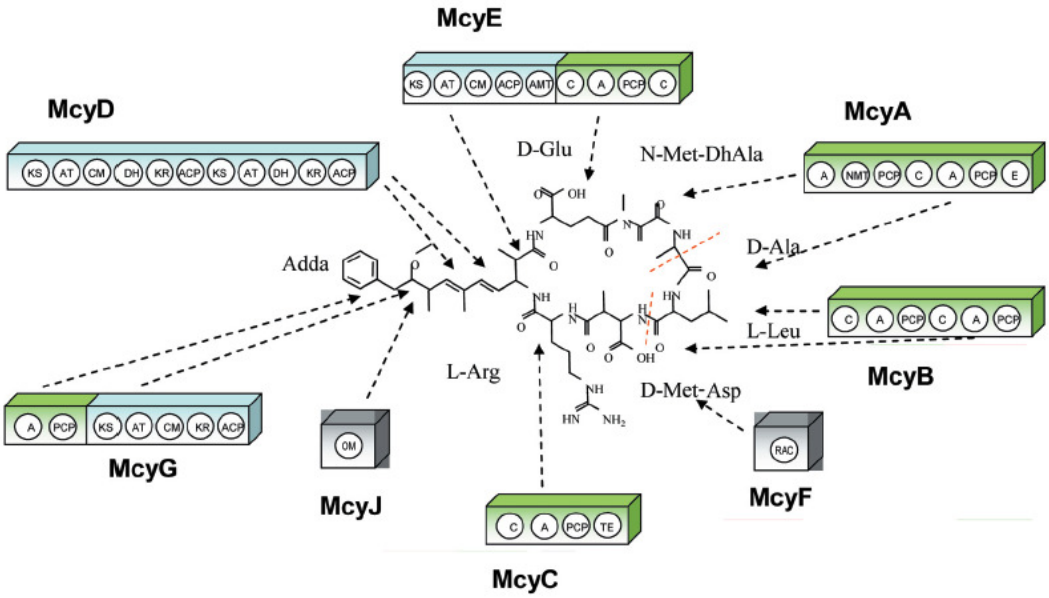


Figura 5 – Modelo indicando os produtos das enzimas envolvidas na síntese da microcistina. KS: *β*-cetoacil sintase, AT: aciltransferase, ACP: proteína carreadora de acila, KR: cetoacil redutase, DH: dehidratase, CM: *C*-metiltransferase, OM: *O*-metiltransferase, NM: *N*-metiltransferase, AMT: aminotransferase, RC, racemase. Azul: PKS, Verde: PS, Cinza: Enzimas de acabamento e finalização (*tailoring enzymes*). Retirado de Dittmann e Wiegand (2005).

Os estudos do agrupamento gênico da MCYST em *Anabaena* e *Planktothrix*, posteriormente, revelaram variações no arranjo dos genes (CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004). Os agrupamentos gênicos da *Microcystis* e *Anabaena* estão arranjados em dois operons em direções opostas, mas de forma diferente nessas duas espécies. Em *Planktothrix* o agrupamento gênico está arranjado de forma diferente e faltam os genes *mcyF* e *mcyI*, mas possui um gene adicional, *mcyT*, situado antes da região promotora central. O *mcyT* está envolvido na codificação de uma enzima putativa, a tioesterase tipo II, que foi proposta ter um papel de edição pela remoção de aminoácidos erroneamente incorporados (*mis-primed*) das enzimas de PS e PKS (SCHNEIDER; MARAHIEL, 1998; CHRISTIANSEN et al., 2003). Em *Microcystis* foi relatada uma proteína da superfamília das tioesterases fora do agrupamento gênico (KANEKO et al., 2007).

Acredita-se que a produção da MCYST pode ser influenciada por diferentes parâmetros físicos e ambientais, incluindo nitrogênio, fósforo, metais traço, temperatura de crescimento, luz e pH (VAN DERWESTHUIZEN; ELOFF, 1985; SIVONEN, 1990; LUKAC; AEGERTER, 1993; SONG et al., 1998). Kaebernick et al. (2000) mediram a transcrição do *mcyB* e *mcyD* sob diferentes condições de iluminação. Altas intensidades de luz e luz vermelha foram relacionadas com o aumento da transcrição, enquanto luz azul levou a redução da transcrição. Os mesmos autores perceberam que houve um aumento significativo da transcrição em duas faixas de luz, entre escuro e baixa luminosidade (0 e 16 μmol de fótons $m^{-2}s^{-1}$), e média e alta luminosidade (31 e 68 μmol de fótons $m^{-2}s^{-1}$). Sítios de início de transcrição alternativos foram identificados para ambos os operons (*mcyA-C* e *mcyD-J*) quando as células foram cultivadas em alta e baixa intensidade luminosa (68 μmol e 16 μmol de fótons $m^{-2}s^{-1}$, respectivamente; KAEBERNICK et al., 2002). Alguns trabalhos relatam um aumento na concentração de MCYST extracelular quando as culturas são expostas à alta intensidade luminosa (RAPALA et al., 1997; KAEBERNICK et al., 2000; BÖTTCHER et al., 2001; WIEDNER et al., 2003).

Uma hipótese proposta por Rantala et al. (2004) sugere que a habilidade de produzir MCYST foi herdada verticalmente por meio da diversificação dos gêneros de cianobactérias tóxicas e depois disso, repetidamente perdida. No entanto, Tanabe, Kasai e Watanabe (2007) relataram por análise de MLST que as relações entre grupos tóxicos e não-tóxicos não são estatisticamente comprovados, o que poderia ser explicada pela posterior aquisição dos genes da toxina em clados tóxicos durante a evolução de *M. aeruginosa*. E sugerem que as análises filogenéticas dos genes da MCYST são necessárias para testar onde o ganho desses genes é

também um fator importante na evolução de *Microcystis* tóxicas (TANABE; KASAI; WATANABE, 2007).

A caracterização do agrupamento de genes envolvidos na produção de toxinas nos diversos gêneros de cianobactérias tem possibilitado o estudo da origem e evolução dessas toxinas. A identificação de transposases associadas com os agrupamentos gênicos e subsequente análise filogenética têm permitido sugerir que a transferência horizontal de genes e eventos de recombinação são os responsáveis pela distribuição esporádica desses agrupamentos de genes no grupo das cianobactérias e também pelas várias isoformas identificadas até hoje (TILLETT et al., 2000; MIKALSEN et al., 2003; TANABE; KAYA; WATANABE, 2004).

O gene *uma4*, uma putativa transposase, foi identificado próximo ao *mcyC* em *M. aeruginosa* PCC7806 (TILLETT et al., 2000). Tooming-Klunderud et al. (2008) relataram a presença de um elemento IS (sequência de inserção) em uma região intergênica entre os genes *mcyJ* e *dnaN* (subunidade β da DNA polimerase III, TILLETT et al., 2000) em *Microcystis* tal região parece ser um *hot spot* de recombinação, enquanto que a região *mcyC-uma1* é mais conservada. Dois outros genes foram identificados entre *dnaN* e *mcyJ* em várias linhagens de *Microcystis* (NISHIZAWA et al., 2007), mas nenhuma foi relatada como sendo transposase. Esses estudos, que indicam a presença de elementos de inserção e transposases envolvendo o agrupamento gênico da MCYST, contribuem para a hipótese de transposição dos operons entre as linhagens, o que contribui para a instabilidade (presença ou ausência) e diversidade genética dos genes da MCYST em populações naturais de cianobactérias (KANEKO et al., 2007). Porém, estudos não comprovam a existência de recombinação entre gêneros (RANTALA et al., 2004; FEWER et al., 2007; TOOMING-KLUNDERUD et al. 2008), assim como também não ocorre em outro caso com agrupamentos gênicos de PSs (ROUNGE et al., 2007; TOOMING-KLUNDERUD et al., 2007). Isso está de acordo com estudos que sugerem que a recombinação genética diminui conforme aumenta a distância genética (PAPKE et al., 2007; RUDI; SKULBERG; JACOBSEN, 1998; ZHAXYBAYEVA et al., 2006). Os resultados baseados em filogenia, recombinação, perda gênica e transferência horizontal de genes podem ajudar a explicar a distribuição e variação da produção de MCYST em diferentes gêneros de cianobactérias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de cianobactérias

Oito linhagens de cianobactérias pertencentes à Ordem Stigonematales isoladas de diferentes ambientes e pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) foram selecionadas para este estudo (Tabela 8). Os isolados foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura constante de aproximadamente 25 ºC ± 1 °C com fotoperíodo de 14 h claro:10 h escuro (irradiância 40 µmol fótons $m^{-2}s^{-1}$) em meios de cultura AA/4 (ALLEN; ARNON, 1955) e BG-11 (ALLEN, 1968) sem adição de nitrogênio inorgânico (Tabela 9).

Tabela 8 - Linhagens escolhidas para o estudo filogenético e seus respectivos meios de cultura.

Linhagem	Local de origem	Meio de cultura
Fischerella sp. CENA19	Estação Mari, Rio Amazonas, Amazônia (7º4'S e 64º34'O)	AA/4
CENA63*	Reservatório ESALQ, Piracicaba, São Paulo (22º42'S e 47º36'O)	BG-11 sem N
CENA71*	Terra Preta (0-20 cm), Sítio Hatahara, Amazônia (3º11'S e 60º09'O)	AA/4
CENA72*	Terra Preta (20-40 cm), Sítio Hatahara, Amazônia (3º11'S e 60º09'O)	AA/4
Fischerella sp. CENA161	Nascente de água, Piracicaba, São Paulo (22º39'S e 47º37'O)	BG-11 sem N
CENA212*	Nascente de água, Piracicaba, São Paulo (22º39'S e 47º37'O)	BG-11 sem N
CENA213*	Nascente de água, Piracicaba, São Paulo (22º39'S e 47º37'O)	BG-11 sem N
CENA214*	Nascente de água, Piracicaba, São Paulo (22º39'S e 47º37'O)	BG-11 sem N

*Identificação do gênero foi realizada neste estudo.

Tabela 9 - Meios de cultura AA/4 e BG-11 sem N usados na manutenção das cianobactérias (ALLEN; ARNON, 1955; ALLEN, 1968).

	Concentração da solução estoque ($g\ L^{-1}$) *		**Volume adicionado por litro (mL)**	
	BG-11	**AA**	**BG-11**	**AA**
Macronutriente (mM)				
K_2HPO_4	40	42,8	1	3,10
$MgSO_4.7H_2O$	75	40	1	1,56
$CaCl_2.2H_2O$	36	12	1	1,56
NaCl	-	40	-	1,56
Na_2EDTA	1	-	1	-
Ácido cítrico	6	-	1	-
Citrato férrico amoniacal	6	-	1	-
Na_2CO_3	20	-	1	-
Micronutrientes (µM)	a	b	1	1,56
pH			7,4	7,8

*As soluções estoque devem ser armazenadas a 4°C.

a. Solução de micronutrientes para o meio BG-11:

H_3BO_3	2,86	$g\ L^{-1}$
$MnCl_2.4H_2O$	1,81	$g\ L^{-1}$
$ZnSO_4.7H_2O$	0,222	$g\ L^{-1}$
$Na_2Mo_4.2H_2O$	0,39	$g\ L^{-1}$
$CuSO_4.5H_2O$	0,079	$g\ L^{-1}$
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,049	$g\ L^{-1}$

b. Micronutrientes para o meio AA/4:

Fe-EDTA**	160	$mL\ L^{-1}$
$MnCl_2.4H_2O$	0,36	$g\ L^{-1}$
$Na_2MO_4.2H_2O$ (99% pureza)	0,0611	$g\ L^{-1}$
$ZnSO_4.7H_2O$	0,044	$g\ L^{-1}$
$CuSO_4.5H_2O$	0,0158	$g\ L^{-1}$
H_3BO_3	0,572	$g\ L^{-1}$
NH_4VO_3	0,0046	$g\ L^{-1}$
$CoCl_2.6H_2O$	0,008	$g\ L^{-1}$

**Fe-EDTA: Dissolver 5.2 g de KOH em 186 mL de água destilada e adicionar 20,4 g de $Na_2EDTA.2H_2O$. Em seguida, dissolver 13,7 g $FeSO_4.7H_2O$ em 364 mL de água destilada e misturar com solução anterior. Borbulhar ar filtrado com filtro Millipore (0,45 mm) até a solução mudar de cor (de 4 min a 4 horas).

3.2. Análise fenotípica dos isolados

Os isolados foram analisados em microscópio óptico (Axioskop 40) equipado com o sistema digital de imagem AxioVisionLE 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) de acordo com os seguintes caracteres morfométricos: diâmetro e comprimento da célula vegetativa e do heterócito. Foram realizadas cinco medições de cada caractere buscando obter a média de variação fenotípica. As identificações dos isolados foram realizadas seguindo o Sistema de

Classificação de Anagnostidis e Komárek (1990) para a ordem Stigonematales e artigos mais recentes (HOFFMANN, KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005; KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008), baseadas nos caracteres morfológicos diacríticos. Fotos e informações coletadas foram enviadas ao sistemata Dr. Jan Kaštovský (Faculdade de Ciências, Universidade Sul da Bohemia, República Tcheca) para confirmação morfológica dos gêneros identificados.

3.3 Análise genética

3.3.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das cianobactérias foi realizada utilizando o Kit Ultra Clean Soil DNA (MoBio, Solana Beach, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, ou de acordo com a metodologia descrita por Fiore et al. (2000), conforme descrito a seguir. Três mililitros (mL) de cultura na fase de crescimento exponencial foram concentrados (13.000 rpm, 5 min, 20 ºC) 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 ressuspendido em 200 µL de soluçao 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 ºC, 600 µL de tampão de extração preparada 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 ºC, 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 ºC). 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 ºC, 10 min) e depois centrifugadas (10.000 rpm, 30 s, 20 ºC) 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 ºC em bloco de aquecimento (LabLine Instruments, Illinois, IL, EUA) e reidratado com 30 µL de água ultrapura

esterilizada. Após incubado em banho-maria (45 ºC, 10 min) foi centrifugado (10.000 rpm, 1 min, 20 ºC) 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® Gold 10X (Invitrogen, Carlsbad, CA, 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 "Fluor-S™ Multilmager" (BioRad, Hercules, CA, EUA). A verificação do tamanho dos amplicons foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Lambda DNA/*Eco*RI + *Hin*d III (Promega, Madison, EUA). O material foi armazenado a −20 °C.

3.3.2 Amplificação por PCR dos genes selecionados

Os genes constitutivos, RNAr 16S, rpoC1, rbclX, *tufA* e *cpcBA*-IGS (Tabela 10) foram selecionados para serem amplificados . Todos esses genes já foram utilizados em outros estudos com cianobactérias (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995; SEO; YOKOTA, 2003; FEWER et al., 2007; TANABE; KASAI; WATANABE, 2007).

Tabela 10 - Oligonucleotidos iniciadores para a amplificação dos genes selecionados.

Gene	Produto do gene	Primers	Sequência (5´-3´)	Comprimento (pb)	Referência
RNAr 16S	Subunidade 16S do RNA ribossômico	27F1 1494Rc	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGCTACCTTGTTACGAC	1500	NEILAN et al., 1997
rpoC1	Subunidade γ da RNA polimerase dependente de DNA	rpoC1-1 rpoC1-T	GAGCTCYAWNACCATCCAYTCNGG GGTACCNAAYGGNSARRTNGTTGG	609	PALENIK; HASELKORN, 1992
rbcLX	Ribulose-1,6-bisfosfato (rubisco)	rbcLF rbcLR CW CX DF	GACTTCACCAAAGAYGACGAAAACAT GAACTCGAACTTRATYTCTTTCCA CGTAGCTTCCGGTGGTATCCACGT GGGGCAGGTAAGAAAGGGTTTCGTA GGGCARYTTCCACAKNGTCCA	1500	RUDI; SKULBERG; JACOBSEN, 1998; FEWER et al., 2007
tufA	Fator de elongação	TF TR	CACGTDGAYTGYCCNGGNCACGCTG ATNCGRTCNCCDGGCATAACCATTTC	836	FEWER et al., 2007
cpcBA-IGS	Região intergênica da ficocianina	PCβF PCαR	GGCTGCTTGTTTACGCGACA CCAGTACCACCAGCAACTAA	685	NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995

A amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita em solução contendo tampão para a reação PCR 1X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 3 mM $MgCl_2$; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 5 ρmol de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada no termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas condições descritas na Tabela 11. A integridade dos produtos de PCR foi verificada no item 3.3.1. A verificação do tamanho dos amplicons foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Lambda DNA/*Eco*RI + *Hin*d III (Promega) e/ ou o padrão 100 pb (Invitrogen).

Tabela 11 - Condições de amplificação dos genes selecionados.

Gene	Condições do PCR
RNAr 16S	95 ºC/3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 10 s, anelamento a 50 ºC por 20 s, extensão a 72 ºC por 1 min; e extensão final a 72 ºC por 7 min.
rpoC1	95 °C/10 min; 35 ciclos de desnaturação a 92 °C por 90 s, anelamento a 58 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 2 min; extensão final a 72 ºC por 10 min.
rbcLX e tufA	95 °C/3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min, extensão final a 72 ºC por 10 min.
cpcBA-IGS	92 °C/2 min; 40 ciclos de desnaturação a 92 °C por 40 s, anelamento a 55 °C por 50 s, extensão a 72 °C por 2 min, extensão final a 72 ºC por 8 min.

3.3.3 Clonagem e transformação de produtos de PCR

Após a amplificação via PCR das sequências de DNA, foi realizada a clonagem dos amplicons utilizando o kit de clonagem "pGEM®-T Easy Vector Systems" (Promega). O volume de 10 µL de ligação foram misturados a 100 µL de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α. A transformação ocorreu por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), mantendo-se por 30 min em gelo, 45 s em banho-maria a 42 ºC e voltando por 2 min no gelo. Posteriormente, 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foram adicionados à mistura e incubado a 37 ºC por 60 min, sob agitação constante de 250 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo LB (Luria-Bertold, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) na concentração de 20 g L^{-1}, solidificado com ágar 1,5% (LabCenter, Campinas, SP, Brasil), acrescido de ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos nas concentrações

finais de 100 µg mL^{-1}. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. Os clones transformados foram selecionados a partir de colônias com coloração branca, as quais foram crescidas em 4 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg mL^{-1}) a 37 ºC durante 12 horas, sob agitação constante de 250 rpm. A presença dos insertos nos clones transformados foi confirmada por meio de PCR de colônia utilizando os iniciadores M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') do vetor. As reações de PCR continham 1 µL de suspensão de células (clone), tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 8,4), 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 1,5 U de Taq polimerase (Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 25 µL. As reações foram feitas em termociclador "Gene Amp® PCR System 9700" (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94 ºC/5 min, 30 ciclos 95 ºC/20 s, 50 ºC/15 s e 60 ºC/1 min.

Plasmídios contendo o inserto de interesse foram extraídos pelo método de hidrólise alcalina com pequenas modificações (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Em microtubo de 1,5 mL, 3 mL de cultura foram concentrados (5.000 rpm, 5 min, 4 ºC) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 100 µL de solução I (2,5 mL Tris-HCl 1 M, pH 8,0, 2,0 mL EDTA 0,5 M, 0,9 g glicose e água ultrapura para volume final de 100 mL) gelada. Em seguida, 200 µL de solução II (NaOH 0,4 N, SDS 2%, na proporção 1:1) foram adicionados ao microtubo e os volumes misturados por inversão. Após 10 minutos de incubação no gelo, 150 µL da solução III (60 mL acetato de potássio 5 M; 11,5 mL ácido acético glacial e água ultrapura para volume final de 100 mL) foram adicionados. Depois de homogeneizado gentilmente por inversão, o material foi incubado no gelo por mais 10 min. Posteriormente, o material foi centrifugado (14.000 rpm, 20 min, 4 ºC) e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e tratado com 1 µL RNAse (10 mg mL^{-1}) a 37 ºC por 30 min. Após esse período, adicionou-se 1 mL de etanol 100% gelado e centrifugou-se (14.000 rpm, 15 min, 4 ºC). Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 750 µL de etanol 75% gelado e centrifugado novamente (14.000 rpm, 5 min, 4 ºC). O sobrenadante foi descartado e o pélete, após período de secagem, foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura esterilizada. Os plasmídios extraídos foram quantificados em gel de agarose 1% utilizando o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e foram armazenados a −20 ºC.

3.3.4 Sequenciamento dos genes clonados

Os plasmídios extraídos foram reamplificados por PCR usando o "DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit" (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Para a reação foram utilizados 200 ηg de plasmídio contendo o inserto, 5 ρmol do iniciador T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'), 1 µL de *Sequencing Reagent Premix*, 2 µL de tampão *Save Money* 2,5 X (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura esterilizada para volume final de 10 µL. Também foram utilizados conjuntos de iniciadores internos visando o fechamento das sequências que codificam a subunidade RNAr 16S (357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R) (LANE, 1991) e o gene *rbclX* (CW, DN, rbclR) (RUDI; SKULBERG; JABSEN, 1998; FEWER et al., 2007). As condições da PCR foram: 25 ciclos 95 ºC/20 s, 50 ºC/15 s e 60 ºC/1 min. Após a reação, o DNA foi precipitado usando tampão de acetato de sódio (acetato de sódio 1,5 M – pH 9,0 3 EDTA 250 mM), em seguida foi lavado com etanol 100% e 70% para remover resíduos dos corantes dos terminadores. O DNA foi resuspendido em formamida HiDi (Applied Biosystems) e colocado no sequenciador capilar "ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems). Os dados foram coletados e processados pelo programa "ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software", versão 3.7 (Applied Biosystems).

3.3.5 Análise filogenética

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade ≤ 20) usando o pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional Linux. Essas sequências foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se a ferramenta Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990), visando a identificação dos gêneros das cianobactérias analisadas. Para análise filogenética pelo método de distância (NJ - *Neighbor Joining*) (SAITOU; NEI, 1987), as sequências de RNAr 16S, *rpoC1*, *tufA*, *rbcL* e *cpcBA*-IGS obtidas e outras sequências escolhidas retiradas do NCBI foram alinhadas utilizando o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994) contido no programa MEGA

4.0.2 (TAMURA et al., 2007). O ajuste das extremidades das sequências de DNA, de forma que todas elas tenham o mesmo número de bases e estejam completamente alinhadas, foi feito com o auxílio do programa MEGA 4.0.2. No cálculo da significância estatística da similaridade entre as sequências foi usada a análise de reamostragem (*bootstrap*) (SWOFFORD, 2002) para 1.000 replicações. A árvore filogenética foi gerada no programa MEGA 4.0.2 utilizando o parâmetro Kimura-2.

Para as análises filogenéticas das sequências pelo método de Máxima Verossimilhança (MV - *Maximum Likelihood*) o alinhamento dos genes independentemente foi realizado usando o programa R-Coffee (www.tcofee.org) (MORETTI et al., 2008). Alinhamentos múltiplos foram feitos para os genes codificantes de proteínas no programa T-Coffee do EBI (*European Bioinformatics Institute*) com valores de parâmetro padrão (www.ebi.ac.uk/t-coffee) (NOTREDAME; HIGGINS; HERINGA, 2000). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente. A análise foi realizada com o auxílio do Prof. Dr. Carlos Eduardo Guerra Schrago (Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

A escolha do modelo utilizado na MV foi conduzido em HyPhy (*Hypothesis Testing Using Phylogenies*) (KOSAKOVSKY POND; FROST; MUSE, 2005). O GTR+G+I foi o melhor ajuste para os dados, com 1% de significância. A árvore MV foi estimada no PhyML 3.0 (GUINDON; GASCUEL, 2003). A significância topológica foi medida pelo teste de razão de verossimilhança aproximado (*approximate likelihood ratio test* - aLRT) para os ramos (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006) nas árvores MV. Foram realizadas 1.008 reamostragens para acessar a confiabilidade dos nós.

A história evolutiva das linhagens estudadas também foi reconstruída por meio da montagem de um conjunto de dados de 4.956 pb contendo as sequências gênicas de RNAr 16S, *rpoC1*, *tufA*, *rbcL* e *cpcBA*-IGS. A topologia da árvore foi inferida no programa MrBayes utilizando o modelo GTR+G+I. A cada partição do gene, parâmetros evolutivos próprios foram usados. Foram realizadas 1.000 reamostragens para acessar a confiabilidade dos nós. O algoritmo MCMC foi executado como descrito acima.

3.4 Ensaio Imunoenzimático para detecção de microcistinas

A produção da cianotoxina MCYST foi avaliada para as linhagens selecionadas utilizando o ensaio imunológico ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de MCYST em água (Kit placa Microcistina, Beacon Analytical Systems, Inc., Portland, ME, EUA). Esse ensaio imunológico, segundo o fabricante, foi desenvolvido para identificar MCYST do tipo –LR, -RR e –YR, e nodularinas. O preparo das amostras para esse teste foi feito em duplicatas de 5 mL de cultura da linhagem no final da fase exponencial de crescimento, foram colocadas em microtubos e a lise celular foi feita utilizando fervura em microondas por 1 min seguida por 30 s de agitação em vortex, procedimento repetido mais uma vez (SILVA-STENICO et al., 2009). As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 5 min, 4 ºC). Em seguida a análise foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5 Análise de bioatividade

As cianobactérias selecionadas foram cultivadas em erlenmeyers contendo 300 mL de meio de cultura (Tabela 8) por um período de 20 dias, cultivadas com temperatura constante de aproximadamente 25 ºC ± 1 °C com fotoperíodo de 14 h claro: 10 h escuro (irradiância 40 µmol fótons m^{-2} s^{-1}). As células foram concentradas por centrifugação (9.000 rpm, 15 min, 10 ºC) e o sobrenadante retirado foi dividido em duas frações para a extração de substâncias bioativas extracelulares. Utilizou-se 2 mL de metanol para a extração de cianopeptídeos intracelulares mantidos sob agitação a 250 rpm por 12 h. Posteriormente as amostras foram concentradas (3.000 rpm, 15 min, 4 ºC) e os sobrenadantes foram armazenadas em freezer a -20 °C para análises posteriores. Os cianopeptídeos extracelulares presentes nas frações do sobrenadante foram extraídos com 150 mL de acetato de etila e 150 mL de clorofórmio. Utilizou-se um funil de separação para separar a fase aquosa da fase do solvente orgânico, e este foi coletado e concentrado, evaporado e, posteriormente, armazenado a -20 ºC.

Os extratos obtidos foram utilizados em bioensaios em placas de Petri contendo meio LB cotendo 1,5% de ágar. Foram aplicados 100 µL dos extratos em discos de 6 mm de diâmetro de papel filtro (J. Prolab, São José dos Campos, SP, Brasil) esterilizados. Foram espalhados com alça de drigalski 50 µL de cultura líquida de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli, Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus*

pasteuri e *Staphylococcus aureus*. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. Para os ensaios com os fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, um bloco de ágar contendo micélio foi colocado no centro da placa contendo meio BDA (2% de caldo de batata, 1% de dextrose e 1% de ágar). As placas foram incubadas a 28 °C por 48 a 72 h. Os discos contendo os extratos foram colocados ao redor do bloco. Resultados positivos foram visualizados pelo aparecimento de zonas de inibição de crescimento e seu tamanho, em milímetros, foi anotado.

Os extratos intra e extracelulares com atividade biológica significante foram analisados por espectrometria de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, Reino Unido) para identificar substâncias bioativas já descritas em literatura contidos na biblioteca virtual de cianopeptídeos do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias (CENA/USP). A espectrometria de massas foi realizada no laboratório do Dr. Marcos Nogueira Eberlin (Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP). As amostras foram misturadas em solução de metanol: água ultrapura (1:1, v/v), contendo 0,1% ácido fórmico, na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram injetadas a velocidade de 0,5 µL min^{-1} e o espectro foi adquirido no modo positivo utilizando 3,5 kV de voltagem no capilar, 30 V no cone e 4 V no extrator. As temperaturas no bloco e do gás de dessolvatação foram 100 ºC. A fragmentação das substâncias foi obtida utilizando diferentes energias de colisões (4-70 eV) utilizando o gás argônio (Ar) como gás de colisão.

3.6. Análise de cianopeptídeos produzidos pela *Fischerella* sp. CENA161 e detecção de genes envolvidos na síntese de microcistina

3.6.1. Curva de Crescimento

A linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foi cultivada por 60 dias em câmara de crescimento com temperatura constante de aproximadamente 25 ºC e iluminação fluorescente de 40 µmoles fótons m^2s^{-1}. Triplicatas contendo 100 mL de meio de cultura BG-11 sem nitrogênio foram coletadas a cada três dias. Desses, 5 mL foram armazenados a -20 ºC até a última coleta para o processamento da curva de crescimento, que foi realizada utilizando o peso seco da cultura em estufa à 60 ºC por 12 h. O restante da cultura foi centrifugado (9.000 rpm, 30 min, 4 ºC). O sobrenadante foi filtrado à vácuo e seco em estufa à 60 ºC. O sobrenadante seco e o pélete liofilizado foram armazenados separadamente a -20 ºC.

3.6.2. ELISA

O pélete liofilizado de cada ponto da coleta foi ressuspendido em 2 mL de água ultrapura esterilizada e a quebra da membrana ocorreu conforme descrito no item 3.4. As frações intracelulares concentradas foram diluídas 1.000 vezes em água ultrapura e analisadas por imunoensaio ELISA conforme descrito no item 3.4.

3.6.3. Bioatividade

Das triplicatas de cada ponto, em duas acrescentou-se 2 mL de clorofórmio e em uma 2 mL de acetato de etila e realizou-se o ensaio de bioatividade com três bactérias patogênicas, *Staphylococcus pasteuri*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, conforme descrito no item 3.5. Utilizou-se o extrato intracelular do item 3.6.2 para o ensaio com a bactéria *Micrococcus luteus*, conforme descrito no item 3.5.

Um teste para a purificação parcial das substâncias foi realizado utilizando uma coluna C_{18} (Applied Separations, Allentown, PA, EUA), na qual 500 µL do extrato extracelular extraído em clorofórmio, coletado no 20º dia foram concentrados em estufa a 60 ºC até um volume de 100 µL e acrescentado a 500 µL de metanol, e então eluídos com 25, 50, 75 e 100% de metanol:água. Novo ensaio com a bactéria *Micrococcus luteus* foi realizado com 100 µL de cada fração conforme descrito no item 3.5 para identificar em qual fração se encontravam as substâncias bioativas. As frações que apresentaram bioatividade foram aplicadas no espectrômetro de massas para identificação das possíveis substâncias bioativas.

3.6.4 Detecção de genes envolvidos na biossíntese de microcistina

3.6.4.1 Extração de DNA e amplificação de genes envolvidos na síntese de microcistina

A extração do DNA genômico da *Fischerella* sp. CENA161 foi feita conforme já descrito no ítem 3.3.1. A amplificação por PCR de sequências de genes codificadores da MCYST foi feita utilizando os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores dos genes descritos na Tabela 12. As condições de amplificação seguiram os protocolos descritos pelos autores da referência com algumas modificações (Tabela 13).

Tabela 12 - Oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação dos genes envolvidos na síntese de microcistina.

Gene	Primers	Sequência (5´- 3´)	Tamanho e Região do gene	Referência
mcyA	OMETF OMETR MSF MSR MSI	TTATTCCAAGTTGCTCCCCA CTCGGTTGTGCAGTATTTCC ATCCAGCAGTTGAGCAAGC TGCAGATAACTCCGCAGTTG GAGAATTAGGGACACCTAT	202 pb - *N*-metiltransferase - (PS) 1.369 pb - *N*-metiltransferase - (PS)	LORENZI, 2004 TILLETT et al., 2001
mcyB	FAA RAA pB3F pB9R	CTATGTTATTTATACATCAGG CTCAGCTTAACTTGATTATC CAAAARCARGCAGAAMTTCAGG CCAATCVCTATCTAAACAC	758 pb – domínio de adenilação (PS) 807 pb – domínio de adenilação (PS)	NEILAN et al., 1999 FEWER et al., 2007
mcyC	pC1F pC13R pC7F pC8R	GGMTKTGGATTYTGCASCATAT CACTTTCTAACCACTGATTTTGCCA CCTTTATCAATGATTTATGAAAA CCAGAGAAAATTAAAGTATTCCCA	3581–3593 pb – domínio de condensação, adenilação e tiolação (PS)	FEWER et al., 2007
mcyD	KSF KSR mcyDF mcyDR	MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG GGRTCICCIARISWIGTICCIGTICCRTG GATCCGATTGAATTAGAAAG GTATTCCCCAAGATTGCC	700 pb - PKS 818 pb – parte da cetoacil sintase e domínio da aciltransferase (PKS)	BEYER et al., 1999 RANTALA et al., 2004
mcyE	mcyE-F2 mcyE-R4	GAAATTTGTGTAGAAGGTGC AATTCTAAAGCCCAAAGACG	809 a 812 pb – parte do domínio de adenilação e do sítio de ligação da fosfopanteteína (PS)	RANTALA et al., 2004
mcyG	KSF KSR mcyGF mcyGR PKGR1	MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG GGRTCICCIARISWIGTICCIGTICCRTG GAAATTGGTGCGGGAACTGGAG TTTGAGCAACAATGATACTTTGCTG AATCGCTAAAACGCCACC	700 pb - PKS 385 pb - Domínio da *C*-metiltransferase (PKS)	BEYER et al., 1999 FEWER et al., 2007; OUAHID; PEREZ-SILVA; DEL CAMPO, 2005
mcyI	*mcyIdegenF* *mcyIdegenR*	TGTGCGTTATCCTAMTAA GGCTTCTCDCCCTGAAGC	790 pb - Ácido 2-hidroxidesidrogenase	PEARSON et al., 2007
mcyH	*mcyH*5KF *mcyH*5KR	ACTATTAACCCGCAGCCAGA GGGAGGTATGCTCGATCTTG	5.000 pb – Transportadores de cassetes de ligação de ATP	PEARSON et al., 2004

Tabela 13 - Condições de amplificação dos genes selecionados.

Gene	Condições do PCR
mcyA	94 ºC/4 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 20 s, anelamento a 50 ºC por 30 s, extensão a 72 ºC por 1 min; e extensão final a 72 ºC por 7 min.
mcyB (FAA/RAA)	94 ºC/2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 ºC por 10 s, anelamento a 52 ºC por 20 s, extensão a 72 ºC por 1 min; e extensão final a 72 ºC por 5 min.
mcyB, mcyC, mcyD, mcyG, mcyE	95 °C/3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 30 min, extensão a 72 °C por 3 min*; extensão final a 72 ºC por 10 min.
mcyG e mcyD (KSF/KSR)	94 °C/2 min; 5 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 45 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 50 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 4 min, extensão final a 72 ºC por 15 min.
mcyI e mcyH	95 °C/3 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 45 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min, extensão final a 72 ºC por 10 min.

* 1 min de extensão a cada 1000 pb.

3.6.4.2 Sequenciamento e análise dos genes da microcistina

Após a amplificação via PCR das sequências de DNA dos genes foi realizada a clonagem, transformação e sequenciamento dos amplicons conforme descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os seguintes: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG -3'), os quais flanqueiam sequências de nucleotídeos do vetor de clonagem. As sequências foram processadas conforme descrito no item 3.3.5. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as sequências de aminoácidos do banco de dados usando a ferramenta BLASTx (ALTSCHUL et al., 1990). Uma árvore filogenética foi feita utilizando o método de distância (NJ - *Neighbor Joining*) com as sequências de aminoácidos do gene *mcyE* da *Fischerella* sp. CENA161 e outras linhagens do banco de dados. No cálculo da significância estatística da similaridade entre as sequências foi usada a análise de reamostragem (*bootstrap*) (SWOFFORD, 2002) para 1.000 replicações. A árvore filogenética foi gerada no programa MEGA 4.0.2 utilizando o parâmetro Amino: Poisson correction.

Também foi construída uma árvore filogenética concatenada baseada em uma matriz de distância calculada com a média ponderada das distâncias baseada nas sequências de aminoácidos do McyD, McyE e McyG. O método NJ foi utilizado para a construção da árvore.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica dos gêneros

As linhagens selecionadas para o estudo foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon*, cuja caracterização morfológica está apresentada na Figura 6 e nas Tabelas 14 e 15. Todas as linhagens foram isoladas de ambientes naturais brasileiros, algumas de solos da Amazônia (*Fischerella* sp. CENA19, *Hapalosiphon* sp. CENA71 e *Hapalosiphon* sp. CENA72) e outras de ambientes aquáticos do Estado de São Paulo (*Fischerella* sp. CENA161, CENA212, CENA213, CENA214 e *Hapalosiphon* sp. CENA63) (Tabela 14). A maioria das linhagens desses dois gêneros relatadas na literatura ocorre em ambientes termofílicos (BINDER; WILSON; ZUBER,1972; HOFFMANN; CASTENHOLZ, 2001; FINSINGER et al., 2008), portanto, as informações obtidas para linhagens não termofílicas selecionadas neste estudo trazem novos conhecimentos para o grupo e auxiliam na sua taxonomia.

Os dois gêneros estudados foram principalmente diferenciados morfologicamente pelo tipo do tricoma, ou seja, multisseriado em *Fischerella* e uni ou bisseriado em *Hapalosiphon* (Figura 6 e Tabela 14). Baseando-se nesse caractere, a linhagem CENA19, designada anteriormente como *Fischerella* sp. (ETCHEGARAY et al., 2004; FIORE et al., 2005), pertence ao gênero *Hapalosiphon*, uma vez que apresenta o tricoma unisseriado. Porém, de acordo com Dr. Yan Kaštovský (comunicação pessoal), a linhagem CENA19 representa uma cianobactéria diferente tanto de *Fischerella* quanto de *Hapalosiphon*, porque apresenta um tricoma que em parte se assemelha ao tricoma de *Fischerella*, mas em sua maioria não apresenta heterotriquia, semelhante à *Hapalosiphon*. Assim, morfologicamente, essa linhagem não tem uma posição definida, mas neste estudo a sua designação continuará sendo *Fischerella* sp. CENA19, seguindo as publicações anteriores (ETCHEGARAY et al., 2004; FIORE et al., 2005). Mais estudos referentes à variação morfológica em diferentes condições de cultivo possibilitarão uma melhor definição taxonômica para essa linhagem.

Ambos os gêneros apresentaram ramificação tipo-T, como demonstrado na Figura 6 (A, B, D, G e H), na qual as células da ramificação são perpendiculares às células do tricoma. O heterócito (Figura 6), célula especializada na fixação de nitrogênio atmosfério, esteve presente em todas as linhagens estudadas, variando de subesférico (Figuras 6A e 6F) a retangular/cilíndrico (Figuras 6B, 6C, 6E e 6G). Na linhagem CENA212 (Figura 6B) pode-se observar a presença de heterócito com dois poros, em contato com duas células, e heterócito

com três poros, em contato com três células. O contato do heterócito com três células é possível devido à ramificação verdadeira existente para os indivíduos da ordem Stigonematales (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990). Nas linhagens *Fischerella* sp. CENA19 (Figura 6F) e *Hapalosiphon* sp. CENA71 (Figura 6H) observam-se tricomas com possíveis heterócitos em formação. Além disso, as linhagens apresentaram heterotriquia, ou seja, diferenciação entre tricoma e ramificação lateral, e reprodução por hormogônios (Figuras 6E e 6H, Tabela 14). Alguns acinetos foram verificados nas linhagens *Fischerella* sp. CENA19, CENA161, CENA212, CENA213 e CENA214 (Tabela 14).

Os gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon*, juntamente com *Mastigocladus*, *Nostochopsis* e *Westiellopsis* estão agrupados na Família Hapalosiphonaceae (Ordem Nostocales) (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Historicamente, a separação de *Fischerella* e *Hapalosiphon* tem sido feita de acordo com o tipo do tricoma (uni, bi ou multisseriado) e presença de heterotriquia, e estavam em grupos separados, nas Famílias Fischerellaceae e Mastigocladaceae, respectivamente (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1990). A classificação de *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Mastigocladus* é considerada problemática (RIPPKA et al., 1979; HOFFMANN; CASTENHOLZ, 2001; KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008) e uma revisão desses gêneros foi proposta. Hoffmann e Castenholz (2001) recomendaram que as linhagens de *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Mastigocladus* fossem agrupadas em um gênero único, tendo como base as espécies analisadas na época, uma vez que limites claros não foram encontrados entre elas. Entretanto, em um estudo recente, no qual mais espécies desses gêneros foram incluídas, foi proposto que todas as linhagens originadas de águas termais devem ser designadas como *Mastigocladus* e recomenda-se uma completa revisão dos membros aquáticos e terrestres de *Hapalosiphon* e *Fischerella* usando mais linhagens (KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008). No presente estudo utilizou-se do tipo de tricoma para caracterizar cada gênero e espera-se que no futuro outras características morfológicas sejam descritas capazes de diferenciar *Hapalosiphon* de *Fischerella*.

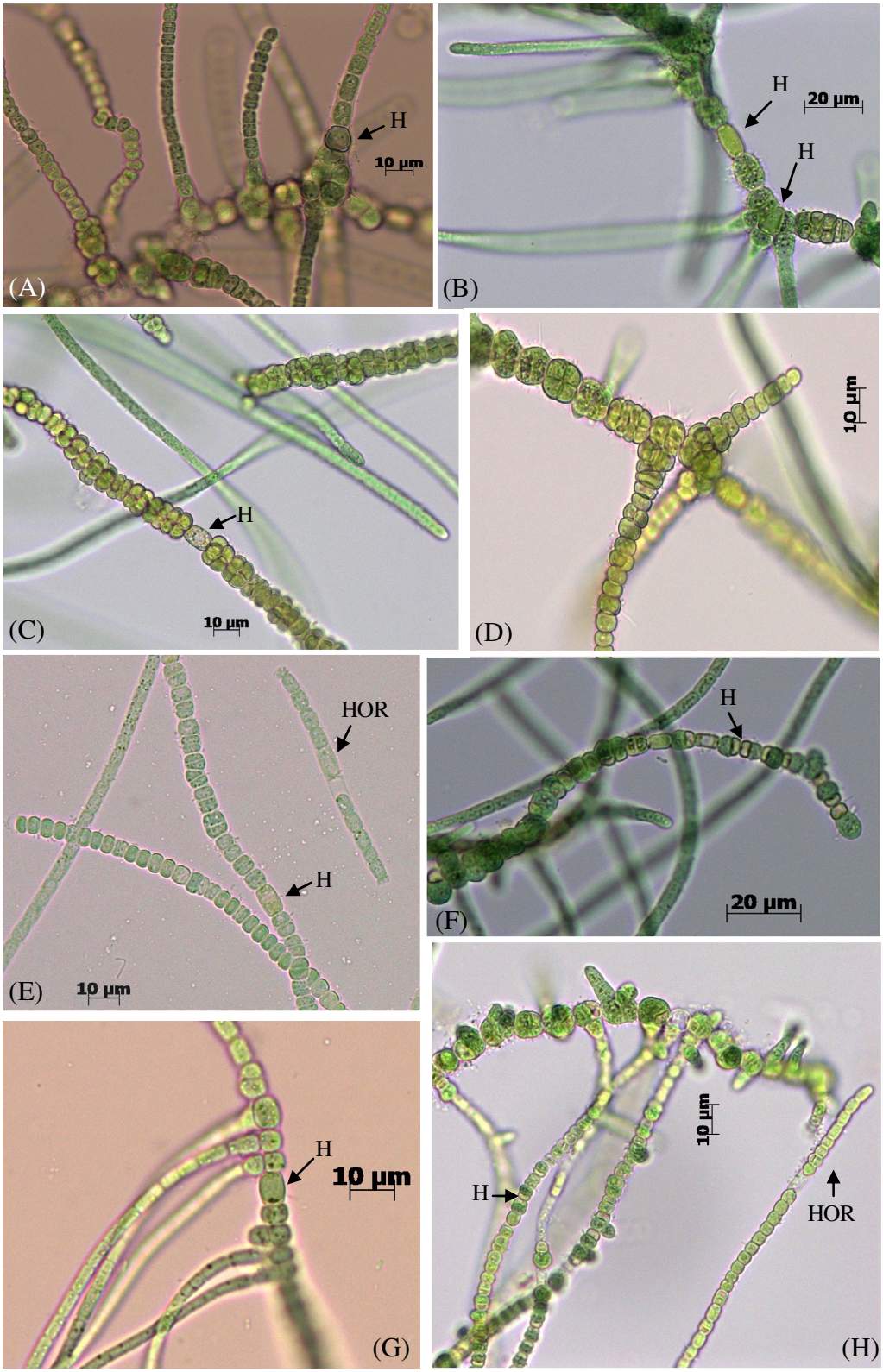


Figura 6 – Fotomicrografia das linhagens de cianobactérias. (A) *Fischerella* sp. CENA161; (B) *Fischerella* sp. CENA212; (C) *Fischerella* sp. CENA214; (D) *Fischerella* sp. CENA213; (E) *Hapalosiphon* sp. CENA72; (F) *Fischerella* sp. CENA19; (G) *Hapalosiphon* sp. CENA63; (H) *Hapalosiphon* sp. CENA71**.** H. Heterócito; HOR. Hormogônio.

Tabela 14 - Caracterização das linhagens brasileiras de *Fischerella* e *Hapalosiphon*, com ramificação do tipo T, de acordo com os caracteres morfológicos segundo Komárek e Hauer (2004).

Gênero/ Linhagem	Ecologia/Ocorrência	Células	Hetero-triquia (1)	Ramo principal/ ramificação (2)	Multiplicação	Acinetos (1)	Referência
Fischerella (espécie tipo *F. thermalis*)	Maioria subaerofítica, solos húmidos (ácidos); florestas tropicais (casca de árvores, musgos, etc)	Heterócito intercalar, subesférico nos tricomas basais e cilíndrico nas ramificações; célula vegetativa cilíndrica com conteúdo levemente granuloso	+	M/U	Hormogônio com aerótopos	Ocasional-mente nos tricomas basais	KOMÁREK; HAUER, 2004
Fischerella sp. CENA161, CENA212, CENA213 e CENA214	Nascente de água, Piracicaba, São Paulo	Heterócito intercalar, esférico, retangular a cilíndrico; célula vegetativa quadrática a retangular	+	M/U	Hormogônio	+	Presente estudo
Fischerella sp. CENA19	Estação Mari, Rio Amazonas, Amazônia	Heterócito intercalar, retangular a cilíndrico; célula vegetativa quadrática a retangular	+	U/U	Hormogônio	+	Presente estudo
Hapalosiphon (espécie tipo *H. pumilus*)	Maioria em águas estagnadas claras, e várias preferem águas de pântano e turfosas; uma espécie citada para águas termais e duas para local subaerofítico	Heterócito intercalar, excepcionalmente lateral, cilíndrico; célula vegetativa cilíndrica ou em forma de barril, às vezes com conteúdo granuloso	- (raros afilados)	U ou (B)/U	Hormogônio, com auxílio de necrídios	Algumas vezes ocorrem solitários	KOMÁREK; HAUER, 2004
Hapalosiphon sp. CENA63	Reservatório ESALQ, Piracicaba, São Paulo	Heterócito intercalar, retangular a cilíndrico; célula vegetativa quadrática a retangular	+	U/U	Hormogônio	-	Presente estudo
Hapalosiphon sp. CENA71 e CENA72	Terra Preta, Sítio Hatahara, Amazônia	Heterócito intercalar, retangular a cilíndrico; célula vegetativa quadrática a retangular	+	U ou B/U	Hormogônio	-	Presente estudo

(1) + presente, - ausente

(2) U - unisseriado; B – bisseriado; M – multisseriado

Tabela 15 - Características morfométricas das linhagens pertencentes aos gêneros estudados *Fischerella* e *Hapalosiphon* [Valores de media (mínimo - máximo) expressos em µm].

Gênero	Linhagens	Heterócito	Células do ramo principal	Células basais da ramificação lateral	Células distais da ramificação lateral
Fischerella	CENA161	**Comprimento** 12,6 (11,1-14,4) **Diâmetro** 7,5 (6,2-8,4) **Razão C/D** (0,7-2,0)	**Comprimento** 8,0 (4,5-11,1) **Diâmetro** 6,5 (5,5-7,2) **Razão C/D** (1,4-2,3)	**Comprimento** 6,3 (5,7-6,8) **Diâmetro** 4,7 (4,2-5,3) **Razão C/D** (1,1-1,6)	**Comprimento** 4,4 (4,0-4,7) **Diâmetro** 3,3 (3,0-3,6) **Razão C/D** (1,2-1,6)
	CENA19	**Comprimento** 9,0 (6,4-11,4) **Diâmetro** 4,1 (3,2-4,7) **Razão C/D** (1,3-2,7)	**Comprimento** 6,2 (4,0-9,4) **Diâmetro** 4,8 (4,4-5,5) **Razão C/D** (0,8-1,8)	**Comprimento** 7,0 (6,2-7,7) **Diâmetro** 3,1 (3,0-3,3) **Razão C/D** (1,9-2,5)	**Comprimento** 4,5 (4,2-5,2) **Diâmetro** 3,1 (3,0-3,3) **Razão C/D** (1,3-1,6)
	CENA212	**Comprimento** 13,1 (11,3-14,5) **Diâmetro** 6,1 (5,2-6,6) **Razão C/D** (1,8-2,5)	**Comprimento** 11,0 (9,1-12,5) **Diâmetro** 6,1 (5,5-7,4) **Razão C/D** (1,6-2,2)	**Comprimento** 8,6 (7,3-9,7) **Diâmetro** 5,8 (5,5-6,1) **Razão C/D** (1,2-1,8)	**Comprimento** 7,7 (4,9-9,3) **Diâmetro** 3,7 (3,2-3,9) **Razão C/D** (1,2-2,7)
	CENA213	**Comprimento** 12,8 (10,9-16,2) **Diâmetro** 6,8 (6,0-7,5) **Razão C/D** (1,4-2,7)	**Comprimento** 7,5 (6,5-9,6) **Diâmetro** 7,2 (6,0-8,0) **Razão C/D** (0,9-1,3)	**Comprimento** 9,0 (5,2-11,3) **Diâmetro** 4,6 (4,1-5,3) **Razão C/D** (1,2-2,8)	**Comprimento** 5,4 (4,7-6,2) **Diâmetro** 4,2 (3,6-4,8) **Razão C/D** (1,3-1,3)
	CENA214	**Comprimento** 12,9 (11,9-14,2) **Diâmetro** 6,6 (6,2-6,9) **Razão C/D** (1,8-2,3)	**Comprimento** 7,8 (5,8-9,0) **Diâmetro** 7,0 (6,4-8,3) **Razão C/D** (0,8-1,3)	**Comprimento** 10,5 (6,6-13,2) **Diâmetro** 4,6 (3,9-5,0) **Razão C/D** (1,4-3,1)	**Comprimento** 4,6 (3,6-5,3) **Diâmetro** 4,4 (4,2-4,7) **Razão C/D** (0,9-1,3)
Hapalosiphon	CENA63	**Comprimento** 7,2 (5,3-9,1) **Diâmetro** 4,7 (4,3-5,1) **Razão C/D** (1,2-1,9)	**Comprimento** 5,1 (2,7-8,0) **Diâmetro** 4,2 (3,3-5,2) **Razão C/D** (0,5-2,3)	**Comprimento** 4,2 (3,4-5,0) **Diâmetro** 3,9 (3,6-4,3) **Razão C/D** (0,8-1,4)	**Comprimento** 4,5 (4,2-5,0) **Diâmetro** 3,1 (2,9-3,6) **Razão C/D** (1,2-1,8)
	CENA71	**Comprimento** 9,5 (8,4-10,7) **Diâmetro** 4,7 (4,3-5,5) **Razão C/D** (1,9-2,1)	**Comprimento** 7,4 (5,8-9,5) **Diâmetro** 5,0 (3,4-6,3) **Razão C/D** (1,0-2,1)	**Comprimento** 5,5 (3,9-7,4) **Diâmetro** 3,1 (2,8-3,4) **Razão C/D** (1,2-2,6)	**Comprimento** 4,2 (3,4-5,1) **Diâmetro** 2,8 (2,6-3,1) **Razão C/D** (1,2-1,7)
	CENA72	**Comprimento** 8,6 (6,5-11,6) **Diâmetro** 4,7 (3,2-5,9) **Razão C/D** (1,1-2,7)	**Comprimento** 6,2 (4,4-7,5) **Diâmetro** 5,6 (4,6-7,0) **Razão C/D** (0,8-1,6)	**Comprimento** 5,0 (3,1-6,6) **Diâmetro** 3,3 (2,8-3,9 **Razão C/D** (0,8-2,0)	**Comprimento** 3,4 (3,1-3,9) **Diâmetro** 3,8 (3,2-4,5) **Razão C/D** (0,8-1,1)

4.2 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando os genes de *rrs*, *rbcLX*, *rpoC1*, *tufA* e a região intergênica dos genes B e A da ficocianina (*cpcBA*-IGS) separadamente e concatenados. As sequências do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNAr (RNAr 16S), obtidas no estudo foram comparadas com sequências do banco de dados do NCBI (Tabela 16). Na bacteriologia tem sido considerado que similaridade acima de 95% entre sequências do gene de RNAr 16S indica que os organismos pertencem a um mesmo gênero (LUDWIG et al., 1998) e acima de 97,5% a uma mesma espécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Esses valores foram estabelecidos tendo como base a reassociação de DNA-DNA, onde o valor de 70% de reassociação entre o genoma de duas espécies diferentes é considerado o limite para diferenciar espécies, ou seja, valores abaixo de 70% considera-se que as espécies são diferentes e valores acima de 70% são da mesma espécie (WAYNE et al., 1987). Assim, observou-se 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). Esses valores são usados para distinguir gêneros e espécies baseando-se somente em sequências de RNAr 16S e não podem ser aplicados a outras sequências gênicas.

A sequência de RNAr 16S da linhagem *Fischerella* sp. CENA19 obtida por Fiore et al. (2005) apresentou baixa identidade com *Fischerella* sp. IAM M-263 (96%), *Hapalosiphon welwitschii* e *Hapalosiphon* sp. IAM M-264 (ambos com 95%) (Tabela 16). Assim, a linhagem CENA19 necessita de revisão em sua classificação, sugestão corroborada também pelos dados morfológicos. Porém, seriam necessárias análises de sua ultraestrutura, análise de proteínas e ácidos graxos para que sua reclassificação seja baseada na taxonomia polifásica (VANDAMME et al., 1996).

A *Fischerella* sp. CENA161 apresentou alta similaridade com a *Fischerella* sp. 1711 (99%), isolada de solo de Papua-Nova Guiné, *Fischerella muscicola* UTEX1829 (99%), proveniente de água doce, e *Fischerella* sp. IAM M-263 (98%), isolada de solo da Tailândia. As sequências de RNAr 16S das linhagens de *Fischerella* sp. CENA212, CENA213 e CENA214 mostraram identidade de 99% com a *Fischerella* sp. CENA161, e no alinhamento das sequências aos pares observa-se que há uma diferença de três nucleotídeos entre as sequências dessas linhagens e a de *Fischerella* sp. CENA161. Essas três linhagens foram

isoladas do mesmo ambiente da *Fischerella* CENA161, ou seja, de uma nascente de água da Fazenda Capuava em Piracicaba, SP, podendo, portanto, representar a mesma linhagem.

A sequência do gene de RNAr 16S da *Hapalosiphon* sp. CENA63 apresentou 100% de identidade com a sequência da *Hapalosiphon* sp. IAM M-264, proveniente de solo da Tailândia, e 99% de identidade com outras duas linhagens do mesmo gênero, ou seja, *Hapalosiphon welwitschii*, isolada de solo da Austrália, e *Hapalosiphon delicatulus* IAM M-266 também isolada de solo, mas da Tailândia (Tabela 16). As linhagens *Hapalosiphon* sp. CENA71 e CENA72 que morfologicamente foram identificadas como pertencente ao gênero *Hapalosiphon*, mostraram ter sequência de RNAr 16S com identidade e cobertura de 100% com a *Fischerella* sp. IAM M-263. Provavelmente, algumas linhagens dos gêneros *Hapalosiphon* e *Fischerella* são muito próximas, tanto pela morfologia quanto pelas sequências do RNAr 16S, e necessitam de revisão. Komárek e Anagnostidis (1989) relatam que mais de 50% das linhagens existentes nas coleções de culturas de cianobactérias não correspondem às características do táxon nas quais elas foram incluídas. Infelizmente, é desconhecido algum trabalho que ilustre e caracterize morfologicamente a linhagem *Fischerella* sp. IAM M-263, impossibilitando a verificação de sua identificação.

Tabela 16 – Identidades das sequências do RNAr 16S das linhagens estudadas e comparadas com outras sequências de cianobactérias do GenBank (NCBI).

Linhagens	Tamanho do fragmento de RNAr 16S (pb)	I (%)	C (%)	Organismo mais próximo no GenBank (nº de acesso)
Fischerella sp. CENA19	1412	96	98	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		95	100	*Hapalosiphon welwitschii* (AY034793)
		95	98	*Hapalosiphon* sp. IAM M-264 (AB093485)
Fischerella sp. CENA161	1417	98	100	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		99	94	*Fischerella* sp. 1711 (AJ544076)
		99	81	*Fischerella muscicola* UTEX1829 (AB075984)
Fischerella sp. CENA212	1417	99	100	*Fischerella* sp. CENA161 (EU840724)
		98	100	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		99	94	*Fischerella* sp. 1711 (AJ544076)
Fischerella sp. CENA213		99	99	*Fischerella* sp. CENA161 (EU840724)
		98	99	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		99	94	*Fischerella* sp. 1711 (AJ544076)
Fischerella sp. CENA214	1418	99	100	*Fischerella* sp. CENA161 (EU840724)
		98	100	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		99	94	*Fischerella* sp. 1711 (AJ544076)
Hapalosiphon sp. CENA63	1412	100	100	*Hapalosiphon* sp. IAM M-264 (AB093485)
		99	100	*Hapalosiphon welwitschii* (AY034793)
		99	100	*Hapalosiphon delicatulus* IAM M-266 (AB093484)
Hapalosiphon sp. CENA71	1414	100	100	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		98	100	*Fischerella* sp. CENA161 (EU840724)
		98	100	*Westiellopsis* sp. Ar73 (DQ786168)
Hapalosiphon sp. CENA72	1414	100	100	*Fischerella* sp. IAM M-263 (AB093491)
		98	100	*Fischerella* sp. CENA161 (EU840724)
		98	100	*Westiellopsis* sp. Ar73 (DQ786168)

Nota: I – identidade; C – cobertura.

Nas árvores filogenéticas, as sequências de RNAr 16S das linhagens estudadas agruparam-se em um clado maior com 99% de valor de reamostragem pelo método de NJ e um valor de 93,6% de reamostragem pelo método de MV (Figuras 7 e 8). Entretanto, dentro desse clado maior, essas linhagens formaram três grupos distintos, sendo que a *Fischerella* sp. CENA19 mostrou em ambos os métodos ser mais distante das outras linhagens analisadas. O grupo I é representado pela linhagem *Hapalosiphon* sp. CENA63 que formou um clado com valor de reamostragem de 89% (NJ) com a *Hapalosiphon* sp. IAM M-264 e *Hapalosiphon delicatus* IAM M-266 e de 95% (NJ) e 87,1% (MV) com a *Hapalosiphon welwitschii* do banco de dados NCBI. No mesmo grupo a linhagem *Westiellopsis prolífica* SAG 16.93 está agrupada com essas linhagens do gênero *Hapalosiphon* com altos valores de reamostragem (99% - NJ e 99,3% - MV).

O grupo II contém as linhagens de *Fischerella* CENA212, CENA213 e CENA214 que formaram um clado único com as linhagens do mesmo gênero *Fischerella* sp. 1711 e *Fischerella muscicola* UTEX1829, com valor de reamostragem de 60% e de 100% outro clado com a linhagem CENA161 (NJ). Porém, pelo método de MV as linhagens de *Fischerella* CENA161, CENA212, CENA213 e CENA214 formaram um clado único com valor de reamostragem de 76,8% com a linhagem *Fischerella muscicola* UTEX1829, e estas cinco linhagens formam um clado com a *Fischerella* sp. 1711 com valor de reamostragem de 86,1%, sugerindo que a análise de MV indicou melhor as relações de parentesco entre as linhagens agrupadas no clado II. O grupo III é composto pelas linhagens do gênero *Hapalosiphon* CENA71 e CENA72 formaram um clado com valor de reamostragem de 99% (NJ) com a linhagem *Fischerella* sp. IAM M-263. No grupo IV, as linhagens termais com ramificação verdadeira originadas de *hot spring* agruparam-se com 100% de reamostragem (NJ e MV). Esses resultados confirmam a separação das cianobactérias termais conforme observado anteriormente por Finsinger et al. (2008) para as linhagens *Fischerella* sp. MV9, MV11 e RV14. As características ecofisiológicas são importantes na descrição das linhagens e têm refletido nas análises filogenéticas. Por exemplo, *Mastigocladus laminosus* representa atualmente um gênero de ambientes termais cuja similaridade de sequências do RNAr 16S foi ≤ 95,2 em relação às linhagens do grupo *Fischerella-Westiellopsis-Hapalosiphon-Nostochopsis* de locais não termais (KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008).

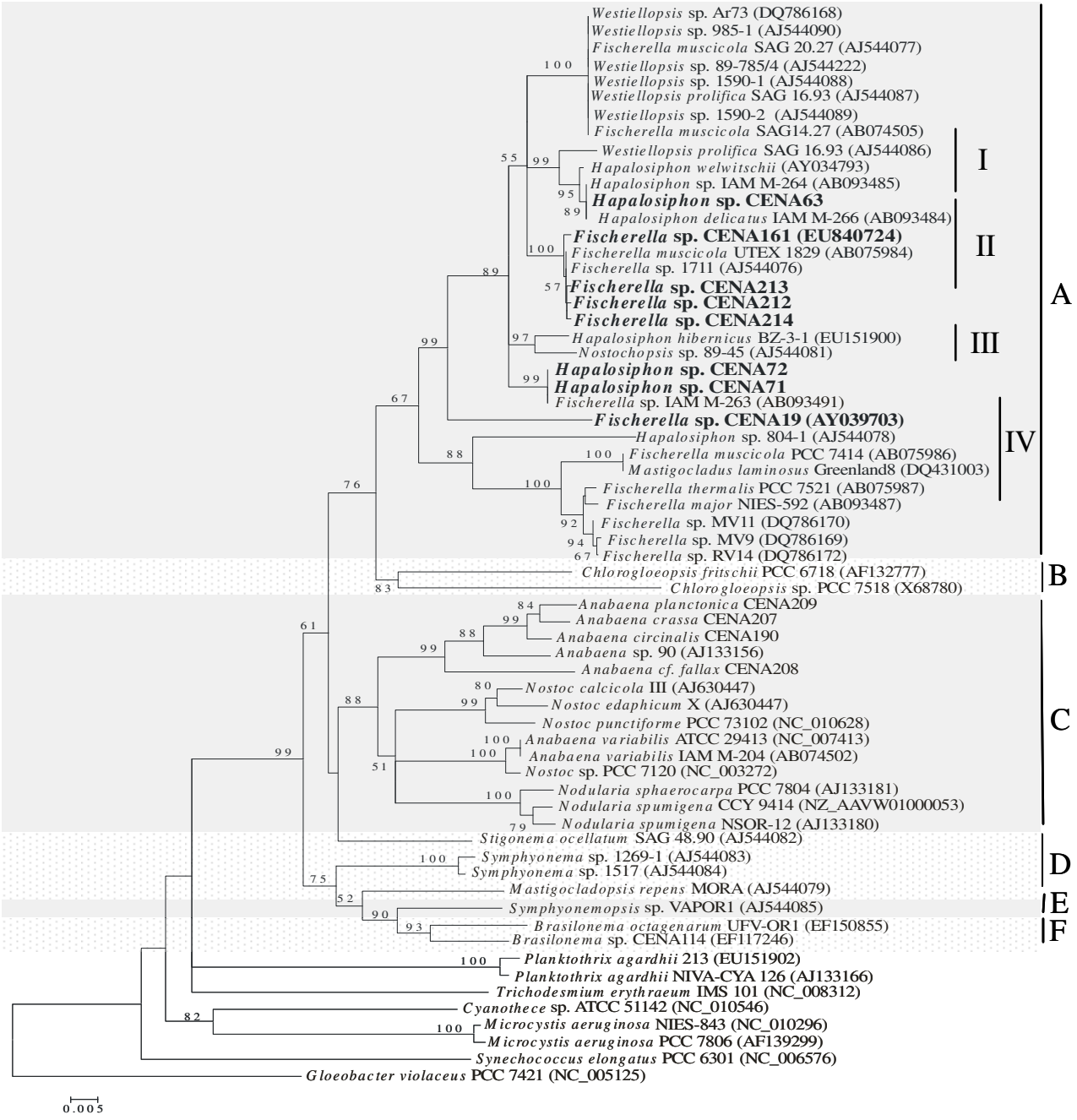


Figura 7 - Análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S usando o método da distância (*Neighbor Joining* – NJ). As sequências analisadas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise NJ estão apresentados em cada nó. Tipos de ramificação: A. Ramificação tipo-T; B. Ramificação irregular ou sem ramificação; C. Sem ramificação; D. Ramificação tipo-Y; E. Ramificação tipo-V; F. Ramificação falsa.

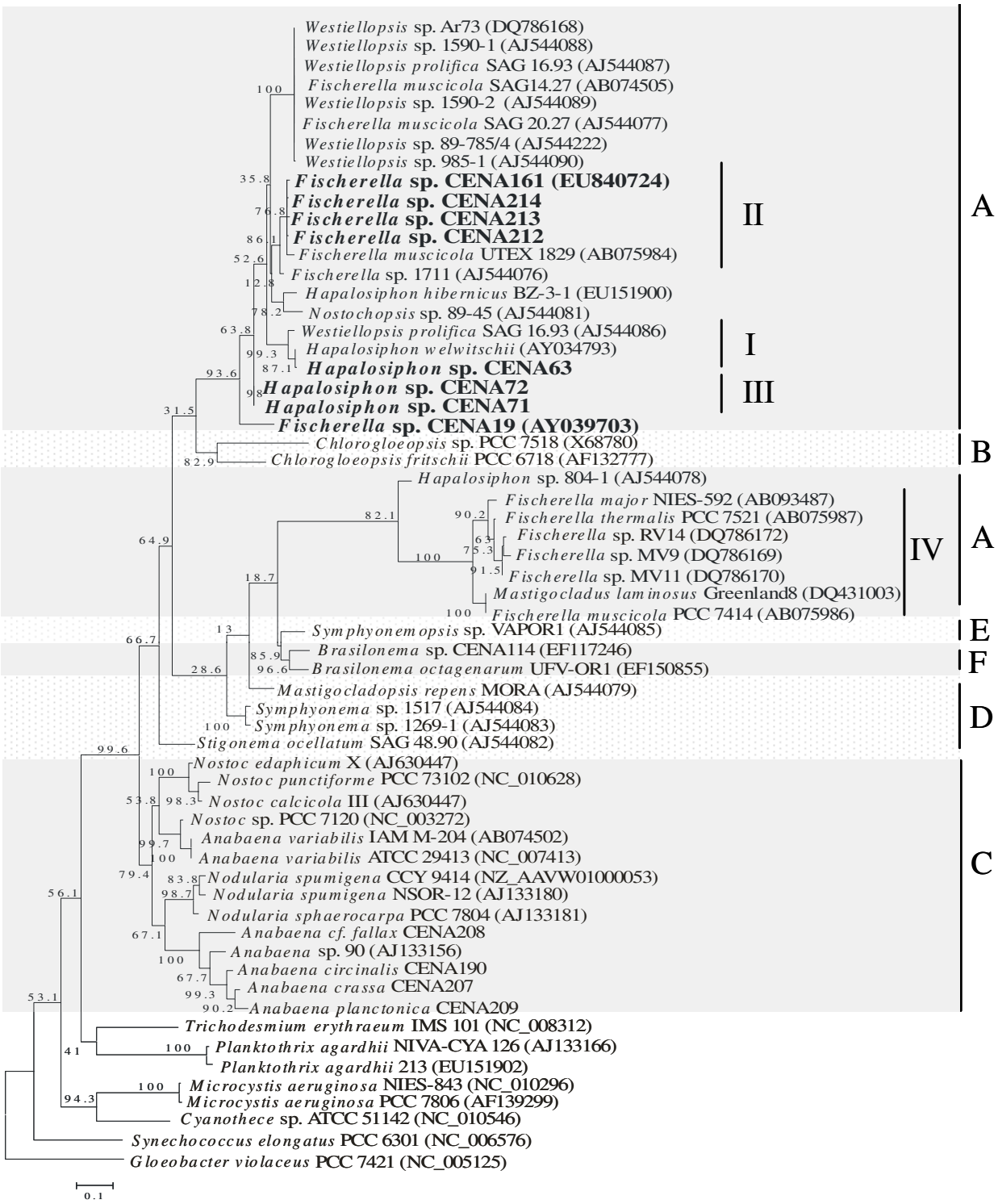


Figura 8 - Análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S usando o método de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood* – MV). As sequências analisadas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó. Tipos de ramificação: A. Ramificação tipo-T; B. Ramificação irregular ou sem ramificação; C. Sem ramificação; D. Ramificação tipo-Y; E. Ramificação tipo-V; F. Ramificação falsa.

Analisando as topologias das árvores filogenéticas (NJ e MV) observou-se que os representantes selecionados das ordens Nostocales e Stigonematales separaram-se dos organismos pertencentes às ordens Chroococcales e Oscillatoriales (Figuras 7 e 8). Morfologicamente, os táxons das ordens heterocitadas Nostocales e Stigonematales eram diferenciados pelo tipo de ramificação do tricoma (falsa ou sem ramificação e verdadeira, respectivamente), mas as análises genéticas mostraram que esta divisão é artificial (WILMOTTE, 1994; WILMOTTE; HERDMAN, 2001; GUGGER; HOFFMANN, 2004; HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). As análises filogenéticas usando diversos genes (RNAr 16S, *nifH*, *gyrB*, *rpoC1* e *rpoD1*) mostram que as duas ordens formam um grupo monofilético (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Assim, as linhagens heterocitadas teriam um ancestral em comum.

A divisão das duas ordens Nostocales e Stigonematales não suportada pelas análises filogenéticas (WILMOTTE; HERDMAN, 2001) auxiliou também na proposição do atual Sistema de Classificação de Hoffmann, Komárek e Kaštovský (2005). Nesse sistema, as tradicionais ordens Nostocales e Stigonematales (cianobactéria heterocitadas) passaram a integrar uma única ordem (Nostocales) dentro da subclasse Nostocophycidae. As linhagens dos gêneros *Hapalosiphon* e *Fischerella* nesse sistema pertencem à família Hapalosiphonaceae, sendo *Fischerella* um gênero revisado com base em análises moleculares da espécie tipo e identificada de acordo com os caracteres fenotípicos revisados e *Hapalosiphon* um gênero com suporte molecular, mas sem análise molecular da espécie tipo (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005).

O gene de RNAr 16S é considerado muito conservado para separação de espécies, sendo, portanto, capaz de discriminar a nível de gênero somente (STALEY, 2006). No presente estudo as sequências de RNAr 16S não foram suficientemente discriminatórias para classificar e separar coerentemente alguns gêneros dentro da família Hapalosiphonaceae. Porém, esse resultado pode também ter sido influenciado pela falta de sequências representativas de alguns gêneros (por exemplo, *Nostochopsis*) ou pela classificação errônea desses gêneros. As árvores filogenéticas utilizando sequências do RNAr 16S de membros da família Hapalosiphonaceae mostram que linhagens do gênero *Fischerella*, *Westiellopsis*, *Hapalosiphon*, *Nostochopsis* e *Mastigocladus* se misturam. Gugger e Hoffmann (2004) sugeriram que entre as cianobactérias heterocitadas a combinação de presença ou ausência de ramificação e o tipo de ramificação podem representar um importante caractere diacrítico para definir as linhagens monofiléticas. Portanto, como verificado por Gugger e Hoffmann (2004),

as linhagens de cianobactérias heterocitadas podem ser agrupadas conforme presença/ausência de ramificação e tipo de ramificação, no caso tipo T para *Fischerella* e *Hapalosiphon* (Figura 7). Uma exceção pode ser verificada nas linhagens com ramificações falsas do gênero *Brasilonema*, as quais formam um clado com a *Symphyonemopsis* sp. VAPOR1 que apresenta ramificações tipo-V, porém, algumas raras ramificações falsas também podem ser encontradas (KOMÁREK; HAUER, 2004). Entretanto, existe somente essa sequência de RNAr 16S de *Symphyonemopsis* no banco de dados e micrografias desse material não está disponível.

As análises filogenéticas pelos métodos NJ e MV formaram um clado separado contendo linhagens termais formadoras de ramificações tipo-T (Figura 8). Entretanto, a análise de MV tem a vantagem em relação aos métodos de distância (por exemplo, NJ) por analisar cada sítio independentemente, e a MV pode incorporar modelos evolutivos na análise, mostrando ser o método mais robusto. As características ecofisiológicas, conforme já mencionada, assim como a biogeografia e a morfologia, têm se mostrado importantes na taxonomia das cianobactérias heterocitadas (FINSINGER et al., 2008; KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008). Assim, caracteres morfológicos como a presença/ausência e tipo de ramificação podem auxiliar na divisão dos diferentes gêneros, mas não é o principal parâmetro que deve ser considerado.

Com o objetivo de caracterizar de forma mais robusta as informações gênicas das linhagens de *Fischerella* (CENA19 e CENA161) e *Hapalosiphon* (CENA63, CENA71 e CENA72), além do RNAr 16S, foram utilizadas as sequências dos genes *cpcBA*-IGS, *rpoC1*, *rbcLX* e *tufA*, individualmente (Figura 9) e concatenadas (Figura 10) nas análises filogenéticas. Essas análises foram realizadas com baixo número de representantes do filo *Cyanobacteria* devido a não disponibilidade de sequências de todos os genes avaliados. Assim, essas análises filogenéticas não puderam ser comparadas com as análises anteriores baseadas somente em sequências do gene de RNAr 16S.

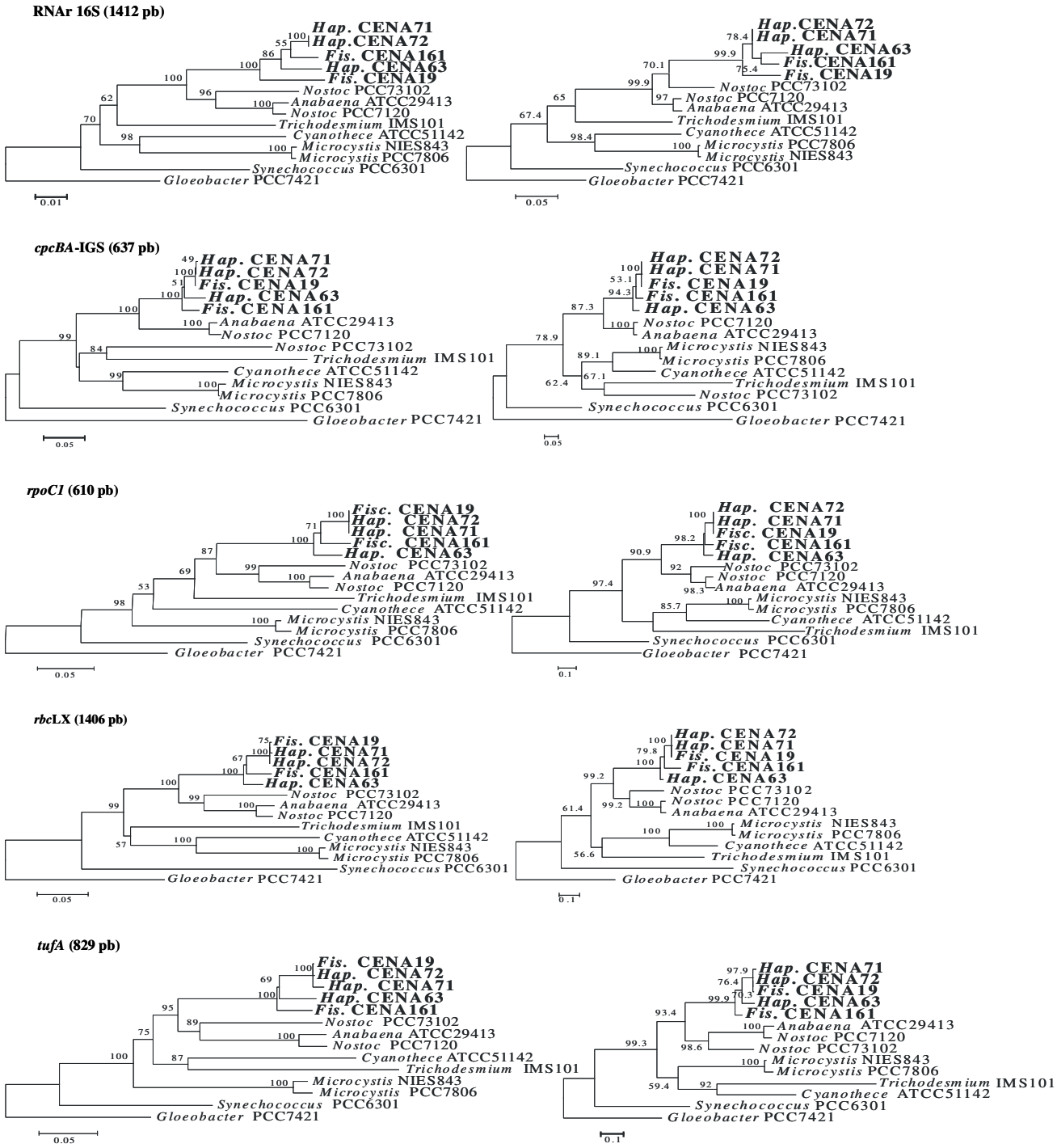


Figura 9 - Análise filogenética de sequências dos gene de RNAr 16S, *cpcBA*-IGS, *rpoC1*, *rbcLX* e *tufA* usando método da distância *Neighbor Joining* (esquerda) e o método de máxima verossimilhança (direita). As sequências analisadas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó. (Todas as sequências obtidas nesse estudo estão disponíveis no ANEXO A).

Na análise de cada gene individualmente, usando ambos os métodos (NJ e MV), as linhagens da Família Hapalosiphonaceae formaram um clado separado e com alto valor de reamostragem (Figura 9). A topologia das árvores dos genes *rbcLX*, *rpoC1* e a região

intergênica da ficocianina (*cpcBA*-IGS), essa última na árvore pelo método de MV, são semelhantes em relação às linhagens estudadas. A *Fischerella* sp. CENA19 formou um clado com as linhagens de *Fischerella* sp. CENA71 e CENA72, sendo que a *Fischerella* sp. CENA161 ficou mais próxima desse grupo que a *Hapalosiphon* sp. CENA63. Já a análise da região *cpcBA*-IGS pelo método de NJ e as análises do gene *tufA* mostram a *Fischerella* sp. CENA161 mais distantemente posicionada que a *Hapalosiphon* sp. CENA63. A análise do gene de RNAr 16S mostrou o resultado mais divergente entre os genes analisados, posicionando a *Fischerella* sp. CENA19 mais distantemente. Assim, a análise individual dos genes selecionados neste estudo mostrou que existem diferenças evolutivas entre eles. Acinas et al. (2009) verificaram que os aminoácidos do operon *cpcBA* em *Pseudanabaena* spp., estão sob seleção negativa (purificadora) em diferentes níveis, ou seja, mutações sinônimas são favorecidas (novas proteínas são eliminadas da população). Outro estudo mostrou que os genes *hetR*, *nifH*, *rpoC1* também estão sob seleção negativa, os genes *kaiC* e *rbcX* estão sob seleção positiva e não foram encontradas evidências para os genes *petB* e *rbcL* (MES et al., 2006). Mais recentemente, Han, Fan e Hu (2009) relataram que as substituições para *rpoC1* e *rbcL* são na maioria sinônimas e para os genes *hetR* e *rbcX*, é relativamente alta a taxa de substituição não-sinônima, o que seria possível devido a pressão seletiva relaxada sobre a evolução desses genes. Assim como no presente estudo, os autores (HAN; FAN; HU, 2009) verificaram que as árvores baseadas em alguns genes (*rpoC1*, *hetR*, *rbcLX* e 16S-23S-ITS) foram incongruentes com a filogenia construída com as sequências do gene de RNAr 16S. Os modelos de substituição e parâmetros indicaram que os cinco loci tem padrões de evolução diferentes (HAN; FAN; HU, 2009). Para o *rpoC1*, a maioria das substituições ocorrem na posição do terceiro códon, isso porque substituições sinônimas não modificam a função do produto do gene. Os dados dos pesquisadores sugerem que o *rpoC1* fornece limitado sinal cladístico, e que essa pode ser a principal causa da incongruência com a árvore do gene de RNAr 16S. Consequentemente, esse gene não é recomendado ser utilizado como um marcador filogenético para níveis intragenéricos. Já os genes *rbcLX* devem ser utilizados com cuidado para inferências filogenéticas porque foram detectados eventos de recombinação nesses genes (HAN; FAN; HU, 2009). Portanto, a análise filogenética aplicada para cada gene em separado deve ser interpretada com cuidado devido às diferentes histórias evolutivas.

Na tentativa de suprimir os problemas de análises filogenéticas baseada em um único gene, a análise de MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), onde as sequências dos genes são concatenados, tem sido utilizada para diferenciação em níveis genéricos ou supragenéricos

(GEVERS et al., 2005). A vantagem em utilizar esse tipo de análise, assim como MLST (*Multilocus Sequence Typing*), é minimizar as consequências de uma recombinação local que pode afetar as verdadeiras relações filogenéticas, o que ocorre quando a filogenia é baseada em um ou poucos genes (HANAGE et al., 2005).

A análise das sequências gênicas concatenadas (Figura 10) mostrou que as linhagens *Fischerella* e *Hapalosiphon*, pertencentes à família Hapalosiphonaceae, agruparam-se em um clado robusto, com 100% de reamostragem. Além disso, as linhagens da família Nostocaceae formaram um clado com 99,8% de reamostragem e esses dois clados internos, formaram um clado maior da ordem Nostocales, com 100% de reamostragem. Por outro lado, a análise concatenada não possibilitou a separação dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon*, confirmando a proximidade desses dois gêneros. Da mesma forma, estudos de morfologia e filogenia indicaram que os gêneros *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Mastigocladus* são muito semelhantes (KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008).

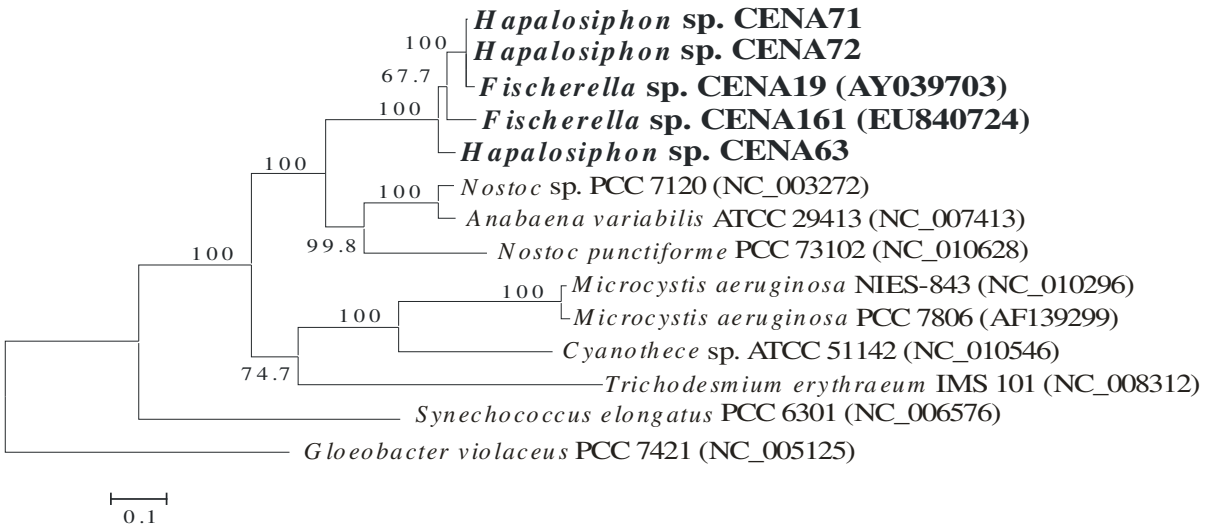


Figura 10 -Análise filogenética de sequências concatenadas dos genes constitutivos RNAr 16S, *cpcBA*-IGS, *rpoC1, tufA* and *rbcL* (4.956 pb) usando o método máxima verossimilhança (*Maximum likelihood* - MV). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% na análise MV estão apresentados em cada nó

Gugger e Hoffmann (2004) sugerem que *Mastigocladus*, *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Westiellopsis* devem ser colapsadas em um único gênero devido as similaridades encontradas entre as sequências de RNAr 16S. Kaštovský e Johansen (2008), no entanto, sugerem que todas as linhagens com ramificações verdadeiras originadas de águas termais, devem ser

classificadas como *Mastigocladus* e é necessária uma revisão dos membros aquáticos e terrestres dos gêneros *Hapalosiphon* e *Fischerella*. Isso está de acordo com a análise filogenética das linhagens brasileiras, mostrando-se necessária, portanto, a revisão dos gêneros *Hapalosiphon* e *Fischerella*.

Quanto aos caracteres morfológicos diacríticos, o tipo de ramo principal (uni, bi ou multisseriado) não correspondeu às análises filogenéticas dos genes de RNAr 16S, *cpcBA*-IGS, *rpoC1*, *rbcLX* e *tufA* (Figura 9). Isso foi confirmado também pela análise concatenada cujas linhagens de *Fischerella* e *Hapalosiphon* ficaram agrupadas em um único clado (Figura 10). A escolha dessa análise mais robusta, por utilizar mais genes além do RNAr 16S e possuir inferência de modelo evolutivo, proporcionou grande suporte aos resultados obtidos. Ainda em relação à morfologia, a presença e o tipo de ramificação (T, Y e V) mostraram ter significado na delimitação dos gêneros de cianobactérias heterocitadas (Figuras 7 e 8). Portanto, a comparação das sequências gênicas do RNAr 16S de linhagens brasileiras com outras obtidas no GenBank (NCBI) confirmaram resultados anteriores (GUGGER; HOFFMANN, 2004). Por outro lado, características ecofisiológicas mostraram-se importantes também na filogenia quando utilizado o RNAr 16S (Figuras 7 e 8). Linhagens termofílicas como as *Fischerella* sp. MV9, MV11 e RV14 (FINSINGER et al., 2008) formaram um clado separado das linhagens não termais. Ou seja, as linhagens termais de *Fischerella*, por formarem esse clado coeso (grupo IV, Figuras 7 e 8), devem ser consideradas como pertencentes à espécie *Mastigocladus laminosus* (KAŠTOVSKÝ; JOHANSEN, 2008). Porém, as diferenças morfológicas entre os gêneros da família Hapalosiphonaceae, incluindo *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Mastigocladus* ainda não foram revisadas. Provavelmente, estudos de biogeografia e ecologia molecular de populações possibilitarão em breve a proposição de gêneros mais bem definidos.

4.3 Ensaio Imunoenzimático para detecção de microcistinas

No ensaio imunoenzimático a *Fischerella* sp. CENA161 e as linhagens isoladas do mesmo local, CENA212, CENA213 e CENA214, apresentaram elevada produção de MCYST–LR, -RR e/ou –YR (Tabela 17). Apesar da linhagem *Hapalosiphon* sp. CENA63 apresentar resultado de produção de 0,19 ppb de MCYST, quando realizado o cálculo da produção dessa toxina por massa seca de célula, este valor foi baixo (0,022 $\mu g\ g^{-1}$). Considerando o erro de leitura, estabeleceu-se que somente as linhagens que apresentaram

leituras com valores acima de 0,13 ppb são potencialmente produtoras de MCYSTs, portanto, *Fischerella* sp. CENA19, *Hapalosiphon* sp. CENA71 e CENA72 não foram consideradas produtoras de MCYSTs.

Tabela 17 - Detecção da produção de microcistina utilizando o imunoensaio ELISA.

Linhagem	Microcistina (ppb)	Microcistina (µg de MCYST/g biomassa seca)
Fischerella sp. CENA19	0,09	0,013
Fischerella sp. CENA161	703,36	703,36
Fischerella sp. CENA212	935,81	222,81
Fischerella sp. CENA213	784,62	170,51
Fischerella sp. CENA214	915,62	143,06
Hapalosiphon sp. CENA63	0,19	0,022
Hapalosiphon sp. CENA71	0,13	0,123
Hapalosiphon sp. CENA72	0,10	0,156

4.4 Análise de bioatividade

4.4.1 Extração de metabólitos secundários

Os solventes selecionados para a extração intracelular (metanol) e extracelular (clorofórmio e acetato de etila) de metabólitos com atividade antimicrobiana mostraram-se eficientes para algumas linhagens de cianobactérias (Tabela 18). O acetato de etila é capaz de dissolver um grande número de substâncias tais como gorduras, óleos e resinas devido a sua baixa polaridade (MUNDT; KREITLOW; JANSEN, 2003; BIONDI et al., 2007). Já o clorofórmio também é um bom solvente por ser miscível na maioria dos líquidos orgânicos e ser convenientemente volátil, extraindo alcalóides (GANTAR et al., 2008). O metanol é utilizado normalmente na extração de óleos vegetais, mas também consegue extrair com eficiência substâncias antimicrobianas (HARADA; KONDO; LAWTON, 1999; CHAIKLAHAN et al., 2008). Os extratos obtidos com esses solventes das oito cianobactérias avaliadas foram capazes de inibir o crescimento de várias bactérias patogênicas (Tabela 18). A inibição do crescimento foi determinada qualitativamente por meio da medição do tamanho dos halos de inibição formados (Tabela 18). Entretanto, esses extratos não apresentaram

atividade de inibição para a bactéria *Salmonella typhimurium* e para os fungos testados (*Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*).

Tabela 18 - Tamanhos dos halos de inibição contra as bactérias testadas (em mm).

Linhagem	*Bacillus cereus*	*Escherichia coli*	*Micrococcus luteus*	*Bacillus subtilis*	*Staphylococcus pasteuri*	*Staphylococcus aureus*
Fischerella sp. CENA212						
Intracelular	-	-	-	-	-	-
Extracelular (AE)	-	-	-	-	-	-
Extracelular (CL)	-	-	-	-	-	-
Fischerella sp. CENA213						
Intracelular	-	-	-	-	-	-
Extracelular (AE)	-	-	-	-	-	-
Extracelular (CL)	-	-	-	-	-	-
Fischerella sp. CENA214						
Intracelular	-	-	-	-	-	-
Extracelular (AE)	-	-	-	-	-	-
Extracelular (CL)	-	-	7	-	-	-
Fischerella sp. CENA161						
Intracelular	9	-	8	-	10	-
Extracelular (AE)	-	-	12	7	-	11
Extracelular (CL)	10	-	9	-	-	8
Fischerella sp. CENA19						
Intracelular	7	-	9	8	-	-
Extracelular (AE)	-	-	-	-	-	-
Extracelular (CL)	-	-	-	-	-	-
Hapalosiphon sp. CENA63						
Intracelular	-	-	-	8	-	-
Extracelular (AE)	-	-	-	-	-	-
Extracelular (CL)	-	-	-	-	-	-
Hapalosiphon sp. CENA71						
Intracelular	12	-	-	14	11	-
Extracelular (AE)	-	-	-	8	-	-
Extracelular (CL)	-	-	-	7	-	-
Hapalosiphon sp. CENA72						
Intracelular	9	-	8	15	-	-
Extracelular (AE)	-	-	-	-	-	-
Extracelular (CL)	-	7	-	11	-	-
Controle (meio de cultura)						
AE	-	-	-	-	-	-
CL	-	-	-	-	-	-

AE – acetato de etila, CL – clorofórmio

A bactéria *Bacillus cereus* é responsável por intoxicação alimentar em humanos, principalmente relacionada ao arroz, mas também pode ser encontrada em alimentos que contenham amido, como batata e macarrão (FDA, 2009). Extratos celulares das *Fischerella*

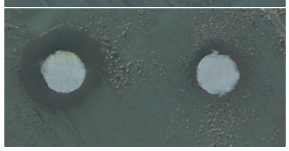
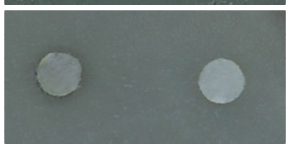
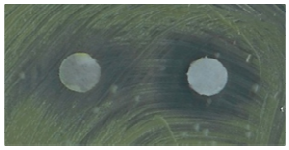
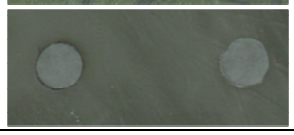
spp. CENA19 e CENA161 e das *Hapalosiphon* spp. CENA71 e CENA72 e extrato extracelular extraído com clorofórmio da *Fischerella* sp. CENA161 apresentaram inibição no crescimento dessa bactéria. Apenas o extrato extracelular extraído com clorofórmio da *Hapalosiphon* sp. CENA72 apresentou halo de inibição para a bactéria *Escherichia coli* e os extratos extracelulares (acetato de etila e clorofórmio) da *Fischerella* sp. CENA161 apresentaram inibição da bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável pela contaminação de alimentos e infecções na pele. Extratos extracelulares da *Fischerella* sp. CENA214 (clorofórmio), intracelular da *Fischerella* sp. CENA19 e *Hapalosiphon* sp. CENA72, e extratos intra e extracelulares da *Fischerella* sp. CENA161 apresentaram inibição da bactéria *Micrococcus luteus*. Essa bactéria é encontrada no leite e seus derivados e em partículas de poeira, podendo causar meningite em humanos (FOSSE et al., 1985).

A bactéria *Bacillus subtilis* é encontrada em solo e material orgânico em decomposição, associada a infecções em pacientes imunodeprimidos, intoxicação alimentar e podem ser fitopatogênicas. Os extratos extracelular da *Fischerella* sp. CENA161 (acetato de etila), intracelular da *Fischerella* sp. CENA19 e *Hapalosiphon* sp. CENA63, e extratos intra e extracelulares da *Hapalosiphon* spp. CENA71 (acetato de etila e clorofórmio) e CENA72 (clorofórmio) apresentaram inibição de crescimento dessa bactéria (Tabela 18, Figura 11). A bactéria *Staphylococcus pasteuri*, encontrada na cavidade bucal e trato respiratório, apresentou inibição do seu crescimento quando em contato com os extratos intracelulares da *Fischerella* sp. CENA161 e da *Hapalosiphon* sp. CENA71.

Figura 11 - Halos de inibição de *Bacillus subtilis*. 1. Controle - metanol; 2. *Hapalosiphon* sp. CENA71 (extrato intracelular); 3. *Hapalosiphon* sp. CENA72 (extrato intracelular).

Os extratos obtidos da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foram os mais efetivos nos bioensaios, inibindo o crescimento de cinco bactérias (Tabela 19), seguida pela *Fischerella* sp. CENA19 que inibiu o crescimento de três bactérias. Østensvik et al. (1998) realizaram bioensaios contra *Aeromonas hydrophila, B. cereus, B. subtilis, E. coli* e *M. luteus* utilizando extratos intracelulares, extraídos com água e metanol, das cianobactérias: *Cylindrospermopsis raciborskii* NIVA-CYA225, *Tychonema bourrellyi* NIVA-CYA 33/1, *Anabaena lemmermannii* NIVA-CYA 83/1, *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon flos-aquae*. Tal estudo mostrou que os extratos contêm diferentes substâncias antibacterianas, devido a variedade de metabólitos secundários produzidos, e que as substâncias solúveis em metanol combinado com ácido acético foram as mais eficientes na inibição das bactérias. Falch, Koening e Wright (1995) já haviam mostrado que extratos extraídos com solventes de diferentes polaridades apresentaram diferentes efeitos antibacterianos em ensaios autobiográficos utilizando *B. subtilis, E. coli* e *M. luteus*. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que extratos intra e extracelulares das cianobactérias *Fischerella* sp. CENA161, *Fischerella* sp. CENA19, *Hapalosiphon* sp. CENA 71, *Hapalosiphon* sp. CENA72 e *Hapalosiphon* sp. CENA63 apresentam potencial para serem utilizados na pesquisa para obtenção de novos fármacos e controladores de pragas.

Tabela 19 - Halos de inibição (mm) das bactérias expostas aos extratos extracelulares da linhagem *Fischerella* sp. CENA161, obtidos com os solventes acetato de etila (AE) e clorofórmio (CL)

Bactérias testadas	AE	CL	Placas de Petri
Staphylococcus pasteuri	10	8	
Staphylococcus aureus	11	8	
Bacillus cereus	6	-	
Micrococcus luteus	17	15	
Bacillus subtilis	7	-	

Estudos anteriores (FALCH; KOENING; WRIGHT, 1995; KREILOW; MUNDR; LINDEQUIST, 1999; WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005; TAN, 2007; SVIRCEV et al., 2008) indicam que as cianobactérias são uma fonte rica de substâncias biologicamente ativas. Um estudo recente de Chlipala et al. (2009) atestou que no total de 12 diferentes linhagens com níveis significantes de bioatividade, 9 pertenciam às ordens formadoras de heterócitos, ou seja, Nostocales (HOFFMANN, KOMÁREK; KAŠTOVSKÝ, 2005). Também, analisando os meios de cultura, 11 das 12 linhagens foram isoladas de água doce ou terrestres, mostrando que o uso de linhagens heterocitadas de água doce é mais promissor na busca de substâncias antivirais, anticâncer e antibióticos (CHLIPALA et al., 2009).

4.4.2 Identificação dos cianopeptídeos bioativos

Os extratos brutos (sem purificação) que produziram halos de inibição no crescimento das bactérias testadas foram analisados em espectrômetro de massas Q-TOF e algumas substâncias putativas foram identificadas (Tabela 20). Entre os extratos analisados (24), somente aqueles obtidos das cianobactérias *Fischerella* sp. CENA161, *Fischerella* sp. CENA19 e *Hapalosiphon* sp. CENA72 produziram espectros que permitiram identificar substâncias putativas. As massas protonadas $[M+H]^+$ obtidas dos extratos foram comparadas com uma biblioteca de substâncias já conhecidas e descritas na literatura. As substâncias com massas conhecidas foram fragmentadas e os fragmentos obtidos foram comparados com os já descritos na literatura. De trinta possíveis substâncias fragmentadas, apenas dez puderam ser identificadas baseando-se nos espectros conhecidos de substâncias já descritas. Porém, os valores de *m/z* de apenas um ou dois pricos produzidos na fragmentação puderam ser identificados baseando-se nas substâncias já conhecidas. A falta de identidade com as substâncias conhecidas de alguns espectros observados na fragmentação pode ser devido aos diferentes equipamentos utilizados para a caracterização dessas substâncias (FAB – *Fast Atom Bombardment* ou MALDI-TOF – *Matrix Assisted Laser Desorption-Time-Of-Flight*). No presente estudo utilizou-se somente o equipamento Q-TOF (*Quadrupole-Time-of-Flight*) o que pode ter fragmentado as substâncias em regiões diferentes, tornando difícil a comparação dos espectros obtidos para verificação da similaridade.

Tabela 20 - Substâncias putativas encontradas nos extratos intra e extracelulares de cianobactérias*.

Linhagem/ extrato	*m/z*	Peptídeo putativo	nº de fragmentos	Equipamento (Referência)	Função
Hapalosiphon sp. CENA72 celular	1055,3	Aeruginopeptina 917S-A	2 (386 e 539)	FABMS (HARADA et al., 2001)	Depsipeptídeo cíclico
Fischerella sp. CENA19 celular	1055,69	Aeruginopeptina 917S-A	2 (386 e 539)	FABMS (HARADA et al., 2001)	Depsipeptídeo cíclico
Fischerella sp. CENA19 celular	1021,70	Cianopeptolina	1 (467)	MALDI-TOF MS (WELKER et al., 2004)	Inibidor de tripsina
Fischerella sp. CENA19 celular	409,24	Fischerellina A	1 (234)	MALDI-TOF (ETCHEGARAY et al, 2004)	Inibidor de fotossíntese
Fischerella sp. CENA19 extracelular (AE)	765,72	Aeruginosina	1 (255)	(WELKER et al., 2004)	Inibidor protease
Fischerella sp. CENA161 celular	1046,6	Oscillapeptilida 97A	1 (1028)	FABMS (FUJII et al., 2000)	Depsipeptídeo cíclico
Fischerella sp. CENA161 celular	755,6	Aeruginosina	1 (140)	WELKER (comunicação pessoal)	Inibidor protease
Fischerella sp. CENA161 celular	462,2	Aeruginosina EI461 ou Microginina	1 (128)	WELKER (comunicação pessoal)	Aeruginosina: Inibidor protease Microginina: Inibição da enzima conversora de angiotensina
Fischerella sp. CENA161 extracelular (CL)	534,1	Ácido Tumonóico C	-	HRFABMS (HARRIGAN et al., 1999)	Depsipeptídeo acíclico não tóxico
Fischerella sp. CENA161 extracelular (CL)	741,4	Aeruginosina	-	WELKER (comunicação pessoal)	Inibidor protease

AE – acetato de etila, CL – clorofórmio; * Os espectros obtidos nesse estudo estão disponíveis no ANEXO B.

No extrato intracelular da cianobactéria *Hapalosiphon* sp. CENA72 um depsipeptídeo cíclico aeruginopeptina 917S-A pode ser presumível. A massa $(M+H-H_2O)^+$ é correspondente a 1055 Da (HARADA et al., 2001) e os fragmentos 386 e 539 foram observados. Essa

substância putativa (aeruginopeptina 917S-A) também foi encontrada no extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA19, sendo obtidos os mesmos fragmentos (386 e 539). No extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA19 também foram encontradas as substâncias putativas cianopeptolina (*m/z* 1021 Da) e fischerelina A (*m/z* 409 Da). Na fragmentação dessas duas substâncias, apenas um pico para cada uma foi identificado, ou seja, 467 e 234 para cianopeptolina e fischerelina A, respectivamente. A cianopeptolina é da mesma classe das aeruginopeptinas e micropeptinas que contém um Ahp (3-Amino-6-hidroxipiperidona) (WELKER et al., 2004). No extrato extracelular extraído com acetato de etila da cianobactéria *Fischerella* sp. CENA19 existe a possibilidade de ter uma aeruginosina, devido ao fragmento 255 Da ter sido identificado. Porém, o fragmento de 140 Da característico do Choi (2-carboxi-6-hidroxioctahidroindole), presente exclusivamente nas aeruginosinas (WELKER; VON DÖHREN, 2006), não foi detectado, não podendo então ser confirmada a produção desse peptídeo.

Os peptídeos putativos encontrados no extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA161 foram oscillapeptilida 97A, aeruginosina e aeruginosina EI461 ou microginina. O peptídeo oscillapeptilida 97A encontrado primeiramente em *Oscillatoria agardhii* é um depsipeptídeo cíclico não tóxico que no estudo de Fujji et al. (2000) foi extraído junto com a toxina MCYST. Esses autores sugerem que linhagens tóxicas possuem genes para a síntese de peptídeos tóxicos e não tóxicos independentes, devido à presença de peptídeos não tóxicos em mutantes sem os genes da MCYST sintetase. No presente estudo, apenas o fragmento correspondente à perda de uma molécula de água, $[M+H-H_2O]^+$ correspondente à *m/z* 1028, descrito no trabalho de Fujji et al. (2000), foi encontrado na fragmentação da substância produzida pela *Fischerella* sp. CENA161. No mesmo extrato, a aeruginosina (*m/z* = 755,6 Da) pode ter sido detectada devido à presença do fragmento *m/z* 140 Da que pode corresponder ao Choi. Já a terceira substância putativa encontrada é a aeruginosina EI461 devido à presença de um espectro de sua massa protonada, mas o fragmento *m/z* 128 Da também encontrado indica que a substância pode ser uma microginina. A microginina é um peptídeo linear que contém um derivado do ácido decanóico, o Ahda (ácido 3-amino-2-hidroxidecanóico) com *m/z* 128 Da (WELKER et al., 2006).

As substâncias extracelulares extraídas com clorofórmio e que apresentaram as maiores inibições no crescimento das bactérias patogênicas (Tabela 18 e 19), não puderam ser completamente identificadas. O espectro *m/z* 534 Da obtido pode corresponder ao ácido tumonóico C (HARRIGAN et al., 1999), porém, a fragmentação dessa substância ainda não

foi publicada e a fragmentação encontrada no presente estudo não pode ser comparada. Já o espectro *m/z* 741 Da também observado nessa fragmentação indica que a substância pode ser uma aeruginosina devido aos intensos sinais entre 280-340 Da, mas o fragmento de 140 Da correspondente ao Choi não foi encontrado.

Os extratos intra e extracelulares potencialmente apresentaram substâncias bioativas interessantes para a indústria farmacêutica e agronômica. A oscilapeptilida 97A e a aeruginopeptina 917S-A são depsipeptídeos cíclicos que apresentam atividade biológica. Outros depsipeptídeos cíclicos são conhecidos pela sua atividade biológica, como por exemplo, a criptoficina-1 que foi primeiramente isolada como sendo um potente antifúngico, mas estudos posteriores verificaram a atividade antitumoral da substância (MOORE, 1996). Outros desipeptídeos cíclicos podem ser prejudiciais, como por exemplo, a hapalosina que é um promotor de tumores e a cianopeptolina, substância putativa encontrada em extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA19, que é um inibidor de tripsina (enzima que participa da proteólise de proteínas e peptídeos produzindo aminoácidos). A aeruginosina é um inibidor de protease e possivelmente está presente nos extratos das linhagens *Fischerella* sp. CENA19 e *Fischerella* sp. CENA161. Um inibidor de protease se liga a um sítio ativo de uma enzima viral impedindo o amadurecimento dos vírus e a sua infecção em novas células (NELSON; COX, 2004). 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 diabete nefropática (WELKER; VON DÖHREN, 2006). A fischerellina A possui atividade biológica devido ao seu potencial de inibição da fotossíntese (ETCHEGARAY et al., 2004). É um aleloquímico que pode ser utilizado, por exemplo, no controle do crescimento de cianobactérias tóxicas. O ácido tumonóico C é um depsipeptídeo acíclico não tóxico que pode ser usado como sistema de defesa, devido sua ação anti-predatória.

Outras linhagens do gênero *Fischerella* já são conhecidas como produtoras de substâncias bioativas, tais como o alcalóide indol tetracíclico fischerindol L (PARK et al., 1992), ambiguina A-F, hapalindol G e H, alcalóides fungicidas tipo-hapalindol (SMITKA et al.,1992), ambigol A, B e o alcalóide indol tjipanazol D (FALCH; KOENING; WRIGHT et al., 1995) e a fischerelina A (HAGMANN; JÜTTNER, 1996). A *Fischerella* sp. JAVA 94/20 isolada de solo sintetiza o 12-*epi*-hapalindol E e H (DOAN et al., 2000) e a *Fischerella* sp. isolada da casca da árvore Neem (*Azadirachta indica*) produz hapalindol T com atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* (ASTHANA et al., 2006). Mais de 50 tipos de hapalindoles, potentes alcalóides antibacterianos e antimicóticos, têm sido reportados de extratos lipofílicos de cianobactérias da ordem Stigonematales, incluindo linhagens do gênero *Fischerella* (KLEIN et al., 1995).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a *Fischerella* sp. CENA161, *Fischerella* sp. CENA19, *Hapalosiphon* sp. CENA71 e *Hapalosiphon* sp. CENA72 apresentam grande potencial como fonte de substâncias bioativas. Estudos futuros baseados na purificação dos extratos obtidos poderão identificar qual ou quais substâncias são responsáveis pela bioatividade em bactérias patogênicas.

4.5 Análise de cianopeptídeos produzidos pela *Fischerella* sp. CENA161 e detecção de genes envolvidos na síntese de microcistina

4.5.1 Curva de crescimento da cianobactéria *Fischerella* sp. CENA161

A curva de crescimento da *Fischerella* CENA161 em meio de cultura BG-11 sem adição de nitrogênio foi realizada a fim de avaliar o período máximo de produção de substâncias bioativas buscando otimizar a extração dessas substâncias. O crescimento da *Fischerella* sp. CENA161 avaliado a cada três dias durante 60 dias, foi lento, apresentando uma longa fase lag (aproximadamente 15 dias) e final da fase logarítmica ao redor dos 50 dias (Figura 12). A curva de crescimento é influenciada pelo inóculo (idade), meio de cultura e condições de incubação (temperatura, irradiância, agitação). A *Fischerella* sp. CENA19 quando cultivada em meio de cultura AA/4 (ALLEN; ARNON, 1955), com agitação constante de 110 rpm, apresentou um crescimento mais rápido (FIORE et al., 2005).

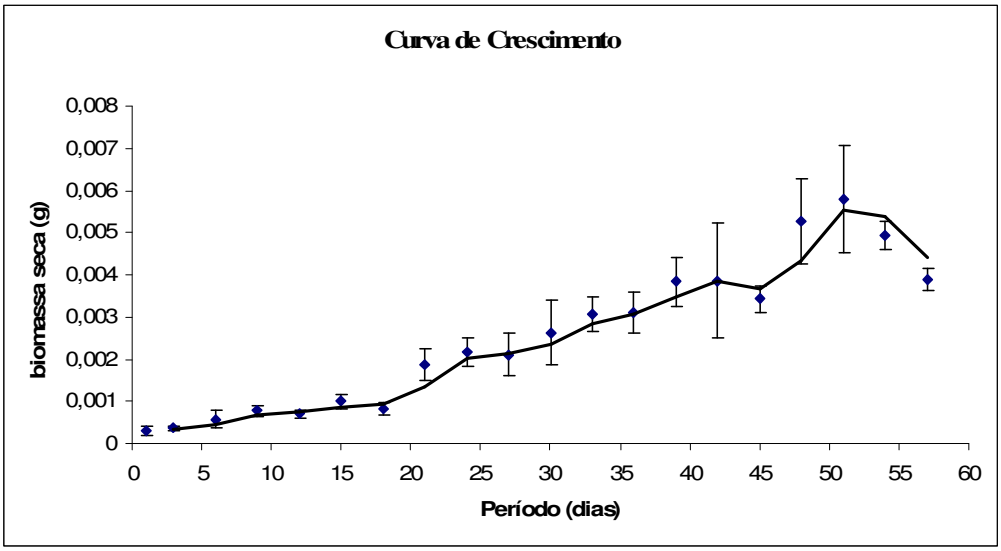


Figura 12 - Curva de crescimento da *Fischerella* sp. CENA161. As barras indicam médias de três repetições e desvio padrão.

Os valores de MCYSTs dos extratos intracelulares obtidos para cada época de amostragens em duplicatas foram bastante variáveis (24 a 143 µg g^{-1}), não acompanhando o aumento ou diminuição de células de acordo com a curva de crescimento. Uma explicação para esses resultados pode ser o fato da *Fischerella* sp. CENA161 produzir três ou quatro variáveis de MCYSTs (–LR, –LL e –FR e/ou –M(O)R (ver item 4.5.2), sendo que destas, o imunoensaio ELISA utilizado para detecção e semiquantificação somente detecta a variante –LR. Outra possível explicação é o fato observado para *Microcystis*, mas que também pode ser que ocorra com a linhagem de *Fischerella* estudada, ou seja, numa mesma população de cianobactérias existem genótipos produtores e não produtores de MCYSTs e a proporção desses dois genótipos mudam com o tempo (VÉZIE et al. 1998; SIVONEN; JONES, 1999; KURMAYER; KUTZENBERGER 2003; JANSE et al., 2004).

As substâncias bioativas dos extratos extracelulares obtidos com o solvente clorofórmio apresentaram melhores resultados (maiores halos de inibição de crescimento das bactérias testadas) do que o solvente acetato de etila, sendo por esse motivo todos os ensaios posteriores realizados com esse solvente. Nas figuras 13 e 14 observa-se o teste de bioatividade realizado com a bactéria *Micrococcus luteus* e os halos de inibição obtidos com 100 µL dos extratos intracelulares (Figura 13) e extracelulares (Figura 14) de cada ponto da coleta aplicado em cada disco. O bioensaio realizado com os extratos intracelulares apresentaram halos de inibição a partir do décimo oitavo dia, e com os extratos intracelulares a partir do décimo segundo dia. A inibição manteve-se constante até o último dia de cultivo. Os extratos extracelulares apresentaram bioatividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*

a partir do 12º dia de cultivo e contra a bactéria *Staphylococcus pasteuri* a partir do 45º dia, permanecendo constante a inibição até o último dia de cultivo.

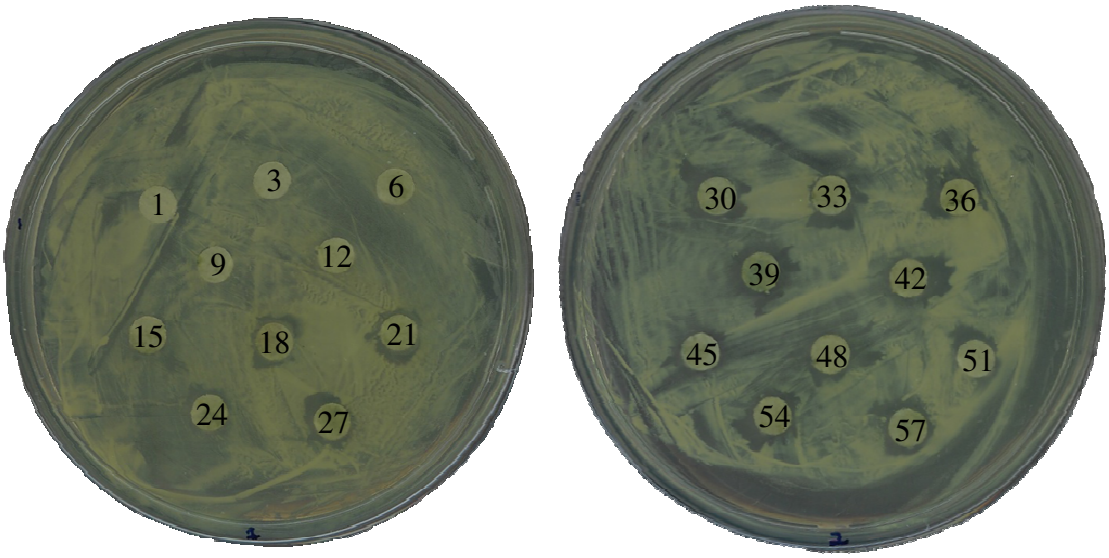


Figura 13 - Halos de inibição da bactéria *Micrococcus luteus*. Extratos intracelulares dos vinte pontos de coleta da curva de crescimento da *Fischerella* sp. CENA161. Os números indicam a época da amostragem realizada (Figura 12).

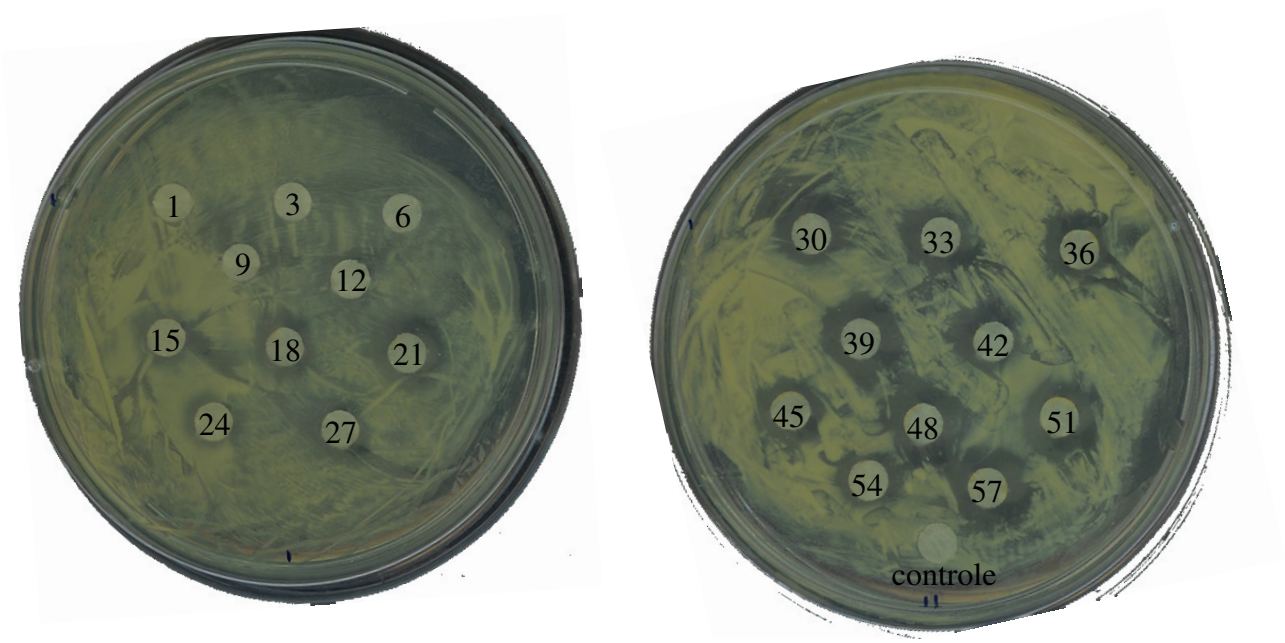


Figura 14 - Halos de inibição da bactéria *Micrococcus luteus*. Extratos extracelulares dos vinte pontos de coleta da curva de crescimento da *Fischerella* sp. CENA161. Os números indicam a época da amostragem realizada (Figura 12).

Utilizando-se o extrato bruto nas análises, sabe-se que diversas substâncias podem estar presentes. Um teste para a purificação parcial das substâncias foi realizado utilizando

uma coluna C_{18}, na qual 500 µL do extrato extracelular extraído em clorofórmio, coletado no 20º dia foram concentrados em estufa a 60 ºC até um volume de 100 µL, acrescentado 500 µL de metanol e então foram eluídos com 25, 50, 75 e 100% de metanol. Um teste de bioatividade contra a bactéria *Micrococcus luteus* foi realizado e observou-se a presença de halo de inibição nas frações de 25 e 100% de metanol. Essas duas frações foram analisadas no espectrômetro de massas para identificação das possíveis substâncias bioativas, sendo encontradas duas substâncias anteriormente detectadas no extrato bruto (Tabela 20), ou seja, o ácido tumonóico C e aeruginosina.

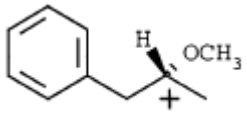
Os resultados obtidos, no entanto, não confirmam nenhuma substância antibacteriana já conhecida, mas os espectros obtidos no espectrômetro de massas apresentam vários picos, indicando a presença de várias substâncias. Østensvik et al. (1998) também utilizaram inicialmente extratos brutos e reconheceram a importância de análises prévias para verificação preliminar de substâncias antibacterianas, antes de executar as análises com os extratos fracionados. A prévia purificação gerou duas frações antimicrobianas (25 e 100% de metanol), assim, outros estudos poderão ser realizados na intenção de isolar estas substâncias e caracterizá-las utilizando a análise de ressonância magnética nuclear (RMN).

4.5.2 Identificação das variantes de microcistina

Nos extratos intracelulares da *Fischerella* sp. CENA161 foram encontradas três variantes de MCYST confirmadas pela fragmentação no espectrômetro de massas Q-TOF MS/MS (Tabelas 21, 22 e 23). As variantes encontradas foram a MCYST-LR (Leucina-Arginina), MCYST-LL (Leucina-Leucina) e MCYST-FR (Fenilalanina-Arginina) e/ou MCYST-M(O)R (Metionina-Arginina). Não pode ser confirmada a produção das variantes -FR e -M(O)R, separadamente ou concomitantemente, porque o padrão de fragmentação das duas variantes são semelhantes, assim como a *m/z* do -Met(O) é a mesma da -Phe (120 Da). Nas três fragmentações observou-se a presença do íon *m/z* 135, que corresponde ao $[PhCH_2CH(OCH_3)^+]$ usado para verificar a presença do Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico) (NAMIKOSHI et al., 1990; 1992). A produção da variante MCYST-LR pela linhagem *Fischerella* sp. CENA161 já tinha sido verificada anteriormente (FIORE et al. 2009) e os resultados obtidos neste estudo comprovam essa produção. Entretanto, a descoberta da síntese de mais duas variantes de MCYST por essa linhagem é inédita.

Tabela 21 - Fragmentação da variante de MCYST-LR e fragmentos encontrados já descritos em literatura (ZWEIGENBAUM et al., 2000).

Variante de MCYST -LR	**Massas *m/z***
$[M+H]^+$	995
$[M+H]^+$-H_2O	977
$[M+H]^+$-Glu ou -MeAsp	866
MeAsp+Arg+Adda+Glu	728
$[M+H]^+$-Arg-MeAsp	710
$[M+H]^+$-Adda ou H+Arg+Adda+Glu+Mdha	682
H+Arg+Adda+Glu ou H+MeAsp+Arg+Adda	599
H+Mdha+Ala+Leu+MeAsp+Arg	553
H+Arg+Addaou H+Ala+Leu+MeAsp+Arg	470
$C_{11}H_{14}O$+Glu+Mdha+H	375
Glu-Mdha + H	213
$[PhCH_2CH(OCH_3)^+]$	135



Espectro

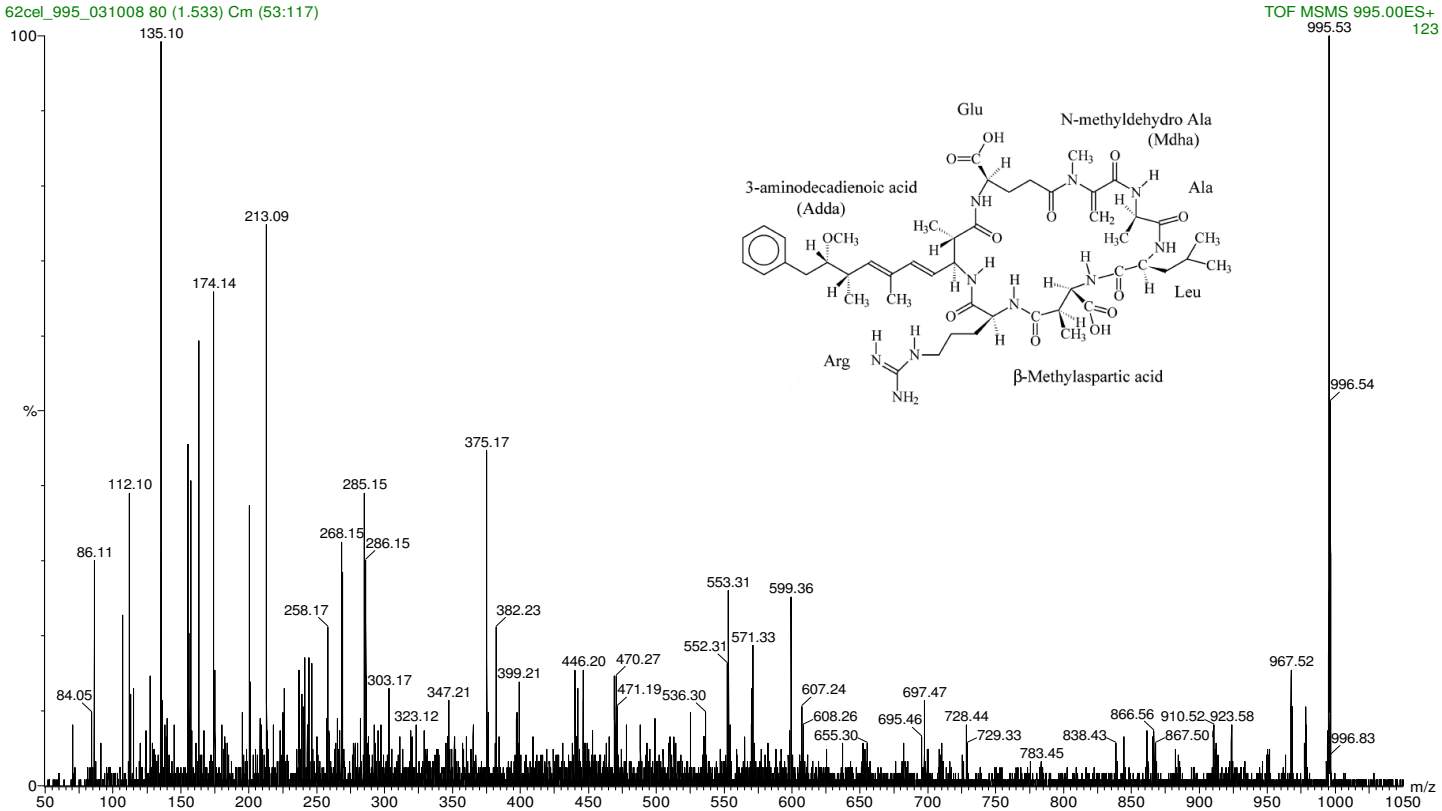


Tabela 22 - Fragmentação da variante de MCYST-LL e fragmentos encontrados já descritos em literatura (ROBILLOT et al., 2000).

Variante de MCYST -LL	Massas *m/z*	Espectro
$[M+H]^+$	952	
$PhCH=CH(OMe)^+$	818	
[Leu-MAsp-Leu-Ala-Mdha-Glu-$C_{11}H_{14}O+H]^+$	801	
[Leu-MAsp-Leu-Ala-Mdha-Glu+H]$^+$	639	
[Leu-Ala-Mdha-Glu-$C_{11}H_{14}O+H]^+$	559	
[Leu-MAsp-Leu-Ala-Mdha+H]$^+$	510	
[Leu-Ala-Mdha-Glu+H]$^+$	397	
[$C_{11}H_{14}O$-Glu-Mdha+H]$^+$	375	
[Glu-Mdha + H]$^+$	213	
[Mdha-Ala + H]$^+$	155	
[$PhCH_2CH(OCH_3)^+$]	135	

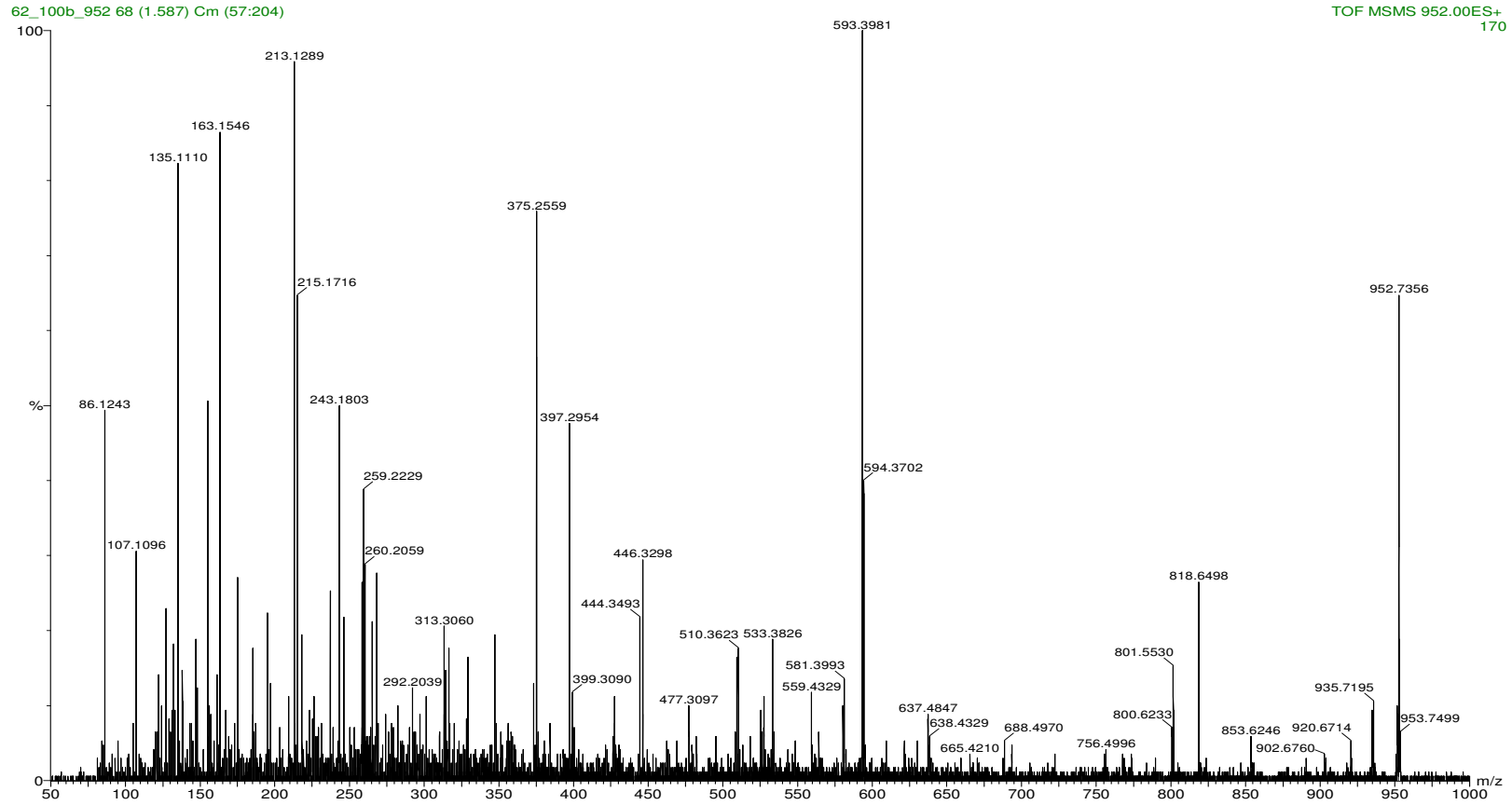
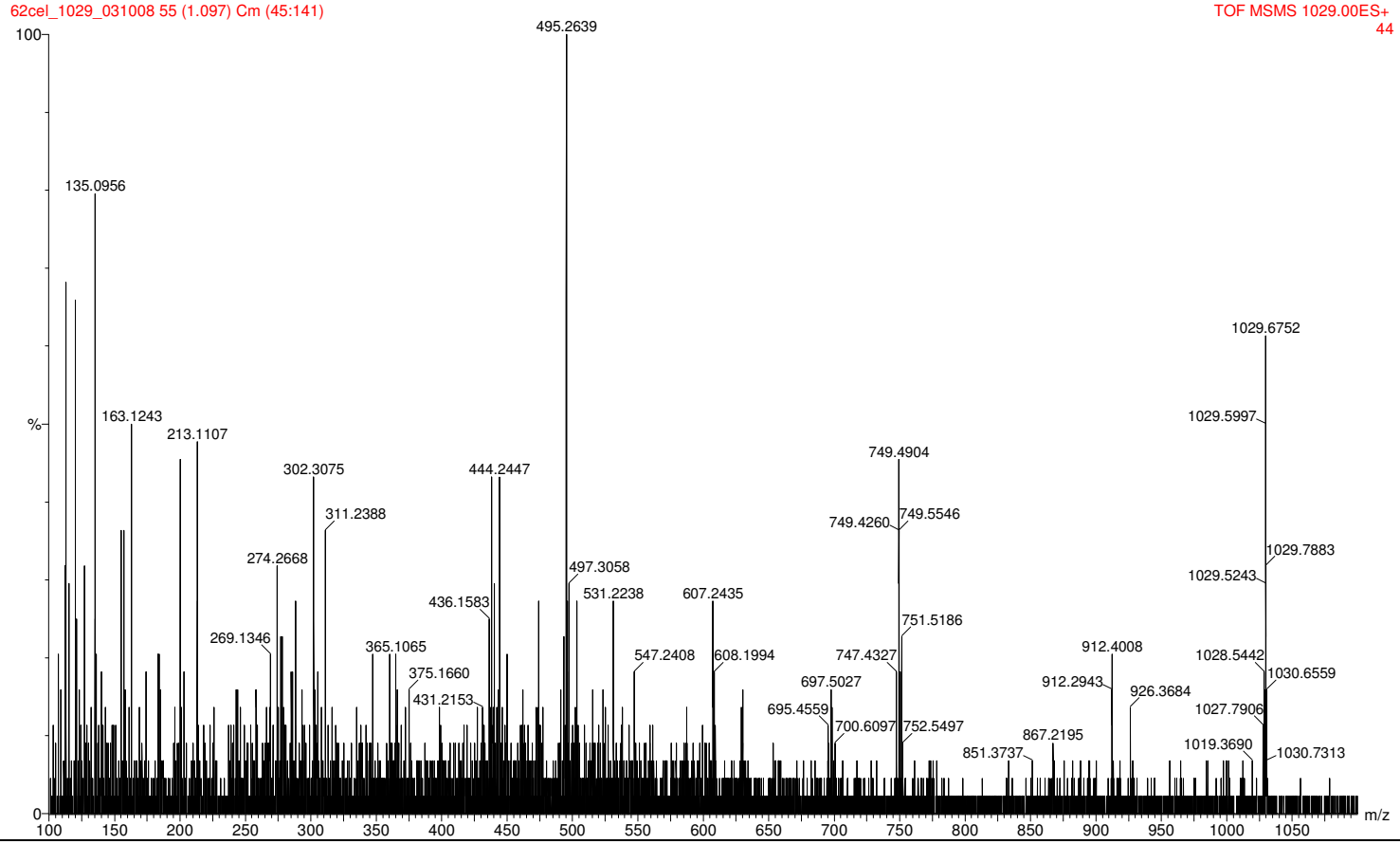


Tabela 23 - Fragmentação da variante de MCYST-FR ou –M(O)R e fragmentos encontrados já descritos em literatura (NAMIKOSHI et al., 1992).

Variante de MCYST -FR ou -M(O)R	**Massas *m/z***	**Espectro**
$[M+H]^+$	1029	
$C_{11}H_{14}O$-Glu-Mdha	375	
CO-Glu-Mdha-H	239	
Glu-Mdha + H	213	
Mdha-Ala + H	155	
$[PhCH_2CH(OCH_3)^+]$	135	



4.5.3 Análise dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina

As sequências de nucleotídeos obtidas foram traduzidas e comparadas às sequências de aminoácidos do banco de dados do GenBank usando a ferramenta BLASTx (Tabela 24). O fragmento de 165 pb do domínio da *N*-metiltransferase (NMT) do gene *mcyA* foi amplificado com sucesso usando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores OMETF/OMETR desenhado por Lorenzi (2004). Entretanto, quando o conjunto MSF/MSR (TILLETT; PARKER; NEILAN, 2001) que amplifica o domínio da NMT quase inteiro (aproximadamente 1.300 pb) foi utilizado, não se obteve produto amplificado do gene *mcyA*. No entanto, quando se fez uma combinação dos oligonucleotídeos inicadores OMETF com o MSR, um produto de 995 pb foi amplificado e apresentou identidade com sequências de enzimas envolvidas na produção da microcistina (microcistina sintetase). Na tentativa de se amplificar o gene *mcyB*, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores FAA/RAA (NEILAN et al., 1999), mas o produto obtido não apresentou similaridade com a região alvo esperada. Utilizando o conjunto de iniciadores pB3F/pB9R desenhado por Fewer et al. (2007) foi obtida uma sequência de 766 pb correspondente ao domínio de adenilação (A) do peptídeo sintetase (PS) do gene *mcyB*. Portanto, os iniciadores pB3F/pB9R mostraram ser específicos para a amplificação de região do gene *mcyB* em *Fischerella* sp. CENA161 quando comparados com os iniciadores FAA/RAA.

Não foi verificada amplificação do gene *mcyC* quando utilizado o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores pC1F/pC8R (FEWER et al., 2007), mas quando utilizados os dois conjuntos de iniciadores pC1F/pC13R e pC7F/pC8R (FEWER et al., 2007) foram obtidos produtos de PCR de 481 e 517 pb, respectivamente. No BLASTx, esses produtos alinharam com PS do gene *mcyC* de outras cianobactérias produtoras de microcistina. A tentativa de amplificação do *mcyD* usando os oligonucleotídeos degenerados KSF/KSR (BEYER et al., 1999), conforme utilizado com sucesso em estudo anterior (FIORE et al., 2009), gerou um fragmento correspondente à dehidrogenase de uma PKS. Entretanto, utilizando os oligonucleotídeos mcyDF/mcyDR (RANTALA et al., 2004) foi possível amplificar uma região correspondente aos domínios da cetoacil sintase (KS) e da acil-transferase (AT) de uma PKS, cuja sequência de aminoácidos mostrou similaridade com um região do gene *mcyD*. Os oligonucleotídeos iniciadores mcyE-F2/mcyE-R4 amplificaram uma região do domínio de adenilação (A) de uma PS que apresentou similaridade com a PS do gene híbrido (PS-PKS) *mcyE*. Outro gene híbrido da microcistina sintetase é o *mcyG*, que foi detectado com oligonucleotídeos degenerados KSF/KSR (BEYER et al., 1999) e

oligonucleotídeos iniciadores não degenerados mcyGF/PKGR1 (FEWER et a., 2007; OUAHID; PERÉZ-SILVA; DEL CAMPO., 2004). Quando utilizado o conjunto de iniciadores mcyGF/mcyGR (FEWER et al., 2007) não foi obtido produto de PCR.

Um fragmento do gene *mcyI* que codifica para um ácido 2-hidroxidesidrogenase (NdaH) envolvido na produção do D-metilaspartato na posição 3 da microcistina, foi detectado usando os oligonucleotídeos iniciadores *mcyIdegenF*/*mcyIdegenR*, o qual apresentou similaridade de 90% com o NdaH envolvido na produção de nodularina em *Nodularia spumigena* CCY9414 (ZP_01629639). Os produtos de PCR obtidos usando os iniciadores *mcyH*5KF/*mcyH*5KR não apresentaram similaridade com a enzima McyH, a qual codifica o transportador ABC do agrupamento de genes da microcistina sintetase.

Tabela 24 – Identidades das sequências dos produtos de PCR amplificados do genoma da *Fischerella* CENA161, usando diversos iniciadores tendo como alvo regiões dos genes da microcistina sintetase, quando comparadas com outras sequências de cianobactérias do GenBank (NCBI).

Gene	Primers	PB obtidos	Blastx*		I%
			Proteína homóloga	linhagem	
mcyA	OMETF/ OMETR	165	Microcistina sintetase	*Nostoc* sp. 152 (ACB78190)	85
			Microcistina sintetase	*Anabaena iyengarii* RPAN9 (ACM66963)	75
			Microcistina sintetase	*Anabaena lemmermannii* NIVA-CYA 270/1 (ABW96257)	75
	OMETF/MSR	995	Microcistina sintetase	*Nostoc* sp. 152 (ACB78190)	79
			Microcistina sintetase	*Anabaena* sp. BIR 246 (ABW96252)	76
			Microcistina sintetase	*Anabaena* sp. 1tu44S16 (ABW96246)	76
mcyB	pB3F/ pB9R	766	Peptídeo sintetase	*Anabaena circinalis* 90 (AAO62587)	85
			Peptídeo sintetase	*Anabaena lemmermannii* 66A (ABW93501)	85
			Peptídeo sintetase	*Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1 (ABW93499)	83
mcyC	pC1F/ pC13R	481	Peptídeo sintetase	*Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1 (ABW93492)	84
			Peptídeo sintetase	*Planktothrix agardhii* 213 (ABW93497)	74
			Peptídeo sintetase	*Anabaena* sp. 18B6 (ABW93493)	80
	pC7F/ pC8R	517	Peptídeo sintetase	*Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1 (ABW93492)	88
			Peptídeo sintetase	*Nostoc* sp. 152 (ABW93495)	89
			NdaB	*Nodularia spumigena* (AAO64402)	87
mcyD	KSF/ KSR	643	Dehidrogenase	*Nodularia spumigena* CCY9414 (EAW45759)	93
			Policetídeo sintase	*Microcystis aeruginosa* (BAB12210)	93
			McyD	*Microcystis aeruginosa* NIES-843 (YP_001658874)	93
	mcyDF/ mcyDR	839	Policetídeo sintase	*Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1 (EU151879)	90
			Policetídeo sintase	*Nostoc* sp. 152 (EU151882)	81
			McyD	*Anabaena* sp. BIR258 (EF565275)	81
mcyE	mcyE-F2/ mcyE-R4	769	Peptídeo sintetase	*Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1 (ABW93513)	85
			Adenilação	*Nodularia spumigena* CCY9414 (ZP_01629641)	80
			McyE	*Nodularia spumigena* BY1 (AAR85543)	80
mcyG	KSF/ KSR	673	McyG	*Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (CAO90231)	61
			McyG	*Microcystis aeruginosa* (AAX73195)	61
			McyG	*Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (AAF00957)	61
	mcyGF/ PKGR1	345	Policetídeo sintase	*Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1 (EU151893)	88
			Policetídeo sintase	*Nostoc* sp. 152 (EU151896)	83
			NdaC	*Nodularia spumigena* NSOR10 (AY210783)	80
mcyI	*mcyIdegenF/ mcyIdegenR*	755	Dehidrogenase	*Nodularia spumigena* CCY9414 (ZP_01629639)	90
			Dehidrogenase	*Anabaena* sp. 90 (AAO62580)	82
			McyI	*Microcystis aeruginosa* PCC7806 (AAF00955)	75

* As sequências obtidas nesse estudo e utilizadas para o BLASTx se encontram disponíveis no ANEXO C.

A análise das sequências obtidas pelo BLASTx possibilitou a confirmação de que elas pertenciam ao agrupamento gênico da microcistina sintetase, e assim, as enzimas codificadas puderam ser identificadas. Interessante observar que a sequência de aminoácido de cada enzima (McyA, McyB, McyC, MycD, MycE, MycI) envolvida na sintese de microcistina na *Fischerella* sp. CENA161, analisada no presente estudo, apresentou similaridade com sequências de aminoácidos de diferentes gêneros de cianobactérias. Por exemplo, os genes *mcyA* e *mcyB* da *Fischerella* sp. CENA161 apresentaram 85% de similaridade com o gene *mcyA* da *Nostoc* sp. 152 e o gene *mcyB* da *Anabaena circinalis* 90, respectivamente.

A análise filogenética utilizando a sequência de aminoácido de parte do domínio de adenilação e do sítio de ligação da fosfopanteteína da PS do McyE (769 pb), formou um agrupamento altamente estável (100% de reamostragem) contendo as cianobactérias produtoras de microcistinas e nodularinas (Figura 15). Dentro desse clado, observa-se a separação das linhagens produtoras de nodularinas das produtoras de microcistinas. Além disso, observa-se que as sequências de aminoácidos de linhagens do mesmo gênero se agruparam, indicando um padrão evolutivo.

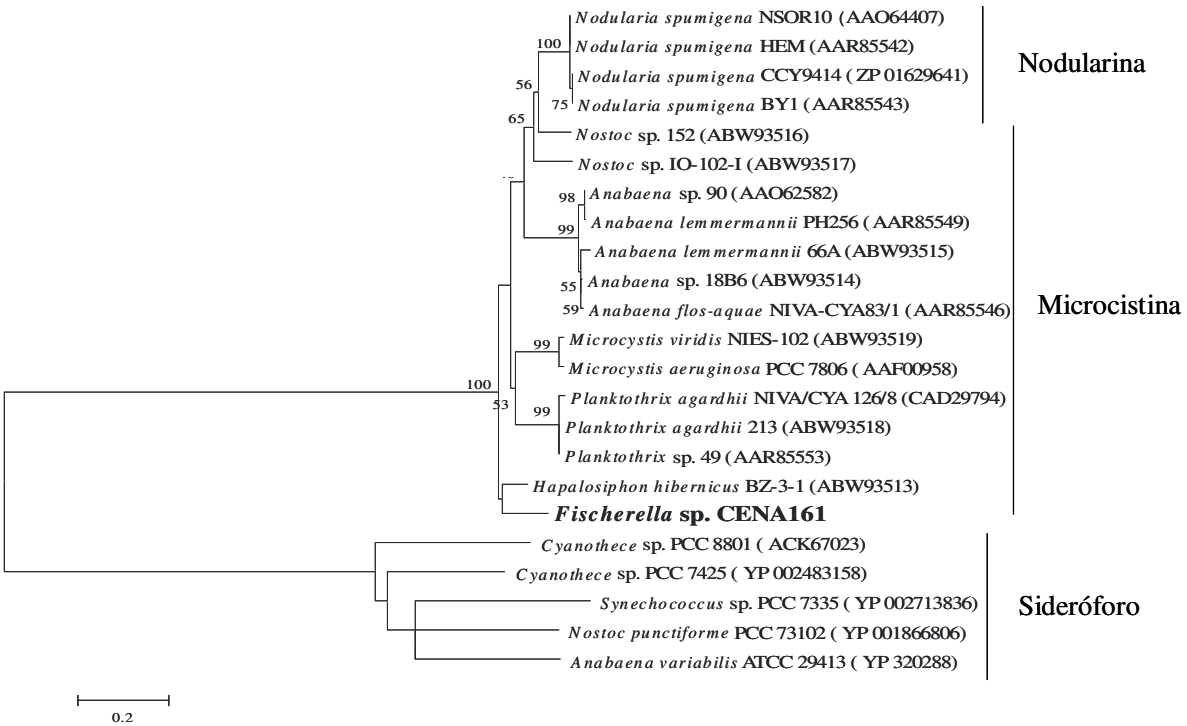


Figura 15 – Árvore filogenética das sequências de aminoácidos do McyE da *Fischerella* sp. CENA161 usando o método da distância (*Neighbor Joining* – NJ). Os valores de reamostragem acima de 50% na análise NJ estão apresentados em cada nó.

Para minimizar as consequências de uma recombinação local que pode afetar as verdadeiras relações filogenéticas, o que ocorre quando a filogenia é baseada em um gene, foi construída uma árvore filogenética com base nas sequências dos aminoácidos McyD, McyE e McyG concatenados (Figura 16). O McyD é uma PS e o McyE e McyG são enzimas híbridas (PS/PKS) (TILLETT et al., 2000). O PS/PKS do McyG e os PKSs do McyD e McyE são responsáveis pela síntese do Adda, o qual é o componente estrutural responsável pela toxicidade das microcistinas. Conforme observado anteriormente na árvore filogenética construída somente com o fragmento de aminoácido McyE (Figura 15), as sequências concatenadas de aminoácidos de linhagens do mesmo gênero também se agruparam (Figura 16). A *Fischerella* sp. CENA161 formou um clado coerente com a *Hapalosiphon hibernicus* BZ-3-1.

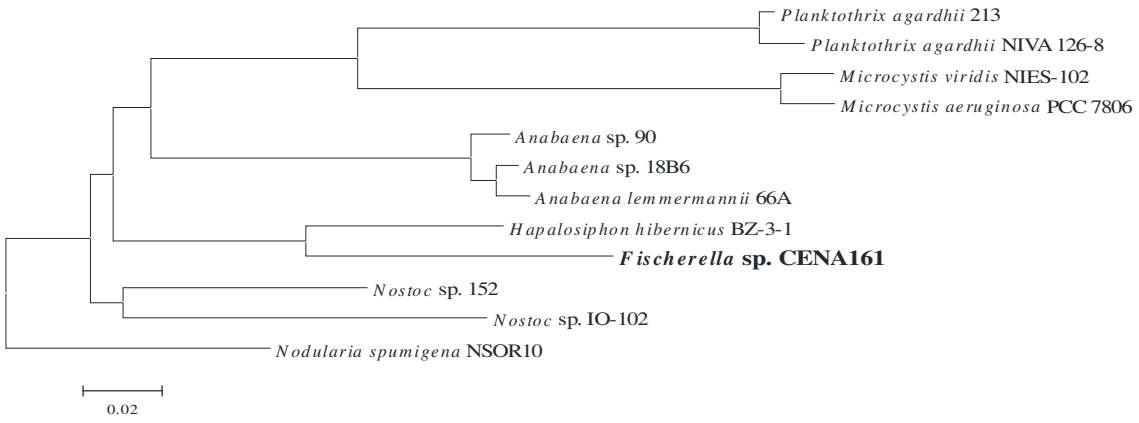


Figura 16 - Árvore filogenética construída pelo método NJ com as sequências de aminoácidos concatenadas do McyD, McyE e McyG.

O agrupamento gênico envolvido na síntese de microcistina de três gêneros de cianobactérias (*Microcystis*, *Planktothrix* e *Anabaena*) já foram completamente sequenciados e sua comparação revela que os genes *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyG* e *mcyJ* estão sempre presentes (TILLETT et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004), no entanto os três gêneros podem apresentar diferenças quanto a presença de enzimas envolvidas no acabamento e finalização (*tailoring enzymes*) da montagem da microcistina. O estudo de Rantala et al. (2004) sugeriu a origem monofilética do agrupamento gênico da microcistina porque uma árvore filogenética obtida com os genes concatenados *mcyA*, *mcyD* e *mcyE* mostraram perfeita congruência com a árvore de dois genes constitutivos (RNAr 16S e *rpoC1*). Assim, algumas linhagens podem ter perdido este agrupamento gênico durante a

evolução. O processo de aquisição/perda de genes *mcy* entre linhagens relativamente próximas não é conhecido. O sequenciamento de genes do agrupamento gênico da microcistina tem revelado a localização de transposases na extremidade 3' desse agrupamento (TILLETT et al., 2000; MOFFITT; NEILAN, 2004). Uma recente descoberta do sistema pilus tipo IV em *Microcystis* sugere que a transferência lateral de genes da microcistina sintetase também pode acontecer (NAKASUGI et al., 2007). Assim, mais estudos sempre são necessários para entender a distribuição do agrupamento gênico da microcistina entre as cianobactérias e a função da produção dessa toxina nas mais diversas linhagens de cianobactérias.

CONCLUSÕES

A maioria das análises fenotípicas das linhagens brasileiras de dois gêneros de cianobactéria (*Hapalosiphon* e *Fischerella*) da Família Hapalosiphonaceae mostrou congruência quanto aos caracteres morfológicos diacríticos presença e tipo de ramificação. Entretanto, vários dos morfotipos descritos não foram suportados pelas filogenias dos genes de RNAr 16S, *cpcBA*-IGS, *rpoC1*, *rbcLX* e *tufA* analisados individualmente ou na forma concatenada. As análises morfológicas e moleculares mostraram que a *Fischerella* sp. CENA19 necessita de revisão na sua classificação. No entanto, mais sequências gênicas de outras linhagens desses dois gêneros isoladas de diferentes biomas são necessárias para realizar uma revisão taxonômica robusta. As sequências gênicas dos isolados brasileiros de cianobactérias do gênero *Hapalosiphon* são inéditas, assim como algumas do gênero *Fischerella*, e certamente irão auxiliar nas correções nomenclaturais desses dois gêneros.

Os extratos orgânicos das linhagens *Fischerella* sp. CENA19, *Fischerella* sp. CENA161, *Hapalosophon* sp. CENA71 e *Hapalosiphon* sp. CENA72 mostraram efeitos inibitórios no crescimento de bactérias patogênicas, sendo identificadas por espectrometria de massas a presença das substâncias aeruginopeptina, cianopeptolina, fischerelina, aeruginosina, oscilapeptilida, microcistinas e ácido tumonóico. A maioria dessas substâncias apresenta potencial para aplicações biotecnológicas, o que propicia novas possibilidades futuras de pesquisa.

Nos extratos intracelulares da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foram identificadas duas ou três novas variantes de microcistinas (MCYST–LL e MCYST–FR e/ou MCYST-M(O)R), além da variante já conhecida (MCYST–LR). Outras duas substâncias putativas, ácido tumonóico C e aeruginosina, também foram detectadas nessa linhagem. Sete genes envolvidos com a produção de microcistinas foram detectados e as análises filogenéticas de suas sequências de aminoácidos indicaram um padrão evolutivo característico de transferência vertical de genes. A baixa similaridade com as sequências de proteínas homólogas existentes no GenBank mostra que os genes da microcistina da *Fischerella* sp. CENA161 sofreram inserções ou deleções durante o processo evolutivo e é de fundamental importância descrever o agrupamento gênico completo dessa linhagem, uma vez que é diferente dos já conhecidos.

REFERÊNCIAS

ACINAS, S.G.; HAVERKAMP, T.H.A.; HUISMAN, J.; STAL, L.J. Phenotypic and genetic diversification of Pseudanabaena spp. (cyanobacteria). **The ISME Journal**, London, v. 3, p. 31–46, 2009.

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.

AlgaeBase. Baradlaia P. Palik, 1960: 283. Disponível em: www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=47353. Acesso em: 23 jul. 2009.

ALLEN, M.B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 4, p. 1-4, 1968.

ALLEN, M.M.; ARNON, D.I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae: I. Growth and nitrogen fixation by Anabaena cylindrica Lemm. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 30, p. 366-372, 1955.

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.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 5- Stigonematales. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.

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.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. **Systematic Biology**, Washington, v. 55, p. 539-552, 2006.

APT, K.E.; COLLIER, J.L.; GROSSMAN, A.R. Evolution of the phycobiliproteins. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 248, p. 79-96, 1995.

ASTHANA, R. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, A. P.; DEEPALI; SINGH, S. P.; NATH, G.; SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, B. S. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 18, p. 33-39, 2006.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Clare, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

BABICA, P.; BLAHA, L.; MARSALEK, B. Exploring the role of microcystins – a review of effects on photoautotrophic organisms. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 42, p. 9-20, 2006.

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**, Hoboken, v. 16, p. 472-482, 2001.

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 and Biotechnology**, Heidelberg, v. 34, p. 443-456, 2007.

BERGSLAND, K.J.; HASELKORN, R. Evolutionary relationships among Eubacteria, Cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the rpoC1 gene of Anabaena sp. Strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 3446-3455, 1991.

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.

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.

BINDER, A.; WILSON, K.; ZUBER, H. C-phycocyanin from the thermophilicblue-green alga Mastigocladus laminosus. Isolation, characterizationand subunit composition. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 20, p. 111–116, 1972.

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**, Oxford, v. 7, p. 1513-1518, 1979.

BLOCH, C. J. S.; BLACKBURN, S. I.; NEILAN, B. A.; GREWE, P. M. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the cpcBA intergenic spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, Oxford, v. 32, p. 445-451, 1996.

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.

BORNET, E.; FLAHAUT, C. Revision des Nostocacées Heterocystées. **Annales des Sciences Naturalles - Botanique**, Paris, v. 3, p. 323-381, 1886a.

BORNET, E.; FLAHAUT, C. Revision des Nostocacées Heterocystées. **Annales des Sciences Naturalles - Botanique**, Paris, v. 4, p. 343-373, 1886b.

BORNET, E.; FLAHAUT, C. Revision des Nostocacées Heterocystées. **Annales des Sciences Naturalles** - Botanique, Paris, v. 5, p. 51-129, 1887.

BORNET, E.; FLAHAUT, C. Revision des Nostocacées Heterocystées. **Annales des Sciences Naturalles** - Botanique, Paris, v. 7, p. 177-262, 1888.

BOTHA, N.; GEHRINGER, M.M.; DOWNING, T.G.; VAN DE VENTER, M.; SHEPHARD, E.G. The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCO2 cells. **Toxicon**, Oxford, v. 43, p. 85–92, 2004.

BÖTTCHER, G.; CHORUS, I.; EWALD, S.; HINTZE, T.; WALZ, N. Light-limited growth and microcystin content of Planktothrix agardhii and Microcystis aeruginosa in turbidostats. In: CHORUS, I. (Ed.). **Cyanotoxins: occurrences, causes, consequences**. Berlin: Springer Press, 2001. p. 115-133.

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

BRYANT, D.A. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 128, p. 835-844, 1982.

CANE, D.E.; WALSH, C.T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 6, p. 319–325, 1999.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 270, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL,W.W.; ESCHEDOR, J.T.; PATTERSON, G.M.L.; MOORE, R.E. Toxicity and partial structure for a hepatotoxic peptide produced by Nodularia spumigena Mertens emend. L575 from New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, p. 2757–2763. 1988.

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

CASTENHOLZ, R.W. General characteristics of the cyanobacteria. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 474-487.

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.

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.

CHANG, Z.X.; SITACHITTA, N.; ROSSI, J.V.; ROBERTS, M.A.; FLATT, P.M.; JIA, J.Y.; SHERMAN, D.H.; GERWICK, W.H. Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of curacin A, an antitubulin natural product from the tropical marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, p. 1356–1367, 2004.

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.

CHEN, T.; WANG, Q.; CUI, J.; YANG, W.; SHI, Q.; HUA, Z.; JI, J.; SHEN, P. Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. **Molecular & Cellular Proteomics**, New York, v. 4, p. 958–974, 2005.

CHLIPALA, G.; MO, S.; BLANCO, E. J. C.; ITO, A.; BAZAREK, S.; ORJALA, J. Investigation of antimicrobial and protease-inhibitory activity from cultured cyanobacteria. **Pharmaceutical Biology**, Philadelphia, v. 47, p. 53–60, 2009.

CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin Biosynthesis in Planktothrix: Genes, Evolution, and Manipulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 564–572, 2003.

CODD, G.A.; 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.; REVSBECH, 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.

DAWSON, R.M. The toxicology of microcystins. **Toxicon**, Oxford, v. 36, p. 953–962, 1998.

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

DIETRICH, D.; HOEGER, S. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue green algal supplements): a reasonable or misguided approach? **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, p. 273–289, 2005.

DITTMANN, E.; BÖRNER, T. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, p. 192-200, 2005.

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

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

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. Molecular Nutrition & Food Research, Weinheim, v. 50, p. 7-17, 2005.

DOAN, N.T.; RICKARDS, R.W.; ROTHSCHILD, J.M.; SMITH, G.D. Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-Hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera Fischerella and Calothrix. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 12, p. 409–416, 2000.

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.

DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONNELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 163, p. 113–186, 2000.

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 majuscule. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 11, p. 817–833, 2004.

EMLYN-JONES, D.; WOODGER, F. J.; PRICE, G. D.; WHITNEY, S. M. RbcX can function as a rubisco chaperonin, but is non-essential in *Synechococcus* PCC7942. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 47, p. 1630–1640, 2006.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin: a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, p. 1–14, 2008.

ERNST, A. Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 13, p. 1307–1312, 1991.

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, 2004.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling automated sequencer traces using phred. II Erros probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, 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.

FALCH, B. S.; KÖNIG; G. M.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M.; BACHMANN, H. Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, p. 321-328, 1995.

FAWELL, J.K.; JAMES, C.P.; JAMES, H.A. **Toxins from blue green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water** FR0358/2/DoE 3. Marlow: Foundation for Water Research, 1994.

FAWELL, J.K.; MITCHELL, R.E.; EVERETT, D.J.; HILL, R.E. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I. Microcystin–LR. **Human and Experimental Toxicology**, London, v. 18, p. 162–167, 1999.

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

FERGUSSON, K.M.; SAINT, C.P. Molecular Phylogeny of Anabaena circinalis and Its Identification in Environmental Samples by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 4145-4148, 2000.

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

FINSINGER, K.; SCHOLZ, I.; SERRANO, A.; MORALES, S.; URIBE-LORIO, L.; MORA, M.; SITTENFELD, A.; WECKESSER, J.; HESS, W.R. Characterization of truebranching cyanobacteria from geothermal sites and hot springs of Costa Rica. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 10, p. 460–473, 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. **Microrganismos 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.; NEILAN, B. A.; COPP, J. N.; RODRIGUES, J. L. M.; TSAI, S. M.; LEE, H.; TREVORS, J. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**, Oxford, v. 39, p. 5017-5026, 2005.

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

FIORE, M.F.; GENUÁRIO, D.B.; SILVA, C.S.P.; SHISHIDO, T.K.; MORAES, L.A.B.; CANTÚSIO NETO, R.; SILVA-STENICO, M.E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus Fischerella. **Toxicon**, Oxford, v. 53, p. 754–761, 2009.

FISCHER, W.J.; ALTHEIMER, S.; CATTORI, V.; MEIER, P.J.; DIETRICH, D.R.; HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 203, p. 257–263, 2005.

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

FOSSE, T.; PELOUX, Y.; GRANTHIL, C.; TOGA, B.; BERTRANDO, J.; SETHIA, N. M. Meningitis due to *Micrococcus luteus*. **Infection**, Marseille, v. 13, p. 280-281, 1985.

FUJII, K.; SIVONEN, K.; NAGANAWA, E.; HARADA, K. Non-Toxic Peptides from Toxic Cyanobacteria, Oscillatoria agardhii. **Tetrahedron**, Oxford, v. 56, p. 725–733, 2000.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 38, n. 2, p. 97-125, 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.

GEHRINGER, M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 557, p. 1–8, 2004.

GEITLER, L. **Cyanophyceae**. In: KOLWITZ, R. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora: Dien Algae. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1932. v. 14, p. 1–1196.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN de PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews**, London, v. 3, p. 733-739, 2005.

GLAZER, A.N. Light guides: directional energy transfer a photosynthetic antenna. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, p. 1-4, 1989.

GLAZER, A.N.; WEDEMAYER, G.J. Cryptomonad biliproteins: an evolutionary perspective. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 46, p. 93-105, 1995.

GOLDEN, J.W.; YOON, H.S. Heterocyst development in Anabaena. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 557-563, 2003.

GOMONT, M. Monographie des oscillatoriées. **Annales des Sciences Naturalles - Botanique**, Paris, v. 9, p. 49-53, 1892.

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

GRIFFITHS, W.J.; JONSSON, A.P.; LIU, S.; RAI, D.K.; WANG, Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 355, p. 545-561, 2001.

GUGGER, M.F.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 349–357, 2004.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, Washington, v. 52, p. 696-704, 2003.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. **Algaebase**: *Baradlaia* P. Palik, 1960: 283. Galway, 2009. Disponível em: <www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=47353>. Acesso em: 23 jul. 2009.

HAGMANN, L.; JIITTNER, F. Fischerellin A, a novel photosystem-ll-inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 37, p. 6539-6542, 1996.

HALINEN, K.; FEWER, D.P.; SIHVONEN, L.M.; LYRA, C.; ERONEN, E.; SIVONEN, K. Genetic diversity in strains of the genus Anabaena isolated from planktonic and benthic habitats of the Gulf of Finland (Baltic Sea). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 199–208, 2008.

HAN, D.; FAN, Y.; HU, Z. An Evaluation of Four Phylogenetic Markers in Nostoc: Implications for Cyanobacterial Phylogenetic Studies at the Intrageneric Level. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 170–176, 2009.

HANAGE, W.P.; KAIJALAINEN, T.; HERVA, E.; SAUKKORIIPI, A.; SYRJANEN, R.; SPRATT, B.G. Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 6223-6230, 2005.

HARADA, K.; KONDO, F.; LAWTON, L. Laboratory analysis of cianotoxins. 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. 369-406.

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

HARADA, K.; OGAWA, K.; MATSUURA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M. F.; ITEZONO, Y.; NAKAYAMA, N. Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 3, p. 473–481, 1990.

HARRIGAN, G.G.; LUESCH, H.; YOSHIDA, W.Y.; MOORE, R.E.; NAGLE, D.G.; BIGGS, J.; PARK, P.U.; PAUL, V.J. Tumonoic Acids, Novel Metabolites from a Cyanobacterial Assemblage of Lyngbya majuscula and Schizothrix calcicola. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, p. 464-467, 1999.

HOFFMANN, L.; CASTENHOLZ, R.W. Subsection V (Formerly Stigonematales Geitler 1925). In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2001. v. 1, p. 589–599.

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.

HUMBLE, A.; GADD, G.; CODD, G. Polarographic analysis of the interactions between cyanobacterial variants and metal cations. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOTOTROPHIC PROKARYOTES**, 8., 1994, Florence. Abstracts... Florence: University of Urbino, 1994. p. 82.

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.

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.

JANSE, I.W.; KARDINAAL, E.A.; MEIMA, M.; FASTER, J.; VISSER, P.M.; ZWART, G. Toxic and nontoxic Microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. **Applied and Environmental Microbiology, Baltimore**, v. 70, p. 3979–3987, 2004.

JANSON, S.; GRANÉLI, E. Phylogenetic analyses of nitrogen-fixing cyanobacteria from the Baltic Sea reveal sequence anomalies in the phycocyanin operon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 1397–1404, 2002.

KAEBERNICK, M.; DITTMANN, E.; B¨ORNER, T.; NEILAN, B.A. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin,a cyanobacterial nonribosomal peptide. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 449–455, 2002.

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

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B.A.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3387–3392, 2000.

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

KAPRALOV, M. V.; FILATOV, D. A. Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 73, 2007.

KAŠTOVSKÝ, J.; JOHANSEN, J.R. Mastigocladus laminosus (Stigonematales, Cyanobacteria): phylogenetic relationship of strains from thermal springs to soil-inhabiting genera of the order and taxonomic implications for the genus. **Phycologia**, Berkeley, v. 47, p. 307-320, 2008.

KEATING, K. Blue-green algal inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic to eutrophic community structure. **Science**, Washington, v. 199, p. 971–973, 1978.

KIM, S. G.; RHEE, S. K.; AHN, C. Y.; KO, S. R.; CHOI, G. G.; BAE, J. W.; PARK, Y. H.; OH, H. M. Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on the basis of *cpcBA i*ntergenic spacer region analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3252–3258, 2006.

KIVIRANTA, J.; SIVONEN, K.; NIEMELA, S. I. Detection of toxicity of cyanobacteria by Artemia salina bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 6, p. 423-436, 1991.

KLEIN, D.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J. C.; HOFFMANN, L.; DEMOULIN, V.; New hapalindoles from the cyanophyte *Hapalosiphon laingii*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 58, p. 1781-1785, 1995.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. Biosynthesis of peptide antibiotics. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 192, p. 1-15, 1990.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. 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.

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

KOMÁREK, J.; HAUER, T. CyanoDB.cz: a database of cyanobacterial genera. South Bohemia, 2004. Disponível em: <http://www.cyanodb.cz>. Acesso em: 08 fev. 2009.

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.

KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 6258-6264, 2005a.

KONZ, D.; MARAHIEL, M.A. How do peptide synthetases generate structural diversity? **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 6, p. 39–48, 1999.

KOSAKOVSKY POND, S.L.; FROST, S.D.W.; MUSE, S.V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 676-679, 2005.

KOTAK, B.G.; KENEFICK, S.L.; FRITZ, D.L.; ROUSSEAUX, C.G.; PREPAS, E.E.; HRUDEY, S.E. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. **Water Research**, Oxford, v. 27, p. 495–506, 1993.

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.

KUIPER-GOOGMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J. Human health aspects. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water**: a guide to their public health consequences, monitoring, and management. London: E & FN Spon, 1999. p. 113-154.

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

LAMBALOT, R.H.; GEHRING, A.M.; FLUGEL, R.S.; ZUBER, P.; LACELLE, M.; MARAHIEL, M.A.; REID, R.; KHOSLA, C.; WALSH, C.T. A new enzyme superfamily: the phosphopantetheinyl transferases. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 3, p. 923–936, 1996.

LANE, D. L.; PACE, B.; OISEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LORENZI, A. S. **Abordagens moleculares para detectar cianobactérias e seus genótipos produtores de microcistinas presentes nas represas Billings e Guarapiranga, São Paulo, Brasil.** 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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**, Berlin, v. 19, p. 554-568, 1998.

LUKAC, M.; AEGERTER, R. Influence of trace metals on growth and toxin production of Microcystis aeruginosa. **Toxicon**, Oxford, v. 31, p. 293–305, 1993.

MAIDEN, M. C. J.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSEL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 3140-3145, 1998.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 70, p. 437–73, 2001.

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

MARGULIS, L. **Origin of eukaryotic cells**: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth. New Haven: Yale University Press, 1970.

MCELHINEY, J.; LAWTON, L.A.; EDWARDS, C.; GALLACHER, S. Development of bioassay employing the desert locust (*Schistocera gregaria*) for the detection of saxitoxin and related compounds in cyanobacteria and shellfish. **Toxicon**, Oxford, v. 36, p. 417-420, 1998.

MES, T.H.M.; DOELEMAN, M.; LODDERS, N.; NÜBEL, U.; STAL, L.J. Selection on protein-coding genes of natural cyanobacterial populations. **Environmental Microbiology**, Oxon, v. 8, p. 1534–1543, 2006.

MIKALSEN, B.; BOISON, G.; SKULBERG, O.M.; FASTNER, J.; DAVIES, W.; GABRIELSEN, T.M.; RUDI, K.; JAKOBSEN, K.S. Natural variation in the microcystin synthetase operon mcyABC and impact on microcystin production in Microcystis strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 2774–2785, 2003.

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.

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

MOORE, R.E.; CHEN, J.L.; MOORE, B.S.; PATTERSON, G.M.L.; CARMICHAEL, W.W. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the Adda and Masp units. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 113, p. 5083–5084, 1991.

MORETTI, S.; WILM, A.; HIGGINS, D.G.; XENARIOS, I.; NOTREDAME, C. R-Coffee: a web server for accurately aligning noncoding RNA sequences. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. W10-3, 2008.

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.

NAKASUGI, K.; ALEXOVA, R.; SVENSON, A.J.; NEILAN, B.A. Functional Analysis of PilT from the Toxic Cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 5, p. 1689–1697, 2007.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; SAKAI, R.; STOTTS, R.R.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W.; EVANS, W.R. Identification of 12 Hepatotoxins from a Homer Lake Bloom of the Cyanobacteria Microcystis aeruginoaa , Microcystis viridis , and Microcystis wesenbergii: Nine New Microcystins. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 57, p. 866-872, 1992.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; SAKAI, R.; SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) Nostoc sp. strain 152. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 55, p. 6135–6139, 1990.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000.

NEILAN, B. A., DITTMANN, E.; ROUHIAINE, L.; BASS, R. L.; 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.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic Cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the Phycocyanin Locus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 3875-3883, 1995.

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

NISHIZAWA, T.; NISHIZAWA, A.; ASAYAMA, K.; HARADA, K.; SHIRAI, M. Diversity within the microcystin biosynthetic gene clusters among the genus Microcystis. **Microbes and Environments**, Ibaraki, v. 22, n. 4, p. 380-390, 2007.

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.

NOTREDAME, C.; HIGGINS, D.G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 302, p. 205-217, 2000.

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.

ORR, P.T.; JONES, G.J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited Microcystis aeruginosa cultures. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 43, p. 1604–1614, 1998.

OUAHID, Y.; PERÉZ-SILVA, G.; DEL CAMPO, F.F. Identification of potentially toxic environmental Microcystis by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions. **Environmental Toxicology**, New York, v. 20, p. 235-42, 2005.

PAERL, H.; GALLUCCI, K. Role of chemotaxis in establishing a specific nitrogen-fixing cyanobacterial-bacterial association. **Science**, Washington, v. 227, p. 647–649, 1985.

PAERL, H.W.; MILLIE, D.F. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. **Phycologia**, Berkeley, v. 35, p. 160–167, 1996.

PALENIK, B.; HASELKORN, R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll-containing prokaryotes. **Nature**, London, v. 355, p. 265-267, 1992.

PAPKE, R. T.; ZHAXYBAYEVA, O.; FEIL, E. J.; SOMMERFELD, K.; MUISE, D.; DOOLITTLE, W. F. Searching for species in haloarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, p. 14092-14097, 2007.

PARK, A.; MOORE, R. E.; PATTERSON, G. M. L. Fischerindole L, a new isonitrile from the terrestrial blue-green alga *Fischerella muscicola*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 33, p. 3257–3260, 1992.

PEARSON, L.A.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. Characterization of the 2-Hydroxy-acid Dehydrogenase McyI, Encoded within the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster of Microcystis aeruginosa PCC7806. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 7, p. 4681–4692, 2007.

PEARSON, L.A.; HISBERGUES, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E.; NEILAN, B.A. Inactivation of an ABC transporter gene, mcyH, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, n. 11, p. 6370-6378, 2004.

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.

PERKEL, J.M. Mass Spectrometry Applications for Proteomics: Recent advances to an old technique aid protein biochemists. **The Scientist**, Philadelphia, v. 15, p. 31, 2001. Disponível em: www.the-scientist.com/article/display/12557. Acesso em: 01 jul 2009.

PFEIFER, E.; PAVELA-VRANCIC, M.; VON DÖHREN, H.; KLEINKAUF, H. Characterization of tyrocidine synthetase 1 (TY1): requirement of posttranslational modification for peptide biosynthesis. **Biochemistry**, Washington, v. 34, p. 7450-7459, 1995.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, p. 439-445, 2000.

RAJANIEMI-WACKLIN, P. **Biodiversity and phylogeny of planktic cyanobacteria in temperate freshwater lakes**. 2006. 69 p. Dissertation (M.Sc. in 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 thegenera Anabaena, Aphanizomenon, Trichormus and Nostoc (Nostocales, Cyanobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 11–26, 2005.

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

RAPALA, J.; SIVONEN, K.; LYRA, C.; NIEMEL¨A, S.I. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in Anabaena spp. as a function of growth stimuli. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 2206–2212, 1997.

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

ROBERTSON, B.R.; TEZUKA, N.; WATANABE, M.M. Phylogenetic analyses of Synechococcus strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal

multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 861-871, 2001.

ROBILLOT, C.; VINH, J.; PUISEUX-DAO, S.; HENNION, M-C. Hepatotoxin Production Kinetics of the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7820, as Determined by HPLC-Mass Spectrometry and Protein Phosphatase Bioassay. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, p. 3372-3378, 2000.

ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIAINEN, H.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in Anabaena strain 90. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 37, p.156–167, 2000.

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. 686-692, 2004.

ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Comparison of cyanopeptolin genes in Planktothrix, Microcystis and Anabaena: evidence for independent evolution within each genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, p. 7322-7330, 2007.

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, n. 13, p. 3453–3461, 1998.

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

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

SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M.A. Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in Bacillus subtilis, **Archives of Microbiology**, Washington, v. 169, p. 404–410, 1998.

SCHOPF, J.W.; WALTER, M.R. Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. In: GARR, N.G.; WHITTON, B.A. (Ed.). **The biology of Cyanobacteria**. Oxford: Blackwell, 1982. p. 543-564.

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

SHI, L.; CARMICHAEL, W. W.; MILLER, I. Immunogold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. **Archives of Microbiology**, New York, v. 163, p. 7–15, 1995.

SIELAFF, H.; DITTMANN, E.; TANDEAU DE MARSAC, N.; BOUCHIER, C.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; SCHWECKE, T. The mcyF gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from Microcystis aeruginosa encodes an aspartate racemase. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 373, p. 909–916, 2003.

SILVA-STENICO, M. E.; CANTÚSIO NETO, R.; ALVES, I. R.; MORAES, L. A. B.; SISHIDO, T. K.; FIORE, M. F. Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 535-542, 2009.

SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by Oscillatoria agardhii strains. **Applied and Environment Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 2658–2666, 1990.

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

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.

SMITH, A.J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 134, p. 93-113, 1983.

SMITKA, T. A.; BONJOUKLIAN, R.; DOOLIN, L.; JONES, N. D.; DEETER, J. B.; YOSHIDA, W. Y.; PRINSEP, M. R.; MOORE, R. E.; PATTERSON, G. M. L. Ambiguine isonitriles, fungicidal Hapalindone-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the Stigonemataceae. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 57, p. 857-861, 1992.

SONG, L.; SANO, T.; LI, R.; WATANABE, M.; LIU, Y.; KAYA, K. Microcystin production of Microcystis viridis (cyanobacteria) under different culture conditions. **Phycological. Research**, Tokyo, v. 42, p. 19, 1998.

SPOOF, L.; VERTERKSVIST, P.; LINDHOLM, T.; MERILUOTO, J.; Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-eletrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1020, n. 1, p. 105-119, 2003.

STACHELHAUS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M.A. Engineered biosynthesis of peptide antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 52, p. 177-186, 1996.

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.

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

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K.J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, London, v. 18, p. 380–416, 2001.

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.

STENSVIK, O. 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**, Oxford, v. 84, p. 1117-1124, 1998.

SVIRCEV, Z.; CETOJEVIC-SIMIN, D.; SIMEUNOVIC, J.; KARAMAN, M.; STOJANOVIC, D. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activity of terrestrial cyanobacterial strains from Serbia. **Science in China Series C – Life Sciences**, Beijing, v. 51, n. 10, p. 941-947, 2008.

SWOBODA, U. K.; DOW, C. S. Expression of cyanotoxins in environmental biomass containing species of *Oscillatoria*. In: CODD, G. A.; JEFFRIES, T. M.; KEEVIL, C. W.; POTTER, E. **Detection methods for cyanobacterial toxins**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 164-167.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. **Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods).** Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TABOADA, E.; MACKINNON, J.M.; LUEBBERT, C.C.; GANNON, V.P.J.; NASH, J.H.; RAHN, K. Comparative genomic assessment of Multi-Locus Sequence Typing: Rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of Campylobacter jejuni. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, p. 229-240, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary 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**, Oxford, v. 68, p. 954-979, 2007.

TANABE, Y.; KASAI, F.; WATANABE, M.M. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa. **Microbiology**, Reading, v. 153, p. 3695-3703, 2007.

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

THIEL, T. Nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J.R.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Genetics and regulation of nitrogen fixing bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 73-110.

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.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

THURET, G. Essai de classification des Nostochiness. **Annales des Sciences Naturales - Botanique**, Paris, v. 6, p. 372-382, 1875.

TILLETT, D.; DITTMAN, 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 and Biology**, London, v. 7, p. 753-764, 2000.

TILLETT, 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.

TOOMING-KLUNDERUD, A.; MIKALSEN, B.; KRISTENSEN, K.; JAKOBSEN, K.S. The mosaic structure of the mcyABC operon in Microcystis. **Microbiology**, Reading, v. 154, n. 7, p. 1886-1899, 2008.

TOOMING-KLUNDERUD, A.; ROHRLACK, T.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; KRISTENSEN, T.; JAKOBSEN, K.S. Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from Microcystis: implications for evolution of cyanopeptolins. **Microbiology**, Reading, v. 153, p. 1382–1393, 2007.

TURELL, M. J.; MIDDLEBROOK, J. L. Mosquito inoculation: an alternative bioassay for toxins. **Toxicon**, Oxford, v. 26, p. 1089-1094, 1988.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. ***Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp**. Silver Spring, MD., 2009. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070492.htm>. Acesso em: 30 abr. 2009.

UTKILEN, H.; GJØLME, N. Iron-stimulated toxin production in Microcystis aeruginosa. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 797–800, 1995.

VAN DERWESTHUIZEN, A.J.; ELOFF, J.N. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue–green alga Microcystis aeruginosa (UV-006). **Planta**, Berlin, v. 163, p. 55–59, 1985.

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.

VÉZIE, C.; BRIENT, L.; SIVONEN, K.; BERTRU, G.; LEFEUVRE, J.C.; SALKINOJA-SALONEN, M. Variation of microcystin content of cyanobacterial blooms and isolated strains in Lake Grand-Lieu (France). **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 126–135, 1998.

VON DOHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J.; ZOCHER, R. Multifunctional peptide synthetases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, p. 675–2706, 1997.

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.; BRUNKE, M.; PREUSSEL, K.; LIPPERT, I.; VON DÖHREN, H. Diversity and distribution of Microcystis (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single-colony mass spectrometry. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 1785–1796, 2004.

WELKER, M.; DÖHREN, H.V. Cyanobacterial peptides – Nature`s own combinatorial biosynthesis. **Federation of European Microbiological Societies**, Amsterdam, v. 30, p. 530-563, 2006.

WELKER, M.; MARŠÁLEK, B.; ŠEJNOHOVÁ, L.; VON DÖHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in Microcystis (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**, New York, v. 27, n. 9, p. 2090–2103, 2006.

WHITTON, B.A. Soils and rice-fields. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 233-255.

WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 669 p.

WIEDNER, C.; VISSER, P.M.; FASTNER, J.; METCALF, J.S.; CODD, G.A.; MUR, L.R. Effects of light on the microcystin content of Microcystis strain PCC7806. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1475–1481, 2003.

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

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.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2001. p. 487-493.

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.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOESE, C.R. A new biology for a new century. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, p. 173-186, 2004.

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.

WOLF, H.U.; FRANK, C. Toxicity assessment of cyanobacterial toxins mixtures. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 17, p. 395-399, 2002.

WOLK, C.P.; ERNST, A.; ELHAI, J. Heterocyst metabolism and development. In: BRYANT, D. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 769-823.

YOUNG, F.M.; THOMSON, C.; METCALF, S.S.; LUCOCQ, J.M.; CODD, G.A. Immunogold localization of microcystins in cryosectioned cells of Microcystis. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 151, p. 208–214, 2005.

ZHAXYBAYEVA, O.; GOGARTEN, J.P.; CHARLEBOIS, R.L.; DOOLITTLE, W.F.; PAPKE, R.T. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. **Genome Research**, Woodbury, v. 16, n. 9, p. 1099-1108, 2006.

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

ZWEIGENBAUM, J.A.; HENION, J.D.; BEATTIE, K.A.; CODD, G.A.; POON, G.K. Direct analysis of microcystins by microbore liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 23, p. 723–733, 2000.

ANEXO A

Sequência do gene de RNAr 16S

>AY039703 Fischerella sp. CENA19 1412pb
GTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTAGGAG
ATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTGG
CTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAAAGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTT
GGTGGTGTAAGGGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA
GCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGCACTGACGGT
ACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCC
GGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTAGTGAGTCTGCTGTTAAAGCATTTGGCTTAACCAG
ATAAAAGCATTGGAAACTACTAGACTAGAGTGCGATAAGGGTAGAGGGAATTAATGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGATATTAGTAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTAGGTTGCAACTGACACTGATGGACGA
AAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTTGR
GAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTCCTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGGGAACCGGAACAC
AGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
CGTACTTAGTTGCCAGCACTTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGG
CAGCGAGACTGCGAAGTCAAGCAAATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCC
TGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCCAAGTCGTTACCCTATCCGTTCGCGGAGGGGGAC
GCCCAAGGTAGG

>EU840724 Fischerella sp. CENA161 1417pb
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTCTTTCGGGGGCAAGTGGCGGACGGGTGAGT
AACGCGTGAGAATCTGGCTCCAGGTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTG
AAAGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACTACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAAC
CTCTTTTCTCAGGGAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTAGCAGTGTGTGTCTATTGT
TAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAGGCGGTAGAAACTACACAGCTAGAGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCC
TGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACA
CTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGG
CGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCCCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTGGGGAAACTCAAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCC
AGCACTTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCA
TGCCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAA
ATCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGC
AGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGC
CCGAAGTCGTTACCCTAACCATTATTTGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>Hapalosiphon sp. CENA63 16S 1412pb
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
CGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCTGTGGGTGAA
AGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACTACCAAGGCGACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCT
CTTTTCTCAAGGAAGAATGATGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTGTCTATTGTTAAA
GAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAAACTACACAGCTAGAGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGA
GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTT
GAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA

CCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTCTGGGAAACTAGAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAGCA
TTTAGGATGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCC
CCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAAATCT
CAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGT
CAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCCGA
AGTCGTTACCCTAACTGTTCGCAGAGGGGGATGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>Hapalosiphon sp. CENA71 16S 1414pb
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTAGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
CGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAA
AGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACTACCAAGGCGACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCT
CTTTTCTCAGGGAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTGTCTATTGTTA
AAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAAACTACACAGCTAGAGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACT
GAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCG
TTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTCCTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGGGAACCGGAACACAGGTGGTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAG
CACTTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATG
CCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTCAAGCAAAT
CTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAG
GTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCC
GAAGTCGTTACCCTAACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

>Hapalosiphon sp. CENA72 16S 1414pb
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTAGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
CGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTTCGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTGAA
AGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGGGACTACCAAGGCGACGATCA
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCT
CTTTTCTCAGGGAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGCTGTGTGTGTCTATTGTTA
AAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAAACTACACAGCTAGAGTGCGTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACT
GAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCG
TTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTCCTGAAAGGGAAGAGTGCCTTCGGGAACCGGAACACAGGTGGTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCCAG
CACTTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATG
CCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTCAAGCAAAT
CTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAG
GTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCCC
GAAGTCGTTACCCTAACCGTTCGCGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAA

Sequências da região intergênica da ficocianina

>Fischerella sp. CENA19 ficocianina 648pb
TGGAAATCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTATCCTCGCTGGTGATGCTAGCGTTCTTGATGATCGTTGCTTGA
ATGGCTTGCGCGAAACCTACCAAGCTCTGGGTACTCCCGGTTCTTCCGTAGCAGTTGGTGTTCAAAAAATGAAAG
AAGCTGCTGTCGGCATTGCTAACGATCCCAATGGAATCACCAAGGGTGATTGCAGTGCTTTGATTTCTGAAGTAG
CTAGCTACTTTGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCGTAATAAAACATAACAAAAAAGCCCAGAACCAAAAATCTAG
GTTTGCAGGCAAAAAATTACGAAACGTTAAGGACGTTAAGGAGATTATAAAATCATGAAAACACCCATTACCGAA
GCAATTGCAGCTGCTGATACCCAAGGTCGCTTTCTGAGCAACACTGAACTCCAAGCTGTTCGCGGTCGTTTAGAG
CGCGCTACTGCTAGCATGGAAGCTGCTCGTGCATTGACCAGCAATGCTCAACGCTTGATTGATGGTGCTACTCAA

GCTGTTTATCAGAAGTTCCCCTTCACCACCCAAACCAGTGGCCCAAACTATGCTGCTGATTCTCGTGGTAAGTCC
AAGTGTGCTCGTGACGTTGGTCACTACCTGCGGATCATCACCTACTCC

>Fischerella sp. CENA161 ficocianina 639pb
TGGAAATCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTGATCCTCGCTGGTGACGCTAGCGTTCTTGACGACCGTTGCTTG
AATGGCTTGCGCGAAACCTACCAAGCTCTGGGTACTCCCGGTTCTTCCGTAGCAGTTGGTGTTCAAAAAATGAAA
GAAGCTGCTGTCGGTATTGCTAACGACCCCATGGAATCACCAAAGGTGATTGCAGTGCTTTGACTTCTGAAGTAG
CTAGCTACTTTGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCGTAATAAAACATAACAAAAAAGCCCAGAACCAAAAAATTAG
GTATCCCGGCAAAAAATTACGAAACGTTAAGGAGATTTTAAGATCATGAAAACACCCATTACCGAAGCAATTGCA
GCTGCTGATACCCAAGGTCGCTTTTTGAGCAACACCGAACTTCAAGCTGTTAACGGTCGTTTCCAACGTGCTACT
GCTAGCATGGAAGCTGCTCGTGCATTGACCAGCAATGCTCAACGCTTGATTGATGGTGCTACTCAAGCTGTATAT
CAGAAGTTCCCCTTCACCACCCAAACCAGTGGCCCAAACTATGCTGCTGATTCTCGTGGTAAGTCCAAGTGCGCT
CGTGACGTTGGTCACTACCTACGGATCATCACCTACTCC

>Hapalosiphon sp. CENA63 ficocianina 637pb
TGGAAATCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTATCCTCGCAGGTGACGCTAGCGTTCTTGATGACCGTTGCTTAA
ATGGCTTGCGCGAAACCTACCAAGCTCTGGGTACTCCCGGTTCTTCCGTAGCAGTTGGTGTACAAAAAATGAAAG
AAGCTGCTGTCGGCATTGCTAACGACCCCAATGGAATCACCAAGGGTGATTGCAGTGCTTTGATGTCTGAAGTAG
CTGGTTACTTTGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCGTAATAAAACATAACAAATAAGCCCAGAACCAAAAGTTAGG
TATCCCGGCAAAAAATTACGAAACGTTAAGGAGATTTAACATCATGAAGACACCCATTACCGAAGCAATTGCAGC
TGCTGATACCCAAGGTCGCTTTCTAGGCAACACCGAACTCCAAGCTGTTCGTGGTCGTTTAGAGCGTGCTACTGC
TAGCATGGAAGCTGCTCGTTCACTGACCAGCAATGCTCAACGCTTGATTGATGGTGCAACTCAAGCTGTATACCA
GAAGTTCCCCTACACCACCCAAACCAGTGGCCCAAACTATGCTGCTGATTCTCGTGGTAAGTCCAAGTGTGCTCG
TGACGTTGGTCACTACCTGCGGATCATCACCTACTCC

>Hapalosiphon sp. CENA71 ficocianina 648pb
TGGAAATCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTATCCTCGCTGGTGATGCTAGCGTTCTTGATGATCGTTGCTTGA
ATGGCTTGCGCGAAACCTACCAAGCTCTGGGTACTCCCGGTTCTTCCGTAGCAGTTGGTGTTCAAAAAATGAAAG
AAGCTGCTGTCGGCATTGCTAACGATCCCAATGGAATCACCAAGGATGATTGCAGTGCTTTGATTTCTGAAGTAG
CTAGCTACTTTGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCGTAATAAAACATAACAAAAAAGCCCAGAACCAAAAATCTAG
GTTTGCAGGCAAAAAATTACGAAACGTTAAGGACGTTAAGGAGATTATAAAATCATGAAAACACCCATTACCGAA
GCAATTGCAGCTGCTGATACCCAAGGTCGCTTTCTGAGCAACACTGAACTCCAAGCTGTTCGCGGTCGTTTAGAG
CGCGCTACTGCTAGCATGGAAGCTGCTCGTGCATTGACCAGCAATGCTCAACGCTTGATTGATGGTGCTACTCAA
GCTGTTTATCAGAAGTTCCCCTTCACCACCCAAACCAGTGGCCCAAACTATGCTGCTGATTCTCGTGGTAAGTCC
AAGTGTGCTCGTGACGTTGGTCACTACCTGCGGATCATCACCTACTCC

>Hapalosiphon sp. CENA72 ficocianina 648pb
TGGAAATCATCTTGCGCTATGTTACCTACGCTATCCTCGCTGGTGATGCTAGCGTTCTTGATGATCGTTGCTTGA
ATGGCTTGCGCGAAACCTACCAAGCTCTGGGTACTCCCGGTTCTTCCGTAGCAGTTGGTGTTCAAAAAATGAAAG
AAGCTGCTGTCGGCATTGCTAACGATCCCAATGGAATCACCAAGGGTGATTGCAGTGCTTTGATTTCTGAAGTAG
CTAGCTACTTTGATCGCGCTGCTGCTGCTGTTGCGTAATAAAACATAACAAAAAAGCCCAGAACCAAAAATCTAG
GTTTGCAGGCAAAAAATTACGAAACGTTAAGGACGTTAAGGAGATTATAAAATCATGAAAACACCCATTACCGAA
GCAATTGCAGCTGCTGATACCCAAGGTCGCTTTCTGAGCAACACTGAACTCCAAGCTGTTCGCGGTCGTTTAGAG
CGCGCTACTGCTAGCATGGAAGCTGCTCGTGCATTGACCAGCAATGCTCAACGCTTGATTGATGGTGCTACTCAA
GCTGTTTATCAGAAGTTCCCCTTCACCACCCAAACCAGTGGCCCAAACTATGCTGCTGATTCTCGTGGTAAGTCC
AAGTGTGCTCGTGACGTTGGTCACTACCTGCGGATCATCACCTACTCC

Sequências dos genes *rbc*LX

>Fischerella sp. CENA19 rbcLX 1406pb
TAACTCCCAGCCTTTCCAACGTTGGCGCGATCGCTTCCTGTTTGTAGCTGATGCAATTCATAAAGCCCAAGCAGA
AACAGGCGAAATCAAAGGTCACTACTTGAACGTTACCGCTCCTACCTGCGAAGAAATGCTGAAGCGGGCTGAGTT
CGCTAAAGAACTCAAGATGCCTATCATCATGCATGACTACTTGACAGCAGGTTTCACCGCCAATACAACTCTGGC
TAAGTGGTGTCGCGACAACGGTATATTGCTCCACATTCACCGAGCAATGCACGCGGTAATTGACCGTCAAAAGAA
CCACGGTATCCACTTCCGCGTTTTGGCTAAGACTCTGCGGATGTCTGGTGGAGACCATATTCACACTGGTACGGT
GGTCGGTAAGCTAGAGGGTGAGCGCGGTATTACAATGGGCTTCGTTGACCTACTGCGCGAAAACTATGTTGAGCA
AGACAAATCTCGCGGTATTTACTTCACCCAAGATTGGGCTTCTATGCCTGGTGTAATGGCTGTTGCTTCTGGTGG
TATCCACGTATGGCACATGCCAGCATTGGTAGAAATCTTTGGTGATGATTCTGTACTGCAATTCGGTGGTGGTAC
ACTCGGTCACCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAACCGCAAACCGTGTTGCTTTGGAAGCTTGTATTCAAGCTCG
TAACGAAGGTCGTAACTTGGCTCGCGAAGGTAACGACGTTATCCGTGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCAGAGTTGGC

TGCTGCTTGCGAACTGTGGAAAGAAATTAAGTTCGAGTTCGAGGCCATGGATACAGTCTGATGTCAAGTAAAAAG
TTAAAAGTTGAAAGATAAAAGAAAATTCTTCTTACTTTTGACTTTTGACTTTTGACTTATATTAGGGCCTGGGGC
CAAGCATGAACATTAAACAAATTGCGAAGGACACAGCCAAGACGCTGCAAAGTTACCTGACTTACCAGGCAATGA
GGACGGTGTTGGCTCAACTCAATGAAACCAATCCTCCCTTGGCATATTGGCTGCACAAATTTTCTGCACAAGACA
AAATCCAGGATGGAGAAGCTTATATCGAAGAACTTTTCCGAGAAAAGCCGGATTTAGCGTTGCGGATTATGACAG
TCAGAGAACACATAGCGGAGGAAGTCACCGAATTCTTGCCGGAAATGATTCGTGCTGGTATTTTACAAGCCAATA
TGGAACACCGTCGCCAGCATCTTGAGCGGATAACGCAGTTAAACCAATCTAACCCCAGCGCCGAATCAGAACAGC
AAGCAACCTCAGATCAAAACAGTGAACAGTAAACAGTTAACAGTTAACAACCGATAACTGATAACTGAATAACTA
ATGTCAACCGCAATAATTATCATTTAGCTATGCAAACTCTACCAAAAGAGCGTCGT

>Fischerella sp. CENA161 rbcLX 1461pb
CAACTCCCAGCCTTTCCAACGTTGGCGCGATCGCTTTCTGTTTGTAGCTGATGCCATTCACAAAGCCCAAGCAGA
AACAGGGGAAATCAAAGGTCACTACCTAAACGTTACCGCTCCTACCTGCGAAGAAATGATGAAACGGGCAGAGTT
CGCTAAAGAACTCAAGATGCCTATCATCATGCATGACTACTTGACCGCAGGTTTCACCGCCAATACAACTTTGGC
TAGATGGTGTCGTGACAACGGTATATTGCTCCACATTCACCGAGCAATGCACGCGGTAATTGACCGTCAAAAGAA
CCACGGTATCCACTTCCGCGTTTTGGCTAAGACTCTGCGGATGTCTGGTGGAGACCATATTCACACTGGTACGGT
GGTCGGTAAGCTAGAGGGTGAGCGCGGTATTACAATGGGCTTCGTTGACCTACTGCGCGAAAATTATGTTGAGCA
AGACAAATCTCGCGGTATTTACTTTACCCAAGATTGGGCTTCTATGCCTGGTGTAATGGCTGTTGCTTCTGGTGG
TATCCACGTATGGCACATGCCAGCATTGGTAGAAATCTTTGGTGATGATTCCGTACTGCGATTCGGTGGTGGTAC
ACTCGGTCACCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAACCGCAAACCGTGTTGCTTTAGAAGCTTGTATTCAAGCTCG
TAACGAAGGTCGCAACTTGGCTCGCGAAGGTAACGACGTTATCCGTGAAGCTGCTAAGTAGTCTCCTGAATTGGC
TGCTGCTTGCGAACTATGGAAAGAAATCAAGTTTGAATTCGAGGCCATGGATACAGTCTGACGATTTTAGATTTG
CGATTTTGGATGGTGGATGAATCTAAAATCCAAAATCCAAAATCTAAAATCTAAAATTCACAGGGGCTGGGGTCA
AGCATGAATCTGAAACAAATTGCGAAGGACACAGCCAAGACGCTGCAAAGCTACCTGACTTATCAGGCGGTTAGG
ACGGTGTTGGCTCAACTCAGTGAAACAAATCCTCCCTTGGCATATTGGCTGCACAAATTTTCTGCACAGGACAAA
ATCCAGGATGGAGAAGCTTATATTGAAGAACTTTTCCGAGAAAAGCCGGATTTAGCATTGCGGATTATGACAGTC
AGAGAACACATAGCCGAGGAAGTCACCGAATTCTTGCCGGAAATGGTTCGTGCTGGTATTTTACAAGCCAATATG
GAACACCGCCGCCAGCATCTTGAGCGGATAACGCAGTTAAACCAATCAAACCCCAGTGCCGACGAATCAGAACAG
CAAGCAACTTCAGATCAAAACAGTGAACAGTAATTATCATTAACTGAATAATTGTACAGACGCGTAGACGCTCGT
AAGAGCGGCTTCTCGTAAGAGTAGAATCGCGTCTCTAACTGATCACTAGCAACTAATGTCAACCGCAATAATTAT
CATTTAGCTATGCAAACTCTACCAAAAGAGCGTCGT

>Hapalosiphon sp. CENA63rbcLX 1434pb
TAACTCCCAACCTTTCCAACGTTGGCGCGATCGCTTTTTGTTTGTAGCTGATGCCATCCATAAAGCTCAAGCAGA
AACAGGCGAAATCAAAGGTCACTACCTGAACGTTACCGCTCCTACCTGCGAAGAAATGCTGAAACGGGCTGAGTT
TGCAAAAGAACTCAAAATGCCCATCATCATGCATGACTACCTAACCGCAGGTTTCACCGCCAACACAACTTTGGC
TAAATGGTGTCGCGACAACGGTATATTGCTCCACATCCACCGAGCGATGCACGCGGTAATTGACCGTCAAAAGAA
CCACGGTATCCACTTCCGTGTTTTGGCTAAGACTCTGCGGATGTCTGGTGGAGACCATATTCACACTGGTACAGT
GGTCGGTAAGCTAGAGGGTGAGCGCGGTATTACAATGGGCTTCGTTGACCTACTGCGCGAAAACTATGTTGAGCA
AGACAAATCTCGCGGTATTTACTTCACCCAAGATTGGGCTTCTATGCCTGGTGTAATGGCTGTTGCTTCTGGTGG
TATCCACGTATGGCACATGCCAGCATTGGTAGAAATCTTTGGTGATGATTCCGTACTGCAATTCGGTGGTGGTAC
ACTCGGACACCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAACCGCAAACCGTGTTGCTTTGGAAGCTTGTATTCAAGCTCG
TAACGAAGGTCGCAACTTGGCTCGCGAAGGTAACGACGTTATCCGTGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCTGAGTTGGC
TGCTGCTTGCGAACTGTGGAAAGAAATCAAGTTCGAGTTCGAGGCCATGGATACAGTCTGATGTCAAGTAAAAAG
TTAAAAGTTGAAAAGTAAAAGAAAATTCTTCTTACTTTTAACTTTTGACTTTTGACTTTTGACTTTATTTGGGGC
TGGGGCCAAGCATGAACATTAAACAAATTGCGAAGGACACAGCCAAGACGCTGCAAAGCTACCTGACTTACCAGG
CAGTTAGGACGGTGTTGGCTCAACTCAGTGAAACCAATCCTCCCTTGGCATATTGGCTGCACAAATTTTCTGCAC
AAGACAAAATCCAGGACGGAGAGGCTTACATTGAAGAACTTTTCCGAGAAAAGCCGGATTTAGCATTGCGGATTA
TGACAGTCAGAGAACACATAGCGGAGGAAGTCACCGAATTCTTACCGGAAATGGTTCGTGCTGGTATCCTACAAG
CCAATATGGAACACCGCCGCCAGCATCTTGAGCGAATAACGCAGTTAAACCAGTCAAACCCCAGTACCGAATCAG
AACGGCAAGCAACTTCAGATCCAAACAGTGAACAGTAATTATCATTAACTGAATAATTGTACAGAAGCGATTCAT
CGCGTCTCTAACTGATCACTGGTAACTAATGTCAACCGCAATAATTATCATTTAGCTATGCAAACTCTACCAAAA
GAGCGTTGT

>Hapalosiphon sp. CENA71 rbcLX 1406pb
TAACTCCCAGCCTTTCCAACGTTGGCGCGATCGCTTCCTGTTTGTAGCTGATGCAATTCATAAAGCCCAAGCAGA
AACAGGCGAAATCAAAGGTCACTACTTGAACGTTACCGCTCCTACCTGCGAAGAAATGCTGAAGCGGGCTGAGTT
CGCTAAAGAACTCAAGATGCCTATCATCATGCATGACTACTTGACAGCAGGTTTCACCGCCAATACAACTCTGGC
TAAGTGGTGTCGCGACAACGGTATATTGCTCCACATTCACCGAGCAATGCACGCGGTAATTGACCGTCAAAAGAA
CCACGGTATCCACTTCCGCGTTTTGGCTAAGACTCTGCGGATGTCTGGTGGAGACCATGTTCACACTGGTACGGT
GGTCGGTAAGCTAGAGGGTGAGCGCGGTATTACAATGGGCTTCGTTGACCTACTGCGCGAAAACTATGTTGAGCA

AGACAAATCTCGCGGTATTTACTTCACCCAAGATTGGGCTTCTATGCCTGGTGTAATGGCTGTTGCTTCTGGTGG
TATCCACGTATGGCACATGCCAGCATTGGTAGAAATCTTTGGTGATGATTCTGTACTGCAATTCGGTGGTGGTAC
ACTCGGTCACCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAGCCGCAAACCGTGTTGCTTTGGAAGCTTGTATTCAAGCTCG
TAACGAAGGTCGTAACTTGGCTCGCGAAGGTAACGACGTTATCCGTGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCAGAGTTGGC
TGCTGCTTGCGAACTGTGGAAAGAAATTAAGTTCGAGTTCGAGGCCATGGATACAGTCTGATGTCAAGTAAAAAG
TTAAAAGTTGAAAGATAAAAGAAAATTCTTCTTACTTTTGACTTTTGACTTTTGACTTATATTAGGGCCTGGGGC
CAAGCATGAACATTAAACAAATTGCGAAGGACGCAGCCAAGACGCTGCAAAGTTACCTGACTTACCAGGCAATGA
GGACGGTGTTGGCTCAACTCAATGAAACCAATCCTCCCTTGGCATATTGGCTGCACAAATTTTCTGCACAAGACA
AAATCCAGGATGGAGAAGCTTATATCGAAGAACTTTTCCGAGAAAAGCCGGATTTAGCGTTGCGGATTATGACAG
TCAGAGAACACATAGCGGAGGAAGTCACCGAATTCTTGCCGGAAATGGTTCGTGCTGGTATTTTACAAGCCAATA
TGGAACACCGTCGCCAGCATCTTGAGCGGATAACGCAGTTAAACCAATCTAACCCCAGCGCCGAATCAGAACAGC
AAGCAACCTCAGATCAAAACAGTGAACAGTAAACAGTTAACAGTTAACAACCGATAACTGATAACTGAATAACTA
ATGTCAACCGCAATAATTATCATTTAGCTATGCAAACTCTACCAAAAGAGCGTCGT

>Hapalosiphon sp. CENA72rbcLX 1406pb
TAACTCCCAGCCTTTCCAACGTTGGCGCGATCGCTTCCTGTTTGTAGCTGATGCAATTCATAAAGCCCAAGCAGA
AACAGGCGAAATCAAAGGTCACTACTTGAACGTTACCGCTCCTACCTGCGAAGAAATGCTGAAGCGGGCTGAGTT
CGCTAAAGAACTCAAGATGCCTATCATCATGCATGACTACTTGACAGCAGGTTTCACCGCCAATACAACTCTGGC
TAAGTGGTGTCGCGACAACGGTATATTGCTCCACATTCACCGAGCAATGCACGCGGTAATTGACCGTCAAAAGAA
CCACGGTATCCACTTCCGCGTTTTGGCTAAGACTCTGCGGATGTCTGGTGGAGACCATATTCACACTGGTACGGT
GGTCGGTAAGCTAGAGGGTGAGCGCGGTATTACAATGGGCTTCGTTGACCTACTGCGCGAAAACTATGTTGAGCA
AGACAAATCTCGCGGTATTTACTTCACCCAAGATTGGGCTTCTATGCCTGGTGTAATGGCTGTTGCTTCTGGTGG
TATCCACGTATGGCACATGCCAGCATTGGTAGAAATCTTTGGTGATGATTCTGTACTGCAATTCGGTGGTGGTAC
ACTCGGTCACCCCTGGGGTAACGCTCCTGGTGCAACCGCAAACCGTGTTGCTTTGGAAGCTTGTATTCAAGCTCG
TAACGAAGGTCGTAACTTGGCTCGCGAAGGTAACGACGTTATCCGTGAAGCTGCTAAGTGGTCTCCAGAGTTGGC
TGCTGCTTGCGAACTGTGGAAAGAAATTAAGTTCGAGTTCGAGGCCATGGATACAGTCTGATGTCAAGTAAAAAG
TTAAAAGTTGAAAGATAAAAGAAAATTCTTCTTACTTTTGACTTTTGACTTTTGACTTATATTAGGGCCTGGGGC
CAAGCATGAACATTAAACAAATTGCGAAGGACACAGCCAAGACGCTGCAAAGTTACCTGACTTACCAGGCAATGA
GGACGGTGTTGGCTCAACTCAATGAAACCAATCCTCCCTTGGCATATTGGCTGCACAAATTTTCTGCACAAGACA
AAATCCAGGATGGAGAAGCTTATATCGAAGAACTTTTCCGAGAAAAGCCGGATTTAGCGTTGCGGATTATGACAG
TCAGAGAACACATAGCGGAGGAAGTCACCGAATTCTTGCCGGAAATGGTTCGTGCTGGTATTTTACAAGCCAATA
TGGAACACCGTCGCCAGCATCTTGAGCGGATAACGCAGTTAAACCAATCTAACCCCAGCGCCGAATCAGAACAGC
AAGCAACCTCAGATCAAAACAGTGAACAGTAAACAGTTAACAGTTAACAACCGATAACTGATAACTGAATAACTA
ATGTCAACCGCAATAATTATCATTTAGCTATGCAAACTCTACCAAAAGAGCGTCGT

Sequências do gene *rpoC1*

>Fischerella sp CENA19 rpoC1 610pb
TGAAGTTACTAAACCAGAGACGATTAACTACCGGACTCTGAAACCAGAGATGGATGGCTTGTTCTGCGAGCGCAT
CTTTGGTCCCGCAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAGAGAGTACGGCATCGTGGAATTGTTTGTGA
ACGTTGTGGTGTAGAAGTTACCGAATCGCGAGTACGTCGTCACCGCATGGGTTACATTAAACTCGCCGCGCCTGT
AGCTCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATTCCTAGTTATATCTCCATCCTCTTGGATATGCCCCTGCGGGATGTAGA
GCAAATTGTTTATTTCAATTCCTATGTAGTTCTTAGCCCTGGTAATGCTGAAACCCTAAGTTATAAACAATTACT
TAGTGAAGACCAGTGGCTAGAAATTGAAGATCAGATTTACAGCGAAGATTCTACTTTACAAGGTGTAGAGGTCGG
CATTGGTGCAGAGGCATTACTGCGTCTACTTGCTGATATTAACCTCGAACAAGAAGCTGAAAATTTGCGCGAAGA
AATTACCACAGCTAAAGGTCAAAAACGAGCGAAGTTAATTAAGCGTTTGCGTGTAATTGACAACTTTATTGCCAC
AGGCTCAAAA

>Fischerella sp CENA161 rpoC1 610pb
TGAAGTCACTAAACCAGAGACAATTAACTACCGGACTCTGAAACCAGAGATGGAAGGCTTGTTCTGCGAGCGTAT
CTTTGGTCCGGCAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAGAGAGTCCGGCATCGCGGTATCGTTTGCGA
ACGTTGTGGTGTGGAAGTTACCGAATCGCGAGTCCGTCGCCACCGCATGGGTTTCATTAAACTCGCTGCGCCTGT
AGCTCACGTTTGGTATCTCAAAGGTATTCCTAGTTATATCTCCATCCTCTTGGATATGCCCCTGCGGGATGTTGA
GCAAATTGTTTATTTCAATTCCTATGTCGTTCTTAGCCCTGGTAATGCGGAAACTTTAAGTTATAAACAATTACT
TAGTGAAGACCAGTGGCTAGAAATTGAAGATCAAATTTACAGCGAAGATTCTACTTTACAAGGTGTAGAAGTCGG
CATTGGTGCAGAAGCATTACTGCGTCTACTTGCTGATATTAACCTCGAACAAGAAGCTGAAACTCTGCGCGAAGA
AATTACCACTGCCAAAGGTCAAAAACGAGCGAAGTTAATTAAGCGTTTGCGGGTAATTGACAACTTTATTGCCAC
CGGCTCAAAA

>Hapalosiphon sp CENA63 rpoC1 610pb

TGAAGTCACTAAACCAGAGACGATTAACTACCGGACTCTCAAACCAGAAATGGATGGCTTGTTCTGCGAGCGCAT
CTTTGGACCAGCAAAAGACTGGGAGTGTCATTGCGGTAAGTATAAAAGAGTACGTCATCGCGGGATTGTTTGCGA
ACGTTGTGGTGTGGAAGTTACCGAATCGCGAGTACGTCGCCACCGCATGGGTTATATTAAACTCGCTGCGCCTGT
AGCTCACGTTTGGTATCTCAAAGGTATTCCTAGTTATATCTCCATCCTCTTGGATATGCCCTTGCGGGATGTAGA
GCAAATTGTTTATTTCAATTCCTATGTAGTTCTTAGCCCTGGTAACGCTGAAACCCTCAGTTATAAACAATTACT
TAGTGAAGACCAGTGGCTAGAAATTGAAGATCAAATTTACAGCGAAGATTCTACTTTACAAGGTGTAGAAGTTGG
CATTGGTGCAGAAGCATTACTGCGTCTACTTGCTGATATTAACCTTGAACAAGAAGCTGAAACTCTGCGCGAAGA
AATTACCACAGCTAAAGGTCAAAAACGAGCCAAGTTAATTAAGCGTTTACGGGTAATTGATAACTTTATTGCCAC
CGGATCAAAA

>Hapalosiphon sp CENA71 rpoC1 610pb
TGAAGTTACTAAACCAGAGACGATTAACTACCGGACTCTGAAACCAGAGATGGATGGCTTGTTCTGCGAGCGCAT
CTTTGGTCCCGCAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAGAGAGTACGGCATCGTGGAATTGTTTGTGA
ACGTTGTGGTGTAGAAGTTACCGAATCGCGAGTACGTCGTCACCGCATGGGTTACATTAAACTCGCCGCGCCTGT
AGCTCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATTCCTAGTTATATCTCCATCCTCTTGGATATGCCCCTGCGGGATGTAGA
GCAAATTGTTTATTTCAATTCCTATGTAGTTCTTAGCCCTGGTAATGCTGAAACCCTAAGTTATAAACAATTACT
TAGTGAAGACCAGTGGCTAGAAATTGAAGATCAGATTTACAGCGAAGATTCTACTTTACAAGGTGTAGAGGTCGG
CATTGGTGCAGAGGCATTACTGCGTCTACTTGCTGATATTAACCTCGAACAAGAAGCTGAAAATTTGCGCGAAGA
AATTACCACAGCTAAAGGTCAAAAACGAGCGAAGTTAATTAAGCGTTTGCGTGTAATTGACAACTTTATTGCCAC
AGGCTCAAAA

>Hapalosiphon sp CENA72 rpoC1 610pb
TGAAGTTACTAAACCAGAGACGATTAACTACCGGACTCTGAAACCAGAGATGGATGGCTTGTTCTGCGAGCGCAT
CTTTGGTCCCGCAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAGAGAGTACGGCATCGTGGAATTGTTTGTGA
ACGTTGTGGTGTAGAAGTTACCGAATCGCGAGTACGTCGTCACCGCATGGGTTACATTAAACTCGCCGCGCCTGT
AGCTCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATTCCTAGTTATATCTCCATCCTCTTGGATATGCCCCTGCGGGATGTAGA
GCAAATTGTTTATTTCAATTCCTATGTAGTTCTTAGCCCTGGTAATGCTGAAACCCTAAGTTATAAACAATTACT
TAGTGAAGACCAGTGGCTAGAAATTGAAGATCAGATTTACAGCGAAGATTCTACTTTACAAGGTGTAGAGGTCGG
CATTGGTGCAGAGGCATTACTGCGTCTACTTGCTGATATTAACCTCGAACAAGAAGCTGAAAATTTGCGCGAAGA
AATTACCACAGCTAAAGGTCAAAAACGAGCGAAGTTAATTAAGCGTTTGCGTGTAATTGACAACTTTATTGCCAC
AGGCTCAAAA

Sequências do gene *tufA*

>Fischerella sp. CENA19 tufA 830pb
ACTATGTGAAGAACATGATCACTGGTGCAGCGCAAATGGATGGTGCTATCCTGGTGGTTTCCGCTGCGGATGGCC
CAATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCCTAGCACGCCAGGTGGGTGTACCCAACCTAGTTGTCTTCTTAAACA
AAGAAGACATGGTGGATGACGAAGAATTGTTGGAACTCGTAGAGTTGGAAGTTCGCGAACTACTTTCCAGCTATG
ATTTCCCTGGTGACGACATCCCAGTAATCAAGGGTTCAGGTCTGCAAGCACTGGAACAAATGACAGCTAACCCTA
AGACACAGAAGGGTGAAAACAAGTGGGTAGACAAAATCTACGAACTGATGGATGCTGTAGATGCTTACATTCCTA
CACCAGAACGTGATATTGATAAGCCCTTCCTGATGGCAGTGGAAGACGTATTCTCAATCACAGGTCGTGGTACAG
TAGCTACCGGACGTATTGAACGGGGTAAAGTCAAGATCGGCGATAACGTAGAGCTAGTTGGTATTAAAGATACTC
GTGCTACCACAGTCACCGGGATCGAGATGTTCAAGAAGAGTCTCGAAGAAGGTATGGCTGGGGATAACGCTGGTA
TACTATTGCGCGGTGTCCAAAAAACTGATATTGAACGGGGGATGGTAATTGCCAAACCTGGTTCTATCACTCCTC
ATACTGAATTTGAAGGAGAAGTGTACGTTCTCACGGAGAAAGAAGGCGGTCGTAAAACTCCTTTCTTCGCAGGAT
ATCGTCCTCAATTCTATGTACGGACAACCGACGTAACCGGTACTATCAAAACCTTTACCTCCGATGACGGTAGCG
CCGCA

>Fischerella sp. CENA161 tufA 829pb
ACTATGTGAAGAATATGATCACTGGTGCAGCGCAAATGGATGGTGCTATTCTGGTGGTTTCGGCTGCGGATGGCC
CAATGCCCCAAACTCGTGAACACATTCTCCTAGCACGCCAGGTGGGTGTACCCAACCTAGTTGTCTTCTTAAACA
AAGAAGACATGGTGGATGATGAAGAATTGTTGGAACTAGTAGAATTGGAAGTTCGTGAACTACTTTCCAGCTATG
ATTTCCCTGGTGATGACATCCCAGTAATCAAGGGTTCTGGTCTGCAAGCGCTGGAAAAAATGACAGCTAGCCCCA
AGACACAGAAGGGTGAAGATAAGTGGGTAGATAAAATCTACGAACTGATGGATGCTGTAGATGCTTATATTCCCA
CACCAGAGCGTGATGTTGATAAGCCCTTCTTGATGGCAGTAGAAGACGTGTTCTCCATCACAGGTCGTGGTACAG
TAGCTACCGGACGTATTGAACGGGGTAAAGTCAGATCGGCGATAACGTAGAGCTAGTTGGTATCAAAGATACTCG
TGCTACCACAGTCACCGGGATCGAGATGTTCAAGAAGAGTCTCGAAGAAGGTATGGCTGGAGATAACGCCGGTAT
ACTTTTGCGCGGTGTCCAAAAAGCTGATATTGAACGGGGTATGGTAATTGCCAAACCTGGTTCTATCACTCCTCA
TACTCAATTTGAAGGGGAAGTGTACGTACTGACTGAGAAAGAAGGTGGTCGTAAAACTCCTTTCTTCCCAGGCTA

TCGTCCTCAATTCTACGTACGAACAACCGACGTAACTGGTACCATCACGACCTTTACCTCCGATGAAGGTGATGC
CGCA

>Hapalosiphon sp. CENA63 tufA 830pb
ACTATGTGAAGAACATGATCACTGGTGCAGCGCAAATGGATGGTGCTATTCTGGTGGTTTCTGCTGCGGATGGCC
CAATGCCCCAAACTCGTGAACACATTCTCCTAGCCCGCCAGGTAGGTGTACCCAACCTAGTTGTCTTCTTAAACA
AAGAAGACATGGTGGATGATGAAGAATTGTTGGAACTCGTAGAATTGGAAGTTCGCGAACTGCTTTCCAGCTATG
ATTTTCCTGGTGACGACATCCCAGTAATCAAAGGTTCTGGTCTGCAAGCGCTGGAAAAAATGACTGCCAACCCCA
AGACTCAGAAGGGTGAAGATAAGTGGGTAGACAAAATCTACGAACTCATGGATGCTGTAGATGCTTACATCCCCA
CACCAGAGCGTGATATTGATAAGCCCTTCCTGATGGCTGTAGAAGACGTGTTCTCCATTACAGGTCGTGGTACAG
TAGCTACCGGACGTATTGAACGGGGTAAAGTCAAGATCGGCGATAACGTAGAGCTAGTTGGTATCAAAGATACCC
GTGCCACCACAGTCACCGGGATCGAGATGTTCAAGAAGAGTCTCGAAGAAGGCATGGCTGGGGATAATGCCGGTA
TACTATTGCGCGGTGTCCAAAAAACCGATATTGAGCGGGGTATGGTAATTGCCAAACCTGGTTCGATCACTCCTC
ATACTCAATTTGAAGGAGAAGTGTACGTTCTGACTGAGAAAGAAGGCGGTCGTAAAACTCCTTTCTTCGCAGGAT
ATCGTCCTCAATTCTACGTACGGACAACCGACGTAACCGGTACTATCAAAACCCTTACCTCTGATGACGGCAGTG
AGGCA

>Hapalosiphon sp. CENA71 tufA 830pb
ACTATGTGAAGAACATGATCACTGGTGCAGCGCAAATGGATGGTGCTATCCTGGTGGTTTCCGCTGCGGATGGCC
CAATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCCTAGCACGCCAGGTGGGTGTACCCAACCTAGTTGTCTTCTTAAACA
AAGAAGACATGGTGGATGATGAAGAATTGTTGGAACTCGTAGAGTTGGAAGTTCGCGAACTACTTTCCAGCTATG
ATTTCCCTGGTGACGACATCCCAGTAATCAAGGGTTCAGGTCTGCAAGCACTGGAACAAATGACAGCTAACCCTA
AGACACAGAAGGGTGAAAACAAGTGGGTAGACAAAATCTACGAACTGATGGATGCTGTAGATGCTTACATTCCTA
CACCAGAACGTGATATTGATAAGCCCTTCCTGATGGCAGTGGAAGACGTATTCTCAATCACAGGTCGTGGTACAG
TAGCTACCGGACGTATTGAACGGGGTANNAGTCAGATCGGCGATNACGTAGAGCTAGTTGGTATTAAAGATACTC
GTGCTACCACAGTCACCGGGATCGAGATGTTCAAGAAGAGTCTCGGAGAAGGTATGGCTGGGGATACGCTGGTAT
ACTATTGCGCGGTGTCCAAAAAAGTGATATTGAACGGGGGATGGTAGTTGCCAAACCTGGTTCTATCACTCCTCA
TACTGAATTTGAAGGAGAAGTGTACGTTCTGAACGGAGAAAGAAGGCGGTCGTAAAACTCCTTTCTTCGCAGGAT
ATCGTCCTCAATTCTATGTACGGACAACCGACGTAACCGGTACTATCAAAACCTTTACCTCCGATGACGGTAGCG
CCGCA

>Hapalosiphon sp. CENA72 tufA 830pb
ACTATGTGAAGAACATGATCACTGGTGCAGCGCAAATGGATGGTGCTATCCTGGTGGTTTCCGCTGCGGATGGCC
CAATGCCCCAAACCCGTGAACACATTCTCCTAGCACGCCAGGTGGGTGTACCCAACCTAGTTGTCTTCTTAAACA
AAGAAGACATGGTGGATGATGAAGAATTGTTGGAACTCGTAGAGTTGGAAGTTCGCGAACTACTTTCCAGCTATG
ATTTCCCTGGTGACGACATCCCAGTAATCAAGGGTTCAGGTCTGCAAGCACTGGAACAAATGACAGCTAACCCTA
AGACACAGAAGGGTGAAAACAAGTGGGTAGACAAAATCTACGAACTGATGGATGCTGTAGATGCTTACATTCCTA
CACCAGAACGTGATATTGATAAGCCCTTCCTGATGGCAGTGGAAGACGTATTCTCAATCACAGGTCGTGGTACAG
TAGCTACCGGACGTATTGAACGGGGTAAAGTCAAGATCGGCGATAACGTAGAGCTAGTTGGTATTAAAGATACTC
GTGCTACCACAGTCACCGGGATCGAGATGTTCAAGAAGAGTCTCGAAGAAGGTATGGCTGGGGATAACGCTGGTA
TACTATTGCGCGGTGTCCAAAAAACTGATATTGAACGGGGGATGGTAATTGCCAAACCTGGTTCTATCACTCCTC
ATACTGAATTTGAAGGAGAAGTGTACGTTCTCACGGAGAAAGAAGGCGGTCGTAAAACTCCTTTCTTCGCAGGAT
ATCGTCCTCAATTCTATGTACGGACAACCGACGTAACCGGTACTATCAAAACCTTTACCTCCGATGACGGTAGCG
CCGCA

ANEXO B

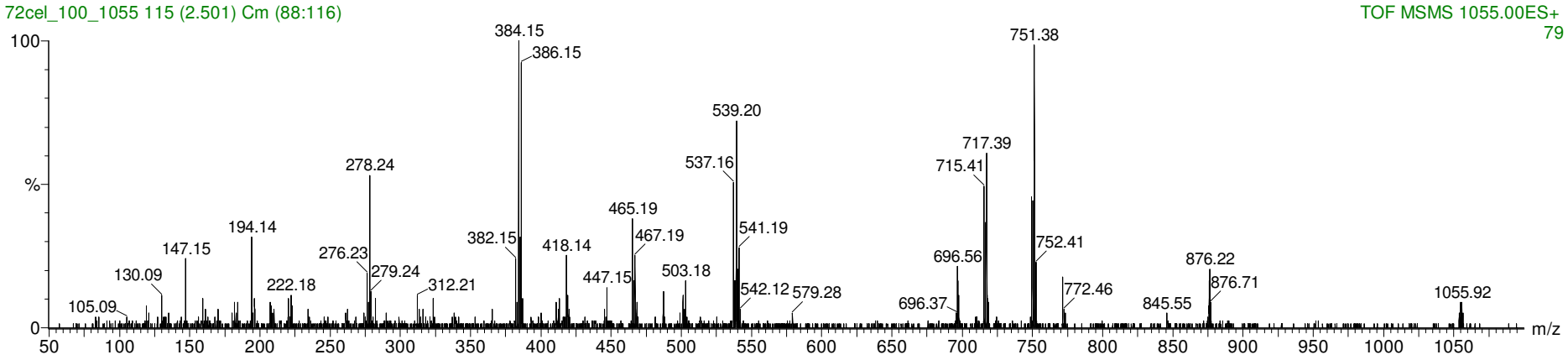


Figura 1 – Fragmentação da substância putativa aeruginopeptina 917S-A de *m/z* 1055 do extrato intracelular da *Hapalosiphon* sp. CENA72.

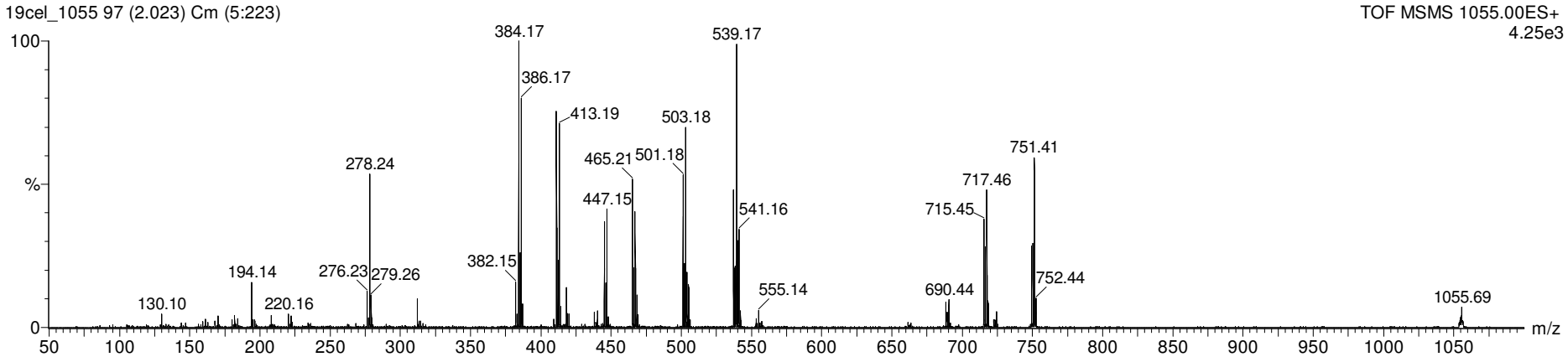


Figura 2 – Fragmentação da substância putativa aeruginopeptina 917S-A de *m/z* 1055 do extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA19.

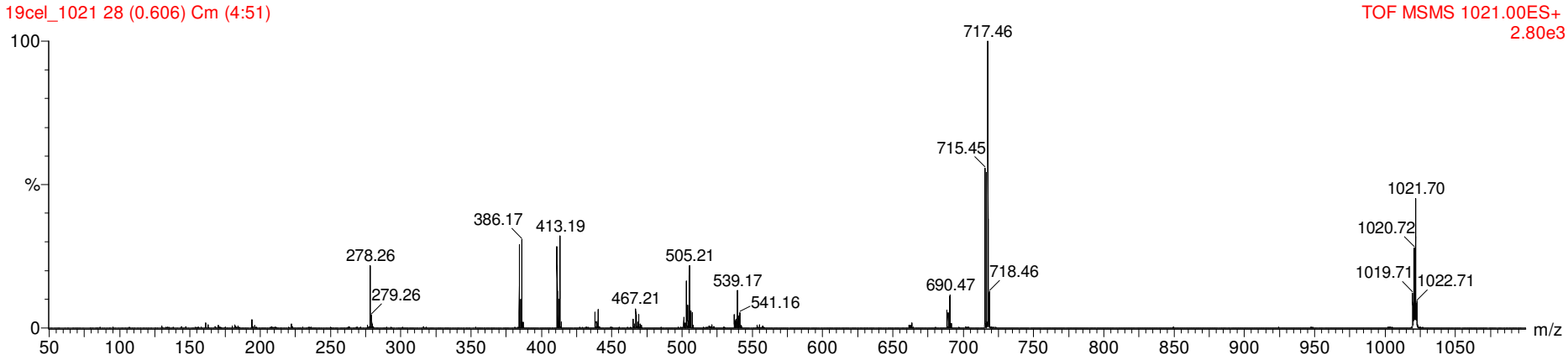


Figura 3 – Fragmentação da substância putativa cianopeptolina de *m/z* 1021 do extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA19.

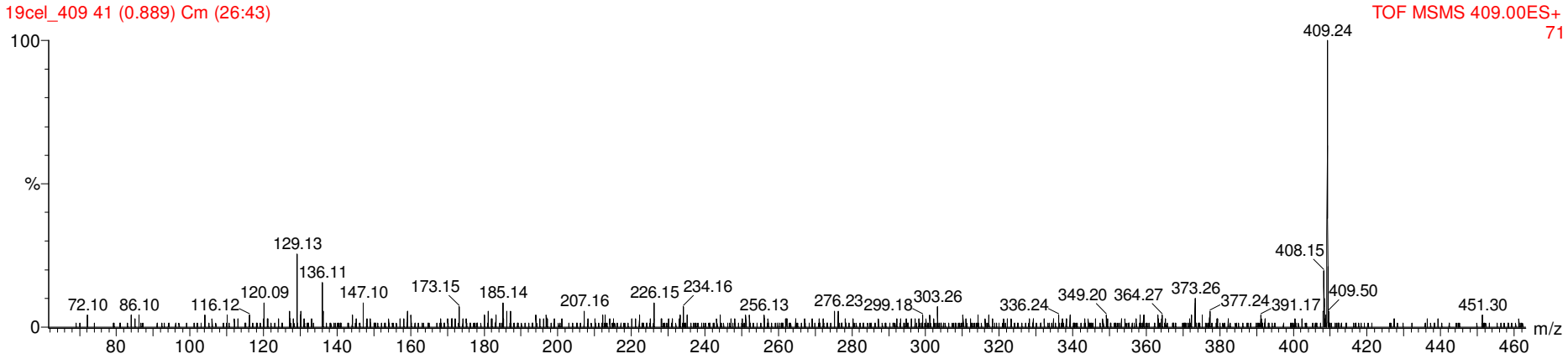


Figura 4 – Fragmentação da substância putativa fischerellina A de *m/z* 409 do extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA19.

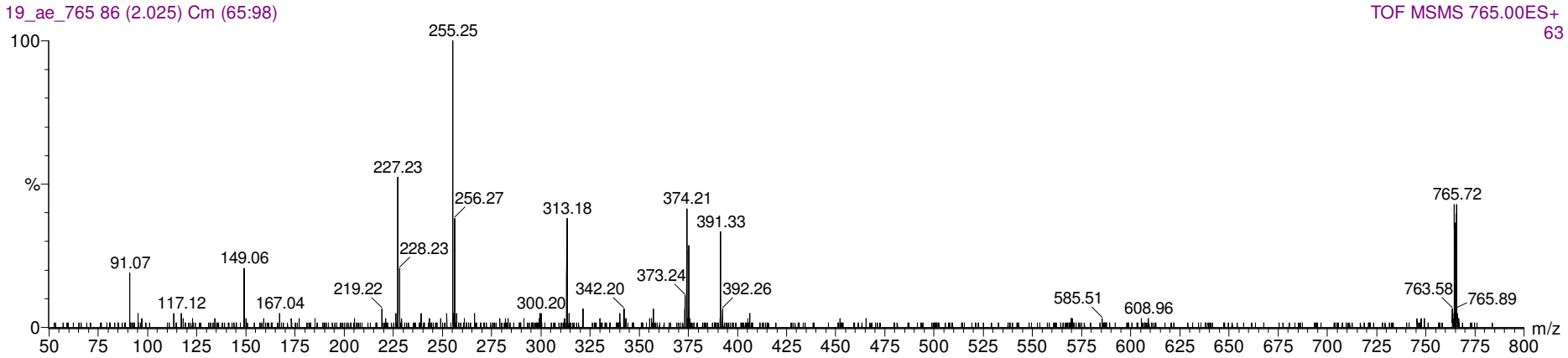


Figura 5 – Fragmentação da substância putativa aeruginosina de *m/z* 765 do extrato extracelular extraído com AE da *Fischerella* sp. CENA19.

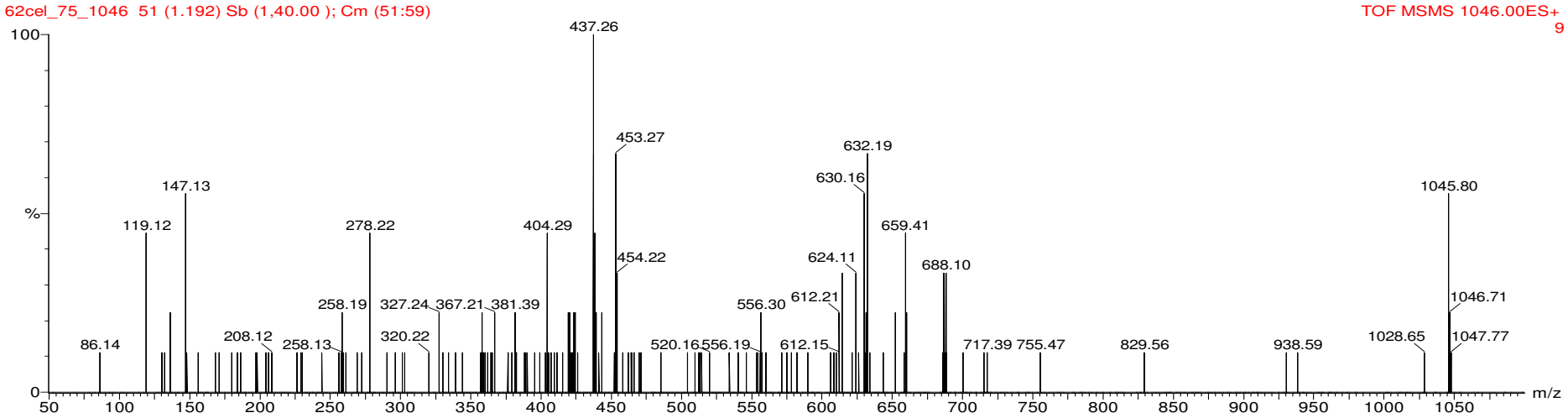


Figura 6 – Fragmentação da substância putativa oscillapeptilida 97A de *m/z* 1046 do extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA161.

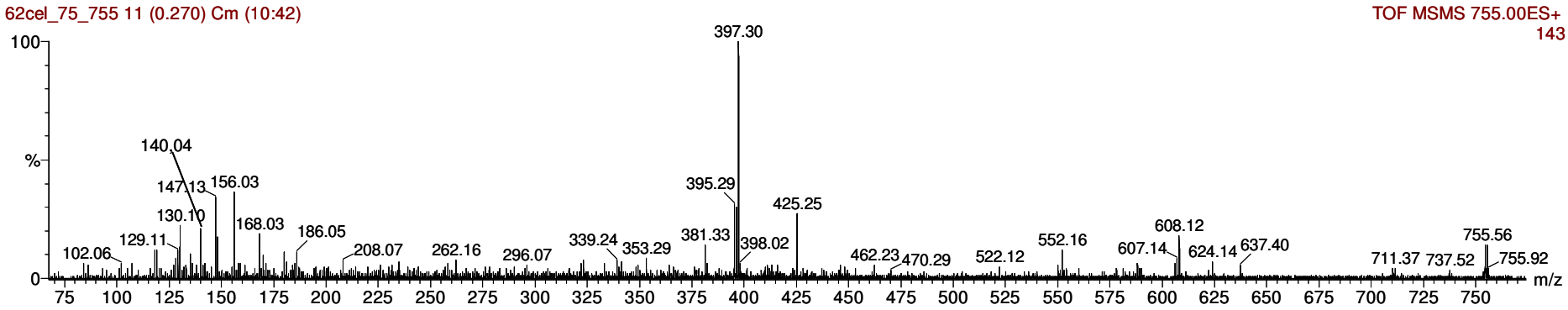


Figura 7 – Fragmentação da substância putativa aeruginosina de *m/z* 755 do extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA161.

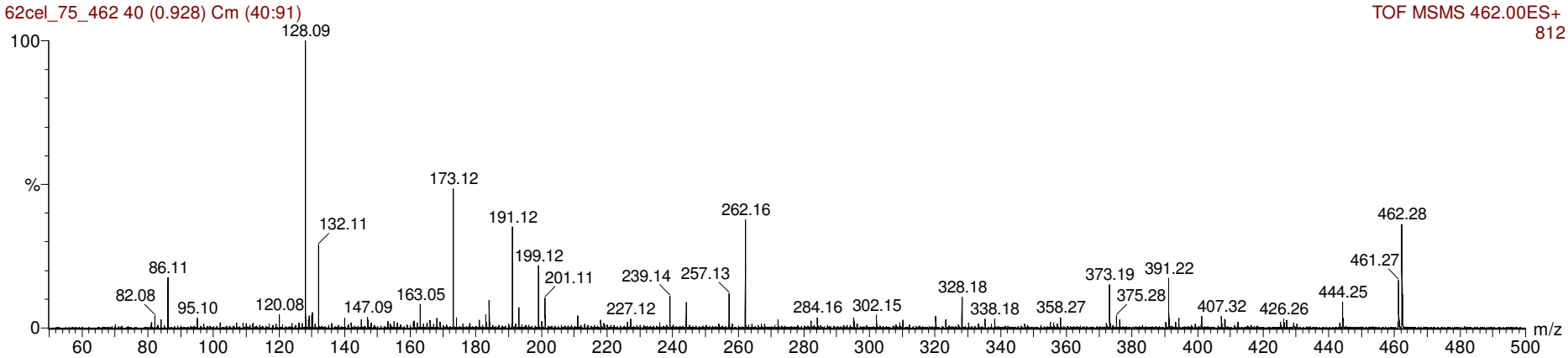


Figura 8 – Fragmentação da substância putativa aeruginosina EI461 ou microginina de *m/z* 462 do extrato intracelular da *Fischerella* sp. CENA161.

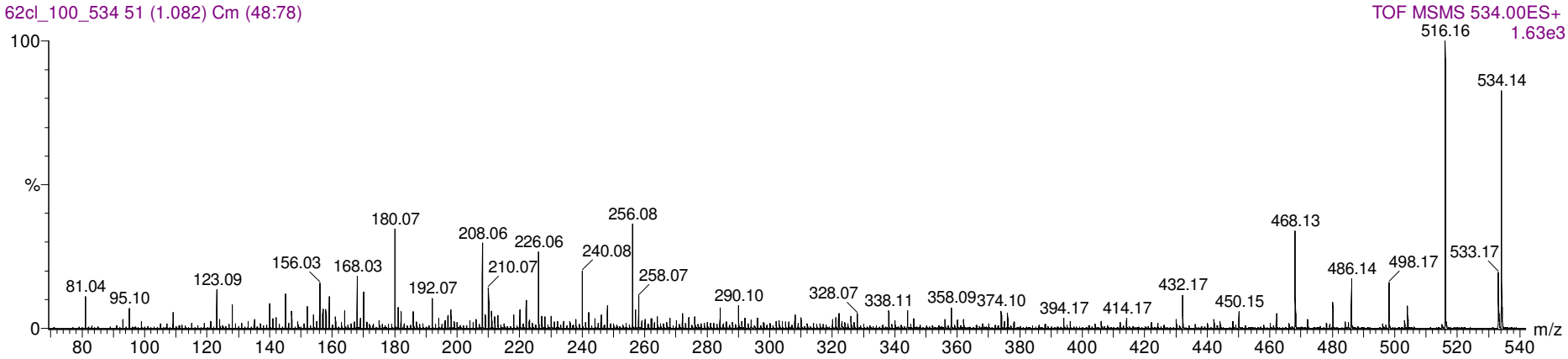


Figura 9 – Fragmentação da substância putativa ácido tumonóico de *m/z* 534 do extrato extracelular extraído com CL da *Fischerella* sp. CENA161.

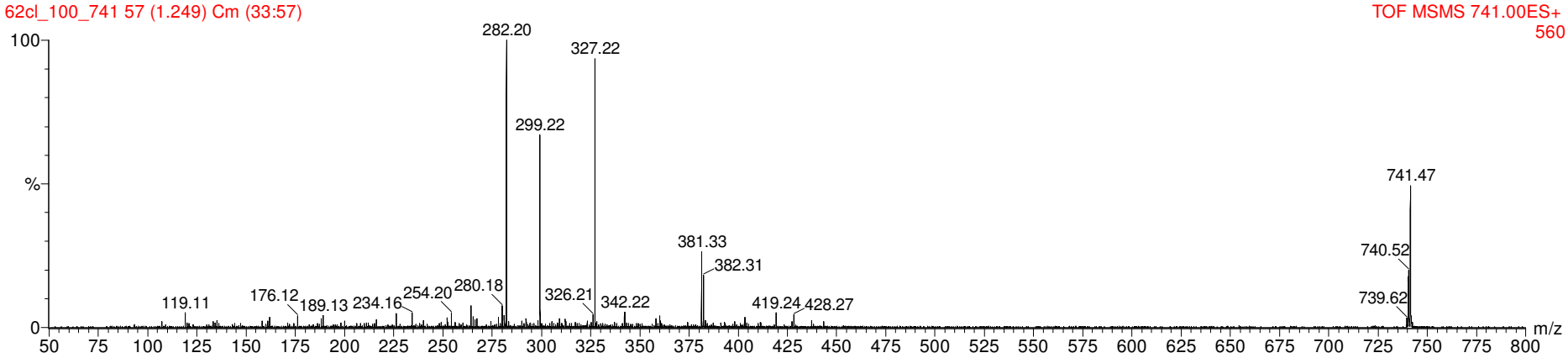


Figura 10 – Fragmentação da substância putativa aeruginosina de *m/z* 741 do extrato extracelular extraído com CL da *Fischerella* sp. CENA161.

ANEXO C

Sequências dos genes *mcy*

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyA* 165 pb (OMETF e OMETR)
CTGCCGCCATTATTGGGGTACAGACATCTCACCAGTGGCAATAGACTACATTCAGCAGCAATTGAGTCAACTACAGCCA
AACTTAGATCATGTGAATCTATTGCAACGTGCAGCCGATAATTTTGAGGGTTTAGAGGCACAAGGATTTGACACCATTA
TCCTCAA

> Fischerella sp. CENA161 *mcyA* 995 pb (MSR e OMETF)
CTGCCGCCATTATTGGGGTACAGACATCTCACCAGTGGCAATAGACTACATTCAGCAGCAATTGAGTCAACTACAGCCA
AACTTAGATCATGTGAATCTATTGCAACGTGCAGCCGATAATTTTGAGGGTTTAGAGGCACAAGGATTTGACACCATTA
TCCTCAACTCGGTCGTGCAGTACTTCCCCCACATTGATTATTTGTTGCGCGTTTTAGAAGGTGCAGTGAATGTAGTTGT
CCCTGGAGGCTGTATTTTCTTGGGAGATGTACGAAATCTGCAATTACTAGAAGCTTTCCACGCCTCTGTGGAGTTGCAT
AAAGCTCCGCCTGAGCTATCTGTAGCCCAGTGGCAACAACGTGTACACAAGCAAATTGCCCAAGAGAATGAACTACTCA
TTCACCCAGCCTTCTTTACAGCTATTCAGCAGCGTTTCCCCCCAATTACCATGTACAGATCCAGCTACAGCAAGGTCAG
CACCCACACGACTACTCAATTTCGCTACACGTCGGTCTACTGCGTGTGGGAGCTTGCGGGGATGTTCCCCAGAATGTTC
AGTGTTGGACTGCAAAAACCAACAACTCACATGTTCTGCGGTGCGACATCTGCTAGTAGAGACAAAACCTGAAATCATG
GGTTTACANCGGATACCAAATGCAAGATTAATAACATCTCTAAAAAGTGCCGCACTCCTGGAAAATCCCCAGGAATATC
AGACAGTCAGCCAATTACATCAACTGATAAATGCGATCGCTCCCCAATCAGGAGTCGAACCTGATGACTTTTATGCTCT
AGCTGAAGTTTTGTCCTATTCTGTAGTTGTTACTTGGTCAGATTCCAGTATATTAGACTACTACGATGTCATTTTTGTG
CAACGCCAAAGTCAGGGGCAAGTCCCTGTGAGAGCGTTTACTCCCAGCAAAAAGCAAACCAAACATGACTGGCGATTTT
ATACCAACCAACCTTTACAGCCAAGGTTGAACCGTCAACTCATACCC

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyB* 766 pb (pB3F e pB9R)
AATACGCTTATAGCACTCTGGCGGAAGTACAAAGGCTGAGTGATGTACCACCAGAAGTCCCCTTATTTGAAAGTTTGGT
GGTGTTTGAGAACTATCCTATGGATAGCTTGTCAGAAGAGCCAAATCAATTATTGCCGATCAGCAAGGTAGAGAATTTT
GAAGAAACAAACTATCCTTTGACTGTGGCAGCAATACCCAAAAAAGAATTACTCATAAAATTTAGTTACGATACTAGTC
GTTTTACAAACAATACAATTGTGCGGATGGCTGGCCATTTACAGACCTTGTTAACAGCCATTGTCGCTAATCCCCAGCA
GCAGGTAGCTGATCTGCCGCTCTTGACAGAGGTAGAACGACATCAGTTATTAGTAGAGTGGAACAATACTCAAGCTGAC
TATCCTCAAGATAAATCAATCCATCAGCTATTTGAAGAACAAGTAGAACGCAACCCTGATGCGGTAGCTGTTATCTTTG
AAAATCAAAAATTAAATTATCAACAATTAAATGAACAAGCCAATCAATTAGCTCACTATTTGCGAACAAAAGGCGTAGA
ACCAGAAGTATTGGTAGGAATTTTTGTTGAGCGTTCAATTGAGATGGTAGTCGGACTACTAGGAATTTTAAAGGCAGGA
GGAGCTTATCTACCTTTAGATCCTAGTTATCCAACAGAGCGCTTGACTCATATGATCTCCGATGCAGCAGTGCCAATTT
TACTAACTCAGCAATCTCTGGTAGATTTTTTACCAGCAAATCAAGCTGAGGTAGT

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyC 517* pb (pC8R e pC7F)
ACCAACAGTAGCAGAATTGAGCGAGTATATCATTTACGCTCAAGAAATGAATATCCAACCGAAAGAACGTCCTTATGTC
GTTTTTAATCAACAGCGAAATCAAGCTGTGTTTTTATTTCCCCCAGCCCTGGGATTTGCCACAGCTTATGCAAATTTAG
CTGATTATTTAAATGACTATACTATCTATACTTTCAGATATATTGCTGATGAAGCAAGTTTAGAAAAATATGCAGAATT
GATAGATCACCTAACAGTAAATCAAGATATAAAATTGATGGGACATTCAGCAGGTGGTTTTTTGGCTATGTTAATGGCT
CAAAAATTAGAAAGTCGCGATCGCATAGTTTCTGATGTCATTTTATTAGATACCTACAGAGGTGGTCGTGAAGCTAAAC
AAGCTGATATGTCAGAAATCAAAGAAGGTGTTGATACTTTCTTGTTAAATCCCAAACGTCAGGAATTAAGACGTTACTT
TTTGGACAATCAAAAGTTACGCGATCGCACCTACAATCAAGTT

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyC* 481 pb (pC1F e pC13R)
AAGTGAATATTCCAGTGGTTATAATATTAGGCTGGCGATGAGAATTAATGGCAGCTTAGATATTTTGGCATTGACAGCA
GCTTTCCAACAACTTGTGAGTCGCCACGAAATTTTGCGTACTACTTTTACAAGTGTTGCAGGCAAGATTCAGCAAATAG
TGCATGAAAATTTATCTACAGAAGAGTTAATAAATTTTAAAGATTTAAGAGAAGAAAAAGATGCTGAGAGCATAGCTGA
TAGACTAATTCAAGAGTCAGCAAACTCGCGTTTTGATTTGGAGAATTTACCTTTAATGCGAGTTTTGTTAATACAGATC
AAGTCAGAAGATTTTTTGTTTGGCTTGACTATACATCATATTATTGGGGATGCGCGATCGCTCGATATCCTTTTTCAAG
AGTTCGTCACTTTATACTCTGCTCGTACGCAACAACAAACTGCTGCCCTACCTCCACTATCATTGCAGTATAAGGATTA
TGCTGCA

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyE 769* pb (mcyE-F2 e mcyE-R4)
AGCATTAGCAGCTGGTTATCACAATCTCCCCCAAATCACCAAAGAAAAATTTCAACCAAGCTTTATTAGTGAGGGAAGA
ACTCTTTTTAGAACCGGAGATTTAGGTAAACAAATTGCTCCTGGTGTGATTGAATTTATTGGTCGCAAAGATAATCAAG
TTAAAGTCAATGGTTATCGCATAGACCCAGGAGAAATCGAATATCAACTCAACCGTCATGCTGATATTGACAGAGCAAT
TGTCTTACCTATCGAGGTAGATAATCGAATTCAATTATCTGCTTATTGTCAAACTGCCAAAGATATAGAAATTTTTGAC
ATCCGAAAATCTCTCTCTCATGCTTTGCCAGTTTATATGATTCCTAGTTATTTTATTTTATTAAAGCAATTTCCTCTCA
CTAGACATGGAAAAATTGACTGGCGATCGCTCCTTGAACTCCAAGAAACGAGTAAATCAACACAGGTAAATTATACAGC
ACCACGTAATAGTTTAGATTCCAGACTAGTCAATATCTGGGAAAAATTTATTAGCAAACGTCCCATCGGTATTTTTGAT
AATTTTTTTGAAATCGGTGGACACTCTCTGCTACTTTCGCGAGTTGTAACTCATGTTCATAAAGAATTAAATGTAGTAG

TCAAATTGGCTGATTTTTTTAAAGTTCCTACCATCGCCGGATTAGCAGCTTTAGTATCTCAAGCCCAATATGACTATCA
AAAACCCATACCACCAATCACTCAGCAAACATCTTATCCTATGTCTCATGGACAACGG

> EU840725 Fischerella sp. CENA161 type I polyketide synthase gene
CTTATTATTGGAAACTAGTTGGCAAGCTTTGGAATCAGCTGGACAAAACCCGCAGCAGTTACGCAACAGTCAAACAGGG
GTTTTTGTGGGAGCAATGACTCAAGATTATGCCCAGTTAAGTTATGCACCAGAAGCGATTAACGCCTATACTGGTTCTG
GAACTTCTGTCAGCGTAGCTGCTGGTCGTTTATCTTATGTACTAGGCTTGCAAGGGCCATCTATGACAGTTGATACCGC
TTGTTCTTCTTCTTTAGTGGCAGTGCATTTAGCCTACAATGCTTTGCGTAATGGAGAGTGTGATATTGCCTTGGCAGGT
GGCGTCAACATCATTTTAACCCCAATCATTTCCTTAATTGAAAGTCGCGCTCATATGCTTGCACCGGATGGACGCTGCA
AAACATTTGATGCAAGTGCGAATGGGATGGTGCGGGGTGAAGGTTGCGGAATGATTGTTCTCAAACGCTTGAGTCAAGC
AATTAAGAATGGCGATCGCATCTTAGCTAGAGTTTATGGTACCGCTGTGAATCACGATGGCCCTAGTAGTGGACTGACT
GTACCTAATGGTGATGCTCAGGAAAAATTATTACATCAAGCCCTGAAGACGGCGCAACTCAAACCAGAGCAAATAGATT
ATATCGAAGCC

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyI* 755 pb (*mcy-IdegenF* e *mcy-IdegenR*)
ATTAGATGCTCAAGCGATCGCATTAGCCAAAAATTTAAAAGTTATCAGTACATCTGGATTTGGAACTGATGCAATTAAT
ATTGCTGCTGCAACAAAACAGGGGATTGTTGTAGTCAACAATCCTGGTTTGTCAACAACCGCTGTTGCTGAACACACGA
TTTGCATGATTTAGCTTTAGCGAAAAAGCTGACTTTTCTCAATCAGTGTGTCAAAACAGGAAACTACCTGATTCGTAAT
CAGGTACAACCAATGCAACTCGAAGGAAAAACACTTGGAATTGTTGGTTTGGGAAGAATTGGTAGTGCTGTCGCCCATA
AGTGCAGTACAGCATTCCAGATGCGAGTTTTAGCATACGATCCTTACGTCCTGGCTAGTAAAGCAGAAGCATTGGGTGG
AACTTTGGTAAATGATTTAGAATACCTTTTGGCTGAATCCGACTTTGTATCTTTACACCCTGAATTAACCGATGAAACC
TATGAAATGTTTGCTCTAGAAACTTTTGAAAAAATGAAATCCACTGCTTTCTTAATCAATACATCTCGTGGGAAGATAG
TTCGAGAAAAAGATTTAGTTGTAGCTATCCATGAAAAATTGATCGCAGGAGCGGCAATAGATGTGTTTGAGCCAGAACC
CCCATCTCACGATAATCCTTTGTATGACTTTGACAATGTAATTTTGTCACCCCATCTCGCTGGAGTTACACCTGAAGCT
GCTATAGCTGCTGCACTTTCCGCAGCTAATCAAATACTGCAAGT

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyD* 839 pb (mcyDF e mcyDR)
TATGGCTGCGGTTTTTGGGAAACGTCCCCAAAATCGACCTTTAATTATTGGTTCTGTCAAAACCAATTTAGGACATTTA
GAAGGAGCAGCTGGAATTGCTGGATTAATCAAAACTGTTTTAGCCTTGCAAAACAATAAAATTCCTCCCCATCTTCACT
TTCAACAACCCAATCCTCGTTTTGATTGGAGTTCTGATATTTTTGAAGTTCCAGTACATGGAAAAAACTGGCATTCTAG
TGAACGTCAACGCATTGCAGGAGTCAGTTCTTTTGGATTTAGTGGTACGAATGCTCATGTAATTGTAGGAGAAATTGCC
GATTATTCTACCCGAAATTTTGATCAAAAATTTTACCTGTTACCACTTTCGGCTCGTTCCGAAAAATCTCTCCAAGAAT
TAGCAAAAAATTATCAATCTTCTTTTAATGAATCTGTTAATTTAGCAGATGCGTGTTTTACTGCTAGCACAGGAAGATC
TGTTTTTCGCCATAGATTGTGTATCTTAGCCGAATCAATCACCACAGTTCAACAAGCACTTATTGATTTTCAAACAGGT
GAGGATTATGAGAATTTAATTACACCAATTTCATCAGAAATTCAGCCCGATGTTGCTTTCCTATTTTCAGGACAAGGTT
CCCAATATTCAGGGATGGGACAAACGCTTTATAATCAAGAACCCGTCTTTAAAAATACTTTAGATCTTTGTCACCAAAT
CCTCGAACCAATTTTAGAAACATCACTGTTAGATATAATCTTTGAATTGCAAAATAGTGATTTGCTACAACAGACTCAA
ATTACCCAGCCAGCCTTATTTGCACTTGAATATTCACTAGCTAAATTAT

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyG* 345 pb (PKGR1 e GF)
GAACTACCCATGAAATTCTCAAAGCTTGCACCTCTTACCAAATGATCTACACATTTACTGATATTTCACCATTCTTTTT
AGAGAACGCGAAAGATACCTTTGCTCAATTCCCCTTCATAGAATACAAACTTCTGGACATAGAAAAAAATCCAGAATTG
CAAAATTTTTCACCCAATACCTATGATTTGATTATTGCGGCAAATGTATTGCATTCGACGCGGGATTTGCAAGCAGAAA
CATTACCTCACATTCGGAATTTATTGCGTCCTGGCGGACATTTGTTACTTTTAGAACTCACCAATCAATCGCGGTGGAT
TGATTTGATATTTGGCTTGACTCAAGGTT

> *Fischerella* sp. CENA161 *mcyG* 673 pb (KSF e KSR)
TGCTTCTACGTAGCTGATGGTGTCTGCATCCACTCCAGACATTGTCATTGCTTCTGTGACTACAGCTGCTTGACCATCT
CCATTGGGAGCCATATAGCCGACTTTTTTACCACCATCGTTATTAACGGCTGAACCTTTTACAACAGCATAAATGTGGT
CTCGATCAGCTAGAGCATCTTCGAGGCGCTTCAATACCACAATCCCCACACCGCTACCAAAAATAGTCCCCTGAGCGCG
CGCATCAAAAGCTCGACAATGACCGTCTGGAGTGACAATCATCCCCTCTTGATACAAATGTCCTACTTTTTGTGGTGCA
TTCACAGAAACCCCACCAGCTAAAACCATGTCACTTTCACCACTCAGTAAGCTGGCACAAGCCATGTGAATTGCTACCA
AGAGATGTAGAGGCAGCGGGTTTGCACATTTACACTCGGGTCAGTCAGGTTGAGTTTGTTAGAATCCGTGTAGTAAATA
ATCTTTATCATTGGCAACCATCACTTGCAAACCGCCCATTGAGTCCATGGTCGCGACTTGCAGATTATCGTTAGCATCA
AGAGTAAAGCGGTTGGGATAAATATTATTCAGTAAGTAGGTATTCATCACCGCACCAGCATAAATCCCAATCGCACCAT
CATAAGTTAGAGGATGTAACCAGCATTTTCTAAGCTTTCCC