UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA – CENA/USP

CAROLINE SOUZA PAMPLONA DA SILVA

Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e

distribuição de genes de produtos naturais

Piracicaba

2006

CAROLINE SOUZA PAMPLONA DA SILVA

Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e

distribuição de genes de produtos naturais

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

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente. Orientadora: Marli de Fátima Fiore

Piracicaba

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E 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

Silva, Caroline Souza Pamplona da

Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais / Caroline Souza Pamplona da Silva; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2006. 93 f. : fig.

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.

Ficocianina 2. Metabólitos secundários 3. Sintases de policetídeos
Sintetases de peptídeos I. Título

CDU 579.25

Aos meus pais, Mariana e Carlos, Pelos ensinamentos que desde cedo guiam meus passos, Pela confiança e companheirismo em todos os momentos, Pela amizade, respeito e carinho, Por todas as oportunidades oferecidas, Por estarmos unidos nesta caminhada, dedico.

À minha irmã, Anne, companheira e amiga alguém que estará sempre a meu lado, com amor, ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação, incentivo, apoio, confiança e acima de tudo, pela amizade,

À Dra. Siu Mui Tsai por todo apoio oferecido,

Ao Dr. Augusto Etchegaray e à Dra. Maria Estela Stenico pelas contribuições indispensáveis,

À Dra. Célia Leite Sant'Anna e Dra. Maria Teresa de Paiva Azevedo por disponibilizarem as linhagens SPC de sua coleção,

Ao Sr. José Elias Gomes pelas sugestões, idéias e atenção,

Aos amigos: Adriana Lorenzi, Ana Luisa Fortes, Daniele Del Rio, Diego Genuário, Edenilson Rabelo, Fabiana Cannavan, Karla Nishiyama, Ricardo Honda e Tânia Shishido pelas contribuições, carinho e agradável convívio,

Aos amigos e colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular: Adriane Nunes, Camila Patreze, Cristina Martini, Chico Montrazi, Diego Bisson, Fábio Duarte, Flávia Capaldi, Jeanedy Pazinato, Juliana Martinati, Vandelei Stefanuto e Wagner Piccinini pelo companheirismo, apoio e momentos divertidos e agradáveis proporcionados ao longo desse período,

Às amigas: Érica Monte Sião, Luciana Fedatto, Marta Porciuncula, Melina Paludeto, Flávia Marques, Joana Maluf, Thaisa Migliatto e Renata Babin pelas lições de vida advindas do convívio longe de casa,

Aos amigos: Maria Luisa Figueiredo, Adélia Bernardes, Luciana Chaves, Carolina Paliotto, Lia Baltieri, Adrielle Belardi, Thiaguinho Saciloto, Gustavo Rocha, Gustavo Giusti, Denílson Zuim, Juliana Boaretto, Juliana e Marcelo Guarnieri, pela AMIZADE,

À Maria Augusta, Sophia e Rafael pela alegria que irradiam através do brilho de seus olhos,

À FAPESP pelos recursos financeiros concedidos,

À CAPES pela bolsa de estudo,

À Deus, pela força e luz que me acompanham em todos os momentos.

RESUMO

SILVA, C.S.P. **Caracterização molecular de cianobactérias brasileiras e distribuição de genes de produtos naturais**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2006.

O espaço intergênico (IGS) juntamente com suas subunidades flanqueadoras (cpcB) e (cpcA) do operon do ficocianina foi usado para identificar linhagens de cianobactérias. Dentro do domínio Bacteria somente as cianobactérias possuem o operon da ficocianina e a região cpcBA-IGS é suficientemente variável para diferenciar linhagens desses microrganismos. No presente estudo 25 linhagens de cianobactérias isoladas de diversos locais brasileiros foram caracterizadas usando a sequência cpcBA-IGS. DNA genômico foi extraído das ordens Chroococcales (oito linhagens), Oscillatoriales (duas linhagens), Nostocales (onze linhagens) e Stigonematales (quatro linhagens). Os oligonucleotídeos iniciadores $PC\beta F/PC\alpha R$, específicos para a seqüência cpcBA-IGS, foram usados para amplificar fragmentos de DNA de aproximadamente 685 pb. Os produtos da PCR foram clonados, seqüenciados e as seqüências foram comparadas pela análise BLAST. Todas as seqüências de Microcystis e também as seqüências de Radiocystis fernadoi SPC736, Planktothrix mougeotii SPC788, Geitlerinema splendidum SPC923, Microchaete investiens CENA64 e Gloeotrichia UFV-B2 mostraram identidades com seqüências do GenBank. Entretanto, nenhuma identidade foi encontrada para as sequências restantes. As relações filogenéticas das sequências de cpcBA-IGS foram investigadas junto com outras seqüências de cianobactéria do Genbank usando a análise "Neighbour Joining". A topologia da árvore foi congruente com outras árvores de cianobactérias, com exceção de todas as següências sem identidades no GenBank, as quais formaram um agrupamento separado. Os dados das seqüências de cpcBA-IGS analisadas confirmam que as cianobactéria heterocitadas formam um grupo monofilético.

Estudos anteriores realizados com linhagens de cianobactéria mostraram que estes microrganismos são uma fonte rica de produtos naturais. No presente estudo conduzido com 59 linhagens de cianobactérias, sendo a maioria isolada de ambientes brasileiros, isto foi confirmado. Para alcançar esse objetivo, dois conjuntos de iniciadores degenerados foram usados para produzir seqüências amplificadas por PCR das sintetases de peptídeos nãoribossômicos (NRPSs), e de sintases policetídeos (PKSs) modulares, as quais são enzimas multifuncionais envolvidas na produção de produtos naturais. O sistema híbrido NRPS/PKS também foi amplificado por PCR usando uma combinação de iniciadores de NRPS e de PKS. Essa abordagem molecular mostrou a presença de genes de NRPS e de PKS em 93% e 81% linhagens de cianobactérias, respectivamente. Genes de NRPS/PKS foram encontrados em 87% das cianobactérias examinadas. Numa tentativa de atribuir funções a oito fragmentos de PKS identificados por PCR, estas següências foram clonadas, següenciadas e analisadas filogeneticamente. As sequências de PKSs da Microcystis aeruginosa NPCD1 e Fischerella CENA62 mostraram correlação com a síntese de sideróforo e de microcistina, respectivamente. Todas as 59 linhagens foram analisadas para a produção do microcistinas e 20 linhagens apresentaram resultados positivos. Para a maioria das linhagens potencialmente produtoras de microcistinas os produtos de PCR esperados de NRPS, PKS e NRPS/PKS foram amplificados. A produção de sideróforos foi testada em 28 linhagens e somente cinco produziram resultados positivos. Em três linhagens produtoras de sideróforos todos os três sistemas moleculares analisados estavam presentes. Estes resultados serão altamente valiosos na exploração futura de cada peptídeo dessas cianobactérias e para a elucidação da bioatividade de tais produtos naturais.

Palavras-chave: Ficocianina, Metabólitos secundários, Sintases de policetídeos, Sintetases de peptídeos.

ABSTRACT

SILVA, C.S.P. Molecular characterization of Brazilian cyanobacteria and distribution of natural products genes. 2006. 93f. Dissertation (Master of Science). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2006.

The intergenic spacer (IGS) together with its flanking subunits β (*cpcB*) and α (*cpcA*) of the phycocyanin operon has been used to identify cyanobacterial strains. Within the Bacteria domain only cyanobacteria present phycocyanin operon and the cpcBA-IGS region is variable enough to differentiate strains of these microorganisms. In the present study 25 cyanobacterial strains isolated from several Brazilian locations were characterized using the cpcBA-IGS sequence. Genomic DNA was extracted from the orders Chroococcales (eight strains), Oscillatoriales (two strains), Nostocales (eleven strains) and Stigonematales (four strains). The primers PC β F/PC α R targeting the cpcBA-IGS sequence were used to amplify DNA fragments of approximately 685 bp. The PCR products were cloned, sequenced and the sequences were compared by BLAST analysis. All Microcystis sequences and also sequences from Radiocystis fernadoi SPC736, Planktothrix mougeotii SPC788, Geitlerinema splendidum SPC923, Microchaete investiens CENA64 and Gloeotrichia UFV-B2 showed identities with sequences from GenBank. However, no identities were found for the remaining sequences. Phylogenetic relationships of the *cpcBA*-IGS sequences were investigated together with other cyanobacterial sequences from Genbank using the Neighbour Joining analysis. The tree topology was congruent with previous cyanobacterial trees, except for all sequences with no identities in the GenBank, which formed a separated cluster. The cpcBA-IGS sequences analysis data confirm that heterocyte-forming cyanobacteria are a monophyletic group.

Previous studies carried out with cyanobacterial strains showed that these microorganisms are a rich source of natural products. This has been confirmed in the present study conducted with 59 cyanobacterial strains, with the majority of them isolated from Brazilian environment. To reach this goal, two sets of degenerate primers were used to generate PCR amplification sequences of nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) and modular polyketide synthases (PKSs), which are multifunctional enzymes implicated in natural products production. Also, NRPS/PKS hybrid system was PCR amplified by using a combination of NRPS and PKS primers. This molecular approach revealed the presence of NRPS and PKS genes in 93% and 81% cyanobacterial strains, respectively. NRPS/PKS genes were found in 87% of cyanobacteria examined. In an attempt to attribute functions to eight PCR identified PKS fragments, these sequences were cloned, sequenced and phylogenetically analyzed. PKSs sequences of Microcystis aeruginosa NPCD1 and Fischerella CENA62 showed correlation with the synthesis of siderophore and microcystin, respectively. All 59 strains were analyzed for microcystin production and 20 strains presented positive results. For the majority of potentially producing-microcystin strains expected PCR products of NRPS, PKS and NRPS/PKS were amplified. The siderophores production was tested in 28 strains and only five gave positive results. In three producing-siderophore strains all three molecular systems analyzed were present. These results will be highly valuable for further exploring each of these cyanobacterial peptides and for elucidating the bioactivity of such natural products.

Keywords: Phycocyanin, Secondary Metabolites, Polyketide Synthase, Peptide Synthetase.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Características gerais das cianobactérias	14
2.2 Sistemática de cianobactérias	16
2.3 Sistemática molecular de cianobactérias	19
2.4 Produtos naturais produzidos por cianobactérias	
2.4.1 Biossíntese de sintetases de peptídeos não-ribossômicos (NRPS)	23
2.4.2 Biossíntese de sintases de policetídeos (PKSs)	
2.4.3 Sistemas enzimáticos integrados	27
2.4.4 Genes de NRPS e PKS em cianobactérias	
2.5 Microcistinas	
2.6 Sideróforos.	
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Caracterização molecular usando a sequência <i>cpc</i> BA-IGS	
3.1.1 Culturas de cianobactérias	
3.1.2 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias	
3.1.3 Amplificação da região <i>cpc</i> BA-IGS	
3.1.4 Clonagem	40
3.1.5 Transformação	40
3.1.6 PCR usando colônias	41
3.1.7 Extração de DNA plasmidial	41
3.1.8 Seqüenciamento	42

3.1.9 Processamento e análise filogenética das seqüências	43
3.2 Distribuição de genes de NRPS, PKS e sistemas híbridos	
em cianobactérias brasileiras	43
3.2.1 Culturas de cianobactérias e extração de DNA genômico	43
3.2.2 Amplificação de sequências conservadas de NRPSs	44
3.2.3 Amplificação de sequências conservadas de PKSs	47
3.2.4 Sitemas enzimáticos integrados (NRPS/PKS)	47
3.2.5 Seqüenciamento dos fragmento de PKS	48
3.3 Produção de microcistinas	49
3.4 Produção de sideróforos	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias	51
4.2 Caracterização molecular usando a seqüência cpcBA-IGS	51
4.3 Distribuição de genes de NRPS, PKS e sistemas híbridos em	
cianobactérias brasileiras	57
4.3.1 Amplificação por PCR de seqüências de NRPS, PKS e NRPS/PKS	64
4.3.2 Seqüenciamento de PKSs	64
4.4 Produção de microcistinas	69
4.5 Produção de sideróforos	70
5 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias têm um amplo e variado impacto dentro dos ecossistemas naturais e podem atuar causando efeitos benéficos ou nocivos à saúde dos seres humanos e animais. Alguns desses organismos oxigênicos fotoautotrófos são importantes produtores primários de nitrogênio combinado (HASELKORN; BUIKEMA, 1992) e algumas espécies possuem alto valor nutricional (DILLON; PHUC; DUBACQ, 1995). Algumas também são de importância econômica (PATTERSON, 1996). Elas colonizam ambientes dulcícula, marinho e terrestre. Dependendo do gênero ou espécie elas podem florescer em sistemas de água doce e marinho de fontes frias e termais e em ambientes onde eucariotos fototróficos não existem (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). A diversidade de cianobactéria é também refletida pela ampla variedade de aspectos estruturais e funcionais de sua morfologia celular e por variações em suas estratégias metabólicas (CARR; WHITTON, 1973; CASTENHOLZ; WATERBURY, 1988). O clima tropical do Brasil favorece o crescimento de cianobactérias e a diversidade destes organismos em tais condições é notável.

Apesar dos avanços alcançados na taxonomia de microrganismos devido à utilização de métodos bioquímicos e moleculares, a condição taxonômica das cianobactérias é ainda bastante problemática. Isto é resultado do vasto arranjo de gêneros e espécies (mais de 2.000) que foram tradicionalmente descritos baseando-se em atributos morfológicos de amostras de campo e da dificuldade de relacionar estes organismos com os mantidos vivos em cultura pura em laboratório. Embora técnicas moleculares para classificação de cianobactérias estejam sendo aplicadas, os dados disponíveis ainda são bastante fragmentados para detectar características cruciais de todos os gêneros e/ou espécies. Para os isolados brasileiros esses dados são ainda mais escassos.

Em adição a sua importância ecológica, as cianobactérias têm sido identificadas como um dos grupos de organismos mais promissores para o isolamento de novos produtos naturais bioquimicamente ativos com potencial de aplicação biotecnológica. Como estratégia de defesa para sobreviverem em ambientes altamente competitivos, as cianobactérias produzem uma diversidade grande de compostos altamente tóxicos afetando numerosos alvos envolvidos em processos de sinalização em células eucarióticas. Investigações conduzidas durante as duas últimas décadas identificaram mais de 600 metabólitos (WELKER; VON DÖHREN, 2006). Apesar da descoberta desses inúmeros compostos, os estudos desses produtos naturais, sua aplicação e sua produção controlada a longo prazo, estão ainda na sua infância.

Muitos desses compostos bioativos isolados de cianobactéria possuem aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos assim como funcionalidade derivada de policetídeos, o que mostra que suas prováveis biossínteses envolvem as enzimas multifuncionais sintetases de peptídeos não-ribossômicos (NRPSs) e sintases de policetídeos (PKSs). As NRPSs estão envolvidas na produção de importantes drogas tais como as penicilinas, vancomicinas e ciclosporinas (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). Os PKSs modulares, os quais estão proximamente relacionados com as NRPSs, são descritos na biossíntese de antibióticos produzidos por actinomicetos (eritromicinas) (KATZ, 1997). Outros peptídeos não-ribossômicos de importância médica (mixotiazóis, epotilones e bleomicinas) são produzidos pelo trabalho cooperativo das NRPSs e PKSs (DU; SANCHEZ; SHEN, 2001). Em cianobactérias, essas duas enzimas estão envolvidas com a biossíntese de microcistinas, barbamida, nodularina, nostopeptolida A, fischerilina A (CHANG et al., 2002; ETCHEGARAY et al., 2004a; HOFFMANN et al., 2003; MOFFITT; NEILAN, 2004; TILLETT et al., 2000).

Em muitos agrupamentos de genes de NRPS a ordem das atividades codificadas é colinear com a estrutura do produto e o número de módulos é o mesmo que o número de resíduos do peptídeo final (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997). Conseqüentemente, é possível deduzir a composição dos peptídeos pela análise das seqüências dos genes de NRPS e/ou PKS. Dessa forma, várias estratégias têm sido descritas para amplificação de fragmentos de genes de NRPS e PKS usando oligonucleotídeos degenerados iniciadores de PCR (CHRISTIANSEN et al., 2001; DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001). A aplicação dessa abordagem molecular aumenta significantemente a chance de identificar metabólitos novos cuja produção é dependente de genes correspondentes (BODE; MÜLLER, 2005).

Neste estudo foram seqüenciados fragmentos dos genes *cpc*B, *cpc*A e seu espaço intergênico, visando a caracterização molecular e o aumento da disponibilidade de informações de seqüência de *cpc*BA-IGS de cianobactérias brasileiras. Técnicas moleculares e análises filogenéticas foram usadas para conhecer a distribuição de genes de NRPS e PKS em cianobactérias isoladas de diferentes ambientes brasileiros. Finalmente, para correlacionar a presença de genes de NPRS e PKS com a síntese de produtos naturais, testes bioquímicos foram realizados para detectar a presença de microcistinas e sideróforos nos extratos celulares e sobrenadantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais das cianobactérias

As cianobactérias compreendem um dos maiores, mais diverso ecologicamente, bem sucedido e importante grupo de bactérias na Terra (WILMOTTE, 1994). Elas constituem um grupo filogeneticamente coerente de microrganismos capaz de realizar fotossíntese com liberação de oxigênio, tendo como modo nutricional dominante o autotrófico (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Sua natureza é tipicamente fotossintética aeróbica, mas algumas espécies são heterotróficos facultativos, crescem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). Outras espécies em condições anaeróbicas utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986).

Algumas espécies de cianobactérias possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico contribuindo para a fertilidade dos solos e águas (RAI, 1990). Essa propriedade está associada à presença de células modificadas chamadas heterocitos, as quais contêm a enzima nitrogenase que fixa o N₂ do ar atmosférico e o transforma em amônia (STEWART, 1973). Elas desempenham importante papel no ciclo do carbono, oxigênio e nitrogênio e tem significância evolutiva em relação às plantas (CARR; WHITTON, 1973; FOGG et al., 1973).

As cianobactérias apresentam uma grande variedade de formas e arranjos, podem apresentar-se como cocos unicelulares, bacilos, podem ser filamentosas e filamentosas ramificadas multicelulares (WHITTON; POTTS, 2000). Não possuem flagelos, mas as espécies filamentosas geralmente possuem movimento deslizante e podem migrar através de superfícies úmidas. Apesar de serem organismos de dimensões microscópicas, o tamanho de suas células varia entre 1 a 100µm, podendo, muitas vezes, serem visualizados a olho nu nos

locais de ocorrência, pois formam densos tapetes ou mantos contendo também algumas outras espécies microbianas (BROCK, 1973).

As cianobactérias têm uma longa história evolutiva na face da Terra. Evidências paleontológicas, geológicas e geoquímicas isotópicas indicam que esses organismos já existiam há aproximadamente 3500 milhões de anos (SCHOPF, 1996). Esses microrganismos foram provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva. A longa história evolutiva das cianobactérias é tida como a razão de sua abundante ocorrência nos mais diversos tipos de habitat modernos (SCHOPF, 1994). A grande diversidade metabólica das cianobactérias propiciou a sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também favoreceu a sua colonização nos ambientes atuais. Esses microrganismos são encontrados em todos os tipos de ecossistemas bem iluminados (exceto em ambientes com pH muito baixo), inclusive em ambientes extremos, como areia e rochas desérticas, águas termais ("hot springs") e lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1973; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). Entretanto, ambientes de águas doce são os mais propícios para o crescimento de cianobactérias, pois a maioria das espécies se desenvolve melhor em águas neutro-alcalinas (pH 6-9), temperatura em torno de 25°C, alta concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999; RIPPKA, 1988). As cianobactérias juntamente com as algas eucarióticas compreendem a maior parte da biomassa do mundo (CANNEL, 1993; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977).

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

2.2 Sistemática de cianobactérias

A sistemática de cianobactérias tem sido notavelmente tumultuada. A primeira identificação de cianobactérias foi feita por Ehrenberg em 1838 e o ponto de partida para a descrição taxonômica iniciou-se com Thuret (1875), sendo que Bornet e Flahault (1886a,b, 1887, 1888) e Gomont (1892) escreveram as primeiras monografias taxonômicas das cianobactérias. Eles descreveram as cianobactérias como um grupo especial de algas, as algas verdes azuladas, e as trataram de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

Exatamente quarenta anos depois da publicação das primeiras monografias taxonômicas, Geitler (1932) compilou todas as informações geradas durante este período em um compreensivo sistema para classificação de cianobactérias. Esse sistema reconheceu aproximadamente 1300 espécies, 145 gêneros, 20 famílias e 3 ordens. Sistemas semelhantes foram propostos subseqüentemente (BOURRELLY, 1970; DESIKACHARY, 1959, 1973; ELENKIN, 1936, 1938, 1949; FRITSCH, 1945; HOLLERBACH; KOSINSKAJ; POLJANSKIJ, 1953; KONDRATEVA, 1968; STARMACH, 1966). Esses sistemas compartilham o mesmo ponto de vista de que a sistemática de cianobactérias deve ser baseada em critérios botânicos tradicionais e se tornaram conhecidos como o sistema "Geitlerian". Esses sistemas baseados na morfologia normalmente utilizavam diferentes números de caracteres para separar grupos relacionados, mas em muitos casos só um caractere era usado. Como resultado muitas espécies foram descritas baseadas em um único critério.

Um sistema completamente diferente para classificar as cianobactérias foi desenvolvido no período de 1951-1981 (DROUET 1968, 1973, 1978, 1981; DROUET; DAILY, 1956). O "sistema Drouet" resultou em uma redução enorme no número de gêneros e espécie de cianobactérias. Mais de 2000 espécies dentro de mais de 140 gêneros foram eventualmente reduzidas para 62 espécies dentro de 24 gêneros. Esse sistema se baseou na hipótese de que a maioria das espécies de cianobactérias era na realidade "ecophenes" (mesmo genótipo mostrando diferenças fenotípicas devido aos estímulos ambientais) morfologicamente variáveis ou um número pequeno de táxons geneticamente homólogos. Embora nenhuma grande crítica do "sistema de Drouet" tenha sido publicada, estudos de hibridação de DNA/DNA e composição de bases de DNA (STAM; HOLLEMAN, 1979) mostraram a natureza insatisfatória desse sistema, o qual conseqüentemente caiu em desuso.

Uma terceira abordagem taxonômica foi introduzida por R. Y. Stanier e seus colaboradores no início dos anos 70. O "sistema Stanierian" reconhece as cianobactérias como um grupo de bactérias baseando-se em estudos ultraestruturais, bioquímicos e moleculares (BONEN; DOOLITTLE, 1978; STANIER et al., 1971; STANEIR, 1977; WOESE et al., 1975) e de acordo com as primeiras observações realizadas por Cohn (1853). Nesse sistema, uma estratégia semelhante à usada para lidar com outros grupos importantes de bactérias é utilizada para as cianobactérias. O sistema é baseado somente em culturas axênicas e além de utilizar as características morfológicas como na maioria dos outros sistemas, usa também características bioquímicas e fisiológicas (RIPPKA et al., 1979, RIPPKA; WATERBURY; STANIER, 1981; STANIER et al., 1971; WATERBURY; STANIER, 1978). Esses investigadores, enfatizando técnicas microbiológicas, desenvolveram uma taxonomia provisória com uma abordagem bacteriológica em lugar da botânica (HERDMAN et al., 1979; HERDMAN; RIPPKA; STANIER, 1979; RIPPKA et al., 1979; RIPPKA; COHEN-BAZIRE, 1983; RIPPKA, 1988; RIPPKA; HERDMAN, 1992). O sistema

"Stanierian", que ainda é baseado largamente na morfologia, foi incluído com algumas modificações no Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática em 1989, uma autoridade reconhecida em sistemática bacteriana (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001; STALEY et al., 1989). Na sistemática atual, *Cyanobacteria* é um importante Filo dentro do domínio *Bacteria* (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001). A classificação das cianobactérias segundo o Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática está apresentada na Tabela 1.

	Ordem	Gêneros
Subseção I	Chroococcales	Chamaesiphon, Chroococcus, Cyanobacterium,
		Cyanobium, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeobacter,
		Gloeocapsa, Gloeothece, Microcystis, Prochlorococcus,
		Prochloron, Synechococcus, Synechocystis
Subseção II	Pleurocapsales	
	subgrupo I	Cyanocystis, Dermocarpella, Stanieria, Xenococcus
	subgrupoII	Chroococcidiopsis, Myxosarcina, Pleurocapsa, Hyella,
		Solentia
Subseção III	Oscillatoriales	Arthrospira, Borzia, Crinalium, Geitlerinema, Leptolyngbya,
		Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Planktothrix,
		Prochlorothrix, Pseudanabaena, Spirulina, Starria, Symploca,
		Trichodesmium, Tychonema
Subseção IV	Nostocales	
	subgrupo I	Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyanospira,
	• •	Cylindrospermopsis, Cylindrospermum, Nodularia, Nostoc,
		Scytonema
	subgrupo II	Calothrix, Rivularia, Tolypothrix
Subseção V	Stigonematales	Chlorogloeopsis, Fischerella, Geitleria, Iyengariella,
		Nostochopsis, Stigonema

Tabela 1. Classificação das cianobactérias (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001).

A possibilidade de ter o mesmo organismo descrito sob dois nomes diferentes dentro do Código Bacteriano e Botânico criaria o caos. Assim, concessões e adaptações mútuas dos dois códigos têm assegurado que as espécies descritas sob um sistema sejam reconhecidas pelo outro. Em um esforço para conciliar as diferenças entre esses sistemas, uma quarta abordagem foi desenvolvida por K. Anagnostidis e J. Komárek (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1985, 1988, 1990; KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1986, 1989, 1999). Esse sistema é baseado principalmente em critérios taxonômicos botânicos por razões históricas, mas ele utiliza também informações obtidas de considerações bacteriológicas usando sempre que possível culturas puras. Os autores fizeram uma extensa revisão de literatura e tentam integrar todos os caracteres bioquímicos, ultraestruturais e moleculares disponíveis com suas consideráveis experiências taxonômicas. Porém, tem sido difícil definir relações taxonômicas ou filogenéticas dentro do grupo das cianobactérias devido à escassez de características distintas e consistentes que sustentem um esquema taxonômico. Além disso, relativamente poucas espécies são mantidas em condições de culturas axênicas, o que é necessário para detectar características cruciais para fazer inferências baseadas na taxonomia atual (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Os dados moleculares disponíveis para as cianobactérias são também ainda muito restritos.

2.3 Sistemática molecular de cianobactérias

Atualmente é de consenso geral que abordagens moleculares devem ser aplicadas na tentativa de solucionar o problema da sistemática de cianobactérias (TURNER, 1997; WILMOTTE, 1994). Vários métodos moleculares usados para inferir relações filogenéticas dentro das cianobactérias foram revisados por Wilmotte (1994). Na Tabela 2 são apresentados os métodos que têm sido utilizados com mais freqüência para classificar cianobactérias.

A sistemática molecular utiliza marcadores genéticos para fazer inferência sobre processos de população e filogênia e ao fazer isso cria uma base de dados comparativa significativa para genes ou proteínas específicas. O desenvolvimento da sistemática molecular tem auxiliado nas situações onde a variação morfológica é limitada ou onde a homologia das características morfológicas não é clara. As abordagens morfológicas e as moleculares apresentam vantagens e desvantagens distintas (WILMOTTE, 1994). Em geral, estudos que incorporam os dados moleculares e morfológicos fornecem descrições e interpretações de diversidade biológica melhores que aqueles que enfocam somente uma abordagem.

Tabela 2 - Métodos moleculares usados para classificar cianobactérias.

Método ^a	Princípio do método	Diferenciação	Referência
Hibridização DNA-DNA	DNA genômico purificado é hibridizado com DNA marcado da linhagem tipo e a eficiência da hibridização é comparada com os resultados da hibridização de DNA idêntico. Ou a taxa de renaturação é opticamente determinada sem marcação.	De gênero ao nível de subespécie	Kondo et al., 2000; Lachance, 1981; Stam; Stulp, 1988; Wilmotte; Stam, 1984.
RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição)	DNA genômico digerido com enzimas de restrição é usado para produzir fragmentos de comprimentos diferentes, os quais são separados em gel de agarose. Enzimas raras ou hibridização com sondas marcadas são usadas para diminuir o grande número de fragmentos. Os padrões dos fragmentos obtidos podem ser comparados numericamente.	De espécie ao nível de linhagem	Asayama et al., 1996; Lehtimäki et al., 2000; Mazel, 1990.
Amplificação de DNA (AFLP, ARDRA, REP-PCR, RAPD)	Amplificação de DNA por PCR produz fragmentos que formam um padrão diretamente ou combinado com digestão com enzimas de restrição.	De espécie ao nível de linhagem	Lyra et al., 1997, 2001; Neilan; Jacobs e Goodman, 1995; Satish et al., 2001.
Seqüenciamento do gene RNAr 16S	PCR e seqüenciamento	De família ao nível de subespécie	Fiore et al., 2005; Giovannoni et al., 1988; Gugger et al., 2002; Lehtimäki et al., 2000.
Seqüenciamento de outros genes: <i>rbc</i> LX, <i>rpo</i> C1, <i>rpo</i> B	PCR e seqüenciamento	De família ao nível de linhagem	Gugger et al., 2002; Toledo e Palenik, 1997.
Seqüenciamento da região ITS (espaço interno transcrito entre o DNAr 16S e o DNAr 23S	PCR, separação ou clonagem dos produtos e seqüenciamento	De família ao nível de linhagem	Gugger et al., 2002; Laamanen et al., 2001; Orcutt et al., 2002.
Seqüenciamento da região <i>cpc</i> BA-IGS espaço intergênico do operon da ficocianina	PCR e seqüenciamento	De família ao nível de linhagem	Barker et al., 1999; Laamanen et al., 2001; Neilan; Jacobs e Goodman, 1995; Tillet; Parker; Neilan, 2001.

^a AFLP = polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados; ARDRA = análise de restrição de DNA ribossômico amplificado; REP-PCR = seqüências repetitivas extragênicas palindrômicas; RAPD = DNA polimórfico amplificado ao acaso

Em estudos filogenéticos, é útil examinar seqüências que evoluiram em diferentes níveis para solucionar diferentes partes da filogenia. Uma das seqüências de DNA que têm sido utilizadas para análises filogenéticas de cianobactérias e avaliação da estrutura de comunidades é a do espaço intergênico do operon da ficocianina que se encontra entre os genes *cpc*B e *cpc*A (*cpc*BA-IGS) (BERGSLAND; HASELKORN, 1991; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995; PALENIK, 1992). Essa seqüência é utilizada como alternativa ao gene de RNAr 16S, o qual em alguns casos apresenta variações insuficientes em suas seqüências para separar espécies próximas relacionadas. Entretanto, os dados de seqüências disponíveis para esse gene ainda são limitados, quando comparados aos de seqüências de RNAr 16S depositada em bancos de dados.

O aparato fotossintético das cianobactérias possui Chl *a*, ficobiliproteínas e vários carotenóides como pigmentos da antena coletora de luz (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). O principal pigmento da antena coletora de luz são as ficobiliproteínas que são organizadas em uma estrutura chamada ficobilissomas, as quais, por sua vez, são compostas de ficoeritrina (um pigmento vermelho que está ausente em algumas cianobactérias), ficocianina (PC – um pigmento azul), aloficocianina e aloficocianina B (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977). Dentro do domínio *Bacteria*, os genes codificadores de PC são encontrados em ambientes de água doce exclusivamente em cianobactérias (BRYANT, 1982; ERNEST, 1991; GLAZER, 1989). Alguns outros organismos do domínio *Eukarya*, tais como algas vermelhas (rodófita) e criptófita também possuem esses genes de PC (APT et al., 1995). O operon PC possui uma região de espaço intergênico (IGS) entre os dois genes, *cpc*B e *cpc*A (Figura 1), que é relativamente grande, se comparada com outras existentes nos genes do pigmento fotossintético de cianobactérias, que apresenta variações suficientes na seqüência que permitem identificar diferentes linhagens de cianobactérias (BOLCH et al., 1996;

NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). Todas essas características do *cpc*BA-IGS propiciam uma maneira rápida e direta para a detecção de cianobactérias.



Figura 1. Operon da ficocianina

2.4 Produtos naturais produzidos por cianobactérias

Assim como fungos filamentosos, leveduras, outras bactérias e plantas as cianobactérias são produtoras de metabólitos secundários, os quais podem ser compostos com atividade biológica que contribuem para a competição entre os organismos e que não são necessários para o seu metabolismo primário, tais como, divisão celular ou metabolismo. As cianobactérias constituem um grupo promissor de organismos dos quais pode-se isolar produtos naturais bioquimicamente ativos (BURJA et al., 2001). Elas são consideradas uma fonte notável de metabólitos secundários ainda pouco explorada. Nas últimas duas décadas foram isolados e caracterizados inúmeros compostos bioativos pertencentes às diversas classes de substâncias, entre eles, inibidores enzimáticos, herbicidas, antimicóticos, inibidores de apetite, antimaláricos e imunossupressores (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et.al., 2004a; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996). Diversas hepatotoxinas (microcistinas, nodularina, cilindrospermopsinas) e neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a, anatoxina-a (S)) produzidas por cianobactérias também são sintetizadas por meio do

metabolismo secundário (SIVONEN; JONES, 1999). A Tabela 3 apresenta as principais classes de peptídeos de cianobactérias com base na estrutura molecular.

|--|

Classes	Sinônimos	Origem	Variantes
Aeruginosinas	microcina, espumigina	Microcystis, Planktothrix, Nodularia	27
Microgininas	cianostatina, oscilaginina, nostoginina	Microcystis, Planktothrix, Nostoc	38
Anabaenopeptinas	oscilamida, ácido ferintóico, nodulapeptina, plectamida, schizopeptina	Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis, Planktothrix, Plectonema, Nodularia, Schizothrix	32
Cianopeptolinas	aeruginopeptina, anabaenopeptilida, hofmannolina, microcistilida, micropeptina, nostociclina, nostopeptina, oscilapeptilida, oscilapeptina, planktopeptina, sciptolina, somamida, simplostatina, tasipeptina	Anabaena, Lyngbya, Microcystis, Planktothrix, Scytonema, Symploca	82
Microcistinas	nodularina	Anabaena, Hapalosiphon, Microcystis, Nodularia, Nostoc, Planktothrix	89
Microviridinas		Microcystis, Planktothrix, Nostoc	10
Ciclamidas	aaniasciclamida, dendroamida, microciclamida, nostociclamida, raociclamida, tenueciclamida, ulongamida, westielamida	Lyngbya, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Stigonema, Westelliopsis	21

A maior parte dos metabólitos secundários é um peptídeo ou possui subestrutura peptídica. A maioria desses oligopeptídeos supõe-se ser sintetizada pelas sintetases de peptídeos não-ribossômicos (NRPSs), sintases de policetídeos (PKSs) e/ou sistemas híbridos de NRPS/PKS (WELKER; VON DÖHREN, 2006).

2.4.1 Biossíntese de peptídeos não-ribossômicos

Na síntese ribossômica de peptídeo, a formação das ligações peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o RNAm funciona como molde determinando a seqüência do aminoácido do produto. O número de aminoácidos incorporados naturalmente nos peptídeos ribossômicos está restrito a 20, codificados pelos códons de RNAm. Na síntese não ribossômica de peptídeos, proteínas modulares com múltiplas atividades catalizam o agrupamento dos peptídeos e simultaneamente servem como molde. A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não-protéicos, hidroxiácidos e substâncias

policetídicas, especialmente elaboradas para serem incorporados na estrutura destes peptídeos. Mais de 300 precursores diretos são conhecidos (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996). No processo biossintético eles podem ser modificados de várias maneiras pelos domínios integrados ou pelas funções codificadas por genes separados, o que propicia uma diversidade enorme de peptídeos lineares ou cíclicos. O tamanho desses peptídeos varia de 2 a 48 aminoácidos (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996) em contraste com os peptídeos ribossômicos, os quais podem consistir de mais de 3000 resíduos de aminoácidos.

A biossíntese de metabólitos secundários envolve uma integração entre atividades enzimáticas, fusão de genes e formação de proteínas complexas (VON DÖHREN, et al., 1997). A estrutura das enzimas envolvidas na biossíntese desses metabólitos é caracterizada por um arranjo modular, encontrando-se de forma correspondente, blocos de seqüências repetitivas nos genes que as codificam (ETCHEGARAY, 1998, ETCHEGARAY et al., 2004b; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997).

As NRPSs funcionam como uma linha de montagem industrial, onde os aminoácidos que constituem a estrutura do peptídeo são incorporados seqüencialmente, através de uma série de reações enzimáticas parciais e repetitivas. Os módulos em NRPSs estão envolvidos nas etapas de elongamento da estrutura do metabólito, ou seja, na catálise de reações parciais. Assim, para a incorporação de um aminoácido em um peptídeo não-ribossômico, a enzima utiliza um módulo composto por cerca de 1.000 aminoácidos, o qual é subdividido em regiões menores, envolvidas em reações enzimáticas específicas.

Existe uma relação linear entre a seqüência de módulos e as etapas de biossíntese. O primeiro módulo de uma NRPS está envolvido na ativação e incorporação do aminoácido N-terminal e os demais módulos na incorporação dos aminoácidos subseqüentes, obedecendo-se uma colinearidade entre o aminoácido incorporado e o módulo responsável pela sua adição. As reações mínimas de NRPS são adenilação, tioesterificação e condensação

(ETCHEGARAY, 1998; MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997; VON DÖHREN et al., 1997). As regiões envolvidas nestas reações parciais estão localizadas em domínios, ou seja, de adenilação (domínio A), de formação de tioésteres (domínio P) e de condensação (domínio C). O domínio de formação de tioesteres também é conhecido como proteína carreadora de peptídeos (PCP), em analogia a biossíntese de ácidos graxos, onde se tem a proteína carreadora de acilas (ACP) (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997).

Vários outros domínios já foram descritos embora não sejam essenciais para a incorporação de aminoácidos. Entre estes encontram-se os domínios de N-metilação e epimerização onde o domínio de epimerização constitui uma variação do domínio de condensação. O domínio N-metil transferase (NMT ou M) está envolvido na acilação do aminogrupo com um grupamento metila. O domínio de epimerização está envolvido na conversão de L-aminoácidos para a forma D.

Ao término da síntese enzimática de peptídeos o produto é liberado da enzima por meio da atividade de tioesterase, geralmente catalisada pelo domínio de tioesterase (T). O domínio T está comumente inserido no último módulo das NRPSs. O domínio M está usualmente inserido entre o domínio de adenilação e o domínio PCP (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). O domínio C também apresenta algumas variações que estão associadas à transferência de peptídeos intermediários, formados por outras sintetases de um mesmo operon (domínio C), ou na transferência de ácidos graxos ou ácidos aromáticos (ETCHEGARAY et al., 2004b).

Para as sintetases de peptídeos tornarem funcionais elas necessitam sofrer modificação pós-traducional, ocorrendo a incorporação do cofator 4'-fosfopantoteína (PAN) ao domínio PCP através de uma ligação covalente do tipo fosfodiéster ao resíduo de serina (WALSH et al., 1997). Nessa modificação ocorre a transformação de uma apoenzima (inativa) em haloenzima (ativa). A extremidade R-SH do cofator está envolvida na formação de intermediários ativos na forma de tioéster, importantes nas etapas de biossíntese de peptídeos não-ribossômicos, ácidos graxos e de substâncias policetídicas. Enzimas envolvidas na trasferência do cofator PAN chamadas de fosfopantotenil transferases já foram descritas (WALSH et al., 1997) e estão, muitas vezes, associadas ao agrupamento de biossíntese de peptídeos não-ribossômicos.

2.4.2 Biossíntese de policetídeos

A biossíntese de produtos policetídicos é realizada por mecanismos semelhantes aos da biossíntese de ácidos graxos. As sintetases de policetídeos são classificadas de acordo com a semelhança estrutural das sintases de ácidos graxos (FAS). As PKSs modulares são proteínas multifuncionais e são classificadas como tipo I (PKS I) semelhantes ao FAS I de fungos e animais. As PKSs iterativas são complexos de multiproteínas constituindo-se de enzimas individuais que são utilizadas repetidamente, ou seja, de forma iterativa, sendo denominadas tipo II (PKS II), como uma FAS II encontrada em bactérias e plantas (JENKE-KODAMA et al., 2005). As PKSs do tipo III são as mais simples e são tipicamente encontradas em plantas e bactérias (MOFFITT; NEILAN, 2003).

As sintases de policetídeos do tipo I são predominantemente encontradas em cianobactérias, actinobactéria, mixobactéria e pseudomonades (BODE; MÜLLER 2005). As PKSs I, assim como as NRPSs, são enzimas multifuncionais, que apresentam uma estrutura modular, e as regiões envolvidas nas reações parciais que estão localizadas em domínios PKSs modulares, sintetizam a maioria dos produtos policetídicos não-aromáticos. A principal diferença entre NRPSs e PKSs reside no fato de que PKSs condensam ácidos carboxílicos a uma cadeia crescente para formar um produto, ao passo que NRPSs adicionam aminoácidos.

A biossíntese de PKSs ocorre pela ação de, no mínimo, três domínios por módulo. Os domínios responsáveis pelas reações mínimas são: transferase de acila (AT), proteína

carreadora de acila (ACP) e cetossintase (KS). O domínio AT é responsável pela ativação e incorporação da unidade extensora, a qual é então covalentemente ligada ao carreador fosfopantoteína do domínio ACP adjacente. Para que ocorra a condensação, o domínio de cetossintase (KS) captura o grupamento acila do domínio ACP anterior via ataque nucleofílico desse carbônion em relação a acila já existente no domínio e condensa os dois grupamentos (KEATING; WALSH, 1999). Ao término da síntese enzimática de policetídeos o produto é liberado do complexo PKS por meio da atividade de tioesterase, catalisada pelo domínio de tioesterase (T) (DITTMANN; NEILAN; BÖRNER, 2001).

Vários outros domínios já foram descritos embora não sejam essenciais para a incorporação de ácidos caboxílicos. Entre os domínios adicionais estão: cetoredutase (KR), orto-metil-transferase (O-MT) para O-metilação, desidratase (DH), enoil redutase (ER), acil Coa ligase (AL), amino transferase (AMT) e metiltransferase (MT) (DU; SÁNCHEZ, SHEN, 2001; JENKE-KODAMA et. al., 2005). Acetato e malonato são utilizados pelas PKSs como iniciadores de cadeia, assim como propionato, butirato, benzoato, cinamato e aminoácidos também podem ser iniciadores de cadeia. Malonato, metilmalonato e etilmalonato são utilizados como unidades de elongação, contribuindo assim para a diversidade de compostos produzidos por essas enzimas (SIMPSON, 1995).

2.4.3 Sistemas enzimáticos integrados

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

Em alguns sistemas híbridos foi detectado um grupo de multienzimas complexas que apresentam um módulo de PKS e de NRPS em um mesmo ORF ("Open Reading Frame" - quadro aberto de leitura) (DITTMANN et al., 1999; SILAKOWSKI et al., 1999). Entretanto, até o momento poucos agrupamentos gênicos codificadores de híbridos de NRPS/PKS são conhecidos (Tabela 4).

2.4.4 Genes de NRPS e PKS em cianobactérias

A grande diversidade de metabólitos secundários de cianobactérias e de suas estruturas químicas indica a presença de diversos agrupamentos de genes NRPS e PKS nos genomas desses organismos, sendo que somente uma parte muito pequena já foi seqüenciada. Uma peculiaridade da biossíntese de metabólitos secundários é a freqüente mistura de genes de NRPS e PKS, quase sempre dentro de um único ORF.

Uma abordagem para estimar o potencial de biossíntese de metabólitos secundários nos táxons de cianobactérias é a detecção de genes de NPRS e PKS usando oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados. A aplicação dessa abordagem permitiu constatar a presença de genes de NRPS em 75% de 146 linhagens de culturas axênicas de cianobactérias, com representantes de todas as subseções (CHRISTIANSEN et al., 2001). Entretanto, não foram identificados genes homólogos em vários gêneros, principalmente dentro da ordem Chroococcales (em linhagens de *Cyanothece, Gloeobacter, Synechococcus* e *Synechocystis*). Numa análise similar conduzida em comunidades de estromatólitos, diversos fragmentos de genes de PKS foram identificados (BURNS et al., 2005). Genes de NRPS foram identificados em uma linhagem simbiótica de *Prochloron* que não pôde ser cultivada (SCHMIDT et al., 2005). Esse fato indica que alguns metabólitos que têm sido atribuídos ao hospedeiro podem estar sendo de fato produzidos pelo simbionte.

		Atividade	N° de genes		N° de genes		N° de genes N° de genes híbridos	
Produto	Produtor	biológica	NRPS	PKS	NRPS/PKS	Referência		
Barbamida	Lyngbya majuscula 19L	moluscicida	4	0	1	Chang et al., 2002		
Microcistina	Microcystis aeruginosa PCC7806	toxina	3	1	2	Tillet et al., 2000		
Microcistina	Microcystis aeruginosa K-139	toxina	3	1	2	Nishizawa et al., 2000		
Microcistina	Planktothrix agardhii CYA126	toxina	3	1	2	Christiansen et al., 2003		
Microcistina	Anabaena 90	toxina	3	1	2	Rouhiainen et al., 2004		
Nodularina	Nodularia spumigena NSOR10	toxina	2	1	2	Moffitt e Neilan, 2004		
Nostopeptolide A	Nostoc sp. GSV224	Não conhecida	3	1	0	Hoffmann et al., 2003		

Tabela 4 - Produtos de cianobactéria sintetizados pela combinação de NRPS e PKS.

Análise estatística de todos os genomas bacterianos seqüenciados mostra que existe uma correlação positiva entre o tamanho do genoma e o número de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2004). Atualmente, existem disponíveis quatorze genomas de cianobactérias completamente ou quase completamente seqüenciados (Tabela 5). É interessante notar que especialmente espécies com genoma pequeno como *Synechocystis* não contém genes de NRPS e PKS, enquanto genomas grandes como *Nostoc* ou *Crocosphaera* contém numerosos agrupamentos. Nesses genomas, genes de NRPS e PKS podem constituir mais que 5% da seqüência genômica. Entretanto, para a maioria dos agrupamentos de NRPS desses genomas o peptídeo produzido não foi ainda identificado. Somente para *N. punctiforme* ATCC29133 um agrupamento gênico foi identificado como sendo de nostopeptolide (*nos*A-D), composto previamente descrito em outra linhagem de *Nostoc* (HOFFMANN et al., 2003). Ambos os agrupamentos são quase idênticos exceto por um domínio de epimerização na NosC da *Nostoc* ATCC 29133 que está ausente na *Nostoc* GSV224.

2.5 Microcistinas

As hepatotoxinas microcistinas são um bom exemplo de produto produzido por NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS. Essa cianotoxina tem sido estudada extensivamente por causar problemas no mundo todo. Entre os métodos diretos de detecção de microcistinas encontramse bioensaios (testes com camundongos), imunológicos - ensaio imuno enzimático (ELISA), bioquímicos (inibição de atividades enzimáticas) e analíticos - cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) e espectrometria de massas. Ao que parece, é produzida somente por cianobactérias (NEILAN et al., 1999), principalmente por linhagens de *Microcystis*, entretanto outros gêneros, tais como *Planktothrix, Oscillatoria, Anabaena, Nostoc, Anabaenopsis, Hapalosiphon, Phormidium, Radiocystis* também a produz (JUNGBLUT; NEILAN, 2006; LOMBARDO et al., 2006; SIVONEN; JONES, 1999). Existem mais de 60 variantes conhecidas de microcistinas, podendo-se diferenciá-las quanto à toxicidade (SIVONEN; JONES, 1999). A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael et al. (1988). Inicialmente apenas as variações qualitativas observadas em seus dois L-aminoácidos foram usadas para designar as diferentes microcistinas, por exemplo, microcistina-LR (leucina-arginina); -RR (arginina-arginina); -YA (tirosina-alanina). A microcistina-LR apresenta como L-aminoácidos a leucina e a arginina, e é a toxina mais hepatotóxica produzida por cepas de *Microcystis aeruginosa*. Todas as microcistinas apresentam DL_{50} (i.p.) entre 60 e 70 µg/kg de peso corpóreo e sintomas similares de envenenamento (CARMICHAEL, 1994).

Ordem	Cianobactéria	Posição	Genoma (Mbn)	NRPSs	PKSs
Ordem			(mpp)		
Chroococcales	Crocosphaera watsonii WH8501	Incompleto	6,17	12	4
	Gloeobacter violaceus PCC7421	Completo	4,66	0	7
	Synechococcus sp. PCC7002	Completo	3,33	0	0
	Synechococcus sp. WH8102	Completo	2,43	0	0
	Synechococcus elongatus PCC7942	Incompleto	2,7	0	0
	Synechocystis sp. PCC6803	Completo	3,57	0	0
	Thermosynechococcus elongatus BP-1	Completo	2,59	0	0
	Prochlorococcus marinus CCMP1375	Completo	1,75	0	0
	Prochlorococcus marinus CCMP1986	Completo	1,66	0	0
	Prochlorococcus marinus MIT9313	Completo	2,41	0	0
Oscillatoriales	Trichodesmium erythraeum IMS-101	Incompleto	7,79	1	2
Nostocales	Anabaena variabilis ATCC 29413	Incompleto	7,06	10	1
	Nostoc sp. PCC7120	Completo	7,21	7	6
	Nostoc punctiforme ATCC 29133	Incompleto	9,02	20	10

Tabela 5 - Genes de NRPS e PKS encontrados nos genomas seqüenciados de cianobactérias. Nos genomas incompletos os números são estimados (EHRENREICH; WATERBURY; WEBB, 2005; WELKER; VON DÖHREN, 2006).

A estrutura geral das microcistinas é um ciclo D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha, onde X e Z são os dois L aminoácidos variáveis, D-MeAsp é D-eritro ácido metilaspártico e Mdha é N-metildeidroalanina (CARMICHAEL et al., 1988). Adda é um aminoácido atípico, o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, que também está presente nas nodularinas e foi determinado como um dos responsáveis pela atividade biológica dessas hepatotoxinas (HARADA et al., 1990).

A caracterização do agrupamento dos genes envolvidos na biossíntese da microcistina foi realizada por Tillett et al. (2000), na *Microcystis aerugiosa* PCC7806 (produtora de microcistina-LR). O agrupamento dos genes que participam da biossíntese da microcistina, denominado *mcy*, contém 55 kb de DNA codificando dez (10) ORFs, *mcy*A-*mcy*J. Dois operons transcritos em direções opostas foram identificados: *mcy*D-J (operon maior) e *mcy*A-C (operon menor). A região *mcy*D-J (operon maior) contém sete (7) ORFs, todas transcritas em direção oposta ao operon menor, que contém três (3) ORFs. O gene *mcy*B codifica uma NRPS e sua inativação resultou na perda da produção de microcistina. Outros genes de NRPSs são os *mcy*A e *mcy*C e existe somente um gene de PKS, o *mcy*D. Genes codificadores de híbridos NRPS/PKS são dois, *mcy*E e *mcy*G.

Até o momento foram seqüenciados o agrupamento de genes de microcistinas em quatro cianobactérias, ou seja, *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Microcystis aeruginosa* K-139, *Planktothrix* sp. 128/6 e *Anabaena* sp. 90 (CHRISTIANSEN et al., 2003; NISHIZAWA et al., 2000; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000). A comparação desses agrupamentos de genes mostrou que a maioria dos genes estava numa ordem diferente, nem todos os genes estavam presentes nos três organismos e a identidade entre os genes foi baixa. Isso indica que há necessidade de caracterizar esses genes para cada organismo (ROUHIAINEN et al., 2004).

2.6 Sideróforos

Sideróforos são compostos com baixa massa molecular (< 1000 Da) e com elevada afinidade por ferro (DRECHSEL; JUNG, 1998). Muitos sideróforos são polipeptídeos que são biossintetizados por NRPS, PKS e sistemas enzimáticos integrados NRPS/PKS (CROSA; WALSH, 2002). Esses metabólitos são produzidos por bactérias e fungos em condições de crescimento em meio com baixas concentrações de ferro. Eles solubilizam Fe (III) formando quelatos que são transportados para o interior da célula. Ferro é um elemento abundante na natureza, essencial para os organismos vivos. A importância deste metal catiônico está nas funções que ele exerce, tais como: cofator de várias enzimas importantes (peroxidases, catalases, citrocromo oxidases e nitrogenases), componente ativo de intermediários de cadeias de transportes de elétrons (ex. citrocromos e proteínas ferro-enxofre) e componente essencial de proteínas com função de transporte (hemoglobina, leghemoglobina).

Várias linhagens de cianobactérias são capazes de produzir e utilizar sideróforos (WILHELM; TRICK, 1994). Entretanto, muito pouco se conhece sobre as propriedades estruturais dos sideróforos de cianobactérias e nada se sabe sobre as seqüências gênicas envolvidas na sua biossíntese. Schizokinen isolado de *Nostoc* PCC7120, o qual foi primeiramente identificado em *Bacillus megaterium*, era até recentemente o único sideróforo de cianobactérias caracterizado (SIMPSON; NEILANDS, 1976). O primeiro sideróforo genuíno de cianobactéria com estrutura elucidada é o Anachelin, isolado da *Anabaena cylindrica* CCAP 1403/2A (BEIDERBECK et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização molecular usando a seqüência cpcBA-IGS

3.1.1 Culturas de cianobactérias

As linhagens de cianobactérias selecionadas para este estudo são as existentes na coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, na Coleção de Cultura do Instituto de Botânica - SPC (Secretaria do Meio Ambiente, SP) e também linhagens provenientes da *University of Texas Culture Collection* (EUA) e *Pasteur Culture Collection* (França) (Tabela 6). As cianobactérias foram mantidas em meio de cultura líquido BG-11 (Tabela 7, ALLEN, 1968) ou ASM-1 (Tabela 8, GORHAM et al., 1964) ou AA/4 (Tabela 9, ALLEN; ARNON, 1955), sob iluminação fluorescente constante de 40 µmol fótons.m⁻².s⁻¹ e temperatura controlada de 24±1°C.

3.1.2 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias

Para a extração de DNA genômico das culturas puras de cianobactérias usadas neste estudo, uma suspensão de 1 mL de células na fase de crescimento exponencial foi coletada e concentrada através de centrifugação a 13000 rpm, durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete contendo as células de cianobactérias foi usado para extrair o DNA genômico, seguindo o método descrito por Fiore et al. (2000) ou utilizando o kit "Ultra Clean Soil DNA" (MoBio, Solana Beach, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Aliquotas (5 μ l) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídio (0,3 μ g/mL de gel), após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM,

Ordem	Linhagens	Origem	Meios de Cultura
Choococales	Microcystis sp. NPJL4	Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ	ASM-1
	Microcystis aeruginosa NPJB1	Lago das Garças, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis aeruginosa NPCD1	ETE, Cidade de Deus, RJ	ASM-1
	Microcystis protocystis SPC697	Represa Guarapiranga, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis panniformis SPC702	Lago das Garças, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis botrys SPC759	Represa de Taiaçupeba, SP	ASM-1
	Sphaerocavum brasiliensis SPC484	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Radiocystis fernandoi SPC736	Lago de Corumbaí, SP	ASM-1
Oscillatoriales	Planktothrix mougeotii SPC788	Parque Ecológico do Tiete, SP	BG-11
	Geitlerinema splendidum SPC923	Represa Billings, São Paulo, SP	BG-11
	Nostoc sp. CENA18	Várzea Rio Japurá, AM	AA
Nostocales	Nostoc sp. CENA 21	Várzea Mari-Mari, AM	AA
	Nostoc sp. CENA61	Igapó Rio Negro, AM	AA
	Nostoc sp. CENA65	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Nostoc sp. CENA66	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Nostoc commune UTEX584	University of Texas Culture Collection, EUA	AA
	Michrochaete investiens CENA64	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	AA
	Aphanizomenon sp. SPC704	Canal Mangeraçá, Maceió, AL	ASM-1
	Cylindrospermum sp. CENA33	Várzea Manacapuru, AM	AA
	Tolypothrix sp. UFV-B1	Ribeirão Bartolomeu, Viçosa, MG	BG-11 (sem N)
	Gloeotrichia sp. UFV-B2	Ribeirão Bartolomeu, Viçosa, MG	BG-11 (sem N)
Stigonematales	Fischerella sp. CENA19	Várzea Mari-Mari, AM	AA
	Fischerella sp. CENA62	Nascente d'água, Fazenda Capuava, Piracicaba, SP	BG-11 (sem N)
	Fischerella sp. CENA63	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	BG-11
	Fischerella sp. CENA72	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA

Tabela 6 - Linhagens de cianobactérias utilizadas na caracterização molecular usando a região cpcBA-IGS.

Meio BG-11 (ALLEN, 1968); Meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964); Meio AA (ALLEN; ARNON, 1955).
Co	omponentes	estoque (g/L)	Usar por litro	Concentração final (g/l)
1.	NaNO ₃	150	10 mL	1,5
2.	K_2HPO_4	40	1 mL	0,04
3.	MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1 mL	0,075
4.	CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1 mL	0,036
5.	Ácido cítrico	6	1 mL	0,006
6.	Citrato de amônio férrico	6	1 mL	0,006
7.	Na ₂ EDTA	1	1 mL	0,001
8.	Micronutrientes	-	1 mL	-
9.	Carbonato de sódio	20	1 mL	0,02

Tabela 7 - Meio de cultura BG-11 usado no cultivo das cianobactérias (ALLEN, 1968).

10. Completar o volume com H_2O deionizada para 1000 mL

Autoclavar.

pH após autoclavagem e esfriamento: 7,4

Notas:

Se fizer aeração com CO_2 , deve-se adicionar 1 M HEPES, pH 8,0 numa concentração final de 10 a 20 mM (ou seja, 10 a 20 mL por litro).

Para meio sólido, adicione noble agar numa concentração final de 1%.

Solução de micronutrientes

H ₃ BO ₃	2,86	g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222	g/L
$Na_2Mo_4.2H_2O$	0,39	g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079	g/L
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,049	g/L

Solução estoque A	Peso (g)	
NaNO ₃	1,70	Completar para 200 mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	
Solução estoque B		
K ₂ HPO ₄ ou	0.87	Completar para 100 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1,14	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ou	1,78	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,33	
Solução estoque C		
H ₃ BO ₃	2,48	Completar para 100 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	
ZnCl ₂	0,335	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
CuCl ₂	0,0014	
Solução estoque D		
EDTA.Na ₂	1,86	Completar para 100 mL

Tabela 8 - Meio de cultura ASM-1 usado na manutenção das cianobactérias (GORHAM et al., 1964).

Para cada litro de ASM-1:

Estoque A	20,0 mL
Estoque B	2,0 mL
Estoque C	0,1 mL
Estoque D	0,4 mL

Completar para 1000 mL. Ajustar o pH para 7,0

Tabela 9 - Meio de cultura AA/4 usado na manutenção das cianobactérias (ALLEN; ARNON, 1955).

MEIO DE CULTURA

mL de solução estoque/litro

	-Pi	+Pi	
AA	25	6,25	
AA/4	6,25	3,10	(dobro de fosfato)
AA/8	3,1	1,56	

Soluções Estoques

I) -Pi

Faça as soluções abaixo e armazene a 4°C. Misture as 4 soluções estoques -Pi, na proporção 1:1:1:1 (armazene a 4°C).

1.	MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g/500 mL
2.	CaCl ₂ .2H ₂ O	6 g/500 mL
3.	NaCl	20 g/500 mL

4. Micronutrientes: Adicionar na ordem listada - espere cada reagente ser dissolvido. Sempre agite antes de usar.

1090 mL
160 mL
360 mg
61,1 mg
44 mg
15,8 mg
572 mg
4,6 mg
8 mg

Solução AA de Fe-EDTA

(1) Dissolver 5.2 g KOH peletes em 186 mL de água pura. Adicionar 20,4 g Na₂EDTA.2H₂O. (2) Em seguida, dissolver 13,7 g FeSO₄.7H₂O em 364 mL de água pura (ou use Fe₂(SO)₃.nH₂O; Ferric sulfate, n-hydrate). Misturar as soluções 1 e 2. Borbulhar ar filtrado com filtro Millipore (0,45 mm) até a solução mudar de cor (entre 4 min a 4 horas)..

II) +Pi

K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	28 g/500 mL	ou
K_2 HPO ₄ anidro	21.4 g/500 mL	

EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita usando o programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM MultiImager" (BioRad, Hercules, CA, EUA). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular Lambda DNA/EcoR I + Hind III (Promega, Madison, WI, EUA). O material foi armazenado a temperatura de -20°C até o momento da próxima análise.

3.1.3 Amplificação da região cpcBA-IGS

Para a amplificação de seqüências parciais dos genes cpcB and cpcA e das seqüências completas do espaço gênico entre esses dois genes do operon da ficocianina utilizou-se o conjunto oligonucleotídeos iniciadores: PCβF (5'seguinte de GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3'), PCαR (5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3') (NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 1X (20mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em um termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram utilizadas diferentes condições para amplificação do fragmento de interesse. Para algumas espécies, a reação foi feita nas seguintes condições: 94°C/4 min; 40 ciclos de 94°C/1 min, 50°C/1 min, 72°C/2 min; extensão final a 72°C/12 min; outras espécies nas condições: 94°C/5 min; 40 ciclos de 94°C/20 s, 50°C/30 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7 min; e as demais nas condições: 94°C/5 min; 30 ciclos de 94°C/1 min, 45°C/30 s, 72°C/1 min; extensão final a 72°C/7 min. A verificação do tamanho dos amplicons resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), depois da corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE; 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0) em gel de agarose 1,2%. A documentação do gel foi feita usando o programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM MultiImager" (BioRad).

3.1.4 Clonagem

Na clonagem das seqüências de ficocianina produzidas na PCR foi utilizado o kit "pGEM[®]-T Easy Vector Systems" (Promega). O vetor utilizado foi o pGEM[®] - T de 3015 pb que é oferecido linearizado com *Eco*R V e com adição de 3' terminal timidina em ambos os lados. Essas terminações 3'- T aumenta a eficiência da ligação. Esse vetor contém sítios para resistência à ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento do *LacZ*. A clonagem no vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante, presentes no Manual de Instrução do "pGEM[®]-T Easy Vector Systems".

3.1.5 Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5 α foi feita através de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Alíquotas de 10 µL do produto de ligação e 100 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e deixado por 30 segundos, sem agitar. Em seguida o microtubo foi incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) a temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentrações finais de 100 µg/mL de meio. As placas foram incubadas por 15 horas, a temperatura de 37°C.

3.1.6 PCR usando colônias

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, uma colônia de cor branca foi utilizada para nova reação de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 µL de reação de PCR utilizando-se os iniciadores: M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'); M13R (5'-

GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 3 mM; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 μL. A reação foi feita em um termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de amplificação foram: 94°C/5 min; 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. A verificação do tamanho dos amplicons gerados foi feita em gel de agarose 1,2% - 0,5 X TBE conforme descrito no item 3.1.2.

3.1.7 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5 α que continham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina, de acordo com Birnboim e Doly (1979). As colônias brancas que fizeram parte da seleção foram transferias para 6 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em microtubos de 1,5 mL foram colocados 1,5 mL da cultura de células produzidas e, em seguida, estas foram centrifugadas a 10.000 × *g* por 20 segundos. O pélete formado foi ressuspenso em 100 μ L de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Em seguida, 200 μ L de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%)

foram adicionados e misturados gentilmente através da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram acrescentados aos microtubos 150 μ L de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Procedeu-se novamente a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 × *g* durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 270 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, misturando-se e centrifugando-se conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pélete foi lavado uma vez com 250 μ L de etanol 70% gelado e centrifugado a 10.000 x g por 2 minutos. O pélete foi então seco e ressuspenso em 30 μ L de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 M e 10 mg RNAse/mL. Incubou-se essa mistura a 37°C por 30 minutos. Os plasmídeos assim extraídos foram armazenados a -20°C até a próxima etapa.

3.1.8 Seqüenciamento

A PCR para o seqüenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit "DYEnamic ET Terminator Cycle Seguencing" (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para a reação utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol do iniciador M13F(5'- GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA- 3') ou SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA- 3'), 2 μL de "DYEnamic", 2 μL de tampão 2,5 X "Save Money" (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 μL. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit "DYEnamic ET Terminator Cycle Seguencing". Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no seqüenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, para o seqüenciamento dos fragmentos de DNA por aproximadamente 2,5

horas. Os dados gerados pelo seqüenciador foram coletados e processados pelo programa "ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Sofware" versão 3.7 (Applied Biosystems).

3.1.9 Processamento e análise filogenética das seqüências

As següências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) através do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional Linux. As següências obtidas foram comparadas com outras següências previamente depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). No alinhamento seqüencial múltiplo dos genes de ficocianina obtidos nesse estudo, e outros selecionados nos bancos de dados públicos, foi usado o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994). O ajuste das extremidades das seqüências de DNA, de forma que todas elas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas, foi feito com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 2001). No cálculo da significância estatística da similaridade entre as següências foi usada a análise de reamostragem ("bootstrap") (SWOFFORD et. al., 1996) para 1000 replicações. O método de distância ("Neighbour Joining") (SAITOU; NEI, 1987) foi usado na construção da árvore filogenética. A visualização gráfica da árvore construída foi observada por meio do programa TreeView (Page, 2001).

3.2 Distribuição de genes de NRPS, PKS e sistemas híbridos em cianobactérias brasileiras

3.2.1 Culturas de cianobactérias e extração de DNA genômico

As linhagens de cianobactérias analisadas para a presença de NRPS, PKS e híbrido NRPS/PKS são apresentadas na Tabela 10. Dentre essas linhagens estão às caracterizadas molecularmente citadas na Tabela 6. A extração do DNA genômico de todas elas foi feita conforme mencionado no item 3.1.2.

3.2.2 Amplificação de seqüências conservadas de NRPSs

Para amplificação de seguências conservadas de sintetases de peptídeos, utilizou-se o oligonucleotídeos iniciadores: MTF (5'seguinte conjunto de GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC - 3') e MTR (5' - CCNCGDATYTTNACYTG - 3') (NEILAN et al., 1999), confeccionado pela Integrated DNA Technologies, Inc. (Integrated DNA Technologies, INC., Coralville, IA, EUA). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1X (Tris HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 5 mM ; 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; 4% de DMSO (dimetilsulfóxido); água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em um termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 94°C/2 min; 5 ciclos de 94°C/1 min, 45°C/1 min, 72°C/1 min; 30 ciclos de 94°C/30 s, 50°C/1 min, 72°C/4 min; extensão final a 72°C/15 min. Os amplicons de tamanho esperados foram purificados com o "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (Amersham Biosciences). A verificação do tamanho dos amplicons resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE; Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) em gel de agarose 1,2%. A documentação do gel foi feita através do programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM MultiImager" (BioRad).

Ordem	Linhagens	Origem	Meios de cultura
Chroococcales	Microcystis sp. NPLJ4	Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ	ASM-1
	Microcystis sp. SPC804	Lago Ibirá, SP	ASM-1
	Microcystis sp. SPC822	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis sp. NPLS1	Lagoa Santa, MG	ASM-1
	Microcystis aeruginosa NPJB1	Lago das Garças, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis aeruginosa NPCD1	ETE, Cidade de Deus, RJ	ASM-1
	Microcystis aeruginosa SPC777	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis novacekii SPC503	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis protocystis SPC697	Represa Guarapiranga, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis panniformis SPC702	Lago das Garças, São Paulo, SP	ASM-1
	Microcystis botrys SPC759	Represa de Taiaçupeba, SP	ASM-1
	Microcystis wesenbergii SPC761	Represa de Taiaçupeba, SP	ASM-1
	Sphaerocavum brasiliensis SPC484	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Radiocystis fernandoi SPC736	Lago Corumbaí, SP	ASM-1
	Rhabdoderma cocoide SPC766	Represa Billings, São Paulo, SP	BG-11
	Synechococcus sp. PCC7942	Pasteur Culture Collection, França	BG-11
	Synechococcus nidulans CENA75	Lagoa de Tratamento de Minério de Urânio, Poços de	BG-11
		Calda, MG	
	Oscillatoria quadripunctulata NPDF-2	Lago Paranoá, Brasília, DF	BG-11
	Oscillatoria quadripunctulata NPRG-1	Represa Guarapiranga, São Paulo, SP	BG-11
	Pseudanabaena galeata NPLB5	Lago da Barra, Maricá, RJ	BG-11
Oscillatoriales	Pseudanahaena galeata SPC772	Represa Billings. São Paulo. SP	BG-11
	Pseudanahaena mucicola SPC782	Represa Billings, São Paulo, SP	BG-11
	Phormidium autumnale UTEX1580	University of Texas Culture Collection. EUA	BG-11
	Phormidium sp. SPC767	Represa Billings, São Paulo, SP	BG-11
	Pseudophormidium sp. CENA76	Lagoa de Tratamento de Minério de Urânio, Poços de	BG-11
		Calda, MG	
	Planktothrix agardhii SPC205	Lago das Garças, São Paulo, SP	BG-11
	Planktothrix agardhii SPC788	Parque Ecológico do Tietê, SP	BG-11
	Geitlerinema sp. UFV-01	Lagoa da UFV, Viçosa, MG	BG-11
	Geitlerinema splendidum SPC923	Represa Billings, São Paulo, SP	BG-11
	Liminothrix sp. CENA74	Represa Guarapiranga, São Paulo, SP	BG-11
			Continua

Ordem	Linhagens	Origem	Meios de Cultura
Nostocales	Nostoc sp. CENA18	Várzea Rio Japurá, AM	AA
	Nostoc sp. CENA21	Várzea Mari-Mari, AM	AA
	Nostoc sp. CENA61	Igapó Rio Negro, AM	AA
	Nostoc sp. CENA65	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Nostoc sp. CENA66	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Nostoc sp. CENA68	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Nostoc sp. CENA73	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Nostoc sp. CENA78	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	BG-11(sem N)
	Nostoc sp. CENA88	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	BG-11(sem N)
	Nostoc sp. CENA89	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	BG-11(sem N)
	Nostoc commune UTEX584	University of Texas Culture Collection, EUA	AA
	Trichormus sp. CENA77	Tabuleiro de arroz inundado, SC	BG-11
	Michrochaete investiens CENA64	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	AA
	Anabaena flos-aquae UTCC64	Ontary Lake, Canada	AA
	Aphanizomenon sp. SPC704	Canal Mangeraçá, Maceió, AL	ASM-1
	Cylindrospermum sp. CENA33	Várzea Manacapuru, AM	AA
	Cylindrospermopsis raciborskii 339-T3	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Cylindrospermopsis raciborskii SPC811	Lago das Garças, São Paulo, SP	ASM-1
	Cylindrospermopsis raciborskii SPC570	Lagoa em Porto Alegre, RS	ASM-1
	Cylindrospermopsis raciborskii UFV-P1	Lagora da UFV, Viçosa, MG	ASM-1 (10%N)
	Raphidiopsis brookie 338-T2	Represa Billings, São Paulo, SP	ASM-1
	Scytonema sp. UFV-E1	Folha de plântulas de Eucaliptus, Dionísio, MG	BG-11 (sem N)
	Tolypothrix sp. UFV-B1	Ribeirão Bartolomeu, Viçosa, MG	BG-11 (sem N)
	Gloeotrichia sp. UFV-B2	Ribeirão Bartolomeu, Viçosa, MG	BG-11 (sem N)
Stigonematales	Fischerella sp. CENA19	Várzea Mari-Mari, AM	AA
	Fischerella sp. CENA62	Nascente d'água, Fazenda Capuava, Piracicaba, SP	BG-11(sem N)
	Fischerella sp. CENA63	Reservatório ESALQ, Piracicaba, SP	BG-11(sem N)
	Fischerella sp. CENA71	Terra Preta antropogênica, Iranduba, AM	AA
	Fierhorella en CENA72	Tomo Ducto automonosânico Turo de La ANG	

.(0061 Meid

3.2.3 Amplificação de seqüências conservadas de PKSs

Para amplificação de següências conservadas de sintases de policetídeos, utilizou-se o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: KSF (5'-MGIGARGCIHWISMIATGGAYCCICARCAIMG 3') KSR (5' e GGRTCICCIARISWIGTI CCIGTICCRTG - 3') (BEYER et al., 1999), confeccionado pela Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies Inc.). A amplificação por PCR foi realizada nas mesmas condições utilizadas para sintetase de peptídeos (MTF/MTR) citadas no item 3.2.2, assim como a verificação do tamanho dos amplicons resultantes e a documentação dos géis.

3.2.4 Sistemas enzimáticos integrados (NRPS/PKS)

As cianobactérias que apresentaram amplificações de següências de NRPS e PKS isoladamente foram testadas na busca de genes de peptídeos híbridos. Para a amplificação de seqüências longas e mistas contendo regiões de NRPSs e de PKSs foi utilizado uma mistura de DNA polimerases, Elongase[®] Enzyme Mix (Invitrogen), capaz de amplificar fragmentos de até 20 Kpb. A técnica de amplificação de DNA por meio da PCR foi realizada seguindo-se o protocolo descrito por Rabello (2003). Para a amplificação da região alvo das seqüências das cianobactérias utilizou-se o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: MTF (5'-GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC -3') (NEILAN et al., 1999) e KSR (5' -GGRTCICCIARISWIGTICCIGTICCRTG) (BEYER et al., 1999). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para a reação "A" 5X [Tris-SO₄ 300mM (pH 9,1 a 25°C), (NH₄)₂SO₄ 90 mM e MgSO₄ 5 mM] e tampão para reação "B" 5X [Tris-SO₄ 300 mM (pH 9,1 a 25°C), (NH₄)₂SO₄ 90 mM e MgSO₄ 10 mM] de forma que a concentração final de Mg⁺ fosse de 1,7 mM; 0,3 mM de dNTP; 1,0 µL de Taq/Pyrococcus species DNA polimerase (Invitrogen) [Tris-HCl 20 mM (pH 8,0 a 25°C), EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, estabilizadores, e glicerol 50% (v/v)]; 200 ng de DNA; 36,25 pmol do iniciador MTF e 20,15 pmol do iniciador KSR e água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 50 μL. A reação foi realizada em um termociclador "Gene Amp PCR System 2400" (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 94°C/30 s; 35 ciclos 94°C/15 s, 55°C/30 s, 68°C/30 min; extensão final a 68°C/15min. Cinco microlitros (5 μL) dos produtos de PCR foram acrescidos de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%), e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,8%, contendo brometo de etídio (0,3 μg/mL de gel) após corrida eletroforética em tampão 1X TAE (1 X TAE; Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 100 mA e 45 V por um período de quatro horas. A verificação do tamanho dos amplicons resultantes foi feita por comparação com o padrão de tamanho de DNA 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). A documentação do gel foi feita através do programa "Multi Analyst" do "Fluor-STM MultiImager" (BioRad).

3.2.5. Seqüenciamento de fragmentos de PKS

Alguns fragmentos (oito) de PKS obtidos na amplificação por PCR de diversas linhagens de cianobactérias foram seqüenciados após a clonagem e transformação conforme descrito nos itens de 3.1.4 a 3.1.8. As montagens das següências foram obtidas conforme descrito no item 3.1.9. As següências de nucleotídeos foram traduzidas para següências de peptídeos usando o programa "Expert Protein Analysis System" (http://br.expasy.org/tools/), ferramenta "Translate" (http://br.expasy.org/tools/dna.html). As seqüências de peptídeos foram analisadas pelo programa "Modular Polyketide Synthase Database" (http://www.nii.res.in/pksdb.html) (YADAV et al., 2003), o qual compara uma seqüência de aminoácidos contra uma base de dados de següências de PKS. A construção da árvore filogenética foi feita conforme descrito no item 3.1.9.

3.3 Produção de microcistinas

A análise de microcistinas foi realizada para todas as linhagens apresentadas na Tabela 10. Essa análise foi realizada em triplicada colocando 100 µL de cultura de cada linhagem de cianobactéria no final da fase exponencial de crescimento em microtubos, sendo obtida a lise celular por meio da incubação em nitrogênio líquido por 30 segundos seguido de banho-maria por 4 minutos a 40°C, repetido por três vezes. Em seguida, procedeu-se a detecção das microcistinas usando o ensaio imunológico ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") (Kit placa Microcistina, Beacon Analytical Systems, Inc., Portland, ME, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada para 28 linhagens de cianobactérias descritas na Tabela 10. A análise de cromoazurol S (CAS) ágar foi realizada conforme a seguir (SILVA-STENICO et al., 2005): 60,5 mg de CAS foram dissolvidos em 50 mL de água destilada e misturada com 10 mL de ferro (III) (FeCl₃•6H₂O 1 mM em HCl 10 mM). Sob agitação, esta solução foi vagarosamente adicionada a 72,9 mg de HDTMA ("hexadecyltrimethylammonium bromide") dissolvido em 40 mL de água. Estas soluções foram autoclavadas separadamente. Separadamente também foi autoclavado um meio de cultura deficiente em ferro (MM9) de acordo com Payne (1994). O meio era composto de (1 L): KH₂PO₄ 0,3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1,0 g/L. Em 100 mL desta solução foram adicionados 1,2 g de Tris e 18 g de agar, pH 5.6, completado para 1L e autoclavada. Esta solução foi suplementada com 30 mL de casaminoácido deferrado 10% (m/v) (o ferro contaminante foi removido com 3% de 8-hidroxiquinolina em clorofórmio), 1 mL de MgCl₂ 1M e 1 mL de CaCl₂ 100 mM. Estas soluções foram preparadas e filtradas em filtro Millipore

0,22 μ separadamente. A solução de CAS foi adicionada ao meio MM9. Toda vidraria usada para este experimento foi limpa com HCl 6N para retirada de ferro contaminante.

Placas de Petri (10 cm de diâmetro) foram preparadas com os meios específicos para cada linhagem de cianobactéria. Após a solidificação destes meios, eles foram cortados no meio da placa e este espaço foi preenchido com o CAS-MM9 sólido. As placas foram inoculadas com linhagens de culturas estoques e incubadas a 23°C sob constante iluminação. A mudança de cor de azul para amarelo do meio CAS foi anotada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA genômico de culturas puras de cianobactérias

As extrações de DNA genômico das culturas puras de cianobactérias foram realizadas com sucesso usando o protocolo descrito por Fiore et al. (2000), que foi desenvolvido visando à obtenção de DNA de todos os gêneros deste grupo de organismos conhecidos até o momento. Para regiões híbridas, os melhores resultados foram obtidos com o Kit Ultra Clean Soil DNA (Mo Bio) devido a grande quantidade (200 ng) de DNA genômico que é necessário para a reação de amplificação com a mistura de DNA polimerases. Linhagens representantes de quatro ordens de cianobactérias (Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales) foram selecionadas para esse trabalho e a boa qualidade dos DNAs genômicos extraídos foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR de seqüências de interesse (*cpc*BA-IGS, NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS).

Representantes da ordem Pleurocapsales não foram analisadas devido à escassez de linhagens isoladas. Esses microrganismos são de crescimento muito lento e são normalmente encontrados numa população baixa em ambientes subaéreo e bentônico/perifítico.

4.2 Caracterização molecular usando a seqüência cpcBA-IGS

Neste estudo foram amplificadas por PCR e seqüenciadas regiões do *cpc*BA-IGS de 25 linhagens de cianobactérias, sendo oito da ordem Chroococcales, duas da ordem Oscillatoriales, onze da ordem Nostocales e quatro da ordem Stigonematales. Os amplicons resultantes foram de aproximadamente 685 pares de bases, conforme o esperado. Embora, todas as linhagens mencionadas na Tabela 10 tenham sido testadas para amplificação da região de ficocianina, somente essas 25 linhagens produziram resultados satisfatórios. O

número relativamente baixo de seqüências de cpcBA-IGS obtidas foi devido à dificuldade em amplificar essas sequências usando os iniciadores PCBF/PCaR em algumas linhagens de cianobactérias brasileiras. Esses iniciadores foram construídos usando as seqüências disponíveis no GenBank em 1995 (BOLCH et al. 1996; NEILAN et al., 1995), cujo número existente era bastante limitado e não incluía nenhuma linhagem brasileira. Assim para cada gênero e/ou espécie diferente houve a necessidade de otimizar a PCR. Entretanto, as seqüências geradas neste estudo irão possibilitar a construção de novos oligonucleotídeos iniciadores por meio da identificação de seqüências conservadas entre um maior número de gênero e/ou espécie de cianobactérias, o que conseqüentemente acarretará em maior facilidade para amplificação por PCR de seqüências de *cpc*BA-IGS. A vantagem de se utilizar essa região do operon da ficocianina para relacionar linhagens de cianobactérias é que o espaço intergênico é relativamente grande, se comparado com outros existentes nos genes do pigmento fotossintético de cianobactérias e possui uma taxa de substituição de seus nucleotídeos potencialmente mais alta do que as seqüências de RNAr 16S, possibilitando a identificação de cianobactérias ao nível de linhagens (BOLCH et al. 1996; NEILAN et al., 1995; TILLET et al., 2001). Outra característica importante, é que dentro do domínio Bacteria o pigmento ficocianina é encontrado exclusivamente em cianobactérias (BRYANT, 1982; ERNEST, 1991; GLAZER, 1989), o que facilita a identificação desse grupo de microrganismos em amostras ambientais e culturas não axênicas.

Na análise BLAST, as seqüências de *cpc*BA-IGS das linhagens de *Microcystis* apresentaram identidade variando entre 98 a 100% com seqüências de *Microcystis* isoladas do Brasil, Israel e Suíça depositadas no GenBank. A linhagem *Radiocystis fernandoi* SPC736 mostrou 98% de identidade com a *Microcystis aeruginosa* FCLA-310 (AF385378) isolada da Lagoa das Garças em São Paulo, enquanto que a seqüência de *Sphaerocavum brasiliensis* SPC484 não teve identidade com nenhuma seqüência do GenBank. Dentro da ordem

Oscillatoriales, a seqüência de *cpc*BA-IGS da linhagem *Planktothrix mougeotii* SPC788 teve 90% de identidade com a *Planktothrix* PCC7811 (AY768471). A *Geitlerinema splendidum* SPC923 mostrou um fragmento do gene *cpc*B e outro do *cpc*A com 98% e 97% de identidade com *Planktothrix* sp. FP1 (AF212923), respectivamente, e um espaço entre esses dois genes (IGS) contendo 51 nucleotídeos sem identidade com essa linhagem. Entretanto, essa *Planktothrix* FP1 isolada de um lago na Itália e identificada como produtora de saxitoxina (POMATI et al., 2000) apresenta características morfológicas de *Limnothrix* de acordo com a foto apresentada no manuscrito publicado.

Na análise BLAST utilizando o gene de RNAr 16S dois organismos são considerados do mesmo gênero se a identidade entre eles for superior a 95% (LUDWIG et al., 1998) e de mesma espécies se for superior a 97,5% (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Esses valores foram determinados com base no estudo que mostrou que dentro do domínio *Bacteria*, dois organismos podem ser considerados da mesma espécie se eles apresentarem reassociação de DNA-DNA de aproximadamente 70% ou maior (WAYNE et al., 1987) e que linhagens com seqüências 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). Embora esses valores estejam sendo usados para distinguir gêneros e espécies baseando-se em seqüências de RNAr 16S, não tem sido aplicado para outras seqüências gênicas.

Dentro da ordem Nostocales, das onze linhagens seqüenciadas, somente as cianobactérias *Microchaete investiens* CENA64 e a *Gloeotrichia* UFV-B2 mostraram identidades com seqüências do GenBank, ou seja, 98% com *Calothrix* sp. PCC7601 (X06084) e 99% *Tolypothrix* PCC7601 (AY768470), respectivamente. As seqüências de *cpc*BA-IGS das demais linhagens não mostraram identidades com as do GenBank. Todas as

seqüências de *cpc*BA-IGS das linhagens de *Fischerella* (ordem Stigonematales) seqüenciadas neste estudo também não tiveram identidades com as seqüências do GenBank. Esses resultados eram esperados uma vez que existem muito poucas seqüências de *cpc*BA-IGS depositadas no GenBank das ordens Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales. Portanto, a maioria das seqüências gênicas obtidas neste estudo representa novas estruturas primárias ainda não descritas dentro do grupo de cianobactérias.

Em adição à identificação de espécies baseada na região da ficocianina, as extensões dos genes cpcB e cpcA codificam regiões conservadas que permitem inferir relações filogenéticas entre as linhagens de cianobactérias. Assim, as inferências filogenéticas entre as seqüências de *cpc*BA-IGS obtidas neste estudo foram realizadas através da construção de uma árvore filogenética (Figura 2). Outras seqüências retiradas do banco de dados do GenBank também foram utilizadas nessa análise (Microcystis NPLS-1 - AF385368; Microcystis aeruginosa KLL MB-K – AY524848; Microcystis aeruginosa EAWAG198b – AJ003183; Microcystis aeruginosa FCLA-310 - AF385378; Microcystis aeruginosa EAWAG167 -AJ003176; Nostoc PCC7120 – X05239; Nostoc punctiforme PACC8646 – AY466131; Nostoc linckia PACC5085 - AY466120; Anabaena variabilis ATCC29413 - NC 007413; Scytonema hofmanni PCC7110 - AY768469; Aphanizomenon TR183 - AY036900; Aphanizomenon KAC15 - AF364339; Tolypothrix PCC7601 - AY768470; Calothrix PCC7601 - X06084; Planktothrix PCC7811 - AY768471; Planktothrix FPI - AF212923; Fischerella – M75599). A árvore filogenética foi enraizada usando como grupo externo uma seqüência de nucleotídeos retirada do GenBank, referente ao operon da ficocianina existente na cianobactéria Gloeobacter violaceus PCC7421 (NC_005125). Nessa análise filogenética observa-se que as linhagens pertencentes à ordem Chroococcales (gêneros de Microcystis e Radiocystis) formaram um agrupamento monofilético numa reamostragem de 100%, com exceção da Sphaerocavum brasiliensis SPC484, a qual ficou num clado formado por oito

linhagens de diferentes gêneros cujas seqüências de cpcBA-IGS são inéditas. Um clado contendo somente as seqüências Gloeotrichia UFV-B2 e Tolypothrix PCC76010 (AY768470) foi formado numa reamostragem de 100%, sendo que as seqüências dessas duas linhagens apresentaram alta identidade (99%) na análise BLAST. As següências de Microchaete investiens CENA64 e Calothrix PCC7601 (X06084) que também mostraram alta identidade (98%) entre elas também formaram um único clado numa reamostragem de 100%. Algumas das seqüências de *cpc*BA-IGS da ordem Nostocales e Stigonematales agruparam-se dentro de um clado, apesar das distintas diferenças morfológicas, tal como filamentos ramificados. Esse resultado confirma o agrupamento monofilético das cianobactérias heterocitadas conforme já observado anteriormente (FIORE et al., 2005; LYRA et al., 2001; WILMOTTE, 1994). Dentro desse clado, as linhagens de Fischerella CENA62, Fischerella CENA63 e Fischerella CENA19 ficaram agrupadas numa reamostragem de 100%, sendo que na análise BLAST, elas não mostraram identidade com outras següências depositadas no banco de dados. As sequências pertencentes à ordem Oscillatoriales (Geitlerinema splendidum SPC923, Planktothrix FP1, Planktothrix mougeotti SPC788 e Planktothrix PCC7811) formaram um agrupamento monofilético numa reamostragem de 80%.

Um agrupamento único e separado dos demais numa reamostragem de 100% foi formado com uma mistura de algumas linhagens pertencentes às ordens Chroococcales, Nostocales e Stigonematales. Todas essas seqüências não mostraram nenhuma identidade com as depositadas no GenBank, conforme já mencionado anteriormente. Análises adicionais, utilizando seqüências de RNAr 16S, possivelmente poderão contribuir para esclarecer a posição dessas linhagens na filogenia de cianobactérias.



Figura 2. Árvore filogenética baseada na seqüência de *cpc*BA-IGS de cianobactérias. Valores superiores 50% na reamostragem de 1000 árvores são indicados nos clados

4.3 Distribuição de genes de NRPS, PKS e sistemas híbridos em cianobactérias brasileiras

4.3.1 Amplificação por PCR de seqüências de NRPS, PKS e NRPS/PKS

Para estimar o potencial de biossíntese de metabólitos secundários nos táxons de cianobactérias utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados para detecção de genes de NPRS, PKS e híbridos NRPS/PKS. O conjunto de iniciadores (MTF/MTR) usados para amplificar fragmento de NRPS tem como alvo o domínio de adenilação (A) dessas enzimas e produz um fragmento de aproximadamente 1000 pares de bases. A seqüência desse domínio A possui regiões bem conservadas, o que permite que iniciadores degenerados amplifiquem por PCR produtos em todas as linhagens que abrigam genes correspondentes. Neste estudo, fragmentos do domínio A de NRPS putativo foram amplificados com sucesso em 93% (55 de 59) das linhagens analisadas (Figura 3; Tabela 11).



Figura 3. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de NRPS. M- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 1-Microcystis aeruginosa SPC777; 2-Microcystis protocystis SPC697; 3-Microcystis panniformis SPC702; 4-Microcystis botrys SPC759; 5-Sphaerocavum brasiliensis SPC484; 6-Radiocystis fernandoi SPC736; 7-Phormidium sp. SPC767; 8-Geitlerinema splendidum SPC923; 9-Nostoc sp. CENA61; 10-Nostoc sp. CENA 65; 11-Nostoc sp. CENA 73; 12-Nostoc commune UTEX584; 13-Michrochaete investiens CENA64; 14-Fischerella CENA19; 15-Fischerella CENA62; 16-Fischerella CENA63; 17-Fischerella sp. CENA 71; 18-Fischerella sp. CENA 72.

Ordem	Linhagens	NRPS	PKS	NRPS/PKS	Microcistinas	Sideróforos
hroococcales	Microcystis sp. NPJL4	+	+	-	+	-
	Microcystis sp. SPC804	+	+	+	-	+
	Microcystis sp. SPC822	+	-	nd	-	nd
	Microcystis sp. NPLS1	-	-	nd	-	nd
	Microcystis aeruginosa NPJB1	+	+	+	+	-
	Microcystis aeruginosa NPCD1	+	+	-	-	+
	Microcystis aeruginosa SPC777	+	+	-	-	-
	Microcystis novacekii SPC503	+	+	+	-	nd
	Microcystis protocystis SPC697	+	+	+	+	-
	Microcystis panniformis SPC702	+	+	+	-	-
	Microcystis botrys SPC759	+	+	+	+	-
	Microcystis wesenbergii SPC761	+	+	+	-	nd
	Sphaerocavum brasiliensis SPC484	+	+	+	+	-
	Radiocystis fernandoi SPC736	+	-	nd	-	nd
	Rhabdoderma cocoide SPC766	-	-	nd	-	nd
	Synechococcus sp. PCC7942	+	+	+	-	-
	Synechococcus nidulans CENA75	+	-	nd	-	nd
Oscillatoriales	Oscillatoria quadripunctulata NPDF-2	+	+	+	-	-
	Oscillatoria quadripunctulata NPRG-1	+	+	+	-	+
	Pseudanabaena galeata NPLB5	+	-	nd	-	nd
	Pseudanabaena galeata SPC772	+	-	nd	-	nd

Tabela 11 – Distribuição de genes de NRPS, PKS e híbrido NRPS/PKS em cianobactérias brasileiras e produção de microcistinas e de sideróforos.

Continua

Continuação

Ordem	Linhagens	NRPS	PKS	NRPS/PKS	Microcistinas	Sideróforos
Oscillatoriales	Pseudanabaena mucicola SPC782	+	+	+	-	-
	Phormidium autumnale UTEX1580	+	+	+	-	+
	Phormidium sp. SPC767	+	+	+	-	-
	Pseudophormidium sp. CENA76	+	+	+	+	nd
	Planktothrix agardhii SPC205	+	+	+	-	nd
	Planktothrix mougeotii SPC788	+	+	+	-	nd
	Geitlerinema sp. UFV-01	-	+	nd	-	nd
	Geitlerinema splendidum SPC923	+	+	+	-	-
	Liminothrix sp. CENA74	+	+	+	+	nd
Nostocales	Nostoc sp. CENA18	+	+	+	-	-
	Nostoc sp. CENA21	+	+	+	-	+
	Nostoc sp. CENA61	+	+	+	-	-
	Nostoc sp. CENA65	+	+	+	+	nd
	Nostoc sp. CENA66	+	+	+	+	nd
	Nostoc sp. CENA68	+	-	nd	-	nd
	Nostoc sp. CENA73	+	+	+	-	nd
	Nostoc sp. CENA78	+	+	+	+	nd
	Nostoc sp. CENA88	+	+	+	+	nd
	Nostoc sp. CENA89	+	+	+	+	nd
	Nostoc commune UTEX584	+	+	+	-	-
	Trichormus sp. CENA77	+	+	+	+	nd

Conclusão

Ordem	Linhagens	NRPS	PKS	NRPS/PKS	Microcistinas	Sideróforos
Nostocales	Michrochaete investiens CENA64	+	+	-	-	-
	Anabaena flos-aquae UTCC64	+	+	+	-	-
	Aphanizomenon sp. SPC704	+	-	nd	-	nd
	Cylindrospermum sp. CENA33	+	+	+	-	-
	Cylindrospermopsis raciborskii 339-T3	+	+	+	-	nd
	Cylindrospermopsis raciborskii SPC811	+	+	+	-	nd
	Cylindrospermopsis racoborskii SPC570	+	-	nd	-	-
	Cylindrospermopsis raciborskii UFV-P1	+	+	+	+	nd
	Raphidiopsis brookie 338-T2	-	-	nd	-	nd
	Scytonema sp. UFV-E1	+	+	+	+	-
	Tolypothrix sp. UFV-B1	+	+	-	+	nd
	Gloeotrichia sp. UFV-B2	+	+	+	+	nd
Stigonematales	Fischerella sp. CENA19	+	+	+	-	-
	Fischerella sp. CENA62	+	+	+	+	-
	Fischerella sp. CENA63	+	+	+	-	-
	Fischerella sp. CENA71	+	+	+	+	nd
	Fischerella sp. CENA72	+	+	+	+	nd

(+) presença; (-) ausência de amplicons; (nd) não determinado

Dentre as linhagens analisadas pertencentes à ordem Chroococcales, 88% (15 de 17) apresentaram o fragmento esperado de 1000 pares de bases. Esse mesmo tamanho de fragmento foi encontrado em 92% (12 de 13) de linhagens da ordem Oscillatoriales. As cianobactérias das ordens Nostocales e Stigonematales tiveram resultado positivo para a presença de gene de NRPS em 95% (23 de 24) e 100% (5 de 5) de suas linhagens, respectivamente. Somente as cianobactérias Microcystis sp. NPLS1, Rhabdoderma cocoide SPC766, Geitlerinema sp. UFV-01 e Raphidiopsis brookie 338-T2, não apresentaram genes de NRPSs. Esses resultados mostram que genes de NRPS estão distribuídos na maioria das cianobactérias brasileiras estudadas. Grande distribuição desses genes foi também observada em linhagens de cianobactérias da coleção de culturas do Instituto Pasteur, França (CHRISTIANSEN et al., 2001). Esses autores utilizaram o mesmo conjunto de iniciadores (MTF/MTR) deste estudo e detectaram a presença do gene NRPS em 110 (75,35%) linhagens de cianobactérias das 146 testadas. Entre as linhagens pertencentes à ordem Chroococcales, amplicons foram produzidos por 52%, enquanto nas ordens Pleurocapsales e Oscillatoriales observou-se os amplicons de interesse em 80% e 64% das linhagens, respectivamente. Todas as linhagens das ordens Nostocales e Stigonematales apresentam resultados positivos para genes de NRPS com exceção de duas linhagens de Nostoc. No presente estudo, todas as Nostocales e Stigonematales analisadas também apresentaram genes de NRPS com exceção da linhagem *Raphidiopsis brookie* 338-T2. Christiansen et al. (2001) também relatam que os genes de NRPSs são raros ou ausentes em linhagens pertencentes ao gênero Synechococcus, pois não observaram produção de amplicons nas oito linhagens examinadas. Entretanto, neste estudo, fragmentos de genes de NRPS foram encontrados nas Synechococcus sp. PCC7942 e Synechococcus nidulans CENA75 (Tabela 11).

Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005) também analisaram a distribuição de NRPS em 24 linhagens de cianobactérias, com representantes das cinco ordens, utilizando iniciadores

degenerados e encontraram amplicons em 54% (13 de 24) delas. Após o seqüenciamento dos fragmentos do domínio A obtidos das cianobactérias, esses autores fizeram análise filogenética das seqüências comparando com seqüências de outros grupos de bactérias e concluíram que existem domínios A comuns a diversas bactérias e outros específicos de cianobactérias. Eles também conseguiram associar algumas das seqüências obtidas com determinados metabólitos descritos na literatura. Dessa mesma forma, o seqüenciamento futuro dos amplicons gerados no presente estudo possivelmente trará informações a respeito do metabólito secundário produzido pelas linhagens brasileiras examinadas.

Outra família de enzimas envolvidas na produção de metabólitos secundários são as PKSs e, portanto, a detecção de genes envolvidos na sua biossíntese pode fornecer informações a respeito de cianobactérias sintetizantes de produtos naturais. Nesse caso, oligonucleotídeos iniciadores de PCR degenerados tendo como alvo regiões da seqüência codificadora do domínio da cetossintase (KS) das PKSs têm sido utilizados. Següências desse domínio KS, amplificadas com o conjunto de iniciadores KSF/KSR, foram encontradas em 81% (48 de 59) das linhagens analisadas (Figuras 4 e 5; Tabela 11). Dentro da ordem Chroococcales, o fragmento de aproximadamente 700 pares de bases foi encontrado em 71% (12 de 17) das linhagens, enquanto que nas demais ordens Oscillatoriales, Nostocales Stigonematales esses valores foram de 85% (11 de 13), 83% (20 de 24) e 100% (5 de 5), respectivamente. Entre as linhagens que não apresentaram amplicons estão: Microcystis sp. SPC822, Microcystis sp. NPLS1, Radiocystis fernandoi SPC736, Rhabdoderma cocoide CENA75. SPC766. *Synechococcus* nidulans Pseudanabaena galeata NPLB5, Pseudanabaena galeata SPC772, Nostoc sp. CENA68, Aphanizomenon sp. SPC704, Cylindrospermopsis raciborskii SPC570 e Raphidiopsis brookie 338-T2.



Figura 4. Gel representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de fragmentos de PKS. M- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 1-Microcystis sp. SPC804; 2-Microcystis sp. NPJL4; 3-Microcystis aeruginosa NPJB1; 4-Microcystis aeruginosa NPCD1; 5-Microcystis aeruginosa SPC777; 6-Microcystis novacekii SPC503; 7-Microcystis protocystis SPC697; 8-Microcystis panniformis SPC702; 9-Microcystis botrys SPC759; 10-Microcystis wesenbergii SPC761; 11-Sphaerocavum brasiliensis SPC484; 12-Rhabdoderma cocoide SPC766; 13-Oscillatoria quadripunctulata NPRG-1; 14-Pseudanabaena mucicola SPC782; 15-Pseudophormidium sp. CENA76; 16-Phormidium sp. SPC767; 17-Planktothrix mougeotii SPC 788; 18-Geitlerinema sp. UFV-01; 19-Geitlerinema splendidum SPC923; 20-Gloeotrichia sp. UFV-B2.



Figura 5. Gel representativo dos produtos de amplificação por PCR de fragmentos de PKS. M- marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 1-Nostoc sp. CENA18; 2-Nostoc sp. CENA21; 3-Nostoc sp. CENA61; 4-Nostoc sp. CENA 65; 5-Nostoc sp. CENA 66; 6-Nostoc commune UTEX584; 7-Trichormus sp. CENA77; 8-Michrochaete investiens CENA64; 9-Cylindrospermum sp. CENA33; 10-Cylindrospermopsis raciborskii UFV-P1; 11-Tolypothrix sp. UFV-B1; 12-Fischerella CENA19; 13-Fischerella CENA62; 14-Fischerella CENA63; 15-Fischerella sp. CENA 71; 16-Fischerella sp. CENA 72. Na análise de genes de PKSs feita por Ehrenreich, Waterbury e Webb (2005), usando 24 linhagens de cianobactérias isoladas de águas dulcícolas e marinhas, com representantes das cinco ordens, seqüências do domínio KS foram encontradas em maior número (92%: 22 de 24) que as do domínio A de NRPSs (54%: 13 de 24). Nas linhagens brasileiras analisadas neste estudo ocorreu o contrário, ou seja, os genes de PKS foram encontrados em menor número (81%: 48 de 59) que os genes de NRPS (93%: 55 de 59).

Sistemas híbridos envolvidos na biossíntese de compostos bioativos são formados por módulos das NRPSs e PKSs ligados covalentemente ou quando esses módulos apresentam-se como proteínas separadas fisicamente trabalhando juntas para formar um único composto. Esses sistemas foram analisados em 47 linhagens de cianobactérias por meio de PCR usando os iniciadores MTF/KSR e foram encontrados em 42 dessas linhagens (89%) (Figuras 6 e 7; Tabela 11). O tamanho aproximado de um módulo é de cerca de 3000 pares de bases ou cerca de 1000 aminoácidos. Desta forma, os fragmentos esperados apresentaram tamanho entre 2000 e 4000 pares de bases. Interessante notar que todas as linhagens que apresentaram resultado positivo para híbrido também continham genes de NRPS e PKS.

4.3.2 Seqüenciamento de PKSs

Para confirmar a identidade das PKSs obtidas por PCR, foram realizados a clonagem e o seqüenciamento dos fragmentos do domínio de cetossintase em oito linhagens de cianobactérias (*Microcystis* sp. SPC804, *Microcystis aeruginosa* NPCD1, *Microcystis novacekii* SPC503, *Nostoc* sp. CENA18, *Nostoc* sp. CENA61, *Michrochaete investiens* CENA64, *Tolypothrix* sp. UFV-B1 e *Fischerella* sp. CENA62). Após a tradução dessas seqüências de nucleotídeos para seqüências de peptídeos, elas foram analisadas no programa "Modular Polyketide Synthase Database" (http://www.nii.res.in/pksdb.html), o qual confirmou ser todas elas seqüências de PKS.



Figura 6. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de NRPS/PKS. M. Marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 1-Microcystis aeruginosa NPJB1; 2-Microcystis aeruginosa NPCD1; 3-Microcystis sp. NPJL4; 4-Microcystis protocystis SPC697; 5-Microcystis panniformis SPC702; 6-Microcystis botrys SPC759; 7-Microcystis aeruginosa SPC777; 8-Microcystis sp. SPC804; 9-Sphaerocavum brasiliensis SPC484; 10-Synechococcus sp. PCC7942; 11-Oscillatoria quadripunctulata NPDF-2; 12-Oscillatoria quadripunctulata NPRG-1; 13-Phormidium autumnale UTEX1580; 14-Phormidium sp. SPC767; 15-Pseudanabaena mucicola SPC782; 16-Geitlerinema splendidum SPC923; 17-Anabaena flos-aquae UTCC64; 18-Cylindrospermum sp. CENA33; 19-Nostoc sp. CENA18; 20-Nostoc sp. CENA21; 21-Nostoc sp. CENA61; 22-Nostoc commune UTEX584; 23-Cylindrospermopsis raciborskii 339-T3; 24-Scytonema sp. UFV-E1; 25-Fischerella CENA19; 26-Fischerella CENA62; 27-Fischerella CENA63.



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Figura 7. Gel de agarose representativo de alguns produtos de amplificação por PCR de NRPS/PKS. M -Marcador molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 1-Nostoc sp. CENA65; 2-Nostoc sp. CENA66; 3-Microcystis wesenbergii SPC761; 4-Gloeotrichia sp. UFV-B2; 5-Michrochaete investiens CENA64; 6-Fischerella sp. CENA71; 7-Fischerella sp. CENA72; 8-Nostoc sp. CENA73; 9-Liminothrix sp. CENA74; 10-Pseudophormidium sp. CENA76; 11-Trichormus sp. CENA77; 12-Planktothrix agardhii SPC205; 13-Planktothrix mougeotii SPC788; 14-Cylindrospermopsis raciborskii SPC811; 15-Tolypothrix sp. UFV-B1; 16-Cylindrospermopsis raciborskii UFV-P1; 17-Nostoc sp.CENA88; 18-Nostoc sp.CENA89; 19-Nostoc sp.CENA78; 20-Branco (sem DNA). Na tentativa de atribuir funções para essas seqüências de PKS e para posteriormente explorar suas potencialidades, inferências filogenéticas entre as seqüências de peptídeos identificadas foram realizadas por meio da construção de uma árvore filogenética (Figura 8). Outras seqüências retiradas do GenBank também foram utilizadas nessa construção (*Microcystis aeruginosa* PCC7806 – AAF00959; *Leptolyngbya* PCC7410 – AAX44116; *Tolypothrix* PCC7601 – AAX44128; *Cyanobacterium* HPC7 – AAU93836; *Cyanobacterium* HPC31 – AAU93834; *Anabaena variabilis* ATCC29413 – YP324603; *Anabaena* 90 – AA062584; *Scytonema* PCC7110 – AAX44132; *Nodularia spumigena* NSOR10 – AA064405; *Nostoc* PCC7120 – BAB78014; *Nostoc punctiforme* PCC73102 – ZP00110105; *Planktothrix agardhii* CYA126/8 – CAD29793; *Lyngbya majuscula* 19L – AAT70105; *Gloeothece* PCC6909 – AAX44105; *Oscillatoria sancta* PCC7515 – AAX44135). Essa árvore foi enraizada usando como grupo externo uma seqüência de peptídeo retirada do GenBank, referente ao gene PKS da bactéria *Streptomyces venezuelae* Pikal (AAC69329).

Nessa filogenia de domínios de KS, um agrupamento foi formado com linhagens produtoras de toxinas numa reamostragem de 100%. A linhagem *Fischerella* CENA62 está incluída nesse agrupamento que também contém as cianobactérias *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Planktothrix agardhii* CYA126/8, *Anabaena* 90 e *Nodularia spumigena* NSOR10. Nesse agrupamento, *Nodularia spumigena* NSOR10, produtora da toxina nodularina, formou um subclado com *Anabaena* 90, linhagem produtora da toxina microcistina, numa reamostragem de 88%. Estudos têm mostrado que nodularinas e microcistinas são sintetizadas por NRPS, PKS e sistema híbrido NRPS/PKS (CHRISTIANSEN et al., 2003; MOORE et al., 1991; RINEHART et al., 1994; TILLET et al., 2000) e, de acordo com Moffitt e Neilan (2004), a estrutura da nodularina é similar a da microcistina. Os autores propõem que a sintetase de nodularina tem sua origem evolutiva a partir da sintetase de microcistina. O gene para síntese de microcistina possui dois aminoácidos que não estão presentes na estrutura da nodularina. Eventos de mutação, recombinação e deleção podem ter ocorrido

durante o processo evolutivo e dois aminoácidos presentes na sintetase de microcistina perderam-se originando a nodularina (MOFFITT; NEILAN, 2004). Desta forma, as espécies produtoras de hepatotoxinas (microcistinas e nodularinas) são intimamente relacionadas. Outro subclado foi formado pelas linhagens Planktothrix agardhii CYA126/8 e Microcystis aeruginosa PCC7806 numa reamostragem de 78%, sendo que ambas sintetizam a hepatotoxina microcistina. Os gêneros de cianobactérias conhecidos por sintetizar essa toxina são Microcystis, Planktothrix, Oscillatoria, Anabaena, Nostoc, Anabaenopsis, Hapalosiphon, Phormidium, Radiocystis (JUNGBLUT; NEILAN, 2006; LOMBARDO et al., 2006; SIVONEN; JONES, 1999). Até o momento, o gênero Fischerella nunca foi relatado como produtor de microcistinas, entretanto, a linhagem Fischerella sp. CENA62 agrupou-se com as demais linhagens tóxicas. Este estudo mostra que essa linhagem, além de apresentar gene de PKS, também possui gene de NRPS e híbrido NRPS/PKS, sendo que o ensaio imunoenzimático ELISA também identificou essa linhagem como produtora de microcistina (Tabela 11). Caso a biossíntese de microcistina pela Fischerella CENA62 seja realmente comprovada, este será o primeiro relato da presença dessa toxina nesse gênero de cianobactéria.

Outro agrupamento interessante foi o formado pelas seqüências de KSs da *Microcystis aeruginosa* NPCD1 e da *Nostoc* PCC7120 numa reamostragem de 100%. A *Nostoc* PCC7120 é uma linhagem conhecida pela capacidade de sintetizar sideróforos (KANEKO et al., 2001). A *Microcystis aeruginosa* NPCD1 não produz a toxina microcistina, no entanto, neste estudo ela apresenta genes de NRPS e PKS, os quais podem estar envolvidos com a síntese de sideróforos ou outros peptídeos. Um forte indício disso é o resultado positivo dessa linhagem no teste de sideróforo. Entretanto, as seqüências de KSs dessas duas linhagens estão proximamente relacionadas com as da *Lyngbya majuscula* 19L, a qual é conhecida pela produção de barbamida, composto que apresenta atividade molucicida (ORJALA; GERWICK, 1996).





Embora as outras seqüências de KS obtidas neste estudo tenham se inserido em clados dentro da árvore construída, fica difícil sugerir funções devido à escassez de informações de seqüências de PKS envolvidas com a síntese de produtos naturais.

4.4 Produção de microcistinas

O ensaio imunológico ELISA realizado com todas as linhagens selecionadas identificou a produção de microcistinas do tipo LR ou RR ou YR ou nodularina nas amostras que possuem concentração (µg/L) maior que 0,1. Neste teste as toxinas ligam-se a anticorpos policionais. A presença da toxina foi detectada em 34% (20 de 59) das espécies analisadas (Tabela 11).

Entre as linhagens pertencentes à ordem Chroococcales, 24% (5 de 17) apresentaram produção de microcistinas. Nas ordens Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales a produção foi detectada em 15% (2 de 13), 42% (10 de 24) e 60% (3 de 5), respectivamente.

Até o momento, todos os operons identificados como envolvidos com a síntese de microcistinas e nodularinas, possuem genes que codificam para as enzimas NRPS, PKS e sistemas híbridos NRPS/PKS (CHRISTIANSEN et al., 2003; MOFFITT; NEILAN, 2001; NISHIZAWA et al., 2000; ROUHIAINEN et al., 2004; TILLET et al., 2000). Neste estudo, em todas as linhagens que apresentaram resultados positivos para a produção de microcistinas, os genes de NRPS, PKS e híbrido NRPS/PKS foram encontrados com exceção das linhagens *Microcystis* NPJL4 e *Tolypothrix* UFV-B1, nas quais o sistema híbrido não foi detectado. Maiores estudos são necessários para confirmar se nessas cianobactérias a síntese de microcistinas não envolve o sistema híbrido, ou se essas amplificações por PCR necessitam ser mais otimizadas.

Em 39 linhagens a produção de microcistinas não foi detectada, mas os genes de NRPS e/ou PKS e/ou híbridos NRPS/PKS foram identificados, o que sugere que elas produzem outros tipos de metabólitos e possivelmente muitos ainda não descritos. Assim, o presente estudo abre caminhos para muitas outras pesquisas futuras. Dentre as 59 linhagens examinadas somente a *Microcystis* sp. NPLS1, *Rhabdoderma cocoide* SPC766, *Raphidiopsis brookie* 338-T2 não apresentaram produção de toxinas e os genes estudados não foram encontrados.

4.5 Produção de sideróforos

Atualmente o método mais comum para detecção de produção de sideróforos por microrganismos é o desenvolvido por Schwyn e Neilands (1997), denominado como método universal. Essa análise utiliza o cromoazurol S em complexo com Fe³⁺, onde a atuação do sideróforo está no seqüestro do ferro complexado, sendo o ferro removido da molécula CAS-Fe, acarretando mudança da cor da solução de azul para amarelo (reações positivas).

A solução de CAS pode ser usada para testes quantitativos em meio líquido ou qualitativo em meio sólido (SCHWYN; NEILANDS, 1997). Atualmente foram descritos 2 métodos modificados a partir do de Schwyn e Neilands (1997) onde pode-se quantificar o composto através de equivalência usando-se um padrão (MILAGRES et al., 1999; SHIN et al., 2001). O método desenvolvido por Milagres et al. (1999) inclui a detecção de bactérias Gram-positivas e fungos, enquanto que o de Shin et al. (2001) consegue quantificar o agente quelante usando-se desferioxamina como padrão para hidroxamatos.

Cianobactérias são bactérias fastidiosas e meio de cultivo para crescimento contém muitos sais, porém esses meios de cultivo, como AA, ASM-1 e BG-11 não interferem na detecção de sideróforos.

Foram analisadas 28 linhagens de cianobactérias para produção de sideróforos, entre estas, 5 (17,85%) apresentaram resultado positivo. A produção de sideróforos foi detectada em *Microcystis* sp SPC804, *Microcystis aeruginosa* NPCD1, *Oscillatoria quadripunctulata*

NPRG1, *Phormidium autumnale* UTEX1580 e *Nostoc* sp. CENA21. A Tabela 11 apresenta a produção de sideróforos por cianobactérias nas placas contendo CAS-Fe-agar.

O método universal de Schwyn e Neilands (1997) foi usado para a detecção de produção de sideróforos por cianobactérias, porém devido ao meio de cultivo (MM9, deficiente em ferro) utilizado para esta análise não ser o adequado para as cianobactérias, foi desenvolvido a partir do método universal, uma metodologia para a detecção de sideróforos em cianobactérias. Assim, um procedimento de inclusão de uma faixa de meio sólido contendo CAS-Fe-agar nas placas para separar os meios de cultivo específicos para cada cianobactéria, apesar da redução do crescimento bacteriano, não apresentou inibição. As



Figura 8. Produção de sideróforos por cianobactérias. Placas contendo CAS-Agar e meios de cultivo para cianobactérias inoculadas com: A-*Nostoc* sp. CENA21; B-*Phormidium autumnale* UTEX1580; C-Oscillatoria quadripunctulata NPRG-1.

Essas linhagens produtoras de sideróforos apresentaram genes de NRPS e PKS híbridos, com exceção da linhagem NPCD1, que apresentou os genes NRPS e PKS separadamente. A produção de microcistinas e nodularinas não foi detectada pelo teste ELISA. A presença desses genes nessas espécies certamente está relacionada com a síntese de sideróforos.
5 CONCLUSÕES

Vinte e cinco novas seqüências de *cpc*BA-IGS pertencentes a diferentes linhagens de cianobactérias, com representantes das ordens Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales foram geradas neste estudo. Várias dessas seqüências não tiveram identidade com seqüências descritas anteriormente, indicando que são inéditas dentro do grupo de cianobactérias. Essas seqüências serão depositadas em bancos de dados públicos e além de contribuirem para aumentar as informações sobre cianobactérias brasileiras, também irão possibilitar a construção de novos oligonucleotídeos iniciadores por meio da identificação de seqüências conservadas entre um maior número de gênero e/ou espécie de cianobactérias, o que acarretará maior facilidade para amplificar essas seqüências por PCR.

Na análise filogenética as cianobactérias da ordem Nostocales formaram um grupo monofilético com as da ordem Stigonematales confirmando estudos anteriores. Essas informações geradas são dados importantes que, possivelmente, poderão contribuir para a discussão em andamento entre os taxonomistas sobre a unificação dessas duas ordens.

Nesta pesquisa foi confirmado o notável potencial das cianobactérias para a produção de produtos naturais. Verificou-se que os genes de NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS estão amplamente distribuídos nas linhagens de cianobactérias brasileiras. A técnica de PCR juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores degenerados constituíram uma eficiente estratégia para detecção desses genes e possíveis produtores de metabólitos secundários dentro de uma ampla diversidade desses microrganismos. A análise filogenética de seqüências do domínio de KS das PKSs produziu resultados que permitiram verificar a relação entre a presença desses genes e a produção de compostos conhecidos, como microcistinas e sideróforos (i.e. *Microcystis aeruginosa* NPCD1 e *Fischerella* CENA62). Concluiu-se também que na maioria das cianobactérias potencialmente produtoras de microcistinas os

genes de híbridos NRPS/PKS foram detectados, enquanto que a síntese de sideróforos foi detectada em linhagens que apresentaram pelo menos um dos genes estudados. Os dados apresentados aqui destacam a necessidade de estudos futuros mais aprofundados para cada uma das linhagens, no sentido de definir o elo entre a ecologia de cianobactérias, os fatores que norteiam a diversificação e a manutenção de genes de NRPS e de PKS, e o papel fisiológico dos compostos produzidos.

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, 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. 1 - Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v.38/39, p.291-302, 1985.

_____. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. Algological Studies, Stuttgart, v.50/53, p.327-472, 1988.

_____. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5 - Stigonematales. Algological Studies, Stuttgart, v.59, p.1-73, 1990.

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

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

BARKER, G.L.A.; HAYES, P.K.; O'MAHONY, S.L.; VACHARAPIYASOPHON, P.; WALSBY, A.E. A molecular and phenotypic analysis of *Nodularia* (Cyanobacteria) from the Baltic Sea. Journal of Phycology, Baltimore, v.35, p.931-937, 1999.

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

BERGSLAND, K.J.; HASELKORN, R. Evolutionary relationship among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. Journal of Bacteriology, Baltimore, v.173, p.3446-3455, 1991.

BEYER, S.; KUNZE, B.; SILAKOWSKI, B.; MÜLLER, R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the 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.

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

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

BOLCH, C.J.S.; BLACKBURN, S.I.; NEILAN, B.A.; GREWE, P.M. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpc*BA intergenic spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, Baltimore, 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, 721p.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-3, p.323-381, 1886.

_____. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-4, p.343-373, 1886.

_____. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-5, p.51-129, 1887.

_____. Revision des Nostocacées Heterocystées. Annales des Sciences Naturelles - Botanique, Paris, v.VII-7, p.177-262, 1888.

BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce. Initiation a la systematique. III. Les algues bleues et rouges. Paris: N. Bouhée, 1970. 512p.

BROCK, T.D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. **Science**, Washington, v.179, p.480-483, 1973.

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

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

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

CANNEL, R.J.P. Algae as a source of biologically active products. **Pesticide Science**, London, v.39, p.147-153, 1993.

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

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.R.; GORHAM, P.R.; HARADA, K.-I.; YU, M.-J.; KRISHNAMURTHY, T.; MOORE, R.E.;

RINEHART, K.L.; RUNNEGAR, M.T.C.; SKULBERG, O.M., WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, Oxford, v.26, p.971-973, 1988.

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

CASTENHOLZ, R.W. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. **The biology of blue-green algae.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1973. p.379-414.

CASTENHOLZ, R.W. WATERBURY, J.B. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltmore: Williams & Wilkins, 1989. v.3, p.1710-1799.

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.

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

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

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

COHN, F. Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte mikroskopischer Algen und Pilze. **Nova Acta Academiae Leopoldino-Carolinae**, v.24, p.103-256, 1853.

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

DESIKACHARY, T.V. **Cyanophyta**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research Monographs on Algae, 1959. 686p.

DESIKACHARY, T.V. Status of classical taxonomy. In: CARR, N.G.; WHITTON, B.A. **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell, 1973. p.473-486.

DILLON, J.C.; PHUC, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. World Review of Nutrition and Dietetics, London, v.77, p.32-46, 1995.

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

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

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

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

DROUET, F. **Revision of the classification of the Oscillatoriaceae**. Philadelphia: Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1968. 370p. (Monograph, 15).

_____. Revision of the *Nostocaceae* with constricted trichomes. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Weinheim v.57, p.1-258, 1978.

_____. Revision of the *Nostocaceae* with cylindrical trichomes. New York: Hafner Press, 1973. 292p.

_____. Revision of the *Stigonemataceae* with a summary of the classification of the bluegreen algae. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Weinheim, v.66, p.1-221, 1981.

DROUET, F.; DAILY, W.A. **Revision of the coccoid Myxophyceae**. Indianapolis: Department of Botany, Butler University, 1956. 218p. (Botanical Studies, 12).

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

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

ELENKIN, A.A.; GOLLERBAKH, M.M. **Sinezelenye vodorosli SSSR.** Monografiia presnovodnykh i nazemnykh Cyanophyceae, obnaruzhennykh v predelakh URSS. Moskva: Izd-vo Akademii nauk SSSR, 1936-1949.

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

ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D.H.; FIORE, M.F.; VON DÖHREN, H.; TSAI, S.M.; NEILAN, B.A. Algicide production by the filamentous

cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.16, p.237-243, 2004a.

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

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

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

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.T. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**, New York, v.39, p.5017-5026, 2005.

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

FRITSCH, F.E. **The structure and reproduction of algae**. Cambridge: Cambridge University Press, 1945. v.2, 939p.

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

GIOVANNONI, S.J.; TURNER, S.; OLSEN, G.J.; BARNS, S.; LANE, D.J.; PACE, N.R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.170, p.3584-3592, 1988.

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

GOMONT, M. Monographie des Oscillariées. **Annales des Sciences Naturelles - 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.

GORHAM, P.R.; McLAHLAN, J.R.; HAMMER, V.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb. Verhandlungen der Internationalen Vereiningung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie, Stuttgart, v.15, p.796-804, 1964.

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

HALL, T. **BioEdit** – version 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001. 192p.

HARADA, K.-I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; OISHI, S.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR on the cyanobacterium (blue-green algae). **Toxicon**, Oxford, v.28, p.55-64, 1990.

HASELKORN, R.; BUIKEMA, W.J. Nitrogen fixation in cyanobacteria. In: STACEY, G., BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman e Hall, 1992. p.166-190.

82

HERDMAN, M.; JANVIER, M.; WATERBURY, J.B.; RIPPKA, R.; STANIER R.Y.; MANDEL, M. Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, Reading, v.111, p.63-71, 1979.

HERDMAN, M.; RIPPKA, R.; STANIER, R.Y. Genome size of cyanobacteria. Journal of General Microbiology, Reading, v.111, p.73-85, 1979.

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.

HOLLERBACH, M.M.; KOSINSKAJA, E.K.; POLJANSKIJ, V.I. Sinezelenye vodorosli. [Blue-green algae]. Izd. "Sovetskaja nauka". **Opredelitel' presnovodnych vodoroslej SSSR**, Moskva, v.2, p.1-652, 1953.

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

JUNGBLUT, A.-D.; NEILAN, B.A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin,synthethase genes in three orders of cianobacteria. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.185, p.107-114, 2006.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C.P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **DNA Research**, Tokyo, v.8, p.205–213, 2001.

KATZ, L. Manipulation of modular polyketide syntheses. Chemical Reviews, Baltimore, v.97, p.2557-2575, 1997.

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

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

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fischer, 1999. v.19/1, p.1-548.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2 - Chroococcales. Algological Studies, Stuttgart, v.43, p.157-226, 1986.

_____. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4 - Nostocales. Algological Studies, Stuttgart, v.56, p.247-345, 1989.

KONDO, R.; YOSHIDA, T.; YUKI, Y.; HIROISHI, S. DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 50, p.767-770, 2000.

KONDRATEVA, N.V. Cyanophyta. Vid. "Naukova dumka". Vyznacnik Prisnovodnich Vodorostej Ukraijnskov RSR, Kiev, v.1, p.1-524, 1968.

KONSTANTINIDIS, K.T.; TIEDJE, J.M. Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.101, p.3160-3165, 2004.

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.

LAAMANEN, M.J.; GUGGER, M.F.; LEHTIMÄKI, J.M.; HAUKKA, K.; SIVONEN, K. Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (Cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.67, p.4638-4647, 2001.

LACHANCE, M.A. Genetic reladness of heterocystous cyanobacteria by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid reassociation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.31, p.139-147, 1981.

LEHTIMÄKI, J.; LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; SUNDMAN, P.; ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SALKINOJA-SALONEN, M.; SIVONEN, K. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.50, p.1043-1053, 2000.

LOMBARDO, M.; PINTO, F.C.; VIEIRA, J.M.S.; HONDA, R.Y.; PIMENTA, A.M.; BEMQUERER, M.P.; CARVALHO, L.R.; KIYOTA, S. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis fernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria): a Brazilian toxic cyanobacterium. **Toxicon**, Oxford, v.47, p.560-566, 2006.

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

LYRA, C.; HANTULA, J.; VAINIO, E.; RAPALA, J.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Characterization of Cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.168, p.176-184, 1997.

LYRA, C.; SUOMALAINEN, S.; GUGGER, M.; VEZIE, C.; SUNDMAN, P.; PAULIN, L.; SIVONEN, K. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon, Microcystis* and *Planktothrix* genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.513-526, 2001.

MANN, N.H.; CARR N.G. **Photosynthetic prokaryotes**. London: Plenum Press, 1992. 275p. (Biotechnology Handbooks, v.6).

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

MAZEL, D.; HOUMARD, J.; CASTETS, A.M.; TANDEAU DE MARSAC, N. Highly repetitive DNA-sequences in cyanobacterial genomes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.172, p.2755-2761, 1990.

MILAGRES, A.M.; MACHUCA, A.; NAPOLEAO, D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.37, p.1-6, 1999.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.196, p.207-214, 2001.

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

_____. 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, Hampshire, v.16, p.134-143, 1996.

MOORE, R.E.; CHEN, J.L.; MOORE, B.S.; PATTERSON, G.M.L.; CARMICHAEL, W.W. Byosynthesis 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.

MUR, L.R.; SKULBERG, O.M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUIS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water**. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon, 1999. Chap.2, p.15-40.

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

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

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

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.

NISHIZAWA, T.; UEDA, A.; ASAYAMA, M.; FUJII, K.; HARADA, K.; OCHI, K.; SHIRAI, M. Polyketide syntethase 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.

ORCUTT, K.M.; RASMUSSEN, U.; WEBB, E.A.; WATERBURY, J.B.; GUNDERSEN, K.; BERGMAN, B. Characterization of *Trichodesmium* spp. by genetic techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.2236-2245, 2002.

ORJALA, J.; GERWICK, W.H. Barbamide, a chlorinated metabolite with molluscicidal activity from the Caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. Journal of Natural **Products**, Pittsburgh, v.59, p.427–430, 1996.

PAGE, R.D.M. TreeView – version 1.6.6. Glasgow: University of Glasgow, 2001.

PALENIK, B. Polymerase evolution and organism evolution. Current Opinion in Genetics& Development, Philadelphia, v.2, p.931-936, 1992.

PATTERSON, G.M.L. Biotechnological applications of cyanobacteria. Journal of Scientific and Industrial Research, New Delhi, v.55, p.669-684, 1996.

PAYNE, S.M. Detection, isolation and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, New York, v.235, p.329-344, 1994.

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

RABELLO, E. **Biossíntese e caracterização de inibidores de fotossíntese produzidos pela cianobactéria** *Fischerella sp.* **CENA 19**. 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RAI, A.N. CRC handbook of symbiotic cyanobacteria. Boca Raton: CRC Press, 1990. 253p.

RINEHART, K.L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B.W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.6, p.159-176, 1994.

RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, New York, v.167, p.28-76, 1988.

RIPPKA, R.; COHEN-BAZIRE, G. The Cyanobacteriales: a legitimate order based on the type strain *Cyanobacterium stanieri*? **Annales de Microbiologie**, Paris, v.134B, p.21-36, 1983.

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.

RIPPKA, R.; HERDMAN. H. **Pasteur culture collection of cyanobacteria catalogue and taxonomic handbook**. Catalogue of strains. Paris: Institute Pasteur, 1992. v.1, 103p.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.B.; STANIER R.Y. Provisional generic assignments for cyanobacteria in pure culture. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. **The prokaryotes**. Berlin: Springer-Verlag, 1981b. p.247-256.

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

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.

SATISH, N.; KRUGMAN, T.; VINOGRADOVA, O.N.; NEVO, E.; KASHI, Y. Genome evolution of the cyanobacterium *Nostoc linckia* under sharp microclimatic divergence at "Evolution Canyon", Israel. **Microbial Ecology**, New York, v.42, p.306-316, 2001.

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

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

_____. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Weinheim, v.112, p.13-32, 1996.

89

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

SHIN, S.H.; LIM, Y.; LEE, S.E.; YANG, N.W.; RHEE, J.H. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.44, p.89-95, 2001.

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

SILVA-STENICO, M.E.; PACHECO, F.T.H.; RODRIGUES, J.L.M.; TSAI, S.M. Growth and siderophore production of Xylella fastidiosa under iron-limited condition. **Microbiological Research**, Amsterdam, v.160, p.429-436, 2005.

SIMPSON, F.B.; NEILANDS, J.B. Siderochromes in cyanophyceae - isolation and characterization of schizokinen from *Anabaena* sp. **Journal of Phycology**, Baltimore, v.12, p.44-48, 1976.

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

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic** cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon, 1999. Chap.3, p.41-111.

SKULBERG, O.M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. **Hydrogen energy system.** Production and utilization of hydrogen and future aspects. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.95-110. (NATO ASI Series E - Applied Sciences, 295).

SMITH, A.J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. **Annales de Microbiologie**, Paris, v.134B, p.93-113, 1983.

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.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.21, p.179-211, 1997.

STALEY, J.L.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N.; HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.3.

STAM, W.T.; HOLLEMAN, H.C. Cultures of *Phormidium*, *Plectonema*, *Lyngbya* and *Synechococcus* (Cyanophyceae) under different conditions: Their growth and morphological variability. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v.26, p.327-342, 1979.

STAM, W.T.; STULP, B.K. New taxonomic methods: DNA-DNA hybridization. **Methods in Enzymology**, New York, v.167, p.125-132, 1988.

STANIER, R. Y. The position of cyanobacterial in the world of phototrophs. **Carlsberg Research Communications**, Copenhagen, v.42, p.77-98, 1977.

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

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

STARMACH, K. Cyanophyta-sinice, Glaucophyta-glaukofity. Flora Slodkowodna Polski, Warszawa, v.2, p.1-807, 1966.

STEWART, W.D.P. Nitrogen fixation. **Botanical Monographs**, Washington, v.9, p.260-278, 1973.

SWOFFORD, D.L. **PAUP***. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

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**, London, v.22, p.4673-4680, 1994.

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

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

TOLEDO, G.; PALENIK, B. *Synechococcus* diversity on the California Current as seen by RNA polymerase (*rpoC1*) gene sequences of isolated strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.4298-4303, 1997.

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

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

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

WATERBURY, J.B.; STANIER, R.Y. Patterns of growth and development in pleurocapsalean cyanobacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v.42, p.2-44, 1978.

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

WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: _____ The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.1-11.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D.A. **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p.1-25.

WILMOTTE, A.M.R.; STAM, W.T. Genetic-relationships among cyanobacterial strains originally designated as *Anacystis nidulans* and some other *Synechococcus* strains. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.130, p.2737-2740, 1984.

WILHELM, S.; TRICK, C.G. Iron-limited growth of cianobactéria: multiple siderophore production is a common response. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v.39, p.1979-1984, 1994.

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.

YADAV, G.; GOKHALE, R.S.; MOHANTY, D. SEARCHPKS: A program for detection and analysis of polyketide synthase domains. **Nucleic Acids Research**, London, v.31, p.3654-3658, 2003.