# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

DIEGO BONALDO GENUÁRIO

Diversidade e atividade funcional de cianobactérias das ilhas Rei George e Deception, Arquipélago Shetland do Sul, Antártica

> Piracicaba 2014

# DIEGO BONALDO GENUÁRIO

Diversidade e atividade funcional de cianobactérias das ilhas Rei George e Deception, Arquipélago Shetland do Sul, Antártica

> Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba 2014 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Genuário, Diego Bonaldo

Diversidade e atividade funcional de cianobactérias das Ilhas Rei George e Deception, Arquipélago Shetland do Sul, Antártica / Diego Bonaldo Genuário; orientador Marli de Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2014. 167 f.: il.

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

1. Biodiversidade 2. Filogenia 3. Fixação de nitrogênio 4. Microbiologia 5. Sequenciamento genético I. Título

CDU 579:574.1

Aos meus pais, Eliana e Moacir, Por terem me propiciado um mundo de possibilidades Pela atenção e carinho dispendidos, decido

> Aos meus irmãos, Luciano e Bruna, pelo apoio e atenção, ofereço

#### **AGRADECIMENTOS**

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudo concedidas.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e ao Programa de Pós-graduação em Ciências pela oportunidade de realização do doutorado.

A Marinha Brasileira pelo suporte logístico para o deslocamento e coleta nas ilhas Rei George e Deception, Península Antártica.

A Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari (IO-USP) pela oportunidade e confiança em integrar-me ao projeto antártico e pela participação na XXVII Operação Antártica Brasileira (OPERANTAR).

Ao Prof. Dr. Carlos Ernesto G. R. Schaefer, Universidade Federal de Viçosa por gentilmente ceder uma de suas vagas na XXIX OPERANTAR.

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai do Lab. de Biologia Celular e Molecular - CENA/USP, pela estrutura do laboratório cedida.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA/Meio Ambiente) e Prof. Dr. Ricardo D. Coletta (FOP-UNICAMP) por disponibilizarem os sequenciadores de DNA.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda (Laboratório de Carbono 14 do CENA/USP) por disponibilizar o microscópio óptico.

A Profa. Célia Leite Sant'Anna pelo constante ensinamento sobre taxonomia de cianobactéria e pela ajuda com as identificações das cianobactérias antárticas.

Ao Prof. Dr. Lucas J. Stal (Royal Netherlands Institute for Sea Research, NIOZ) pela orientação durante o estágio sanduíche em seu laboratório e pelos ensinamentos sobre fixação biológica do nitrogênio.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pela ajuda inicial com as análises independentes de cultivo, por ceder os iniciadores para construção das bibliotecas de rRNA 16S das amostras de biofilme e pela revisão do plano de estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. Pablo Vidal-Torrado e ao Prof. Dr. Raphael M. Beirigo pelas análises físico-químicas das amostras de águas.

Aos doutores Rodrigo Mendes e Rodrigo G. Taketani (EMBRAPA/Meio Ambiente) pelo auxilio na seleção de amostras ambientais a serem sequenciadas.

Ao MSc Joshua A. Halsey e ao Dr. Acácio A. Navarrete pela ajuda com resultados de DGGE.

Aos doutorandos Ademir D. Bigaton e Thiago Gumieri por me inserir no mundo do QIIME.

À Ana Paula Dini Andreote pelas discussões científicas e não científicas e pela acertividade nos momentos de embaraço.

Ao Marcelo G. M. V. Vaz pela amizade, pelas inúmeras discussões científicas e não científicas, pela pronta disponibilidade em ajudar nos momentos de aperto ou não e por cuidar das linhagens antárticas quando da minha ausência.

À Gabriela Machineski pela ajuda com as análises de qPCR e dos dados de sequenciamento.

À Stella T. Lima e Gabriela Machineski pela boa surpresa em conhecê-las na reta final do doutorado e pela convivência agradável nesse curto tempo juntos.

Aos companheiros atuais de laboratório: Danillo A., Karina H. Silva, Bruno Evangelista; e aqueles que passaram e seguiram seus rumos nesses longos anos de permanência do laboratório: Maria Estela S. Stenico, Adriana. S. Lorenzi, Carol S.P. Silva, Carol H., Elaine Crespim.....

Aos companheiros antárticos: Rubens T. D. Duarte, Ana Carolina Araújo, Priscila I. Ushimaru Emanuele Kuhn, Bruno Tinti, Bruno Resck, Adriano Spielmann.

Aos companheiros de trabalho com cianobactérias, Guilherme S. Hentschke, Camila F. S. Malone, Watson A. G. Junior, Fernanda R. Jacinavicius pelo auxílio com as identificações das cianobactérias antárticas e pelos congressos.

Aos companheiros da guest house em Yerseke durante o estágio sanduíche por ter tornado a distância de casa menor. Especialmente, à portuguesa Daniela Clara Cardoso (ora pois), à holandesa Daphne Mermans, à alemã Eva-Maria Zetsche, à lituana Alina Miksiunaite e ao casal italiano Loreta Cornacchia e Francesco Mastrogiacomo.

À. Lucélia Borgo pelos momentos de descontração dentro e fora do ambiente de trabalho.

À Karla N. Marques pela amizade e seus pensamentos positivos mesmo que de longe.

Ao Armando Dias pelo apoio e exemplo de persistência.

Aos funcionários do CENA, especialmente ao Gera, a Marília, Neuda, Sônia, Fábio e Daiane da pósgraduação pela constante ajuda com questões computacionais e burocráticas.

Aos técnicos e funcionários do Royal Netherlands Institute for Sea Research, NIOZ pela recepção a auxílio com questões laboratoriais e burocráticas.

E aqueles que de forma direta ou indireta participaram e contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigado.

#### **RESUMO**

GENUÁRIO, D. B. Diversidade e atividade funcional de cianobactérias das ilhas Rei George e Deception, Arquipélago Shetland do Sul, Antártica. 2014. 167 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

As cianobactérias caracterizam-se como o grupo de micro-organismos fotoautotrófico mais abundante encontrado nas regiões polares. Representantes deste grupo realizam a fotossíntese oxigênica e também podem fixar o nitrogênio atmosférico. A maioria dos levantamentos da comunidade de cianobactérias na Antártica tem sido realizada apenas por meio de observações microscópicas de amostras ambientais. O isolamento de linhagens e consequentes estudos fisiológicos, bem como, análises independentes de cultivo ainda são escassos. Neste estudo a comunidade de cianobactérias de duas ilhas oceânicas da Antártica foi investigada utilizando abordagens moleculares dependentes e independentes de cultivo. O papel ecológico das cianobactérias como fornecedoras de formas assimiláveis de nitrogênio e o potencial genético para biossíntese de produtos naturais também foi avaliado. Sessenta e oito linhagens de cianobactérias foram isoladas a partir de diferentes substratos coletados. Elas pertencem às ordens Chroococcales, Pseudanabaenales, Oscillatoriales e Nostocales, famílias Xenococcaceae. Dermocarpellaceae. Pseudanabaenaceae. Oscillatoriaceae. Nostocaceae, Microchaetaceae e Rivulariaceae. Análises filogenéticas baseadas nas sequências de RNAr 16S dessas cianobactérias revelou a existência de agrupamentos: formado exclusivamente por sequência de linhagem isolada nesse trabalho; composto por sequências antárticas oriundas desse e de outros trabalhos desenvolvidos em outras regiões antárticas; e por sequências originárias de diversas regiões do mundo. Quarenta e uma linhagens apresentaram fragmento do gene nifH, responsável pela codificação do complexo enzimático da nitrogenase, o qual está envolvido na fixação biológica do nitrogênio (FBN). Formas unicelulares (Chroococcales), homocitadas (Pseudanabaenales e Oscillatoriales) e heterocitadas (Nostocales) apresentaram potencial genético para realização da FBN, e 18 delas foram submetidas aos testes de redução de acetileno (ARA) com alta sensibilidade de detecção. Todas as linhagens testadas exibiram alguma atividade em resposta a diferentes concentrações de oxigênio e/ou a luminosidade em diferentes condições de temperatura. Filogeneticamente, as sequências do gene nifH apresentaram três padrões distintos de agrupamento, o que pode estar relacionado aos eventos evolutivos envolvidos na distribuição e ou manutenção deste gene. A presença de genes e ou regiões intergênicas evidenciaram o elevado potencial genético dessas linhagens para sintetizar produtos naturais com interesse biotecnológico. A abundância no número de cópias do gene nifH relacionado às cianobactérias nas amostras de biofilme reforça a importância desse grupo de microorganismos como fornecedor de formas reduzidas de N para o ambiente antártico. A análise da comunidade de cianobactérias por meio do sequenciamento do RNAr 16S de DNA metagenômico evidenciou predominância de UTOs relacionadas às ordens Nostocales, Oscillatoriales e Pseudanabaenales, famílias Pseudanabaenaceae, Phormidiaceae, Nostocaceae e Rivulariaceae. A árvore filogenética contendo as sequências de cianobactérias cultivadas e não-cultivadas mostrou que somente parte da comunidade presente em biofilmes foi acessada por isolamento, indicando a complementariedade entre as duas abordagens utilizadas na análise da comunidade de cianobactérias.

Palavras-chave: Filogenia. RNAr 16S. *nifH*. Cianobactérias cultivadas e não cultivadas. Atividade da nitrogenase. Substâncias com interesse biotecnológico.

#### ABSTRACT

GENUÁRIO, D. B. Diversity and functional activity of cyanobacteria from King George and Deception Islands, South Shetland Archipelago, Antarctica. 2014. 167 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Cyanobacteria are characterized as the most abundant group of photoautotrophic microorganisms found in the polar regions. Members of this group perform oxygenic photosynthesis and many of them can also fix atmospheric nitrogen. Investigations on the cyanobacterial community have been made mainly applying microscopic observations of environmental samples. Cyanobacterial isolation, physiological studies and cultureindependent analyses are scarce. In this study the cyanobacterial community from two oceanic islands in Antarctica was investigated using culture-dependent and independent approaches. Also, the ecological role of this group of microorganisms as nitrogen-fixing organisms and the genetic potential for biosynthesis of natural products were evaluated. Sixty-eight cyanobacterial strains were isolated from different environmental samples. They belong to the Chroococcales, Pseudanabaenales, Oscillatoriales and Nostocales, families orders Xenococcaceae, Dermocarpellaceae, Pseudanabaenaceae, Oscillatoriaceae, Nostocaceae, Microchaetaceae and Rivulariaceae. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA sequences of these cyanobacteria revealed the existence of groups: exclusively formed by sequence of strain isolated in this work; intermixed sequences from this and other studies developed in other Antarctic regions; and sequences originated from different regions of the world. Fortyone cultured strains possess the *nifH* gene fragment encoding the nitrogenase enzyme complex, which is related to the biological nitrogen fixation (BNF). Unicellular (Chroococcales), homocytous (Pseudanabaenales and Oscillatoriales) and heterocytous forms (Nostocales) showed genetic potential for BNF, and 18 of them were subjected to acetylene reduction assay (ARA) coupled with a sensitive laser photoacoustic ethylene detector. All strains tested exhibited some nitrogenase activity in response to different concentrations of oxygen and or irradiance under different temperature conditions. Phylogenetically, the nifH gene sequences showed three distinct grouping patterns that may be related to the evolutionary events involved in the distribution and or maintenance of this gene. The presence of genes and or intergenic regions in these cyanobacterial strains underscores the genetic potential of them to synthesize natural products with biotechnological interest. The abundance of *nifH* gene copies related to cyanobacteria in biofilm samples highlights the importance of this group of microorganisms as suppliers of N reduced forms for Antarctic environment. The analysis of the cyanobacteria community revealed by 16S rRNA sequencing of metagenomic DNA showed a predominance of OTUs related to orders Nostocales, Oscillatoriales and families Pseudanabaenaceae, Phormidiaceae, Pseudanabaenales, Nostocaceae and Rivulariaceae. The phylogenetic tree containing Antarctic sequences from cultivated and uncultivated cyanobacteria showed that only part of this community in biofilms has been accessed by isolation, indicating the complementarity between the two approaches used in the analysis of cyanobacterial community.

Keywords: Phylogeny. 16S rRNA. *nifH*. Cultivated and uncultivated cyanobacteria. Nitrogenase activity. Substances with biotechnological interest.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Biologia de Cianobactérias	15
2.2 Sistemática das cianobactérias	16
2.3 Ambiente Antártico	17
2.4 Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)	19
2.5 Produção de Metabólitos Secundários	22
3 HIPÓTESE	23
4 OBJETIVO	23
4.1 Objetivos específicos	23
5 MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 Coleta	24
5.2 Isolamento de cianobactérias	24
5.3 Análise morfológica	25
5.4 Manutenção das culturas de cianobactérias	25
5.5 Análise molecular dos isolados	25
5.5.1 Extração de DNA	25
5.5.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S	
5.5.3 Amplificação do gene nifH	27
5.5.4 Clonagem	27
5.5.5 Transformação	27
5.5.6 Confirmação da inserção dos fragmentos de interesse	
5.5.7 Extração de DNA plasmidial	29
5.5.8 Sequenciamento	29
5.5.9 Processamento e análise filogenética das seqüências	
5.5.10 Triagem molecular de genes envolvidos na biossíntese de inibidores de protecianotoxinas	ases e 30
5.6 Atividade da nitrogenase em linhagens de cianobactérias	
5.6.1 Cultivo	
5.6.2 Medição da atividade da nitrogenase	
5.6.3 Extração de clorofila a	
3	

5.6.4 Cálculo da atividade específica da nitrogenase	34
5.7 Análises Independentes de Cultivo	34
5.7.1 Coleta e extração de DNA ambiental de amostras de biofilme	34
5.7.2 Análise do perfil da comunidade de cianobactéria nas amostras de biofilme em Ge eletroforese com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE)	el de 38
5.7.3 PCR quantitativo do gene <i>nifH</i> das amostras de biofilme	39
5.7.4 Sequenciamento do gene que codifica para o RNAr de 16S da comunidade bacteri nas amostras de biofilme	ana 40
6 RESULTADOS	43
6.1 Isolamento e análise morfológica das linhagens	43
6.2 Amplificação e seqüenciamento do gene que codifica para o RNAr 16S	57
6.3 Amplificação e seqüenciamento de fragmento do gene <i>nifH</i>	81
6.4 Triagem molecular de substâncias com interesse biotecnológico	91
6.5 Monitoramento contínuo da atividade da nitrogenase	92
6.6 Análises Independentes de Cultivo	103
6.6.1 Coleta e extração de DNA ambiental das amostras de biofilme	103
6.6.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	103
6.6.3 PCR quantitativo do gene <i>nifH</i> nas amostras de biofilme	106
6.6.5 Sequenciamento do gene que codifica para RNAr 16S nas amostras de biofilme	107
7 DISCUSSÃO	115
7.1 Isolamento e caracterização das linhagens de cianobactérias	115
7.2 Caracterização funcional dos isolados	134
7.3 Análises independentes de cultivo	140
8 CONCLUSÃO	145
REFERÊNCIAS	147

# 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os ambientes polares têm recebido atenção mundial, em função de temas relacionados ao aquecimento global. Acredita-se que 50 % da vida na Terra seja procariótica e que o declínio da biodiversidade microbiana seja fortemente influenciado pela mudança climática global. A perda de biodiversidade pode alterar e modificar os papéis ecológicos assumidos pelos micro-organismos bem como inviabilizar a procura de novas substâncias com utilidade para as indústrias fármaco-biotecnológicas. No entanto, o efeito do aumento de temperatura sobre os micro-organismos ainda é incerto, pois pouco se conhece sobre as espécies que habitam regiões extremas como a Antártica. O conhecimento da biodiversidade microbiana da Antártica poderá ser utilizado como indicador de mudanças climáticas a partir do momento que alterações das comunidades endêmicas sejam detectadas. De maneira geral, a diversidade tende a ser menor quanto mais alta a latitude e, em alguns sistemas, os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares chegam a ser exclusivamente formadas por microorganismos, como nos solos minerais dos desertos frios e em porções mais profundas de gelo glacial. Assim, os micro-organismos assumem papel fundamental no transporte de energia e matéria e muitas vezes constituem a base do funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos na Antártica. Além disso, o estudo dos micro-organismos extremófilos traz novos conhecimentos sobre os mecanismos biológicos de adaptação e tolerância, sendo de especial interesse biotecnológico.

Pouco se conhece sobre a diversidade e biogeografia das cianobactérias na Antártica. A maioria dos estudos desenvolvidos nessa região abrange apenas o levantamento taxonômico utilizando amostras ambientais e visualização em microscópio óptico desse grupo de microorganismos. O número reduzido de linhagens de cianobactérias isoladas da região antártica, somada a carência de estudos envolvendo aspectos moleculares desses isolados dificulta uma maior compreensão da filogenia, biodiversidade e potencial para uso biotecnológico das cianobactérias. Assim, fica evidente a necessidade de estudos envolvendo o isolamento de linhagens de cianobactérias, sua identificação morfológica e molecular, bem como a avaliação de atividades funcionais como fixação de  $N_2$  e a investigação do potencial genético de produção de metabólitos secundários. Esse estudo visou estudar a diversidade de cianobactérias colonizadoras do ambiente antártico, avaliar a contribuição desses micro-organismos como fonte de entrada de nitrogênio para este ecossistema e também investigar o potencial genético de produção de metabólitos secundários pelas linhagens isoladas de cianobactérias. A meta foi avançar na geração de conhecimento sobre as populações nativas de cianobactérias fixadoras e não fixadoras de nitrogênio, compreender o papel ecológico destas para o bioma estudado, além da possibilidade de descobrir novos grupos taxonômicos. O sequenciamento dos genes de RNAr 16S e *nifH* fornece informações relacionadas a evolução desse grupo de micro-organismo, proporcionado o enriquecimento do banco de sequências e a elaboração de sistemas de classificação mais robustos para esse grupo de micro-organismos.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Biologia de Cianobactérias

As cianobactérias correspondem a um dos grupos mais bem sucedidos e diversos do ponto de vista metabólico, morfológico e ecológico dentro do domínio *Bacteria* (WHITTON; POTTS, 2000; WILMOTTE, 1994). Esses micro-organismos possuem estrutura celular típica de células gram-negativas (BONEN; DOOLITTLE, 1978) e como modo nutricional dominante, o autotrófico. Seu aparato fotossintético é similar ao das plantas e algas, no qual a água é o agente redutor e o oxigênio é liberado (CASTENHOLZ, 1989; SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). Suas células contêm clorofila *a* e outros pigmentos acessórios característicos (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina), os quais estão organizados em tilacóides, e são responsáveis pela coloração verde-azulada, típica dos membros deste grupo (GLAZER, 1981; TANDEAU DE MARSAC, 1977).

Morfologicamente, as cianobactérias exibem grande variedade de formas, arranjos e tamanhos. Podem apresentar-se em formas mais simples, como os cocos ou bacilo unicelulares, até formas mais complexas como as filamentosas multicelulares ramificadas (FLORES; HERRERO, 2010; WHITTON; POTTS, 2000). As cianobactérias não possuem flagelos, mas algumas espécies filamentosas podem apresentar movimento deslizante, movendo-se em superfícies úmidas (DREWS, 1973). Apesar de serem organismos microscópicos, com tamanho de célula variando de 1 a 100 µm, muitas vezes podem ser observados a olho nu nos locais de ocorrência, pois formam densos tapetes ou mantos, contendo também algumas outras espécies bacterianas (BROCK, 1973).

Evidências geológicas, paleontológicas e geoquímicas indicam que as cianobactérias existam há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 1996), sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva (SCHOPF; WALTER, 1982). Em geral, necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Apesar de sua natureza tipicamente fotossintética aeróbica, algumas espécies são heterotróficas facultativas, crescem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELLAR, 1997). Outras, porém, em condições anaeróbicas, utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986). Essa longa história evolutiva

reflete em uma grande diversidade metabólica, favorecendo sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também sua ocorrência nos mais diversos ambientes (SCHOPF, 1994). Elas estão presentes em todos os tipos de ecossistemas iluminados (exceto em ambientes com pH muito baixo), inclusive em ambientes extremos, como areia e rocha desérticas, águas termais ("hot springs") e lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1973; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). Entretanto, ambientes de água doce são os mais propícios para o crescimento das cianobactérias, pois a maioria das espécies se desenvolve melhor em água com pH neutro-alcalino (pH 6-9), temperatura aproximada de 25 °C e elevada concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999; RIPPKA, 1988).

#### 2.2 Sistemática das cianobactérias

A sistemática do grupo das cianobactérias tem sido tema recorrente nas discussões entre botânicos e microbiologistas. Segundo os botânicos, a presença de clorofila *a* e a liberação de O<sub>2</sub> a partir do processo fotossintético são elementos que caracterizam fisiologicamente as cianobactérias como fotoautotrófica aeróbias, e constituem argumentos significativos para a inclusão dessas junto ao grupo das algas eucarióticas (BOLD; WYNNE, 1985) e sua inserção no Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (MCNEILL et al., 2012). Para os microbiologistas, a organização da estrutura, a composição da parede celular e estrutura dos ribossomos, revelam a natureza procariótica de suas células, e justificam o posicionamento desse grupo junto às bactérias gram-negativas (BONEN; DOOLITTLE, 1978; RIPPKA, 1988; STANIER et al., 1971; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) e inserção do grupo no Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana (BOONE; CASTENHOLZ, 2001). Nesse sentido, os sistemas de classificação propostos por Anagnostidis e Komárek (1985; 1990), Komárek e Anagnostidis (1986; 1999; 2005) e o Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (BOONE; CASTENHOLZ, 2001) têm sido empregados conforme as normas botânicas e microbiológicas, respectivamente.

Atualmente, a classificação taxonômica das cianobactérias tem sofrido modificações constantes como consequência de inúmeras reviões de grupos desse filo de micro-organismos. Existe uma tendência geral de que abordagens moleculares devam ser aplicadas na tentativa de solucionar o problema da sistemática desse grupo (TURNER, 1997; WILMOTTE, 1994). No entanto, algumas vezes, a classificação das cianobactérias é dificultada por somente haver

informações morfológicas dos organismos em questão (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; WILMOTTE; HERDMAN, 2001). De outro modo, há casos, em que existem somente sequências gênicas disponíveis nos bancos de dados públicos sem qualquer menção a morfologia dos organismos (CASTENHOLZ et al., 2001), possibilitada principalmente pelos estudos de organismos não-cultivados de amostras ambientais. Nesse sentido, uma proposta mais recente para a classificação de cianobactérias elaborada por Hoffmann, Komárek e Kaštovscký (2005) recomenda uma classificação unificada e baseada na morfologia e anatomia celular somada às relações filogenéticas (principalmente sequências de RNAr 16S) dos grupos de cianobactérias. Essa última é consequência do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as quais permitem a identificação e classificação mais rápida e precisa de micro-organismos (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999). Assim, o emprego de iniciadores específicos para acessar genes ou regiões específicas em cianobactérias, como rrs (RNAr 16S) (BONEN; DOOLITTLE, 1975), rpoC1 (FERGUSSON; SAINT, 2000), nifH (ZEHR, MELLON; HIORNS, 1997) e cpcBA-IGS (BOLCH et al., 1996; NEILAN; JACOBS, GOODMAN, 1995), tem auxiliado na organização da sistemática desse grupo e revelado sua grande diversidade em muitos ecossistemas. Nos estudos envolvendo a caracterização molecular e filogenia de cianobactérias, o gene RNAr 16S tem sido o mais amplamente utilizado e o que apresenta maior número de sequências depositadas nos bancos de dados públicos, como o GenBank.

#### 2.3 Ambiente Antártico

A Antártica encontra-se isolada geograficamente dos demais continentes pela distância e pela existência de correntes oceanográficas (VINCENT, 2000). É uma região caracterizada por condições ambientais extremas e pela ocorrência de diferentes ecossistemas. Nesses ecossistemas podem ocorrer grandes variações de temperatura e salinidade, dessecação, escassez de nutrientes, alta incidência de radiação ultravioleta alternada com longos períodos de ausência de luz, mudanças climáticas acentuadas e descontínuas, além dos ciclos de congelamento e degelo, que influenciam a distribuição das massas de água no Oceano Austral e geram alterações locais de clima (CLARKE, 2003; VINCENT, 2000; WYNN-WILLIAMS, 1996). A variedade de ambientes existentes na Antártica é grande e pode ser exemplificada pelos solos minerais, ornitogênicos ou aquecidos geotermicamente, como os encontrados na Ilha Deception (Ilhas Shetland do Sul), pelo gelo glacial, marinho ou de água doce, pelo *permafrost*, pelos sistemas endolíticos, pelos ecossistemas marinhos (bentônico e pelágico), pelos lagos com salinidade variada, cobertos perenemente ou sazonalmente por gelo, entre outros (VINCENT, 2000; VINCENT; MUELLER; BONILLA, 2004). Os lagos antárticos permaneçem cobertos de gelo por no mínimo algumas semanas por ano, no entanto, os principais processos microbianos como a fotossíntese, a heterotrofia e a ciclagem de nutrientes ocorrem nesses ambientes (VINCENT, 1988; VINCENT; MUELLER; BONILLA, 2004). A presença de gelo na superfície desses lagos tem influência decisiva sobre suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornando-os distintos das águas continentais em latitudes não polares. O gelo controla a hidrodinâmica, o regime de luz, evita a turbulência causada pelo vento, reduz flutuações de temperatura, restringe a troca gasosa com a atmosfera, sendo responsável também pela formação de gradientes de salinidade durante o período de degelo/derretimento e pela conseqüente entrada de água dos riachos de degelo (COWAN; TOW, 2004; VINCENT, 1988).

Outros fatores importantes para as comunidades microbianas são a salinidade, a temperatura e a estratificação química, a qual permite a formação de gradientes de nutrientes orgânicos e inorgânicos, criando nichos específicos ocupados por diferentes grupos de microorganismos (VINCENT, 1988). A deposição de sedimento também se constitui em um dos principais reguladores da atividade microbiana nos lagos de alta latitude e o aprisionamento das partículas pelos biofilmes, principalmente os de cianobactérias, os quais resultam em estruturas semelhantes aos estromatólitos (COWAN; TOW, 2004). Dentre os microorganismos encontrados nas regiões polares, o grupo fotoautotrófico das cianobactérias é o mais abundante (ELSTER, 2002; VINCENT, 2000) e estas estão adaptadas ao congelamento prolongado (DAVEY, 1989; SABACKA; ELSTER, 2006), podendo até mesmo apresentar atividade metabólica a -20 °C (VINCENT; MUELLER; BONILLA, 2004). Cianobactérias filamentosas homocitadas são as formas mais abundantes e comumente encontradas nos ambientes polares terrestres e de água doce, pertencendo, principalmente aos gêneros Leptolyngbya, Phormidium e Oscillatoria (ELSTER, 2002; KOMÁREK; KOMÁREK, 1999; KOMÁREK; NEDBALOVÁ; HAUER, 2011; MUELLER et al., 2004). No entanto, o levantamento da diversidade de cianobactérias por meio de observações ao microscópio óptico em amostras ambientais revelaram inúmeros outros gêneros compreendendo as formas

unicelulares, filamentosas homocitadas e heterocitadas (BANERJEE; WHITTON; WYNN-WILLIAMS, 2000; BILLI et al., 2011; CAMERON; DEVANEY, 1970; EROKHINA et al., 2002; FRIEDMANN; HUA; OCAMPO-FRIEDMANN, 1988; KOMÁREK; KOMÁREK, 1999; PRESCOTT, 1979; TATON et al., 2003; TATON et al., 2006a; 2006b; YUNG et al., 2014)

#### 2.4 Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é, globalmente, o processo mais importante após a fixação de CO<sub>2</sub>, contribuindo diretamente para a entrada de formas assimiláveis de nitrogênio em ambientes aquáticos e terrestres (ARP, 2000; VITOUSEK; HOWARTH, 1991).

Comunidades microbianas são componentes essenciais nos ecossistemas desempenhando papéis fundamentais no metabolismo da matéria orgânica e na transformação bioquímica dos elementos (ATLAS; BERTHA, 1998; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Dentre os micro-organismos, o grupo das cianobactérias é único a apresentar os dois processos ecológicos mais importantes, a capacidade de fixação do carbono e do nitrogênio (BERMAN-FRANK et al., 2001; CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; FAY, 1992; WOLK; ERNST; ELHAI et al., 1994). Ecologicamente, a FBN possibilita a ocupação e a dominância desse grupo de micro-organismos em ambientes carentes de nitrogênio (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). Entretanto, a FBN não está universalmente distribuída entre as cianobactérias e adaptações morfológicas e eco-fisiológicas são observadas em alguns táxons para sua realização. No geral, essas adaptações visam à criação de ambientes anaeróbicos e/ou micro-aeróbicos, onde o complexo enzimático da nitrogenase fica protegido dos efeitos deletérios do oxigênio molecular presente na atmosfera ou daquele produzido durante a fotossíntese. Dentre as adaptações morfológicas podem ser citadas a ocorrência de células verdadeiramente diferenciadas na ordem Nostocales, conhecidas como heterócitos (GOLDEN; YOON, 2003; HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSCKÝ, 2005; THIEL, 2004; WOLK; ERNST; ELHAI et al., 1994) e células não diferenciadas verdadeiramente, conhecidas como diazócitos nas nas ordens Pseudanabaenales, Oscillatoriales, Synechococcales e Chroococcales (BERMAN-FRANK et al., 2001; COMPAORÉ; STAL, 2010b; HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVSCKÝ, 2005). Nesse último caso, esses microorganismos ainda podem separar espacialmente os processos da fotossíntese e da FBN por

meio de modificações nos arranjos celulares, tais como formação de colônias e ou agregados celulares, as quais favorecem condições anóxicas ou micro-anóxicas em regiões específicas (BERGMAN et al., 1997). As alterações fisiológicas observadas no grupo das cianobactérias heterocitadas envolvem o aumento intracelular das concentrações de glutamina sintetase e da atividade respiratória, seguida da perda das enzimas ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e nitrato redutase e, algumas vezes, das ficobiliproteínas, além da inibição da liberação de O<sub>2</sub> pelo processo fotossintético (BERGMAN et al., 1997). Estudos similares no metabolismo das formas não-heterocitadas revelaram mudanças semelhantes durante a transferência dessas linhagens para meios de cultura com carência de formas nitrogenadas diretamente assimiláveis (BERGMAN et al., 1997). Entretanto, nesse grupo as células vegetativas fixadoras de nitrogênio retêm a enzima (Rubisco) e as ficobiliproteínas (BERGMAN et al., 1997). No grupo das cianobactérias heterocitadas as alterações morfológicas e fisiológicas do heterócito são permanentes, enquanto que nas formas não heterocitadas elas podem ser reversíveis (BERGMAN et al., 1997). Adaptações ecofisiológicas também são verificadas e estão relacionadas à criação de ritmos circadianos em muitas espécies de cianobactérias, separando temporalmente a FBN da fotossíntese (FAY, 1992; GALLON, 1992). Nas espécies unicelulares e filamentosas homocitadas a FBN ocorre durante o período de escuro, quando a fotossíntese está cessada e não existe a produção do O<sub>2</sub> que é prejudicial ao complexo enzimático da nitrogenase.

Nas cianobactérias, a identificação da região do genoma contendo o agrupamento dos genes envolvidos na FBN e responsável pela codificação do complexo enzimático da nitrogenase ocorreu há mais de 30 anos (MAZUR; RICE; HASELKORN, 1980). Os genes envolvidos na FBN são altamente conservados e ocorrem amplamente dentro dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, muito embora não estejam distribuídos em todos seus representantes (YOUNG, 1992; ZEHR; CARPENTER; VILLAREAL, 2000; ZEHR; TURNER, 2001). Os produtos desses genes funcionais intercedem importantes reações químicas e podem ter sido distribuídos em função da força de seleção na natureza (SHORT; ZEHR, 2007; YOUNG, 1992). Existem duas hipóteses sobre a distribuição e evolução desse agrupamento de genes (POSTEGATE; EADY, 1988; YOUNG, 1992). A primeira delas enfatiza a transferência vertical desses genes a partir de um ancestral comum, a qual é suportada pela semelhança de topologia entre as árvores filogenéticas construídas com sequências do RNAr 16S e *nifH* (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). A segunda hipótese é a de transferência horizontal desses genes e foi demonstrada por estudos envolvendo a espécie de cianobactéria *Microcoleus chthonoplastes* (BOLHUIS et al., 2010). Neste último estudo, os autores

demonstraram por análises filogenéticas que os genes estruturais da nitrogenase de *M*. *chthonoplastes* agrupam-se com membros do grupo de Deltaprotobacteria e ainda, evidenciaram a existência de duas regiões adjacentes ao operon do *nif* com valores médios de G+C inferiores ao restante do genoma, indicando incorporação exógena desse fragmento de DNA (BOLHUIS et al., 2010).

A organização do agrupamento gênico envolvido na codificação do complexo enzimático da nitrogenase nas cianobactérias é muito semelhante ao de Klebsiella pneumoniae e de outras bactérias fixadoras de nitrogênio. No genoma da Nostoc PCC7120 foi encontrado somente um agrupamento de genes codificando para a nitrogenase o qual é formado por quinze genes agrupados na seguinte ordem: nifB-fdxN-nifS-nifU-nifH-nifD-nifKnifE-nifN-nifX-orf2-nifW-hesA-hesB e fdxH (KANEKO et al., 2001; MAZUR; RICE; HASELKORN, 1890; RICE; MAZUR; HASELKORN, 1982). O complexo enzimático da nitrogenase é codificado pelos genes estruturais nifDKH (ZEHR et al., 2003) e é constituído de duas enzimas: dinitrogenase ou proteína Mo-Fe (proteína ferro-molibdênio) e dinitrogenase redutase ou proteína-Fe (proteína-ferro). A dinitrogenase é um tetrâmero composto de duas subunidades  $\alpha$  idênticas e duas subunidades  $\beta$  idênticas codificadas pelos genes nifD e nifK, respectivamente (LAMMERS; HASELKORN, 1983; MAZUR; CHUI, 1982) que unidas apresentam massa molecular de aproximadamente 250 kDa (ZEHR et al., 2003). Cada tetrâmero apresenta dois cofatores ferro-molibdênio que são os sítios de ligação e redução do nitrogênio (ORME-JOHNSON, 1992). A dinitrogenase redutase (proteína-Fe) possui massa molecular de 70 kDa e é um homodímero codificado pelo gene nifH (MEVARECH; RICE; HASELKORN, 1980) e suas funções são hidrolisar o ATP e mediar a transferência de elétrons do doador externo (ferrodoxina ou flavodoxina) para a dinitrogenase (FAY, 1992; ORME-JOHNSON, 1992; ZEHR et al., 2003). A reação enzimática da nitrogenase é energeticamente custosa e consome 16 ATPs e 8 elétrons por molécula de N<sub>2</sub> reduzido e em condições in vitro esse complexo enzimático torna-se inativado na presença de oxigênio molecular ou formas reativas de oxigênio (POSTGATE, 1998; ZEHR et al., 2003).

O gene conservado *nifH* é o mais utilizado nos estudos envolvendo a caracterização da comunidade diazotrófica de cianobactérias, pois além de identificar linhagens com potencial para fixação de N<sub>2</sub>, também pode ser utilizado em inferências filogenéticas quando seqüenciado (BEN-PORATH; ZEHR, 1994; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). Dentre os genes envolvidos na FBN, o gene *nifH* é aquele que possui o maior número de sequências depositadas nos bancos de dados público, como o do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

#### 2.5 Produção de Metabólitos Secundários

As cianobactérias constituem um grupo promissor de organismos dos quais pode-se isolar produtos naturais bioquimicamente ativos que, no entanto, ainda são pouco exploradas (BURJA et al., 2001). Esses metabólitos secundários podem ser substâncias com atividade biológica que contribuem para a competição entre os organismos e que não fazem parte do metabolismo primário. Nas últimas duas décadas foram isolados e caracterizados inúmeros substâncias bioativas pertencentes a diversas classes, entre eles, inibidores enzimáticos, herbicidas, antimicóticos, inibidores de apetite, antimaláricos e imunossupressores (BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et al., 2004; MOORE, 1996; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996). Dentro do grupo de inibidores enzimáticos, podem ser citadas as aeruginosinas e cianopeptolina que são peptídeos produzidos pela via não ribossômica, capazes de formar complexos com proteases, promovendo a inibição ou a diminuição da atividade proteolítica (inibidoras de proteases) (CADEL-SIX et al., 2008). As aeruginosinas são peptídeos lineares com 27 variantes descritas (WELKER; VON DOHREN, 2006), as quais apresentam atividade inibitória sobre serina proteases (LOMBARDO et al., 2006). As cianopeptolinas são peptídeos cíclicos com cerca de 80 variantes estruturais conhecidas, caracterizando-se pela presença de sete resíduos de aminoácidos, dos quais seis forma um anel (CHOI et al., 2008; WELKER; VON DOHREN, 2006). O papel dessas moléculas pode estar ligado aos processos de defesa dos micro-organismos, e mais especificamente contra competição e patogenicidade (WELKER; VON DOHREN, 2006). Outra classe de substâncias é formanda pelas cianotoxinas, que podem ser classificadas em categorias de acordo com a sua origem química ou os efeitos biológicos causados nos sistemas e órgãos que afetam mais fortemente. Diversas hepatotoxinas (microcistinas, nodularina, cilindrospermopsinas) e neurotoxinas (saxitoxinas, anatoxina-a, anatoxina-a (S)) são produzidas pelas cianobactérias por meio do metabolismo não ribossômico (WELKER; VON DOHREN, 2006). O papel dos fatores ambientais na produção das cianotoxinas ainda não está suficientemente entendido, embora alguns estudos demostrem que variações em parâmetros como a luz, idade da cultura, temperatura, pH e nutrientes podem afetar a produção destas substâncias (SIVONEN; JONES, 1999).

# **3 HIPÓTESE**

A comunidade de cianobactérias presente nas ilhas oceânicas Rei George e Deception, Shetland do Sul, Antártica é endêmica, atua como fixadora de nitrogênio atmosférico, e ainda apresenta potencial genético de síntese de produtos naturais com interesse biotecnológico.

### **4 OBJETIVO**

Estudar a comunidade de cianobactérias presente nas ilhas oceânicas Rei George e Deception, Shetland do Sul, Antártica e investigar seu papel ecológico como fornecedoras de formas assimiláveis de nitrogênio e como produtoras de substâncias bioativas.

### 4.1 Objetivos específicos

- ✓ Coletar amostras ambientais nas ilhas Rei George e Deception;
- ✓ Isolar linhagens de cianobactérias usando meios específicos de crescimento;
- ✓ Caracterizar os isolados por meio da identificação morfológica e da análise filogenética de sequências do gene de RNAr 16S;
- ✓ Detectar, sequenciar e analisar filogeneticamente o gene *nifH* nos isolados de cianobactérias;
- ✓ Investigar nos isolados com potencial genético para fixação biológica de nitrogênio a atividade da nitrogenase em resposta à temperatura, luminosidade e concentrações de oxigênio;
- ✓ Quantificar o gene *nifH* nas amostras ambientais de biofilme;
- ✓ Detectar fragmentos gênicos de mcyD, mcyE, mcyG, sxtI e os espaços intergênicos da aeruginosina e cianopeptolina nos isolados de cianobactérias;
- Analisar a estrutura da comunidade de cianobactérias em amostras de biofilme usando PCR-DGGE;
- ✓ Investigar a comunidade de cianobactérias nas amostras de biofilme selecionados por meio do sequenciamento do gene de RNAr 16S de DNA metagenômico.

# **5 MATERIAL E MÉTODOS**

# 5.1 Coleta

As amostras ambientais utilizadas nesse estudo foram coletadas nas ilhas Rei George e Deception, situadas no Arquipélago Shetland do Sul, Antártica marítimica, durante a XXVII, XXVIII e XXIX Operação Antártica Brasileira (OPERANTAR) nos anos de 2009, 2010 e 2011, respectivamente (Figura 1).

Amostras ambientais de solo mineral e ornitogênico, de água doce e salgada, rocha, manto microbiano, biofilme e líquen foram coletadas em tubos tipo Falcon de 50 mL e/ou em sacos plásticos tipo WhrilPak<sup>®</sup> esterilizados. Após as coletas, as amostras foram mantidas refrigeradas e ou a temperatura ambiente (5 °C). Durante o transporte até o laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP, Piracicaba) as amostras foram conservadas em isopor com gelo. As amostras coletadas em 2009 foram processadas no módulo de Química da Estação Antártica Comandante Ferraz. As coletas na Ilha Rei George foram distribuídas aleatoriamente pela Baía do Almirantado, enquanto que as coletas na Ilha Deception restringiram-se à porção central da ilha.

#### 5.2 Isolamento de cianobactérias

Para o isolamento das linhagens de cianobactérias, alíquotas dos materiais coletados foram inoculados em seis diferentes meios de cultivo específicos para crescimento de cianobactérias (BG-11, BG-11<sub>0</sub>, 3, 3NP, SWBG-11 e AA) (ALLEN; ARNON, 1955; ALLEN, 1968; CASTENHOLZ, 1988; TATON et al., 2006a) líquidos e solidificados com ágar (1,2% m/v). Os materiais recém-inoculados foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, sob iluminação fluorescente com irradiância 30-40  $\mu$ mol<sup>+</sup>fóton<sup>-</sup>m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 14 h claro:10 h escuro. Após verificação do crescimento, repicagens e estriamentos sucessivos foram realizados até o estabelecimento da condição monoespecífica das linhagens de cianobactérias. Observações ao microscópio óptico foram realizadas ao longo do procedimento de isolamento com o objetivo de confirmar a condição monoespecífica das culturas.

#### 5.3 Análise morfológica

A análise dos caracteres morfológicos diacríticos das linhagens de cianobactérias foi realizada utilizando o microscópio óptico Zeiss Axioplan-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Para identificação taxonômica foram utilizados os caracteres morfológicos, com auxílio de bibliografia especializada, seguindo a chave de classificação por Anagnostidis e Komárek (1985; 1988; 1990), Komárek e Anagnostidis (1986; 1989; 1999; 2005), Hoffmann, Komárek e Kaštovscký (2005) e de artigos nos quais novos gêneros de cianobactérias foram descritos.

#### 5.4 Manutenção das culturas de cianobactérias

As linhagens de cianobactérias isoladas estão sendo mantidas na Coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, Piracicaba, São Paulo. A manutenção dessas linhagens é realizada por meio de sub cultivos periódico em meios de cultura líquido BG-11, BG-11<sub>0</sub>, 3NP, AA e SWBG-. Para manutenção das culturas em meio líquido utiliza-se frascos Erlenmeyer com capacidade para 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Observações periódicas ao microscópio óptico (Carl Zeiss, MicroImaging GnbH, Göttingen, Alemanha) são realizados durante os procedimentos de repicagem das culturas. As culturas são mantidas sob as mesmas condições descritas no item 5.2.

#### 5.5 Análise molecular dos isolados

#### 5.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA genômico das linhagens de cianobactérias foi realizada utilizando 3mL de cultura celular com idade entre 10 e 21 dias de crescimento. As células foram coletadas e concentradas por meio de centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete formado foi lavado em água ultrapura esterilizada (Millipore, Synergy, Molsheim, França) visando diminuição da carga de bactérias heterotróficas, restos celulares e de mucilagens de cianobactérias. A lavagem do pélete consistiu na adição de 1 mL de água ultrapura esterilizada seguida da homegeneização em *vortex* e centrifugação. Esse procedimento foi realizado três vezes alterando-se as velocidades e os tempos de centrifugação na seguinte ordem  $10.000 \times g$  por 5 min,  $13.000 \times g$  por 2 min e  $12.000 \times g$  26

por 3 min. O rompimento das células de cianobactérias foi realizado por choque térmico. Os péletes, acondicionados em microtubos de 1,5 mL do tipo Eppendorf<sup>®</sup>, foram mergulhados em banho-maria a 55 °C por 3 min e transferidos, imediatamente, para nitrogênio líquido (-196 °C) por 3 min. Esse procedimento foi repetido durante 5 vezes ou até a visualização macroscópica do rompimento das células. Posteriormente, os péletes foram usados para extração do DNA genômico, seguindo o método descrito por Fiore e colaboradores (2000). Aliquotas (5  $\mu$ L) dos DNAs extraídos foram acrescidos de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,25 %, glicerol 30 % e 0,1 % de SYBER<sup>®</sup> Green I (Eugene, OR, EUA)) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2 % (m/v) após corrida eletroforética em tampão 0,5 X TBE (1 X TBE: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). O marcador de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi utilizado. A documentação do gel foi feita usando o programa "Kodak MI Application" do "Kodak Gel Logic 212 Imaging System" (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc, Rochester, NY, EUA). O DNA genômico extraído foi armazenado a - 20 °C.

## 5.5.2 Amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S

Para a amplificação por PCR do gene que codifica para o RNAr 16S foi utilizado o conjunto de iniciador 27F1/1494Rc (NEILAN et al., 1997), o qual gera fragmentos com tamanho esperado de aproximadamente 1.500 pares de base.

A amplificação do gene de RNAr 16S foi feita em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,1 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 10 qg de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, England), nas seguintes condições: 95 °C /3 min; 30 ciclos 94 °C /10 s, 50 °C/20 s, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos fragmentos resultantes foi feita conforme descrito no item 5.5.1.

#### 5.5.3 Amplificação do gene nifH

Para amplificação por PCR do fragmento do gene *nifH* foi utilizado o conjunto de iniciadores OlsonF/OlsonR (OLSON et al., 1998), o qual gera fragmentos com tamanho esperado de aproximadamente 359 pares de base. A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,1 mM de cada dNTP; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 0,1 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Albumina de Soro Bovino); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 μL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 95 °C/2 min; 35 ciclos 94 °C/1 min, 47 °C/1 min, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7min (OLSON et al., 1998). A verificação do tamanho dos fragmentos resultantes foi feita conforme descrito no item 5.5.1.

#### 5.5.4 Clonagem

A clonagem dos fragmentos gerados nas reações de PCR foi feita usando o *kit* "pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems" (Promega, Madison, WI, EUA). O vetor utilizado foi o pGEM<sup>®</sup>-T de 3.015 pb oferecido linearizado com *Eco*R V e com a adição de timina nas extremidades 3', as quais aumentam a eficiência de ligação. Esse vetor contém sítio de resistência a ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento *LacZ*. Os procedimentos para a clonagem foram seguidos conforme as instruções do fabricante disponíveis no Manual de Instrução do "pGEM®-T Easy Vector Systems".

#### 5.5.5 Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *Escherichia coli* DH5α foi feita por meio de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Alíquotas de 10 µL do produto de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes foram adicionadas em microtubos esterilizados, misturadas gentilmente e incubadas no gelo durante 30 minutos. Após esse período, o microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42 °C e mantido por 40 segundos, sem agitação. Em seguida, foi novamente resfriado em gelo por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) à temperatura ambiente. A mistura contendo a ligação, as células competentes e o meio SOC foi incubada a 37 °C durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo Luria-Bertani Broth (LB)  $(25g\cdot L^{-1})$  (Himedia, Mumbai, Índia), solidificado com ágar 1,5 % (m/v), contendo ampicilina (100 µg·mL<sup>-1</sup>) (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (50 µg·mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen). As placas foram incubadas por 14-16 horas, a 37 °C.

#### 5.5.6 Confirmação da inserção dos fragmentos de interesse

Para confirmar presença dos fragmentos de interesse nas células transformadas, após o período de incubação das placas, colônias de coloração branca, indicativas da presença dos fragmentos de interesse foram selecionadas e transferidas para tubos contendo 4 mL de meio LB líquido (Himedia) contendo ampicilina (100 µg por mL de meio). Os tubos foram incubados por 14-16 horas em estufa a 37 °C e agitação de 200 rpm. Após o crescimento, 0,7 µL da cultura de células foram adicionadas a 12 µL de reação de PCR. Para o gene que codifica o RNAr 16S foi utilizado o conjunto de iniciadores para região V3-V4 do RNAr 16S de cianobactéria, CYA 359F/CYA781aR e CYA781bR (NÜBEL; GARCIA-PICHEL; MUYZER, 1997), os quais geram tamanho de aproximadamente 420 pares de base. A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação de PCR com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1X (Tris HCl 75mM pH 8,0; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Tween 20 na concentração 0,1 %), 0,1 mM de cada dNTP; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas, Lituânia); 0,2 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Millipore) esterilizada para um volume final de 13 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 95 °C/5 min; 35 ciclos 94 °C/1 min, 63 °C/1 min, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/7min.

Para os demais fragmentos gênicos foi utilizado o conjunto iniciador M13F/M13R (Promega), específico para ancoramento no vetor e na região adjacente a inserção do fragmento. A amplificação foi feita em tampão para reação de PCR com  $(NH_4)_2SO_4$  1X (Tris HCl 75mM pH 8,0; 20 mM  $(NH_4)_2SO_4$  e Tween 20 na concentração 0,1 %), 0,1 mM de cada dNTP; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas); 0,2 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Millipore) esterilizada para um volume final de 13 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 25 ciclos 95 °C/20 s, 50 °C/15 s, 60 °C/1 min. A verificação dos tamanhos dos fragmentos resultantes foi feita conforme descrito no item 5.5.1.

#### 5.5.7 Extração de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial nas culturas de E. coli DH5a que continham os insertos foram realizadas pelo método de hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). Três mililitros de cultura crescida foram centrifugados a  $5.000 \times g$  por 7 minutos. O precipitado formado foi ressuspenso em 100 µL de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM e glucose 50 mM) seguida da adição de 200 µL de solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1 %). Os volumes foram gentilmente misturados por inversão. Após 5 minutos de incubação em gelo, acrescentou-se 150 µL de solução III gelada (Acetato de Potássio 3 M e Ácido Fórmico 1,8 M) e novamente misturados por inversão (20 vezes). As amostras foram mantidas no gelo durante 7 minutos, e posteriormente centrifugadas a  $15.000 \times g$  durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 270 µL de isopropanol (100 %) a temperatura ambiente. Os volumes foram misturados por inversão, e posteriormente centrifugados a  $15.000 \times g$  durante 7 minutos. O precipitado formado foi lavado com 250 µL de etanol 70 % gelado e centrifugado a  $15.000 \times g$  por 2 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco. Após secagem dos precipitados, adicionou-se 30 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada e 2  $\mu$ L de RNAse (10 mg·mL<sup>-1</sup>) seguida da incubação a 37 °C por 30 minutos. Os DNAs plasmidiais extraídos foram visualizados em gel de agarose e quantificados usando o marcador molecular Low Mass Ladder, como descrito no item 5.5.1.

#### 5.5.8 Sequenciamento

Para seqüenciamento dos fragmentos de interesse foi utilizado o *kit* BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA). Na reação de PCR foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial, 0,5 pmol dos iniciadores M13F/M13R, 1 µL de BigDye, tampão de reação 1 X (fornecido com o *kit*) e água ultrapura esterilizada para volume final de 10 µL. Adicionalmente, para seqüenciamento completo do fragmento do gene que codifica para o RNAr 16S foram utilizados os conjuntos internos de iniciadores 341-357F/357-341R, 685-704F/704-685R e 1099-1114F/1114-1099R (LANE, 1991). As condições de amplificação foram 35 ciclos de 95 °C/15 s, 50 °C/15 s e 60 °C/2 min. Após o término da reação, o DNA foi precipitado usando 2 µL de tampão de acetato de sódio (1,5 M de acetato de sódio – pH 9.0 e 250 mM EDTA – pH 8.0), seguido da adição de 60 µL de etanol 100 % e centrifugação por 15 min a 12.000 × g a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 150  $\mu$ L de etanol 70 % seguido de nova centrifugação por 5 min a 12.000 × g, a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e no escuro por aproximadamente 14 horas. As amostras foram ressuspensas em formamida HiDi (Applied Biosystems) e inseridas no sequenciador. Os sequenciamentos foram realizados em equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technologies), na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), no laboratório coordenado pelo Professor Dr. Ricardo Della Coletta ou na EMBRAPA (Meio Ambiente), de Jaguariúna, no laboratório coordenado pelo Pesquisador Dr. Itamar S. Melo.

#### 5.5.9 Processamento e análise filogenética das seqüências

As seqüências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) e assentadas em *contigs* por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) em sistema operacional Linux. Posteriormente, essas seqüências foram comparadas com outras seqüências previamente depositadas no *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando a ferramenta *Basic Local Aligment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção de árvores filogenéticas, pelo método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood), as seqüências obtidas e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas e editadas usando o pacote de programa MEGA 5 (TAMURA et al., 2011).

# 5.5.10 Triagem molecular de genes envolvidos na biossíntese de inibidores de proteases e cianotoxinas

A investigação de linhagens com potencial genético para produção de substâncias com interesse biotecnológico foi realizada pela prospecção de fragmentos gênicos e espaços intergênicos envolvidos na biossíntese de: microcistina, um heptapeptídeo cíclico (mcyD, mcyE e mcyG), saxitoxina, um alcalóide (sxtI) e inibidores de proteases (aeruginosina, aerA-aerB e cianopeptolina, mcnC-mcnE), peptídeos lineares e cíclicos, respectivamente. Para amplificação dos fragmentos mcyD (~ 818 pb) e mcyE (~ 812 pb) foram utilizados os iniciadores mcyDF/mcyDR e mcyEF2/mcyER4, respectivamente (RANTALA et al., 2004), enquanto que para os fragmentos gênicos mcyG (~ 534 pb) e sxtI (~ 923 pb) foram

empregados os conjuntos mcyGF/mcyGR e OCT-F/OCT-R, respectivamente (HOFF-RISSETI et al., 2013; FEWER et al., 2007). Para amplificação dos espaços intergênicos da aeruginosina e cianopeptolina foram utilizados os iniciadores aerA/aerB e mcnC-F/mcnE-R, respectivamente (CADEL-SIX et al., 2008). As reações de amplificação dos fragmentos gênicos de mcyD, mcyE e mcyG continham tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,1 mM de cada dNTP; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 95 °C/3min; 30 ciclos de 94 °C/30s, 56 °C/30s, 72 °C/1min e extensão final a 72 °C/10min. As reações de amplificação do fragmento do gene de sxtI continham tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 0,4 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 94 °C/5min; 35 ciclos de 94 °C/30s, 61 °C/1min, 72 °C/90s e extensão final a 72 °C/7min. As reações de amplificação dos espaços inter-gênicos da aeruginosina e cianopeptolina continham tampão para reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 10 ng de DNA; 0,2 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 95 °C/2min; 40 ciclos de 94 °C/45s, 50 °C/45s, 72 °C/1min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos fragmentos resultantes foi feita conforme descrito no item 5.5.1.

#### 5.6 Atividade da nitrogenase em linhagens de cianobactérias

#### 5.6.1 Cultivo

As linhagens de cianobactérias selecionadas para este experimento foram cultivadas em frascos de cultura de tecido com capacidade de 650 mL contendo 300 mL de meio de cultura específico para crescimento de cianobactérias. As formas heterocitadas (ordem Nostocales) foram crescidas em BG-11<sub>0</sub> (sem adição de formas inorgânicas de N), enquando

que as formas não-heterocitadas (ordens Chroococcales, Pseudanabaenales e Oscillatoriales) foram crescidas em BG-11 ou SWBG-11 (contendo formas inorgânicas de N). As linhagens de cianobactérias foram cultivadas para produção de biomassa por 1-8 semanas, dependendo da taxa de crescimento de cada uma das linhagens. Os meios de cultivos foram renovados após quatorze dias de cultivo, quando necessário. Após o crescimento de biomassa suficiente para condução do experimento, todas as linhagens (independentemente da ordem) foram centrifugas e reinoculadas em BG-11<sub>0</sub> ou SWBG-11<sub>0</sub> de maneira a promover a desnutrição de nitrogênio nas células. Após sete dias de cultivo, as células foram utilizadas para o experimento de estimativa da atividade da nitrogenase. Todos os cultivos foram conduzidos sob agitação orbital (110 rpm) em sala de crescimento a  $20 \pm 1$  °C, com intensidade luminosa entre 15-20 µmol·fóton·m<sup>-2·</sup>s<sup>-1</sup>.

#### 5.6.2 Medição da atividade da nitrogenase

Os experimentos relacionados à atividade da nitrogenase foram realizados no Instituto Real Holandês de Pesquisa Marinha (NIOZ) sob a supervisão do Prof<sup>o</sup>. Dr. Lucas J. Stal no decorrer do ano de 2013.

A atividade da nitrogenase foi avaliada utilizando a análise de redução de acetileno (ARA). Os experimentos foram conduzidos em método on-line de medição utilizando laser de alta sensibilidade à produção de etileno (Sensor Sense, Nijmegen, Holanda) (STAAL et al., 2001). As culturas de cianobactérias foram filtradas utilizando filtros de fibra de vidro (GE/F, 46 mm) (Whatman International Ltd., Maidstone, Inglaterra) de modo a criar uma camada homogênea de células suficientemente fina com o objetivo de prevenir o autosombreamento (STAAL et al., 2002) Os filtros foram colocados em uma câmara feita sob medida, a qual estava conectada a uma unidade Peltier de regulação de temperatura (Supercool, type nr: DA-075-24-02-00-00, Göteborg, Suécia). Aproximadamente sete mililitros de meio de cultivo foram colocados abaixo do suporte dos filtros, de maneira a garantir a saturação do filtro com meio e prevenir a desidratação (COMPAORÉ; STAL, 2010b). A câmara de incubação foi conectada a um fluxo de gases contendo N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> automaticamente produzida por controladores de fluxo (Brooks Instruments, 5850E, Ede, Holanda). A concentração de acetileno foi mantida em 2,5 %. O CO2 foi previamente misturado com 0.04 % de N2 e O2. A concentração de O2 foi variável, de acordo com a concentração desejada e o fluxo final foi completado com  $N_2$  (2  $L \cdot h^{-1}).$  A iluminação foi fornecida por lâmpada halôgena (250 W) (modelo 460-F; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). O programa computacional escrito em *TestPoint* (Capital Equipment Corporation, Bedford, NH, EUA) foi utilizado para controlar automaticamente as misturas de gases, intensidades luminosas e temperatura.

Linhagens de cianobactérias que apresentam inibição da nitrogenase na presença de  $O_2$  (representada pelas não heterocitadas, ordens Chroococcales, Pseudanabaenales e Oscillatoriales), tiveram suas células lavadas com uma solução de BG-11<sub>0</sub> contendo 10<sup>-5</sup> M de DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea). Simplificamente, esse reagente é um herbicida inibidor da fotossíntese e consequentemente bloqueador da geração de  $O_2$  (STAL, 1988). A mesma solução foi utilizada abaixo do suporte do filtro, a fim de saturá-lo impedindo a desidratação das células.

Dois conjuntos de experimentos foram conduzidos em duplicatas. O primeiro deles foi desenvolvido para avaliar a atividade da nitrogenase em resposta a concentrações crescentes de  $O_2$  (0, 5, 10, 20, 40 e 60 %). Esse experimento foi conduzido em três condições de temperatura (5, 20 e 30 °C) e três de intensidades luminosas (0, 17 e 67 µmol fóton m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>). O segundo experimento foi desenvolvido para testar a influência da luz (0-502 µmol fóton m<sup>-2·s<sup>-1</sup></sup>) na atividade da nitrogenase aplicando duas concentrações de  $O_2$  (0 e 20 %) e temperaturas (5 ou 20 e 30 °C).

## 5.6.3 Extração de clorofila a

Ao final de cada experimento, os filtros contendo as células de cianobactérias foram congelados e armazenados a - 80 °C para a extração e quantificação de clorofila *a*. A clorofila *a* foi extraída usando 10 mL de metanol 90 %, mantendo o filtro com as células por uma hora a 4 °C no escuro. Esse procedimento foi repetido mais 4 vezes, totalizando 5 extrações. As frações extraídas foram reunidas ao final da extração, e a absorbância de clorofila *a* foi medida a 665 nm (Espectrôfotometro Cary 100 Bio UV-Visível). A quantidade total de clorofila foi calculada como descrito por Tandeau de Marsac e Houmard (1988), C (µg mL<sup>-1</sup>) = Abs<sub>665 nm</sub> x 13,9.

#### 5.6.4 Cálculo da atividade específica da nitrogenase

A atividade específica da nitrogenase foi calculada pela divisão da atividade da nitrogenase pela quantidade de clorofila *a* produzida. Esses valores são expressos em  $\mu$ mol<sup>-</sup>mg chl*a*<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

## 5.7 Análises Independentes de Cultivo

#### 5.7.1 Coleta e extração de DNA ambiental de amostras de biofilme

Amostras de biofilme foram coletadas na Ilha Deception, Arquipélago Shetland do Sul, durante a XXIX Operação Antártica Brasileira em 2011. Para realização das coletas foram utilizados tubos do tipo Falcon de 50 mL ou sacos plásticos tipo WhrilPak<sup>®</sup> esterilizados. Após as coletas, as amostras foram conservadas a temperatura ambiente (5 °C) e durante o transporte mantidas em isopor com gelo. Em condições esterilizadas e em fluxo laminar, os biofilmes aderidos às rochas foram removidos com auxílio de escova, pinça e bisturi; e acondicionados em microtubos enquanto que os biofilmes sem adesão às rochas foram fracionados em microtubos com auxílio de pinça e bisturi.

Trinta e duas amostras de biofilme foram selecionadas e submetidas à extração de DNA total utilizando o *kit* MOBIO PowerSoil DNA Isolation (MOBIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1). Alíquotas de 1  $\mu$ L dos DNAs extraídos foram utilizados para verificação da qualidade e quantidade conforme descrito no item 5.5.1. O volume de 100  $\mu$ L contendo o DNA foi armazenado a temperatura de -20 °C para utilização nos passos subsequentes.
Tabela 1 – Descrição das amostr	ras de biofilmes coleta	ados na Ilha Deception na 2	XXIX OPERANTAR em 2011

(continua)

Amostra	Local	Ambiente/ Temp. da H <sub>2</sub> O	Observações	Peso amostra
158Rocha	Lago Sapatilla	Água doce/7.2 °C	Raspagem rocha. Presença de partículas de solo	0.0699 g
159Rocha	Crater Lake	Água doce/7.0 °C	Rocha com biofilme marrom, acastanhado, verde. Presença de partículas de solo	0.1625 g
163Rocha	Lago Telephone Bay	Água doce/7.7 °C	Biofilme marrom. Rocha na margem do lago. Formado do derretimento de geleira. Muito	0.1821 g
			vento/suspensão sedimento. Presença de partículas de solo	
165ARocha	Baía Telephone Bay	Água salgada/6.0 °C	Rocha com biofilmes verde, marrom, alaranjado. Presença de partículas de solo	0.0920 g
165BRocha	Baía Telephone Bay	Água salgada/6.0 ℃	Rocha com biofilmes verde, marrom, alaranjado. Presença de partículas de solo	0.4573 g
168Rocha	Lago próx. Estação	Água salgada/8.6 °C	Biofilme verde, amarronzado. Rocha na margem do lago. Presença de partículas de solo	0.3171 g
	Argentina			
169ARocha	Lago próx. Estação	Água salgada/6.7 °C	Biofilme marrom, verde aderido à rocha. Rocha na margem do lago. Presença de partículas	0.1348 g
	Argentina		de solo	
169BRocha	Lago próx. Estação	Água salgada/6.7 ℃	Biofilme marrom, verde aderido à rocha. Rocha na margem do lago. Presença de partículas	0.2231 g
	Argentina		de solo	
169CRocha	Lago próx. Estação	Água salgada/6.7 ℃	Biofilme marrom, verde aderido à rocha. Rocha na margem do lago. Presença de partículas	0.2679 g
	Argentina		de solo	
170Rocha	Lago próx. Estação	Água salobra/6.7 °C	Biofilme aderido à rocha. Rocha a margem do lago. Presença de partículas de solo.	0.3324 g
	Argentina			
173Rocha	Telephone Bay/Telephone		Rocha amarelada com pontos esverdeados. Presença de partículas de solo	0.0655 g
	Ridge			
174Rocha	Ponto Quente Telephone	Água salgada/23.7 °C	Biofilme amarelo, marrom aderido à rocha. Existência de ação geotermal. Presença de	0.5952 g
	Bay		partículas de solo	
175Rocha	Fumarole Bay	Água doce/5.2 °C	Biofilme marrom. Influência de lobos e skuas. Presença de partículas de solo	0.1797 g
177Rocha	Pinguineira Punta de La	Água doce/5.2 °C	Biofilme vermelho, alaranjado. Biofilme vermelho, alaranjado. Poçasmais externa à	0.2645 g
	Descobierta		pinguineira formado próximo as morainas. Presença de partículas de solo	
150	Kroner Lake	Água salgada/ 5.2 °C	Massa celular agregada. Não aderida ao substrato. Conexão com baía	0.0808 g
154	Acampamento 2011	Água doce/ 10.7 °C	Biofilme estruturado verde aderido ao cascalho vulcânico. Lago temporário	1.08 g

0	6
.)	o
~	~

Tabela 1 – Descrição das amostras de biofilmes coletados na Ilha Deception na XXIX OPERANTAR em 2011

	· .•	~ )	
- 1	confinitg	10201	
. 1	continua	ica0,	

Amostra	Local	Ambiente/ Temp. do H-O	Observações	Peso fresco amostr
Allostia	Local			
155	Acampamento 2011	Agua doce/9.7 °C	Biofilme estruturado alaranjado aderido ao cascalho vulcânico. Lago temporário	. 0.7410 g
			Formação de bolhas de ar	
156	Crater Solo	Água doce/8.8 °C	Massa celular verde. Material depositado a margem e sem adesão	0.4180 g
157	Lago entre Crater Lake e	Água doce/9.1 °C	Biofilme início formação marrom alaranjado. Formado pela ação do degelo	0.1763 g
	Crater Solo			
158	Lago Sapatilla	Água doce/7.2 °C	Biofilme início formação verde/acizentado. Água utilizada para abastecimento estação	0.1948 g
			espanhola	
161	Collins Point (Loberia)	Água doce	Biofilme estruturado Cachoeira. Área com aves	0.1948 g
164	Lago Telephone Bay	Água doce/7.7 °C	Biofilme início formação verde/acizentado. Aderido ao solo. Formação de bolhas de ar	0.4491 g
			Presença de skuas	
165	Baía Telephone Bay	Água salgada/6.0 ℃	Biofilme estruturado verde, marrom, alaranjado	0.4810 g
166.1	Baía próx. Estação	Água salgada/5.4 °C	Massa celular marrom, alaranjado Material aderido ao substrato	0.7694 g
	Argentina			
166.2	Baía próx. Estação	Água salgada/5.4 °C	Massa celular marrom, alaranjado. Material aderido ao substrato	0.1433 g
	Argentina			
167	Baía próx. Estação	Água salgada/5.4 ℃	Massa celular. Material depositado na margem. Muito material em toda baía	0.6610 g
	Argentina			
169	Lago próx. Estação	Água salgada/6.7 ℃	Biofilme estruturado verde, marrom aderido a rochas	0.5101 g
	Argentina			
170	Lago próx. Estação	Água salobra/6.7 °C	Biofilme estruturado aderido à rocha	0.7599 g
	Argentina			
174	Ponto Quente Telephone	Água salgada/23.7 °C	Biofilme estruturado amarelo, marrom. Perda da estruturação do biofilme no lab	. 0.2701 g
	Bay		Existência de ação geotermal	
175	Fumarole Bay	Água doce/5.2 °C	Biofilme início formação marrom. Influência de lobos e skuas	0.4918 g
176	Pinguineira Punta de La	Água doce	Massa celular dispersa na lâmina d'água. Material verde em poça d'água no interior da	0.1043 g
	Descobierta		pinguineira	

Tabela 1 – Des	bela I – Descrição das amostras de biofilmes coletados na Ilha Deception na XXIX OPERANTAR em 2011 (con-										
Amostra	Local	Ambiente/ Temp. da H <sub>2</sub> O	Observações P	eso fresco amostra							
177	Pinguineira Punta de La Descobierta	Água doce/5.2 ℃	Biofilme estruturado vermelho, alaranjado. Poças mais externa à pinguineira formado próximo as morainas	0.2087 g							

(acrelucão)

# 5.7.2 Análise do perfil da comunidade de cianobactéria nas amostras de biofilme em Gel de eletroforese com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE)

#### 5.7.2.1 Amplificação por PCR do gene de RNAr 16S

Para a amplificação por PCR do gene de RNAr 16S foi utilizado o conjunto de iniciadores 27F1/23S30R (TATON et al., 2003) o qual gera fragmentos com tamanho esperado de 2.000 pares de base. A reação de amplificação continha tampão de PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 10 ng de DNA; 0,5 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 10 ciclos de 94 °C/45s, 57 °C /45s, 72 °C/2min; 25 ciclos de 94 °C/45s, 54 °C/45s, 72 °C/2min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos fragmentos resultantes foi feita conforme descrito no item 5.5.1. O produto de amplificação obtido da PCR descrita acima foi utilizado para realização de uma nested-PCR como descrito por Nübel, Garcia-Pichel e Muyzer (1997), utilizando os iniciadores CYA359 com grampo GC (40)/CYA781aR e CYA781bR. A reação de amplificação continha tampão de PCR 2 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 3 U de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 10 ng de DNA; 0,4 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 94 °C/2min; 30 ciclos de 94 °C/1min, 63 °C/1min, 72 °C/1min e extensão final a 72 °C/7min. A verificação do tamanho dos fragmentos resultantes foi feita conforme descrito no item 5.5.1.

# 5.7.2.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A análise da estrutura das comunidades de cianobactérias presentes nos biofilmes foi realizada em eletroforese em gel com gradiente desnaturante usando o sistema *Ingeny PhorU2* (Ingeny, Leiden, Holanda) contendo tampão tampão 0,5X (10 mM de Tris-acetato e 0,5 mM de EDTA, pH 8,0). Quantidades iguais dos produtos de PCR foram aplicadas em géis com gradiente desnaturante de 45 - 55 % (ureia e formamida), os quais foram preparados utilizando volumes previamente calculados da solução de acrilamida:bisacrilamida (37:1) com

80 % de ação desnaturante (7 M de ureia e 32 % de formamida) e sem ação desnaturante (HEUER et al., 1997). Durante as 15 horas de corrida eletroforética, a voltagem e a temperatura foram mantidas constantes a 90 V e a 60 °C, respectivamente. Após a eletroforese, os géis foram corados com *SyberGreen* (Invitrogen, São Paulo, Brasil) diluído em água deionizada esterilizada (1:10.000) e a aquisição das imagens foi realizada usando Kodak MI Application" do "Kodak Gel Logic 212 Imaging System" (Molecular Imaging System Carestream Health.

#### 5.7.2.3 Análises estatísticas

Para avaliação da comunidade de cianobactérias de cada uma das amostras, as posições relativas de cada banda foram utilizadas para construção das matrizes binárias, usando a plataforma de software do BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths NV, Belgium). A tolerância com respeito ao posicionamento das bandas foi de 0,8 %. A partir dessas matrizes baseadas na presença e ausência das bandas (CLEGG; LOVELL; HOBBS, 2003; FU et al., 2010), a análise nMDS (*non-Metric Multidimensional Scaling*) foi efetuada pelo programa PAST com base no método de *Jaccard* (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001; LIMA, 2011). Esse método é considerado eficiente quando aplicado a situações não-lineares e resume a variância dos dados em menos eixos do que outros métodos indiretos de ordenação (HALSEY, 2012).

As análises de agrupamento hierárquico foram feitas usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Methods using Arithmetic Averages).

#### 5.7.3 PCR quantitativo do gene nifH das amostras de biofilme

A quantificação do gene *nifH* foi realizada com intuito de inferir a abundância da comunidade diazotrófica de cianobactérias nas amostras de biofilme estudadas. Reações de amplificação foram feitas em triplicatas para cada amostra utilizando o equipamento *StepOnePlus<sup>TM</sup> Real Time PCR System* (Applied Biosystems), disponível no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP. As reações foram feitas utilizando Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), em solução contendo: 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,35 pmol de cada iniciador (OlsonF/OlsonR), aproximadamente 15 ηg de DNA e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) para volume final de 10 μL de reação. As condições de ciclagem foram 1 ciclo de 50 °C/2 min e 95 °C/2 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C/15 s,

47°C/20 s e 72 °C/35 s. A etapa final compreendeu a curva de dissociação a qual inclui um ciclo final de 95 °C/15 s para desnaturação dos produtos gerados e quantificação da fluorescência a cada 0,7 °C de variação iniciando-se na temperatura de 47 °C e finalizando a 95 °C. Essa etapa visa à confirmação se o sinal de fluorescência foi originado especificamente do produto da PCR ou de dímeros formados pelos iniciadores ou outros artefatos da técnica.

Uma curva padrão foi construída a partir de diluições em série 1:10  $(10^{-2} \text{ a} 10^{-6} \text{ cópias}\,\mu\text{L})$  do produto de PCR de fragmento do gene *nifH* da linhagem *Nostoc* sp. CENA444, cuja concentração inicial era de 42,7 ng $\mu$ L<sup>-1</sup>. Essa curva foi utilizada para interpolação dos valores médios das triplicatas do limiar de fluorescência (Ct – "threshold cycle") obtido das amostras com as concentrações conhecidas do produto de PCR mencionado.

# 5.7.4 Sequenciamento do gene que codifica para o RNAr de 16S da comunidade bacteriana nas amostras de biofilme

Sete amostras foram selecionadas com base nos resultados dos perfis das comunidades de cianobactérias obtidas pela análise de DGGE. Para esta finalidade, o DNA metagenomico extraído das amostras (150, 154, 157, 158, 165, 170 e 174) foi submetido à amplificação por PCR utilizando os iniciadores 967F e 1046R flanqueadores da região hipervariável V6 do gene DNAr 16S (SOGIN et al., 2006). Ao iniciador *forward* foi adicionado a extremidade 3' um adaptador PMG *sequencing* e uma *tag* de identificação (*barcode*) composta por cinco pares de bases o que possibilita a identificação das amostras pós-sequenciamento. A reação de amplificação foi realizada em solução contendo: tampão para a reação PCR 1 X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 U de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies); 10 ng de DNA; 0,4 pmol de cada iniciador e água ultrapura (Millipore) esterilizada, para o volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termociclador Techne TC-412 Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited), nas seguintes condições: 94 °C/5 min; 30 ciclos 94 °C/30 s, 57 °C/45 s, 72 °C/1 min; extensão final a 72 °C/10 min (SOGIN et al., 2006). A verificação do tamanho e qualidade dos fragmentos resultantes foi realizada conforme descrito no item 5.5.1.

Posteriormente à corrida eletroforética, os produtos de amplificação foram purificados utilizando o *kit* de purificação ChargeSwitch<sup>®</sup> PCR Clean-Up Kit (Invitrogen, Life Technologies) e estante magnética, seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante. Em seguida, os produtos purificados foram quantificados usando Qubit<sup>®</sup> dsDNA BR Assay

Kit (Invitrogen, Life Technologies). As concentrações das diferentes amostras foram ajustadas levando-se em consideração a amostra de menor concentração e, em seguida, todas as amostras foram misturadas a fim de se obter uma única amostra equimolar composta por todas as amostras em estudo.

#### 5.7.4.1 PCR de emulsão (em-PCR)

Os fragmentos obtidos e purificados foram submetidos à reação de em-PCR (reação em cadeia da polimerase em emulsão), na qual os produtos amplificados foram ligados a esferas (*Ion Sphere*) seguindo as recomendações fornecidas pela Life Technologies (Ion PGM<sup>TM</sup> 200 Xpress<sup>TM</sup> *Template Kit*). O processo de ligação entre os produtos amplificados e as esferas ocorre em um ambiente microfluídico no qual os reagentes ficam limitados no interior de micelas de emulsão. Dessa forma, a amplificação ocorre nas esferas revestidas por streptavidina e pelo adaptador B (biotina) contendo um único produto amplificado. A recuperação das esferas contendo os novos produtos de amplificação (*haired* esferas) é feita pelo meio da quebra da emulsão facilitada pela retirada do óleo emulsificado. Após a recuperação das esferas, realizou-se a etapa de enriquecimento que consistiu na retirada das esferas em que houve falha de amplificação e que portanto, não continham os fragmentos amplificados ligados a sua superfície.

### 5.7.4.2 Sequenciamento

A qualidade da amplificação de emulsão foi confirmada em gel de agarose 2,0 % (p/v), seguida de uma nova purificação utilizando 90  $\mu$ L de Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP Reagent e estante magnética, seguindo as recomendações da *Life Technologies – Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries)*. Posteriormente, as amostras foram carregadas no Ion Chip 316 e enviadas para sequenciamento no *Ion Torrent PGM* seguindo as recomendações da *Life Technologies e utilizando o kit Ion Sequencing Kit User Guide* v 2.0. Nesse sequenciamento foi utilizado o Ion Chip 316 com capacidade de obtenção de fragmentos de até 200 pb e um volume total de informação de até 10 Mb com precisão superior a 99,0 %.

# 5.7.4.3 Análise das sequências

A análise das sequências obtidas foi realizada com o programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology - QIIME versão 1.8.0 (CAPORASO et al., 2010). As sequências foram inicialmente filtradas utilizando os seguintes parâmetros: índice de qualidade > 25, tamanho de sequência > 50 e < 150 nt, máximo homopolímero de 6 e máximo número de bases ambíguas de 0. Após a filtragem, as sequências foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) com nível de identidade de nucleotídeo de 97 %, utilizando o método UCLUST (EDGAR, 2010). A distribuição de UTOs por tratamento foi rarefeita à 30.000 sequências por amostra (determinado pela amostra com o menor número de sequência), de modo a minimizar efeitos de amostragem nas análises posteriores e a escolha da sequência representativa foi feita usando a sequencia mais abundante de cada UTO. As sequências representativas foram alinhadas utilizando a ferramenta de alinhamento PyNAST (CAPORASO, 2010) e caracterizada taxonomicamente pelo RDP Classifier usando o banco de dados do Ribossomal Database Project (RDP) incluído no QIIME 1.8.0. A plataforma QIIME também foi utilizada para gerar índices de α-diversidade (cobertura amostral, índices de riqueza de espécies – Chao1, e diversidade – Shannon) e  $\beta$ -diversidade utilizando distâncias obtida pela métrica UniFrac weighted e unweighted. O índice Chao1 usa o número de UTOs formadas a partir de uma ou duas sequências para estimar as "espécies" ausentes (CHAO, 1984). O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever que a "espécie" pertencerá a um indivíduo escolhido ao acaso em uma amostra com "S" espécies e "N" indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa (MÖHLENHOFF et al., 2001).

Os índices de cobertura, riqueza (Chao1) e diversidade (Shannon) obtidos para cada uma das amostras foram comparados pelo teste Scott-Knott (p < 0,01) no programa SASM – Agri (CANTERI et al., 2001).

#### **6 RESULTADOS**

### 6.1 Isolamento e análise morfológica das linhagens

Sessenta e oito linhagens de cianobactérias foram isoladas a partir de diferentes substratos coletados nas ilhas Rei George e Deception, na Península Antártica (Figura 1).



Figura 1 – Áreas de coleta das amostras ambientais. A: continente antártico; B: Arquipélago Shetland do Sul; C: Ilha Deception; D: Ilha Rei George na Península Antártica

Todas as linhagens foram morfologicamente identificadas ao nível genérico e estão distribuídas nas ordens Chroococcales, Pseudanabaenales, Oscillatoriales e Nostocales (Tabela 2). Na ordem Chroococcales, foram identificadas linhagens das famílias Xenococcaceae (gênero *Chroococcidiopsis*) e Dermocarpellaceae (gênero *Stanieria*), enquanto que nas ordens Pseudanabaenales e Oscillatoriales as famílias Pseudanabaenaceae (gêneros *Leptolyngbya* e *Pseudanabaena*) e Oscillatoriaceae (gêneros *Phormidium, Microcoleus* e *Wilmottia*) foram reconhecidas, respectivamente. Na ordem Nostocales, representantes das famílias Nostocaceae (gêneros *Nodularia, Hydrocoryne* e *Nostoc*), Microchaetaceae (gênero *Dactylothamnos*) e Rivulariaceae (gênero *Calothrix*) foram encontradas.

O registro por fotomicrografia de microscopia óptica (Figuras 2 e 3) e a medição celular das 68 linhagens de cianobactérias foi realizada (Tabela 3).

Onders	E4:-	Identificação	Numeração	Meio de	e Cultivo	Matarial	Danta da Calata	Data	Coordenadas
Ordem	Familia	morfológica	CENA	Man.	Isol.	Material	Ponto de Coleta	Data	Geográficas
		Chroococcidiopsis	CENA401	BG-11	BG-11	Rocha	Agat Point, próximo à geleira	19.01.2009	62° 12' 07"S;
		sp.					Baranowski, Baía do		58° 26' 55"W
							Almirantado, Ilha Rei George		
		Chroococcidiopsis	CENA408	BG-11	BG-11	Associada a alga verde	Arctowski, Baía do	21.01.2009	62° 09' 46"S;
	sae	sp.				(Prasiola crispa)	Almirantado, Ilha Rei George		58° 27' 46"W
es	cace	Chroococcidiopsis	CENA416	BG-11	BG-11	Rocha	Agat Point, próximo à geleira	19.01.2009	62° 11' 54"S;
ococ	sp.					Baranowski, Baía do		58° 26' 32''W	
0000	Xen						Almirantado, Ilha Rei George		
Chr		Chroococcidiopsis	CENA440	BG-11	BG-11	Rocha	Morro da Cruz/Casinha do	30.01.2009	62° 05' 10"S;
		sp.					cachorro, próximo a EACF,		58° 23' 33"W
							Baía do Almirantado, Ilha Rei		
							George		
	Dermocarnellaceae	Stanieria sp.	CENA421	SWBG-	SWBG-	Biofilme levemente aderido	Kroner Lake, Whalers Bay, Ilha	08.02.2011	62° 58' 52"S;
	Definitearpenaceae			11	11	ao substrato, água salgada	Deception		60° 34' 42"W
		Leptolyngbya sp.	CENA402	BG-11	3NP	Biofilme	Refúgio 2, próximo a EACF,	24.01.2009	62° 05' 24"S;
							Baía do Almirantado, Ilha Rei		58° 24' 10"W
ules							George		
Jaena		Lentolynghyg sp	CENA403	BG-11	3NP	Biofilme	Próximo a FACE Baía do	30.01.2009	62° 05' 10"S.
anał	Pseudanabaenaceae	Leptolyngbyd sp.	CERTIO	<b>D</b> 0 11	514	marrom/esverdeado	Almirantado Ilha Rei George	50.01.2009	58° 23' 28''W
seud		Lentolynghyg sp	CFNA404	BG-11	BG-11	Biofilme marrom	Geleira Znosko próximo à	26.01.2009	62° 05' 43"S
Ч		Lepioryngoyu sp.	CLIMITOT	<i>b</i> 0 11	DO 11	Diomine martoni	estação Peruana Baía do	20.01.2007	58° 28' 14"W
							Almirantado Ilha Rei George		50 20 11 W

Tabela 2 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (continua)

Coordenadas Identificação Numeração Meio de Cultivo Ordem Família Material Ponto de Coleta Data Geográficas morfológica CENA Man. Isol. Pseudanabaena sp. CENA405 BG-11 BG-11 Baía do Almirantado, Ilha Rei 2009 \_ \_ George CENA407 BG-11 BG-11 Solo Arctowski. Baía 21.01.2009 62° 09' 51"S: Leptolyngbya sp. do Almirantado, Ilha Rei George 58° 27' 29"W Leptolyngbya sp. CENA409 BG-11 BG-11 Biofilme esverdeado Lago formado na praia, próximo 24.01.2009 62° 05' 24"S; ao mar, Baía do Almirantado, 58° 24' 10"W Ilha Rei George Leptolyngbya sp. CENA411 BG-11 BG-11 Biofilme Refúgio 2, Baía do 24.01.2009 62° 05' 24"S; Pseudanabaenaceae Pseudanabaenales Almirantado, próximo à EACF, 58° 24' 10"W Baía do Almirantado, Ilha Rei George Nodosilinea sp. CENA414 BG-11 3NP Biofilme, poça entre geleira Agat Point, próximo à geleira 19.01.2009 62° 11' 54"S: e lago Baranowski, Baía do 58° 26' 32"W Almirantado, Ilha Rei George *Leptolyngbya* sp. CENA415 BG-11 3NP Biofilme Agat Point, próximo à geleira 19.01.2009 62° 11' 54"S; Baranowski, Baía do 58° 26' 32"W Almirantado, Ilha Rei George 3NP Leptolyngbya sp. CENA419 BG-11 Associada a alga verde Arctowski, 21.01.2009 62° 09' 46"S; Baía do (Prasiola crispa) Almirantado, Ilha Rei George 58° 27' 46"W Biofilme Leptolyngbya sp. CENA422 BG-11 BG-11 Geleira Wanda, Baía do 03.02.2009 62° 06' 42"S: Almirantado, Ilha Rei George 58° 21' 29"W

Tabela 2 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (continuação)

Orders	E4:-	Identificação	Numeração	Meio de	e Cultivo	Matarial	Dente de Celete	Data	Coordenadas
Ordem	Familia	morfológica	CENA	Man.	Isol.	Material	Ponto de Coleta		Geográficas
		Leptolyngbya sp.	CENA426	BG-11	BG-11	Biofilme marrom, água	Lago Telephone Bay, Ilha	16.02.2011	62° 55' 06"S;
						doce	Deception		60° 40' 08"
		Nodosilinea sp.	CENA432	BG-11	3NP	Biofilme, água doce	Collins Point, Loberia, Ilha	15.02.2011	62° 59' 55"S;
							Deception		60° 34' 37"W
		<i>Leptolyngbya</i> sp.	CENA439	BG-11	AA	Biofilme verde	Lago Sapatilla, Ilha Deception	14.02.2011	62° 59' 00"S;
						acinzentado, rocha			60° 40' 31''W
		<i>Leptolyngbya</i> sp.	CENA446	BG-11	BG-11	Biofilme	Agat Point, próximo à geleira	19.01.2009	62° 11' 54"S;
	(h						Baranowski, Baía do		58° 26' 32''W
lales	acea						Almirantado, Ilha Rei George		
baer	)aen:	Leptolyngbya sp.	CENA453	BG-11	3NP	Biofilme	Geleira Wanda, Baía do	03.02.2009	62° 06' 42"S;
lana	anat						Almirantado, Ilha Rei George		58° 21' 29"W
seuc	seud	Leptolyngbya sp.	CENA454	BG-11	BG11	Sedimento, fundo lago.	Geleira Znosko, próximo à	26.01.2009	62° 05'43"S;
Н	ď.					Material esverdeado	estação Peruana, Baía do		58° 28' 14''W
							Almirantado, Ilha Rei George		
		Leptolyngbya sp.	CENA455	BG-11	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme verde	Refúgio 2, próximo a EACF, Baía do Almirantado, Ilha Rei	24.01.2009	62° 05' 24"S; 58° 24' 10"W
		<i>Leptolyngbya</i> sp.	CENA456	BG-11	BG-11	Biofilme verde. Água doce	Próximo acampamento, Crater	11.02.2011	62° 58' 50"S;
		1 5 6 5 1				U	Lake, Ilha Deception		60° 39' 54"W
		<i>Leptolyngbya</i> sp.	CENA457	BG-11	BG-11	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
S		Wilmottia sp.	CENA395	BG-11	BG-11	Líquen aderido à rocha	Arctowski, Baía do	21.01.2009	62° 09' 46''S;
riale							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27' 46''W
llato:	Phormidiaceae	Microcoleus sp.	CENA396	BG-11	BG-11	-	Baia Almirantado, Ilha Rei	2009	-
<b>Dsci</b>							George		

Tabela 2 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (continuação)

Ordem Família	Família	Identificação ília	Numeração	Meio de	e Cultivo	Matarial	Ponto de Coleta	Data	Coordenadas
Ordeni	Faiiiiia	morfológica	CENA	Man.	Isol.	Wateria	r onto de Coleta		Geográficas
1		Microcoleus sp.	CENA413	BG-11	BG-11	Rocha	Agat Point, próximo à geleria	19.01.2009	62° 11' 54"S;
							Baranowski, Baía do		58° 26' 32''W
							Almirantado, Ilha Rei George		
		Microcoleus sp.	CENA417	BG-11	3NP	Biofilme	Punta Plaza, Baía do	20.01.2009	62° 05' 27"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 24' 19"W.
		Phormidium sp.	CENA424	BG-11	BG-11	Biofilme alaranjado. Água	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
						doce	Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54''W
		Microcoleus sp.	CENA428	BG-11	BG-11	-	Baía do Almirantado, Ilha Rei	2009	-
S	e						George		
rriale	aces	Microcoleus sp.	CENA431	BG-11	BG-11	-	Baía do Almirantado, Ilha Rei	2009	-
llatc	midi						George		
Osci	Phor	Wilmottia sp.	CENA441	BG-11	BG-11	Associada a alga verde	Arctowski, Baía do	21.01.2009	62° 09' 46"S;
						(Prasiola crispa)	Almirantado, Ilha Rei George		58° 27' 46"W
		Wilmottia sp.	CENA442	BG-11	3NP	Biofilme	Collins Point, Loberia, Ilha	15.02.2011	62° 59' 55"S;
							Deception		60° 34' 37"W
		Wilmottia sp.	CENA443	BG-11	3NP	Líquen aderido à rocha	Arctowski, Baía do	21.01.2009	62° 09' 46"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27' 46"W
		Wilmottia sp.	CENA448	BG-11	3NP	Líquen aderido à rocha	Arctowski, Baía do	21.01.2009	62° 09' 46"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27' 46''W
		Wilmottia sp.	CENA450	BG-11	3NP	Líquen aderido à rocha	Arctowski, Baía do	21.01.2009	62° 09' 46"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27' 46''W

Tabela 2 – Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (continuação)

Ordem	Família	Identificação	Numeração	Meio de	Cultivo	Material	Ponto de Coleta	Data	Coordenadas
ordeni	1 annna	morfológica	CENA	Man.	Isol.	Wateria	Tonto de Coleta	Data	Geográficas
		Halotia branconii	CENA390	BG-11 <sub>0</sub>	3NP	Biofilme aderido a ossos de	Punta Plaza, Baía do	20.01.2009	62° 05' 28"S;
						baleia	Almirantado, Ilha Rei George		58° 24' 22''W
		Halotia branconii	CENA391	BG-11	BG-11	Biofilme aderido a ossos de	Punta Plaza, Baía do	20.01.2009	62° 05' 28"S;
						baleia	Almirantado, Ilha Rei George		58° 24' 22''W
		Halotia branconii	CENA392	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido a ossos de	Punta Plaza, Baía do	20.01.2009	62° 05' 28"S;
						baleia	Almirantado, Ilha Rei George		58° 24' 22''W
		Hydrocoryne sp.	CENA393	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme. Poça de água	Agat Point, próximo à geleira	19.01.2009	62° 11' 52"S;
						doce	Baranowski, Baía do		58° 27'42"W
							Almirantado, Ilha Rei George		
		Nostoc sp.	CENA394	BG-11 <sub>0</sub>	$BG11_0$	Biofilme	Refúgio 2, próximo à EACF,	24.01.2009	62° 05' 24"S;
SS	ae						Baía do Almirantado, Ilha Rei		58° 24' 10''W
ocale	cace						George		
Voste	osto	Nostoc sp.	CENA397	BG-11 <sub>0</sub>	$BG11_0$	Água	Arctowski, Baía do	01.2010	62° 09' 58"S;
4	Z						Almirantado, Ilha Rei George		58° 27'59"W
		Hydrocoryne sp.	CENA398	BG-11	BG-11	Biofilme. Poça de água	Agat Point, próximo à geleira	19.01.2009	62° 11' 52"S;
						doce	Baranowski, Baía do		58° 27'42"W
							Almirantado, Ilha Rei George		
		Nodularia sp.	CENA399	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11	Sedimento. Água salobra	Lago Geotermal, Illha	14.04.2006	62° 58'52"S;
							Deception		60° 34'42"W
		Nostoc sp.	CENA400	BG-11	3NP	Biofilme	Refúgio 2, próximo a EACF,	24.01.2009	62° 05' 24"S;
							Baía do Almirantado, Ilha Rei		58° 24' 10"W
							George		

Tabela 2 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (continuação)

Ordem Família	Identificação	Numeração	Meio de	e Cultivo	Material	Ponto de Coleta	Data	Coordenadas	
Ordeni	Tannna	morfológica	CENA	Man.	Isol.	Wateria	I onto de Coleta	Data	Geográficas
		Nostoc sp.	CENA406	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Água	Arctowski, Baía do	01.2010	62° 09' 58"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27'59"W
		Nostoc sp.	CENA418	BG-11	BG-11	Água	Arctowski, Baía do	01.2010	62° 09' 58"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27'59"W
		Halotia longispora	CENA420	BG-11	BG-11	Rocha	Agat Point, próximo à geleria	19.01.2009	62° 11' 54"S;
							Baranowski, Baía do		58° 26' 32"W
							Almirantado, Ilha Rei George		
		Nostoc sp.	CENA423	BG-11	AA	Biofilme verde. Água doce	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
							Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54"W
		Nostoc sp.	CENA425	BG-11	AA	Biofilme verde. Água doce	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
lles	ceae	сеае					Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54"W
stoca	tocac	Nostoc sp.	CENA430	BG-11	AA	Biofilme verde. Água doce	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
Nos	Nost						Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54"W
		Nostoc sp.	CENA434	BG-11	AA	Biofilme verde. Água doce	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
							Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54''W
		Nostoc sp.	CENA435	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11	Água	Arctowski, Baía do	01.2010	62° 09' 58"S;
							Almirantado, Ilha Rei George		58° 27'59"W
		Nostoc sp.	CENA436	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
		Nostoc sp.	CENA437	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
		Nostoc sp.	CENA438	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W

Tabela 2 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (continuação)

Ordem Família		Identificação	Numeração	Meio de Cultivo		Materia	Ponto de Coleta	Data	Coordenadas
olucin	1 annna	morfológica	CENA	Man.	Isol.		Tomo de Coleta	Data	Geográficas
		Nostoc sp.	CENA444	BG-11	AA	Biofilme verde. Água doce	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
	e						Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54"W
	acea	Nostoc sp.	CENA451	BG-11	BG-11	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
	stoc					Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
	Nc	Nostoc sp.	CENA452	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
		Dactylothamnos sp.	CENA410	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme verde	Refúgio 2, próximo a EACF,	24.01.2009	62° 05' 24"S;
	e						Baía do Almirantado, Ilha Rei		58° 24' 10''W
	acea						George		
	chaet	Dactylothamnos sp.	CENA412	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	-	Baía do Almirantado, Ilha Rei	2009	-
les	croc						Geoge		
toca	Wi	Dactylothamnos sp.	CENA433	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme verde. Água doce	Lago temporário próximo ao	11.02.2011	62° 58' 50"S;
Nos							Crater Lake, Ilha Deception		60° 39' 54"W
		Calothrix sp.	CENA427	BG-11	BG-11	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
		Calothrix sp.	CENA429	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme. Água salobra	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
	ae						Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
	iace	Calothrix sp.	CENA445	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
	'ular					Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
	Riv	Calothrix sp.	CENA447	BG-11 <sub>0</sub>	BG-11 <sub>0</sub>	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W
		Calothrix sp.	CENA449	BG-11	BG-11	Biofilme aderido à rocha.	Lago próximo à estação	19.02.2011	62° 58' 32"S;
						Água salobra	Argentina, Ilha Deception		60° 42'03"W

Tabela 2 - Linhagens de cianobactérias isoladas a partir de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception na Península Antártica, Arquipélago Shetland do Sul (conclusão)

Ordem	Família	Linhagem	Comprimento	Largura	Observação
Olueill	ганша	Lilliageni	(µm)		Ouservação
ပ		Chroococcidiopsis sp. CENA401	-	$2,0-4,5^{d}$	fissão binária e múltipla
ŏ.	Vanaaaaaaaaaa	Chroococcidiopsis sp. CENA408	-	3,1 – 5,2 <sup>d</sup>	fissão binária e múltipla
ooc ales	Aenococcaceae	Chroococcidiopsis sp. CENA416	-	$3,2-5,0^{d}$	fissão binária e múltipla
, jhr		Chroococcidiopsis sp. CENA440	-	$2,4-5,5^{d}$	fissão binária e múltipla
0	Dermocarpellaceae	Stanieria sp. CENA421		$4,0-9,0^{d}$	fissão múltipla, marrom-avermelhado
		Leptolyngbya sp. CENA402	2,0-4,9	1,0 - 1,4	bainha, constricta, grânulo na célula terminal? cel. terminal cônico – arredondada, verde-acizentada
		Leptolyngbya sp. CENA403	1,4-2,2	1,0 - 1,3	bainha, constricta, cél. terminal cônico – arredondada, verde-acizentada
		Leptolyngbya sp. CENA404	1,4 – 2,7	1,0-1,4	bainha, constricta, cél. terminal arredondada, necrídeos, falsa ramificação
		Pseudanabaena sp. CENA405	1,8 - 3,0	1,3-2,2	constricta, cél. terminal cilindrica
		Leptolyngbya sp. CENA407	1,0 - 1,6	1,6-2,0	cél. terminal arredondada
		Leptolyngbya sp. CENA409	2,0-4,0	1,0-1,2	bainha, grânulos nos septos e polo da cél. terminal, cél. terminal cilíndrico - arredondado
		Leptolyngbya sp. CENA411	2,8-4,4	1,2-1,6	constricta, cél. terminal cônico - arredondada
ales	ceae	Nodosilinea sp. CENA414	1,0 - 1,6	1,5 – 2,3	bainha, necrídeos, cél. terminal cilíndrico – arredondada, grânulos no ápice da célula terminal, falsa ramificação
abaen	baena	Leptolyngbya sp. CENA415	1,9 – 4,3	0,9 – 1,2	grânulos nos septos e na cél. terminal, cél. terminal cilíndricas - arredondadas
lana	ana	Leptolyngbya sp. CENA419	0,7-2,4	1,3-2,0	necrídeos
enc	pu	Leptolyngbya sp. CENA422	0,9 -2,1	1,8-2,3	bainha, cél. terminal cilíndrico - arrendondada
$\mathbf{P}_{\mathbf{S}}$	Pse	Leptolyngbya sp. CENA426	0,7-2,6	2,0-3,1	bainha, necrídeo, ram. falsa, cél. terminal cilíndrico - arrendondada
		Nodosilinea sp. CENA432	1,6 – 3,2	1,0 – 1,3	bainha, grânulos nos septos, septos translúcidos, cél. terminal cilindrico - arredondada
		Leptolyngbya sp. CENA439	1,7 – 2,3	1,0-1,3	grânulos nos septos, septos translúcidos, cél. terminal cilíndrico - arredondada
		Leptolyngbya sp. CENA446	1,3 - 1,9	1,8-2,3	bainha, necrídeos, falsa ramificação
		Leptolyngbya sp. CENA453	1,6 - 3,3	1,0-1,2	cél. terminal cilíndrico - arredondada
		Leptolyngbya sp. CENA454	1,7 - 3,3	0,9 - 1,1	cél. terminal cilíndrico - arredondada
		Leptolyngbya sp. CENA455	1,7-4,2	1,0-1,2	cél. terminal cilíndrico – arredondada – as vezes pontiaguda
		<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA456	2,3-4,3	0,9 - 1,2	cél. terminal cilíndrico - arredondada
		Leptolyngbya sp. CENA457	2,1-4,0	1,0 - 1,2	cél. terminal cilíndrico - arredondada

(continua)

Tabela 3 – Análise morfométrica das linhagens de cianobactérias isoladas

Tabela 3 – Análise morfométrica das linhagens de cianobactérias isoladas					(continuação)
Ordem	Família	Linhagem	Comprimento (µm)	Largura	Observação
		Wilmottia sp. CENA395	2,3 - 4,4	3,8-4,2	bainha, cél. terminal arredondada
		Microcoleus sp. CENA396	3,0-6,0	4,3 - 6,3	bainha, necrídeos, aerótopo, ligeira atenuação em direção ao ápice
		Microcoleus sp. CENA413	2,5-5,5	3,7-6,2	bainha, necrídeo, movimento, cél. terminal capitada e com caliptra
		Microcoleus sp. CENA417	1,9 - 3,4	4,2-7,8	bainha, necrídeo, cél. terminal capitada e com caliptra
		Phormidium sp. CENA424	1,5 – 3,4	6,7 – 9,0	bainha, septos com grânulo, ápice curvo com necrídeo, cél. terminal cônico –arredondada, levemente constricta
iales	ceae	Microcoleus sp. CENA428	2,6-4,6	3,6-6,7	necrídeos, grânulos dispersos, movimento, cél. terminal capitada e com caliptra, tricoma curvo no ápice, atenuação em direção ao ápice
tori	dia	Microcoleus sp. CENA431	2,3-4,4	4,6-5,6	necrídeo, bainha, tricoma curvo no ápice, capitado com caliptra
scilla	hormi	Wilmottia sp. CENA441	2,1-4,6	3,6-4,3	bainha, tricoma não constrictos nem atenuados, cél. terminal cônico - arredondado
0	d.	Wilmottia sp. CENA442	3,1 - 4,4	3,6-4,3	bainha, tricoma não constrictos nem atenuados, cél. terminal cônico - arredondado
		Wilmottia sp. CENA443	3,7 - 6,5	4,5-6,3	bainha, tricoma não constrictos nem atenuados, cél. terminal cônico - arredondado
		Wilmottia sp. CENA448	3,0-3,8	4,0-4,8	bainha, tricoma não constrictos nem atenuados, cél. terminal cônico - arredondado
		Wilmottia sp. CENA450	2,2-6,3	3,4-4,7	bainha, tricoma não constrictos nem atenuados, cél. terminal cônico - arredondado
		Halotia branconii CENA390	$2.1 - 3.2^{v}$	$3.8 - 5.1^{v}$	marrom
			$2.1 - 3.6^{h}$	$2.5 - 4.5^{\text{h}}$	
			$2.7 - 4.3^{a}$	$3.4 - 5.3^{a}$	
		Halotia wernereae CENA391	$2.4 - 3.4^{v}$	$2.4 - 3.7^{v}$	marrom
			$2.0 - 3.1^{h}$	$2.8 - 3.9^{h}$	
es	eae		$3.7 - 5.1^{a}$	$3.7 - 5.1^{a}$	
cal	ace	Halotia branconii CENA392	$2,0-3,0^{v}$	$3,4-4,7^{v}$	marrom
sto	toc		$2.9 - 3.0^{h}$	$3.4 - 3.8^{h}$	
Ň	los		$4,0-4,3^{a}$	$3,6-5,9^{a}$	
	4	Hydrocoryne sp. CENA393	3,5 – 4,9 <sup>v</sup>	4,4 – 5,2 <sup>v</sup>	múltiplos tricomas em uma mesma bainha
		- v A	$4,6-6,5^{h}$	$4,5-6,5^{h}$	*
			$5,8-9,9^{a}$	$4,7-5,4^{a}$	
		Nostoc sp. CENA394	$2,7-3,8^{v}$	$3,8-5,0^{v}$	-
		-	$3,2-4,9^{h}$	$2,8-4,3^{h}$	

Ordem	Família	Linhagem	Comprimento (µm	Largura	Observação
		Nostoc sp. CENA397	3,6 – 5,5 <sup>v</sup>	3,6 - 5,5 <sup>v</sup>	-
			5,4 - 8,4 <sup>h</sup>	5,4 - 8,4 <sup>h</sup>	
		Hydrocoryne sp. CENA398	2,9 – 5,8 <sup>v</sup> 5,5 – 7,8 <sup>h</sup>	$4,0-5,4^{v}$ $3,8-5,3^{h}$	múltiplos tricomas em uma mesma bainha
		Nodularia sp. CENA399	6,4 - 10,8 $3,6 - 5,5^{v}$ $5,4 - 8,4^{h}$	$4,7-6,0^{\circ}$ $3,8-4,8^{\circ}$ $5,0-7,0^{\rm h}$	-
		Nostoc sp. CENA400	2,5 – 3,5 <sup>v</sup>	3,6 – 5,5 <sup>v</sup>	-
		Nostoc sp. CENA406	2,7 – 4,9 <sup>h</sup>	$4,5-5,5^{h}$ $3,6-5,1^{d}$	-
ales	aceae	Nostoc sp. CENA418	$2,6-4,0^{v}$	$2,8-4,1^{v}$	_
Nostoc	Vostoca	Halotia longispora CENA420	$3,7-5,0^{v}$ $3,5-3,9^{h}$	$3,0-4,6^{v}$ $3,4-3,6^{h}$	marrom
		Nostoc sp. CENA423	4,6 – 8,5 <sup>a</sup> 1,9 – 3,6 <sup>h</sup>	$3,6-5,8^{a}$ $3,9-4,9^{h}$ $3,3-4,8^{d}$	-
		Nostoc sp. CENA425	$3,1-4,5^{v}$ $3,4-3.9^{h}$	$4,0-5,0^{v}$ 5 0 - 5 6 <sup>h</sup>	-
		Nostoc sp. CENA430	$4,2-5,5^{v}$ $4,1-5,7^{h}$	$4,1-5,6^{v}$ $4,1-6,5^{h}$	-
		Nostoc sp. CENA434	$2,7-7,0^{v}$	3,2-4,4 <sup>v</sup>	-
		Nostoc sp. CENA435	$2,5-4,0^{v}$ $2,7-4,1^{h}$	4,2 – 5,9 <sup>v</sup> 3,0 – 5,4 <sup>h</sup>	-
		Nostoc sp. CENA436	$2,0-4,4^{v}$ $2,9-4,9^{h}$	$4,0-5,3^{v}$ $3,7-5,6^{h}$	-
		Nostoc sp. CENA437	$2,5-4,1^{v}$ $2,8-6,0^{h}$	$3,4-4,6^{v}$ $3,8-6,1^{h}$	-

# Tabela 3 – Análise morfométrica das linhagens de cianobactérias isoladas

(continuação)

Tabela 3 – Análise morfométrica das linhagens de cianobactérias isoladas

(conclusão)

Ordem	Família	Linhagem	Comprimento	Largura	Observação
Oldelli	Taillina	Linnageni	(µm		Observação
		Nostoc sp. CENA438	2,3 – 4,3 <sup>v</sup>	2,3 – 4,3 <sup>v</sup>	-
			$2,3-5,4^{h}$	$4,0-6,4^{h}$	
	eae	Nostoc sp. CENA444	3,5 – 5,2 <sup>v</sup>	3,9 – 4,8 <sup>v</sup>	-
	cac	Nostoc sp. CENA451	3,9–5,1 <sup>v</sup>	$4,2-5,8^{v}$	-
	stoe	-	$4,8-7,0^{\text{h}}$	$4,8-6,8^{h}$	
	Ň	Nostoc sp. CENA452	$2,0-3,0^{v}$	3,9 – 4,8 <sup>v</sup>	-
	-		$3,7-6,7^{\text{h}}$	$4,5-6,0^{h}$	
			$4,4-5,5^{a}$	$5,0-6,6^{a}$	
		Dactylothamnos sp. CENA410	1,1 – 6,6 <sup>v</sup>	5,8 – 9,3 <sup>v</sup>	grânulos, bainha, necrídeos, atenuação em direção ao ápice, heterócitos
	Microchaetaceae		4,3 – 10,0 <sup>h</sup>	$2,5-9,3^{h}$	terminais e intercalares
les		Dactylothamnos sp. CENA412	4,3 – 6,9 <sup>v</sup>	$5,5-7,8^{v}$	grânulos, bainha, necrídeos, atenuação em direção ao ápice, heterócitos
oca			6,6 – 11,5 <sup>h</sup>	$4,8-7,3^{h}$	terminais e intercalares
ostc		Dactylothamnos sp. CENA433	$3,5-6,4^{v}$	$5,1-6,1^{v}$	grânulos, bainha, necrídeos, atenuação em direção ao ápice, heterócitos
ž			5,7 – 10,9 <sup>h</sup>	$5,7-7,2^{h}$	terminais e intercalares
		Calothrix sp. CENA427	$1,9-5,3^{v}$	5,6 – 15,5 <sup>v</sup>	necrídeos, falsa ramificação, atenuação em direção ao ápice não
			2,2 – 5,9 <sup>h</sup>	7,7 – 12,7 <sup>h</sup>	terminando em pêlo
		Calothrix sp. CENA429	$2,9-6,5^{v}$	4,7 – 14,9 <sup>v</sup>	necrídeos, falsa ramificação, atenuação em direção ao ápice não
			4,3 – 7,6 <sup>h</sup>	4,2 – 12,1 <sup>h</sup>	terminando em pelo, heterócitos nas duas extremidades do filamento
	Rivulariaceae	Calothrix sp. CENA445	2,4-6,7	5,0 – 14,2 <sup>v</sup>	necrídeos, falsa ramificação, atenuação em direção ao ápice não
	Kivulailaceae		3,1 – 8,2 <sup>h</sup>	4,9 – 10,3 <sup>h</sup>	terminando em pêlo
		Calothrix sp. CENA447	$2,4-5,4^{v}$	4,9 – 10,5 <sup>v</sup>	necrídeos, falsa ramificação, atenuação em direção ao ápice não
			4,1 – 10,4 <sup>h</sup>	4,5 – 10,3 <sup>h</sup>	terminando em pêlo
		Calothrix sp. CENA449	2,0-4,3	$3,6-10,2^{v}$	necrídeos, falsa ramificação, atenuação em direção ao ápice não
			$6,2-7,9^{\text{h}}$	5,7 – 9,1 <sup>h</sup>	terminando em pêlo

d: diâmetro celular; v: células vegetativas; h: heterócito; a: acineto.



Figura 2 - Fotomicrografias das linhagens de cianobactérias unicelulares e homocitadas, isoladas da Antártica e representantes dos clados obtidos nas análises filogenéticas. A - Chroococcidiopsis sp. CENA401; B - Chroococcidiopsis sp. CENA416; C - Chroococcidiopsis sp. CENA400; D e E Chroococcidiopsis sp. CENA408; F, G e H - Stanieria sp. CENA421; I e J- Leptolyngbya sp. CENA439; K - Leptolyngbya sp. CENA411; L - Leptolyngbya sp. CENA402; M e N- Leptolyngbya sp. CENA404; O - Leptolyngbya sp. CENA426; P e Q - Leptolyngbya sp. CENA407; R - Leptolyngbya sp. CENA426; S - Pseudanabaena sp. CENA405; T - Nodosilinea sp. CENA414; U e V - Phormidium sp. CENA424; X – Wilmottia sp. CENA395; Z- Microcoleus sp. CENA417. Barra de escala =  $20 \,\mu m$ 



Figura 3 - Fotomicrografias das linhagens heterocitadas das cianobactérias isoladas da Antártica e representantes dos clados obtidos nas análises filogenéticas. A e B – *Nodularia* sp. CENA399; C e D – *Halotia branconii* CENA390; E - *Halotia branconii* CENA392; F e I – *Hydrocoryne* sp. CENA393; G e H - *Hydrocoryne* sp. CENA398; J- *Nostoc* sp. CENA400; K e L - *Nostoc* sp. CENA423; M - *Nostoc* sp. CENA406; N e P– *Dactylothamnos* sp. CENA410; O - *Dactylothamnos* sp. CENA412; Q - *Nostoc* sp. CENA394; R e S – *Calothrix* sp. CENA447; Barra de escala =  $20 \mu m$ 

# 6.2 Amplificação e seqüenciamento do gene que codifica para o RNAr 16S

O gene que codifica para o RNAr 16S (±1400 pares de base) foi amplificado e sequenciado com sucesso nas sessenta e oito linhagens de cianobactérias isoladas neste trabalho. Adicionalmente, os espaços intergênicos do RNAr 16-23S (332- 800 pb) de quarenta e oito linhagens foram amplificados e sequenciados (resultados não apresentados). Essas informações serão utilizadas futuramente para discussão infra-genérica dos grupos formados.

A comparação entre as sequências de RNAr 16S geradas a partir das linhagens isoladas da Antártica e outras sequências disponíveis no *GenBank* do NCBI foi realizada utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e os valores de identidade são apresentados (Tabela 4).

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
Chroococcidiopsis sp. CENA401	1.416	100	99,7	Chroococcidiopsis thermalis PCC 7203 (AB039005)
		100	98,5	Chroococcidiopsis sp. 9E-07 (FR798923)
		97	99,4	Chroococcidiopsis cubana SAG 39.79 (AJ344558)
		99	98,4	Chroococcidiopsis sp. SAG 2025 (AM709635)
		100	96,1	Chroococcidiopsis sp. SAG 2024 (AJ344553)
Chroococcidiopsis sp. CENA408	1.416	100	98,0	Uncultured bacterium clone JSC2-A6 (DQ532167)
		92	98,4	Uncultured bacterium clone ncd2030d01c1 (JF167907)
		92	98,3	Uncultured bacterium clone ncd2030b01c1 (JF175596)
		92	98,3	Uncultured bacterium clone ncd809a07c1 (HM302653)
		100	95,9	Uncultured cyanobacterium clone 3GSCR K16 (JX127185)
Chroococcidiopsis sp. CENA416	1.420	99	98,6	Chroococcidiopsis sp. SAG 2025 (AM709635)
1 1		100	98,3	Chroococcidiopsis sp. 9E-07 (FR798923)
		100	98,1	Chroococcidiopsis thermalis PCC 7203 (AB039005)
		96	98,1	Chroococcidiopsis cubana SAG 39.79 (AJ344558)
		100	95,9	Chroococcidiopsis sp. SAG 2024 (AJ344553)
Chroococcidiopsis sp. CENA440	1.416	100	98,7	Chroococcidiopsis thermalis PCC 7203 (AB039005)
1 1		100	98.3	Chroococcidiopsis sp. 9E-07 (FR798923)
		99	98.0	Chroococcidiopsis sp. SAG 2025 (AM709635)
		97	98,6	Chroococcidiopsis cubana SAG 39.79 (AJ344558)
		100	95.9	Chroococcidiopsis sp. SAG 2024 (AJ344553)
Stanieria sp. CENA421	1.415	100	97,6	Stanieria sp. PCC7301 (AB039009)
I		100	96.6	Pleurocansa sp. (X78681)
		100	96.3	$M_{\rm vxosarcina}$ sp. PCC 7312 (AJ344561)
		99	96.1	Uncultured bacterium clone SHFH444 (FJ203411)
		100	96.0	Myxosarcina sp. PCC 7325 (AJ344562)
Leptolyngbyg sp CENA402	1 454	100	98.2	Uncultured cyanobacterium clone H-A02 (DO181685)
	1.101	100	98 1	Lentolyngbya frigida ANT L64B 1 (AY493577)
		100	98.1	Uncultured cyanobacterium clone RI088 (DO181681)
		99	98.1	Uncultured bacterium MPB1-3 (AB630385)
		99	98.2	<i>Phormidium</i> sp. SAG 37.90 (EF654082)
Leptolyngbyg sp. CENA403	1.414	100	98.3	Uncultured cyanobacterium clone H-A02 (DO181685)
		100	98.2	Lentolynghya frigida ANT L64B 1 (AY493577)
		100	98.2	Uncultured cyanobacterium clone RJ088 (DO181681)
		99	98.2	Uncultured bacterium MPB1-3 (AB630385)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no GenBank (continua)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
		99	98,2	Phormidium sp. SAG 37.90 (EF654082)
Leptolyngbya sp. CENA404	1.414	100	99,8	Leptolyngbya antarctica ANT.BFI.1 (AY493590)
		100	99,7	Uncultured cyanobacterium RJ096 (IDQ181683)
		100	99,4	Uncultured bacterium GBII-14 (GQ441288)
		98	99,7	Uncultured Antarctic cyanobacterium Fr132 (AY151730)
		100	99,2	Uncultured bacterium GBII-50 (GQ441321)
Pseudanabaena sp. CENA405	1.415	100	96,6	Cyanobacterium enrichment culture CAWBG123 (KC818276)
-		100	96,4	Cyanobacterium enrichment culture CAWBG118 (KC818271)
		100	96,2	Synechococcus sp. PCC 7002 (AJ000716)
		100	96,1	Cyanobacterium enrichment culture CAWBG124 (KC818268)
		100	96,1	Synechococcus sp. PCC7003 (AB015059)
Leptolyngbya sp. CENA407	1.414	100	97,4	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-45 (FN811229)
		100	97,3	Leptolyngbya sp. ANT.L52.1 (AY493584)
		100	97,2	Uncultured cyanobacterium R8-R13 (DQ181690)
		100	96,9	Uncultured bacterium GBII-52 (GQ441323)
		99	96,9	Uncultured cyanobacterium FBP256 (AY250870)
Leptolyngbya sp. CENA409	1.411	99	99,4	Uncultured bacterium MPB1-8 (AB630390)
		99	99,3	Uncultured cyanobacterium RJ102 (DQ181684)
		100	99,2	Leptolyngbya antarctica ANT.L67.1 (AY493572)
		99	99,0	Uncultured Antarctic bacterium LB3-46 (AF076165)
		97	99,3	Leptolyngbya antarctica ANT.L18.1 (AY493607)
Leptolyngbya sp. CENA411	1.414	100	98,3	Uncultured cyanobacterium H-A02 (DQ181685)
		100	98,2	Leptolyngbya frigida ANT.L64B.1 (AY493577)
		100	98,2	Uncultured cyanobacterium clone RJ088 (DQ181681)
		99	98,2	Uncultured bacterium MPB1-3 (AB630385)
		99	98,2	Phormidium sp. SAG 37.90 (EF654082)
Nodosilinea sp. CENA414	1.412	100	99,5	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-62 (FN811246)
		100	99,2	Leptolyngbya sp. 0BB19S12 (AJ639895)
		100	98,7	Leptolyngbya sp. 0BB32S02 (AJ639894)
		100	98,7	Oscillatoriales cyanobacterium EcFYyyy400 (KC463194)
		100	98,7	Pseudanabaenaceae cyanobacterium DPG1-KK5 (EF654067)
Leptolyngbya sp. CENA415	1.411	99	99,2	Uncultured bacterium MPB1-8 (AB630390)
		99	99,1	Uncultured cyanobacterium RJ102 (DQ181684)
		100	99,0	Leptolyngbya antarctica ANT.L67.1 (AY493572)
		99	98,8	Uncultured Antarctic bacterium LB3-46 (AF076165)
		97	99,1	Leptolyngbya antarctica ANT.L18.1 (AY493607)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
Leptolyngbya sp. CENA419	1.415	100	97,3	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-45 (FN811229)
		100	97,2	Leptolyngbya sp. ANT.L52.1 (AY493584)
		100	97,1	Uncultured cyanobacterium R8-R13 (DQ181690)
		100	96,8	Uncultured bacterium GBII-52 (GQ441323)
		99	96,8	Uncultured cyanobacterium FBP256 (AY250870)
Leptolyngbya sp. CENA422	1.414	100	98,2	Uncultured cyanobacterium H-A02 (DQ181685)
		100	98,1	Leptolyngbya frigida ANT.L64B.1 (AY493577)
		100	98,1	Uncultured cyanobacterium clone RJ088 (DQ181681)
		99	98,1	Uncultured bacterium MPB1-3 (AB630385)
		99	98,2	Phormidium sp. SAG 37.90 (EF654082)
Leptolyngbya sp. CENA426	1.414	100	98,9	Uncultured cyanobacterium RJ094 (DQ181682)
		99	98,9	Uncultured bacterium MPB1-2 (AB630384)
		99	98,7	Uncultured bacterium MPB2-8 (DQ366018)
		98	99,1	Uncultured bacterium 20B9 (DQ366018)
		98	98,8	Uncultured cyanobacterium WB1.10 (GQ324968)
Nodosilinea sp. CENA432	1.412	100	99,1	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-62 (FN811246)
		100	98,7	Leptolyngbya sp. 0BB19S12 (AJ639895)
		100	98,5	Pseudanabaenaceae cyanobacterium DPG1-KK5 (EF654067)
		100	98,4	Leptolyngbya sp. LEGE 07298 (HM217044)
		100	98,4	Leptolyngbya margaretheana 1T12 (FR798934)
Leptolyngbya sp. CENA439	1.411	99	99,4	Uncultured bacterium MPB1-8 (AB630390)
		99	99,3	Uncultured cyanobacterium RJ102 (DQ181684)
		100	99,2	Leptolyngbya antarctica ANT.L67.1 (AY493572)
		99	99,0	Uncultured Antarctic bacterium LB3-46 (AF076165)
		97	99,3	Leptolyngbya antarctica ANT.L18.1 (AY493607)
Leptolyngbya sp. CENA446	1.415	100	99,0	Uncultured cyanobacterium RJ094 (DQ181682)
		99	99,0	Uncultured bacterium MPB1-2 (AB630384)
		99	98,7	Uncultured bacterium MPB2-8 (DQ366018)
		98	99,2	Uncultured bacterium 20B9 (DQ366018)
		98	98,9	Uncultured cyanobacterium WB1.10 (GQ324968)
Leptolyngbya sp. CENA453	1.414	100	99,9	Leptolyngbya antarctica ANT.BFI.1 (AY493590)
		100	99,7	Uncultured cyanobacterium RJ096 (DQ181683)
		100	99,5	Uncultured bacterium GBII-14 (GQ441288)
		98	99,8	Uncultured Antarctic cyanobacterium Fr132 (AY151730)
		100	99,3	Uncultured bacterium GBII-50 (GQ441321)
Leptolyngbya sp. CENA454	1.414	100	99,7	Leptolyngbya antarctica ANT.BFI.1 (AY493590)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
		100	99,6	Uncultured cyanobacterium RJ096 (DQ181683)
		100	99,3	Uncultured bacterium GBII-14 (GQ441288)
		98	99,7	Uncultured Antarctic cyanobacterium Fr132 (AY151730)
		100	99,2	Uncultured bacterium GBII-50 (GQ441321)
Leptolyngbya sp. CENA455	1.429	94	95,0	Uncultured cyanobacterium RJ051 (DQ181707)
		99	93,1	Uncultured Antarctic cyanobacterium Fr094 (AY151727)
		99	92,4	Uncultured bacterium MPB2-4 (AB630680)
		99	91,8	Phormidium sp. SAG 37.90 (EF654082)
		99	91,7	Uncultured bacterium MPB1-2 (AB630384)
Leptolyngbya sp. CENA456	1.414	100	99,7	Leptolyngbya antarctica ANT.BFI.1 (AY493590)
		100	99,6	Uncultured cyanobacterium RJ096 (DQ181683)
		100	99,3	Uncultured bacterium GBII-14 (GQ441288)
		98	99,7	Uncultured Antarctic cyanobacterium Fr132 (AY151730)
		100	99,2	Uncultured bacterium GBII-50 (GQ441321)
Leptolyngbya sp. CENA457	1.414	100	99,7	Leptolyngbya antarctica ANT.BFI.1 (AY493590)
		100	99,5	Uncultured cyanobacterium RJ096 (DQ181683)
		100	99,2	Uncultured bacterium GBII-14 (GQ441288)
		98	99,6	Uncultured Antarctic cyanobacterium Fr132 (AY151730)
		100	99,1	Uncultured bacterium GBII-50 (GQ441321)
Wilmottia sp. CENA395	1.415	100	99,9	Phormidium sp. CCAP 1462/11 (HF678504)
		100	99,7	Phormidium murrayi Ant-Ph58 (DQ493872)
		100	98,6	Phormidium murrayii ANT.LPE.2 (AY493598)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN75 (JF925319)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN76 (JF925320)
Microcoleus sp. CENA396	1.424	100	99,5	Uncultured bacterium P-13_(HQ910311)
		100	99,4	Oscillatoria sp. 327/2 (FJ461751)
		100	99,4	Microcoleus vaginatus UBI-KK2 (EF654079)
		100	99,3	Oscillatoria amoena CCAP 1459/39 (HF678512)
		100	99,3	Microcoleus vaginatus SAG 2211 (EF654074)
Microcoleus sp. CENA413	1.424	100	99,6	Uncultured bacterium P-13_(HQ910311)
		100	99,5	Oscillatoria sp. 327/2 (FJ461751)
		100	99,5	Microcoleus vaginatus UBI-KK2 (EF654079)
		100	99,5	Oscillatoria amoena CCAP 1459/39 (HF678512)
		100	99,5	Microcoleus vaginatus SAG 2211 (EF654074)
Microcoleus sp. CENA417	1.413	100	99,7	Phormidium autumnale Ant-Ph68 (DQ493874)
-		100	99,3	Phormidium autumnale SAG 35.90 (EF654081)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
		100	99,2	Phormidium autumnale Arct-Ph5 (DQ493873
		99	99,1	Uncultured bacterium MPB1-6 (AB630388)
		100	99,0	Phormidium autumnale SAG 78.79 (EF654084)
Phormidium sp. CENA424	1.415	100	99,4	Oscillatoria sp. PCC 9631 (GQ351578)
-		100	99,1	Oscillatoria sp. PCC 8926 (GQ351574)
		100	98,7	Uncultured Oscillatoria sp. GU3-6 (JN382233)
		100	98,5	Planktothrix agardhii PCC 9637 (GQ351569)
		100	98,5	Oscillatoria sp. 49 (AJ133167)
Microcoleus sp. CENA428	1.424	100	99,6	Uncultured bacterium P-13_(HQ910311)
-		100	99,5	Oscillatoria sp. 327/2 (FJ461751)
		100	99,5	Microcoleus vaginatus UBI-KK2 (EF654079)
		100	99,5	Oscillatoria amoena CCAP 1459/39 (HF678512)
		100	99,5	Microcoleus vaginatus SAG 2211 (EF654074)
Microcoleus sp. CENA431	1.424	100	99,6	Uncultured bacterium P-13_(HQ910311)
-		100	99,5	Oscillatoria sp. 327/2 (FJ461751)
		100	99,5	Microcoleus vaginatus UBI-KK2 (EF654079)
		100	99,5	Oscillatoria amoena CCAP 1459/39 (HF678512)
		100	99,5	Microcoleus vaginatus SAG 2211 (EF654074)
Wilmottia sp. CENA441	1.415	100	100	Phormidium sp. CCAP 1462/11 (HF678504)
		100	99,8	Phormidium murrayi Ant-Ph58 (DQ493872)
		100	98,7	Phormidium murrayii ANT.LPE.2 (AY493598)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN75 (JF925319)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN76 (JF925320)
Wilmottia sp. CENA442	1.415	100	99,9	Phormidium sp. CCAP 1462/11 (HF678504
-		100	99,7	Phormidium murrayi Ant-Ph58 (DQ493872)
		100	98,6	Phormidium murrayii ANT.LPE.2 (AY493598)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN75 (JF925319)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN76 (JF925320)
Wilmottia sp. CENA443	1.415	100	100	Phormidium sp. CCAP 1462/11 (HF678504
		100	99,8	Phormidium murrayi Ant-Ph58 (DQ493872)
		100	98,7	Phormidium murrayii ANT.LPE.2 (AY493598)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN75 (JF925319)
		97	99,2	Wilmottia murrayi CYN76 (JF925320)
Wilmottia sp. CENA448	1.415	100	99,8	Phormidium sp. CCAP 1462/11 (HF678504
*		100	99,7	Phormidium murrayi Ant-Ph58 (DQ493872)
		100	98,5	Phormidium murravii ANT.LPE.2 (AY493598)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
		97	99,1	Wilmottia murrayi CYN75 (JF925319)
		97	99,1	Wilmottia murrayi CYN76 (JF925320)
Wilmottia sp. CENA450	1.415	100	99,8	Phormidium sp. CCAP 1462/11 (HF678504
		100	99,7	Phormidium murrayi Ant-Ph58 (DQ493872)
		100	98,5	Phormidium murrayii ANT.LPE.2 (AY493598)
		97	99,1	Wilmottia murrayi CYN75 (JF925319)
		97	99,1	Wilmottia murrayi CYN76 (JF925320)
Halotia branconii CENA390	1.413	100	99,8	Nostoc sp. CENA186 (KC695877)
		100	98,0	Nostoc sp. CENA184 (KC695875)
		100	97,5	Nostoc sp. CENA159 (KC695853)
		100	97,4	Nostoc sp. CENA158 (KC695852)
		100	97,4	Nostoc sp. CENA160 (KC695854)
Halotia branconii CENA391	1.414	100	99,9	Nostoc sp. CENA159 (KC695853)
		100	99,8	Nostoc sp. CENA158 (KC695852)
		100	99,8	Nostoc sp. CENA160 (KC695854)
		100	98,7	Nostoc sp. CENA184 (KC695875)
		100	97,8	Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-067' (DQ185207)
Halotia branconii CENA392	1.413	100	99,7	Nostoc sp. CENA186 (KC695877)
		100	97,9	Nostoc sp. CENA184 (KC695875)
		100	97,3	Nostoc sp. CENA159 (KC695853)
		100	97,3	Nostoc sp. CENA158 (KC695852)
		100	97,3	Nostoc sp. CENA160 (KC695854)
Hydrocoryne sp. CENA393	1.413	100	99,7	Hydrocoryne sp. UFV-ANT32 (KC346268)
		100	99,7	Hydrocoryne sp. UFV-ANT31 (KC346267)
		100	99,2	Anabaena cylindrica PCC 7122 CCAP 1403/2A (HF678516)
		100	99,2	Anabaena inaequalis CCAP 1446/1A (HF678486)
		100	99,2	Anabaena augstumalis SCMIDKE JAHNKE/4a (AJ630458)
Nostoc sp. CENA394	1.413	100	99,8	Uncultured Nostoc sp. UK409 (JQ007767)
		100	99,2	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 2 (DQ185218)
		100	99,2	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 1 (DQ185217)
		99	99,3	Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-106b2' (DQ185209)
		100	99,1	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 5 cyanobiont' (DQ185249)
Nostoc sp. CENA397	1.413	100	99,0	Uncultured Nostoc sp. UK409 (JQ007767)
		100	99,0	Nostoc sp. 8901:1 (AM711539)
		100	99,0	Nostoc sp. 'Peltigera membranacea 5 (DQ185247)
		100	99,0	Uncultured Nostoc sp. clone AR5 (JQ007800)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
8	¥ /	100	98.9	Uncultured <i>Nostoc</i> sp. clone UK397 (JO007788)
Hydrocoryne sp. CENA398	1.413	100	99.7	Hvdrocorvne sp. UFV-ANT32 (KC346268)
		100	99.7	Hydrocoryne sp. UFV-ANT31 (KC346267)
		100	99,2	Anabaena cylindrica PCC 7122 CCAP 1403/2A (HF678516)
		100	99,1	Anabaena inaequalis CCAP 1446/1A (HF678486)
		100	99,1	Anabaena augstumalis SCMIDKE JAHNKE/4a (AJ630458)
Nodularia sp. CENA399	1.413	100	98,0	Nodularia spumigena CCY9414 (CP007203)
-		100	98,0	Nodularia spumigena BY1 (AF268004)
		100	97,9	Nodularia baltica BY1 (AJ133177)
		100	97,9	Nodularia spumigena UTEX-B2092 (AF268022)
		100	97,9	Nodularia spumigena NSGL02A10 (AF268015)
Nostoc sp. CENA400	1.415	98	98,5	Uncultured Nostoc sp. clone UK18 (FJ815320)
-		98	98,6	Uncultured Nostoc sp. clone A16 (FJ815318)
		98	98,5	Uncultured Nostoc sp. clone A10 (FJ815316)
		98	98,5	Uncultured Nostoc sp. clone A6 (FJ815315)
		98	98,5	Uncultured Nostoc sp. clone A22 (FJ815319)
Nostoc sp. CENA406	1.415	100	99,7	Nostoc sp. ANT.L34.1 (AY493591)
		100	99,5	Nostoc sp. ANT.L61.1 (AY493592)
		100	98,6	Nostoc edaphicum X (AJ630449)
		100	98,4	Nostoc sp. ANT.L52B.1 (AY493594)
		100	98,4	Nostoc sp. ANT.LG2.6 (AY493595)
Nostoc sp. CENA418	1.413	100	99,0	Uncultured Nostoc sp. clone UK409 (JQ007767)
		100	99,0	Nostoc sp. 8901:1 (AM711539)
		100	98,9	Nostoc sp. 'Peltigera membranacea 5 cyanobiont' (DQ185247)
		100	98,9	Uncultured Nostoc sp. clone AR5 (JQ007800)
		100	98,8	Uncultured Nostoc sp. clone UK397 (JQ007788)
Halotia longispora CENA420	1.414	100	99,8	Nostoc sp. CENA184 (KC695875)
		100	98,6	Nostoc sp. CENA159 (KC695853)
		100	98,5	Nostoc sp. CENA158 (KC695852)
		100	98,5	Nostoc sp. CENA160 (KC695854)
		100	97,8	Nostoc sp. CENA186 (KC695877)
Nostoc sp. CENA423	1.415	100	99,4	Uncultured Nostoc sp. clone UK409 (JQ007767)
		100	99,2	Uncultured <i>Nostoc</i> sp. clone AR125 (JQ007769)
		100	99,1	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 2 cyanobiont' (DQ185218)
		100	99,1	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 1 cyanobiont' (DQ185217)
		98	99,4	Uncultured Nostoc sp. clone A23 (FJ815298)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
Nostoc sp. CENA425	1.415	100	99,2	Uncultured Nostoc sp. clone UK409 (JQ007767)
-		100	99,0	Uncultured Nostoc sp. clone AR125 (JQ007769)
		100	98,9	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 2 cyanobiont' (DQ185218)
		100	98,9	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 1 (DQ185217)
		98	99,2	Uncultured Nostoc sp. clone A23 (FJ815298)
Nostoc sp. CENA430	1.413	100	99,3	Uncultured Nostoc sp. clone UK409 (JQ007767)
		99	99,4	<i>Nostoc</i> sp. 'Mollenhauer 1:1-106b2' (DQ185209)
		100	99,2	Nostoc punctiforme SAG 65.79 (DQ185255)
		100	99,1	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 5 cyanobiont' (DQ185249)
		99	99,0	Nostoc sp. 'Peltigera canina 2 cyanobiont' (DQ185230)
Nostoc sp. CENA434	1.413	100	98,9	Nostoc flagelliforme str. Sunitezuoqi (GU810186)
		100	98,8	Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-108' (DQ185210)
		100	98,8	Nostoc calcicola VI (AJ630448)
		100	98,7	Nostoc calcicola III (AJ630447)
		100	98,7	Nostoc commune (AB251863)
Nostoc sp. CENA435	1.413	100	98,8	Uncultured Nostoc sp. clone UK409 (JQ007767)
		100	98,8	Nostoc sp. 8901:1 (AM711539)
		100	98,7	Nostoc sp. 'Peltigera membranacea 5 (DQ185247)
		100	98,7	Uncultured Nostoc sp. clone AR5 (JQ007800)
		100	98,7	Uncultured Nostoc sp. clone UK397 (JQ007788)
Nostoc sp. CENA436	1.413	100	99,6	Uncultured <i>Nostoc</i> sp. clone UK409 (JQ007767)
		99	99,7	Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-106b2' (DQ185209)
		100	99,5	Nostoc punctiforme SAG 65.79 (DQ185255)
		100	99,4	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 5 cyanobiont' (DQ185249)
		99	99,3	Nostoc sp. 'Peltigera canina 2 cyanobiont' (DQ185230)
Nostoc sp. CENA437	1.413	100	99,5	Uncultured <i>Nostoc</i> sp. clone UK409 (JQ007767)
		99	99,5	Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-106b2' (DQ185209)
		100	99,3	Nostoc punctiforme SAG 65.79 (DQ185255)
		100	99,2	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 5 cyanobiont' (DQ185249)
		99	99,2	Nostoc sp. 'Peltigera canina 2 cyanobiont' (DQ185230)
Nostoc sp. CENA438	1.413	100	99,3	Uncultured <i>Nostoc</i> sp. clone UK409 (JQ007767)
		99	99,4	Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-106b2' (DQ185209)
		100	99,2	Nostoc punctiforme SAG 65.79 (DQ185255)
		100	99,1	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 5 cyanobiont' (DQ185249)
		99	99,0	Nostoc sp. 'Peltigera canina 2 cyanobiont' (DQ185230)
Nostoc sp. CENA444	1.415	100	99,3	Uncultured Nostoc sp. UK409 (JQ007767)

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)						
		100	99,1	Uncultured Nostoc sp. clone AR125 (JQ007769)						
		100	99,0	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 2 cyanobiont' (DQ185218)						
		100	99,0	Nostoc sp. 'Peltigera rufescens 1 cyanobiont' (DQ185217)						
		98	99,4	Uncultured Nostoc sp. clone A23 (FJ815298)						
Nostoc sp. CENA451	1.413	100	98,5	Nostoc commune SO-42 (AB098071)						
		100	98,4	<i>Nostoc</i> sp. 9104 (AM711542)						
		100	98,2	Uncultured bacterium partial FB03E03 (FM872829)						
		100	98,1	Uncultured Nostoc sp. clone AR125 (JQ007769)						
		100	98,1	Uncultured Nostoc sp. clone UK409 (JQ007767)						
Nostoc sp. CENA452	1.402	95	98,4	Nostoc sp. 9104 (AM711542)						
		95	98,4	Nostoc commune SO-42 (AB098071)						
		95	98,2	Nostoc sp. 'Pannaria fulvescens cyanobiont' NZ (EF174231)						
		95	98,2	Nostoc sp. 'Pannaria elixii cyanobiont' 1 NZ (EF174229)						
		95	98,1	Uncultured Nostoc sp. clone AR125 (JQ007769)						
Dactylothamnos sp. CENA410	1.412	100	99,5	Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G (GQ397073)						
		100	98,3	Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 (AY493596)						
		100	98,0	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-50 (FN811234)						
		99	97,3	Uncultured cyanobacterium clone BkfYyy_700 (KC463682)						
		98	97,4	Tolypothrix sp. Es_Yyy1600 (KC463187)						
Dactylothamnos sp. CENA412	1.413	100	99,5	Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G (GQ397073)						
		100	98,4	Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 (AY493596)						
		100	98,0	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-50 (FN811234)						
		99	97,4	Uncultured cyanobacterium clone BkfYyy_700 (KC463682)						
		98	97,5	Tolypothrix sp. Es_Yyy1600 (KC463187)						
Dactylothamnos sp. CENA433	1.413	100	99,6	Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G (GQ397073)						
		100	98,5	Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 (AY493596)						
		100	98,1	Uncultured cyanobacterium UMAB-cl-50 (FN811234)						
		99	97,5	Uncultured cyanobacterium clone BkfYyy_700 (KC463682)						
		98	97,6	Tolypothrix sp. Es_Yyy1600 (KC463187)						
Calothrix sp. CENA427	1.410	100	94,7	Rivularia sp. MU24 UAM-305 (EU009149)						
		100	94,6	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847580)						
		100	94,4	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847581)						
		100	94,4	Calothrix sp. PCC 7714 (AJ133164)						
		100	94,3	Rivularia sp. VP4-08 (FR798919)						
Calothrix sp. CENA429	1.410	100	94,7	Rivularia sp. MU24 UAM-305 (EU009149)						
*		100	94,6	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847580)						

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (continuação)

Linhagem	Tamanho (pb)	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)					
		100	94,4	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847581)					
		100	94,4	Calothrix sp. PCC 7714 (AJ133164)					
		100	94,3	Rivularia sp. VP4-08 (FR798919)					
Calothrix sp. CENA445	1.410	100	94,6	Rivularia sp. MU24 UAM-305 (EU009149)					
		100	94,5	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847580)					
		100	94,2	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847581)					
		100	94,2	Calothrix sp. PCC 7714 (AJ133164)					
		100	94,2	<i>Rivularia</i> sp. VP4-08 (FR798919)					
Calothrix sp. CENA447	1.410	100	94,6	Rivularia sp. MU24 UAM-305 (EU009149)					
		100	94,5	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847580)					
		100	94,2	Calothrix sp. HA4186-MV5 (HQ847581)					
		100	94,2	Calothrix sp. PCC 7714 (AJ133164)					
		100	94,2	Rivularia sp. VP4-08 (FR798919)					
Calothrix sp. CENA449	1.413	99	92,3	Uncultured bacterium clone JSC8-C11 (DQ532230)					
		77	99,5	Calothrix elsteri CCALA 953 (FR822750)					
		99	91,9	Rivularia sp. MU24 UAM-305 (EU009149)					
		99	91,8	Calothrix sp. HA4356-MV2 (JN385288)					
		99	91,8	Calothrix sp. CCAP 1410/14 (HF678500)					

Tabela 4 – Porcentagem de identidade entre as sequências de RNAr 16S (±1400 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens deste estudo e sequências depositadas no *GenBank* (conclusão)

\*Cobertura, \*\* Identidade

Os valores de identidade das sequências gênicas de RNAr 16S geradas a partir das linhagens isoladas da Antártica variaram de 91,7 a 100 % quando comparadas com sequências disponíves no banco de dados do NCBI. As sequências de RNAr 16S obtidas e outras disponíveis no banco de dados do NCBI foram utilizadas para inferências filogenéticas utilizando o método de máxima verossimilhança (ML) (Figuras 4, 5, 6 e 7). Considerando os clados formados nas árvores filogenéticas, tabelas de identidade foram geradas utilizando-se sequências de RNAr 16S contidas em clados específicos, bem como as proximamente relacionadas (Tabelas 5 a 17).



0.05

Figura 4 – Análise filogenética de sequências de RNAr 16S das linhagens da ordem Chroococcales usando o método de máxima verossimilhança (ML). As sequências geradas nesse estudo estão em negrito. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das Ilhas Deception e Rei George, respectivamente. Círculos preenchidos e vazados representam linhagens isoladas de ambientes aquáticos e terrestres ou aéreos, respectivamente. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

Linhagens		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Chroococcidiopsis sp. CENA401													
2. Chroococcidiopsis sp. CENA408		-											
3. Chroococcidiopsis sp. CENA416		91,1	-										
4. <i>Stanieria</i> sp. CENA421		90,6	88,6	-									
5. Chroococcidiopsis sp. CENA440		91,0	97,9	88,8	-								
6. <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203 (AB039005)		90,6	98,1	88,3	98,8	-							
7. Stanieria cyanosphaera PCC 7437 (AF132931)		91,7	89.3	92,7	89,0	89,0	-						
8. Stanieria sp. PCC7301 (AB039009)		90,2	88,3	97,6	88,6	88,7	92,2	-					
9. Dermocarpa sp. MBIC10768 (AB058287)		90,6	88,5	99,8	88,4	87,9	92,7	98,1	-				
10. <i>Pleurocapsa</i> sp. (X78681)		90,2	88,5	96,6	88,2	88,3	91,9	96,4	97,3	-			
11. Myxosarcina sp. PCC 7312 (AJ344561)		90,9	88,4	96,4	88,3	88,4	93,0	96,0	96,8	96,7	-		
12. Chroococcidiopsis sp. CC1 (DQ914863)		94,2	89,4	89,6	89,7	89,5	91,2	88,9	89,4	89,0	89,5	-	
13. Chroococcidiopsis sp. CCMP2733 (JF810076)		90,4	88,4	96,5	88,3	88,1	92,1	95,6	96,6	96,5	97,4	88,8	-

Tabela 5 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens morfologicamente ou filogeneticamente relacionadas (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Chroococcales – Figura 4)
Figura 5 - Análise filogenética de sequências de RNAr 16S das linhagens das ordens Pseudanabaenales e Oscillatoriales usando o método máxima verossimilhança de (ML). As sequências geradas nesse estudo estão em negrito. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das Ilhas Deception e Rei respectivamente. George, Círculos preenchidos e vazados representam linhagens isoladas de ambientes aquáticos e ou aéreos, terrestres respectivamente. Os quadrados indicam as linhagens com origem desconhecida. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



Tabela 6 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens morfologicamente ou filogeneticamente (clado I) relacionadas (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. Leptolyngbya sp. CENA455	-																
2. Leptolyngbya sp. CENA415	97,2	-															
3. Leptolyngbya sp. CENA439	97,4	99,7	-														
4. Leptolyngbya sp. CENA409	97,4	99,7	99,9	-													
5. Leptolyngbya antarctica ANT.LG2.5 (AY493603)	96,5	99,0	99,3	99,3	-												
6. Leptolyngbya antarctica ANT.L67.1 (AY493572)	96,6	99,0	99,2	99,2	99,9	-											
7. Leptolyngbya antarctica ANT.L18.1 (AY493607)	96,6	99,1	99,3	99,3	100	99,8	-										
8. Phormidium priestleyi ANT.LG2.4 (AY493580)	90,7	91,8	92,0	92,0	91,6	91,8	91,6	-									
9. Alkalinema pantanalense CENA531	90,3	91,4	91,6	91,6	91,0	91,3	91,2	93,0	-								
10. Plectolyngbya hodgsonii ANT.LG2.1 (AY493615)	89,5	90,6	90,8	90,8	91,0	90,8	91,0	91,6	91,1	-							
11. Leptolyngbya boryana PCC 6306 (EF429290)	89,6	90,8	91,1	91,1	90,8	90,9	90,8	91,7	93,1	95,1	-						
12. Leptolyngbya sp. CENA402 (clado II)	92,4	93,6	93,8	93,8	93,4	93,5	93,4	92,7	92,9	90,7	91,8	-					
13. Leptolyngbya sp. CENA404 (clado III)	91,0	91,9	92,1	92,1	91,3	91,3	91,2	90,3	90,2	88,7	90,4	91,6	-				
14. Leptolyngbya sp. CENA426 (clado IV)	91,3	93,0	93,2	93,2	93,0	92,7	92,8	91,3	90,2	89,4	88,8	93,2	91,8	-			
15. Leptolyngbya sp. CENA407 (clado V)	89,5	90,6	90,8	90,8	90,3	90,4	90,1	90,5	89,3	88,0	89,5	90,9	89,9	89,5	-		
16. Pseudanabaena sp. CENA405 (clado VI)	89,3	90,4	90,6	90,6	90,2	90,3	90,1	89,8	89,3	88,3	89,6	90,8	90,1	90,4	89,2	-	
17. Nodosilinea sp. CENA414 (clado VII)	89,9	90,7	90,9	90,9	90,6	90,9	90,6	89,9	89,7	87,9	88,8	91,2	91,3	90,2	91,2	90,7	-

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Leptolyngbya sp. CENA402	-								
2. Leptolyngbya sp. CENA403	99,9	-							
3. Leptolyngbya sp. CENA411	99,9	100	-						
4. Leptolyngbya sp. CENA422	99,8	99,9	99,9	-					
5.Leptolyngbya frigida ANT.LH52B.3 (AY493612)	99,4	99,4	99,4	99,4	-				
6. Phormidium sp. SAG37.90 (EF654082)	98,2	98,3	98,3	98,2	98,5				
7. Pseudanabaena tremula UTCC471 (AF218371)	98,3	98,4	98,4	98,3	98,2	98,9	-		
8. Leptolynbya frigida ANT.L64B.1 (AY493577)	98,1	98,2	98,2	98,1	98,2	98,8	98,5	-	
9. Pantanalinema rosaneae CENA516	93,8	93,9	93,9	93,8	93,8	94,4	94,7	94,0	-

Tabela 7 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado II (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5).

Tabela 8 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas aos clados III e IV (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Leptolyngbya sp. CENA457	-										
2. Leptolyngbya sp. CENA456	99,6	-									
3. Leptolyngbya sp. CENA453	99,7	99,7	-								
4. Leptolyngbya sp. CENA454	99,6	99,7	99,7	-							
5. Leptolyngbya sp. CENA404	99,6	99,7	99,7	99,7	-						
6. L. antarctica ANT.BFI.1 (AY493590)	99,7	99,7	99,8	99,7	99,8	-					
7. Leptolyngbya sp. CENA112 (EF088337)	91,2	91,2	91,3	91,2	91,2	91,2	-				
8. L. frigida ANT.LH70.1 (AY493574)	91,6	91,6	91,7	91,6	91,7	91,8	94,5	-			
9. Oculatella sp. VRUC135 (X84809)	91,7	91,7	91,8	91,7	91,8	92,1	91,5	92,5	-		
10. Leptolyngbya sp. CENA426	91,7	91,7	91,7	91,7	91,8	91,7	92,1	93,3	92,4	-	
11. Leptolyngbya sp. CENA446	91,8	91,8	91,9	91,9	91,8	91,8	92,2	93,5	92,6	99,4	-

Tabela 9 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado V (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7
1. Leptolyngbya sp. CENA407	-						
2. Leptolyngbya sp. CENA419	99,6	-					
3. Leptolyngbya sp. ANT.L52.1 (AY493584)	97,3	97,2	-				
4. Phormidium pristleyi ANT.PROGRESS2.5 (AY493620)	96,3	96,5	97,7	-			
5. Pseudophormidium sp. ANT.LPE.3 (AY493587)	96,8	96,8	97,2	97,2	-		
6. Leptolyngbya sp. PCC 9207 (AF317506)	91,5	91,5	91,8	91,4	91,5	-	
7. Limnothrix redekei 165a (AJ505942)	88,6	88,6	89,7	90,1	89,6	91,7	-

Tabela 10 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado VI (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5)

Linhagens	1	2	3
1. Pseudanabaena sp. CENA405	-		
2. Synechococcus sp. PCC 7002 (AJ000716)	96,3	-	
3. Synechococcus sp. PCC7003 (AB015059)	96,1	99,5	-

Tabela 11 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado VII (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5)

Linhagens	1	2	3	4	5	6
1. Nodosilinea sp. CENA432	-					
2. Nodosilinea sp. CENA414	99,3	-				
3. Nodosilinea nodulosa UTEX 2910 (EF122600)	98,1	98,1	-			
4. Pseudanabaena sp. CENA405	90,4	90,7	91,1	-		
5. Synechococcus sp. PCC 7002 (AJ000716)	90,8	91,1	90,9	96,3	-	
6. Synechococcus sp. PCC7003 (AB015059)	90,7	91,0	91,0	96,1	99,5	-

Tabela 12 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado VIII (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Pseudanabaenales e Oscillatoriales – Figura 5)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1 1
1. Phormidium sp. CENA424	-										
2. Oscillatoria sp. PCC 9631	99,4	-									
(GQ351578)											
3. Oscillatoria sp. PCC 8926	99,1	99,1	-								
(GQ351574)											
4. Oscillatoria princeps NIVA-CYA	89,1	89,1	88,7	-							
150 (AB045961)											
5. Planktothrix agardhii PCC 9637	98,6	98,8	98,3	88,9	-						
(GQ351569)											
6. Oscillatoria sp. PCC 9631	99,4	100	99,1	89,1	98,8	-					
(GQ351578)											
7. Lyngbya confervoides LC14	89,9	90,1	90,1	89,7	89,8	90,1	-				
(FJ602751)											
8. Geitlerinema sp. PCC 7105	89,8	89,9	90,0	88,7	90,1	89,9	93,4	-			
(AF132780)											
9. Phormidium lloydianum CCALA	89,9	90,3	90,3	90,6	90,1	90,3	91,4	91,8	-		
960 (JF729323)											
10. Arthrospira sp. (X75044)	91,4	91,7	91,7	89,6	91,6	91,7	91,8	91,2	91,9	-	
11. Phormidium cf. terebriformis	91,8	92,0	92,1	90,0	91,9	92,0	92,1	91,8	92,1	96,8	-
AB2002/07 (AY575933)											

Figura 6 - Análise filogenética de sequências de RNAr 16S das linhagens da ordem Nostocales (família nostocaceae) usando o método de máxima verossimilhança (ML). As sequências geradas nesse estudo em negrito. Círculos estão vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das Ilhas Deception Rei e George, respectivamente. Círculos preenchidos vazados e representam linhagens isoladas de ambientes aquáticos e ou terrestres aéreos. respectivamente. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó



Linhagens	1	2	3	4	5	6	7
1. Nodularia sp. CENA399	-						
2. Nodularia spumigena PCC 73104 (DQ185241)	97,8	-					
<i>3. Nodularia sphaerocarpa</i> PCC 7804 (DQ185243)	97,5	98,7	-				
4. Nodularia harveyana Bo53 (AJ781143)	97,9	98,3	98,0	-			
5. Nodularia harveyana BECID29 (AJ781146)	97,8	97,9	97,6	98,9	-		
6. Cyanospira rippkae PCC9501 (AY038036)	97,3	97,0	97,6	97,2	98,1	-	
7. Anabaenopsis sp. PCC 9215 (AY038033)	97,0	96,8	97,1	97,1	97,7	98,1	-

Tabela 13 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado I (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Nostocaceae – Figura 6)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. Halotia wernerae CENA158	-														
2. Halotia wernerae CENA159	99.6	-													
3. Halotia wernerae CENA160	99.8	99.7	-												
4. Halotia longispora CENA184	98.7	98.5	98.7	-											
5. Halotia branconii CENA186	97.3	97.1	97.3	97.8	-										
6. Halotia branconii. CENA390	97.4	97.3	97.5	98.0	99.8	-									
7. Halotia wernerae CENA391	99.7	99.6	99.8	98.6	97.3	97.5	-								
8. Halotia branconii CENA392	97.3	97.1	97.3	97.8	99.7	99.8	97.3	-							
9. Halotia longispora CENA420	98.6	98.4	98.6	99.7	97.8	97.9	98.5	97.8	-						
10. Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-067'	97.9	97.7	97.9	97.6	96.3	96.5	97.8	96.3	97.5	-					
11. Nostoc sp. PCC 8112	95.4	95.1	95.4	95.4	95.1	95.3	95.3	95.2	95.3	95.8	-				
12. Anabaenopsis sp. PCC 9215	96.0	95.8	96.0	96.2	95.2	95.3	96.0	95.2	96.1	96.5	95.6	-			
13. Cyanospira rippkae PCC9501	96.3	96.1	96.3	96.6	95.2	95.5	96.3	95.3	96.5	96.8	96.0	98.1	-		
14. Mojavia pulchra JT2-VF2	96.0	95.7	96.0	95.9	95.2	95.2	96.1	95.1	95.7	95.4	94.0	94.7	95.1	-	
15. Desmonostoc muscorum I	95.6	95.3	95.6	95.6	94.4	94.7	95.5	94.5	95.5	95.5	94.2	94.2	94.6	95.2	-

Tabela 14 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado II (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Nostocaceae – Figura 6)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. Hydrocoryne sp. CENA393	-																	
2. Hydrocoryne sp. CENA398	99.8	-																
3. <i>Hydrocoryne</i> sp. UFVANT-31	99.7	99.7	-															
4. <i>Hydrocoryne</i> sp. UFVANT-32	99.7	99.7	99.7	-														
5. Anabaena augstumalis SCMIDKE JAHNKE/4a	99.2	99.2	99.1	99.2	-													
6. Hydrocoryne spongiosa HA4387-MV2;	98.9	98.9	98.8	98.8	98.5	-												
7. Anabaena cylindrica UTAD_A212	99.2	99.2	99.1	99.1	99.7	98.5	-											
8. Anabaena vaginicola ISC90	99.1	99.1	99.1	99.1	99.7	98.5	99.4	-										
9. Anabaena sp. BECID8	98.2	98.2	98.1	98.1	98.3	97.7	98.4	98.0	-									
10. Anabaena sp. XPORK36C	98.3	98.3	98.2	98.2	98.4	97.8	98.5	98.1	99.9	-								
11. Anabaena sp. XP35A	98.0	98.0	97.9	97.9	98.1	97.4	98.2	97.9	99.6	99.7	-							
12. Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-067'	97.2	97.2	97.1	97.1	97.2	97.0	97.0	97.5	97.0	96.9	96.5	-						
13. Cuspidothrix issatschenkoi LEMCYA31;	95.7	95.7	95.6	95.6	96.0	95.4	96.0	95.9	96.5	96.6	96.4	95.1	-					
14. Anabaena oscillarioides BECID22	95.6	95.6	95.6	95.6	95.7	96.0	95.8	95.7	96.2	96.3	96.1	95.0	97.2	-				
15. Dolichospermum planctonicum 00-05	95.6	95.6	95.5	95.5	95.5	95.7	95.6	95.6	95.9	96.0	96.0	94.8	95.6	96.9	-			
16. Anabaena oscillarioides BO HINDAK 1984/43;	96.7	96.7	96.6	96.6	96.5	96.1	96.5	96.5	96.8	96.9	96.6	95.2	95.9	95.4	95.1	-		
17. Wollea saccata ACCS 045	96.0	96.0	95.9	95.9	95.9	95.2	95.7	95.7	95.2	95.1	94.9	94.1	93.9	93.0	92.8	96.4	-	
18. Nostoc commune SO-42	95.6	95.6	95.5	95.5	95.7	95.6	95.8	95.7	96.1	96.2	96.0	95.2	94.6	94.4	94.8	95.3	93.7	-

Tabela 15 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado III (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S de Nostocaceae – Figura 6)

Figura 7 - Análise filogenética de sequências de RNAr 16S das linhagens da ordem Nostocales, (famílias Microchaetaceae, Rivulariaceae e Scytonemataceae) usando o método de máxima verossimilhança (ML). As sequências geradas nesse estudo estão em negrito. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das Ilhas Deception e Rei George, Círculos respectivamente. preenchidos e vazados representam linhagens isoladas de ambientes aquáticos e terrestres ou aéreos, respectivamente. Os quadrados indicam as linhagens com origem desconhecida Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó



Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Dactylothamnos sp. CENA410	-												
2. Dactylothamnos sp. CENA412	99,7	-											
3. Dactylothamnos sp. CENA433	99,8	99,9	-										
4. Tolypothrix sp. PCC 7504 (AM230669)	95,0	95,1	95,2	-									
5. Tolypothrix sp. PCC 7415 (AM230668)	95,4	95,5	95,5	96,7	-								
6. Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 (AY493596)	98,3	98,4	98,5	95,4	95,2	-							
7. Coleodesmium wrangelii (AF334703)	95,6	95,6	95,7	92,5	93,0	95,4	-						
8. Hassallia byssoidea CCALA 841 SKALOUD 2008/1 (HE797728)	98,5	98,5	98,6	95,2	94,9	98,3	95,2	-					
9. Hassallia andreassenii CCALA 954 (FR822751)	98,1	98,1	98,2	95,4	95,3	99,9	95,1	98,1	-				
10. Rexia erecta CAT 1M (AY452533)	95,9	95,9	96,0	93,7	93,0	97.5	93,3	96,2	97,4	-			
11. Spirirestis rafaelensis WJT-71-NPBG6 (JQ083655)	96,8	96,8	96,9	95,7	95,8	97,8	94,5	96,0	97,7	95,2	-		
12. Tolypothrix distorta SAG 93.79 (GQ287651)	98,0	98,0	98,1	94,9	95,0	98,4	95,3	98,8	98,5	96,6	96,9	-	
13. Microchaete sp. CENA176 (KC695868)	93,7	93,7	93,8	94,1	93,4	93,9	91,6	93,7	93,9	92,7	93,6	94,2	-

Tabela 16 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado I (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S Microchaetaceae, Rivulariaceae e Scytonemataceae – Figura 7)

Tabela 17 – Análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S geradas nesse estudo e sequências de linhagens filogeneticamente relacionadas ao clado II (baseada na árvore das sequências de RNAr 16S Microchaetaceae, Rivulariaceae e Scytonemataceae – Figura 7)

Linhagens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Calothrix sp. CENA427	-										
2. Calothrix sp. CENA429	100	-									
3. Calothrix sp. CENA445	99,8	99,8	-								
4. Calothrix sp. CENA447	99,8	99,8	99,7	-							
5. Calothrix sp. CENA449	95,3	95,3	95,1	95,1	-						
6. Calothrix desertica PCC 7102 (AF132779)	94,1	94,1	94,0	94,0	91,3	-					
7. Calothrix sp. PCC 7507 (AM230678)	91,2	91,2	91,0	91,0	89,3	89,9	-				
8. Rivularia sp. PCC 7116 (AM230677)	91,7	91,7	91,6	91,6	90,8	91,4	93,9	-			
9. Calothrix sp. CCALA 953 (FR822750)	99,6	99,6	99,6	99,5	99,5	94,2	91,4	92,7	-		
10. Calothrix sp. BECID1 (AM230680)	93,1	93,1	93,0	93,0	91,0	92,3	91,2	92,1	93,5	-	
11. Calothrix sp. XP4B (AM230692)	93,1	93,1	92,9	92,9	90,5	91,4	90,3	91,1	93,5	92,9	-

# 6.3 Amplificação e seqüenciamento de fragmento do gene nifH

As sessenta e oito linhagens de cianobactérias isoladas neste trabalho foram submetidas a testes de amplificação do fragmento do gene *nifH*. Dessas, quarenta e uma apresentaram resultado positivo e tiveram esse fragmento gênico sequenciado com sucesso (292 -350 pb) (Tabela 18).

Ordem	Linhagem	Fragmento do gene <i>nifH</i> (nt)	Fragmento do gene <i>nifH</i> (aa)	
	Chroococcidiopsis sp. CENA401	325	108	
Chroococcales	Chroococcidiopsis sp. CENA408	325	108	
	Stanieria sp. CENA421	325	108	
	Leptolyngbya sp. CENA402	325	108	
	Leptolyngbya sp. CENA403	325	108	
D 1 1 1	Leptolyngbya sp. CENA404	325	108	
Pseudanabaenales	Pseudanabaena sp. CENA405	325	108	
	Leptolyngbya sp. CENA407	325	108	
	Leptolyngbya sp. CENA411	325	108	
Oscillatoriales	Wilmottia sp. CENA395	325	108	
	Halotia branconii CENA390	325	108	
	Halotia wernerae CENA391	325	108	
	Halotia branconii CENA392	325	108	
	Hydrocoryne sp. CENA393	325	108	
	Nostoc sp. CENA394	325	108	
	Nostoc sp. CENA397	325	108	
	Hydrocoryne sp. CENA398	292/325	97/108	
	Nodularia sp. CENA399	325	108	
	Nostoc sp. CENA400	325	108	
	Nostoc sp. CENA406	325	108	
	Nostoc sp. CENA418	325	108	
	Halotia longispora CENA420	325	108	
	Nostoc sp. CENA423	325	108	
S	Nostoc sp. CENA425	325	108	
ale	Nostoc sp. CENA430	325	108	
toc	Nostoc sp. CENA434	325	108	
los	Nostoc sp. CENA435	349	116	
4	Nostoc sp. CENA436	325	108	
	Nostoc sp. CENA437	325	108	
	Nostoc sp. CENA438	325	108	
	Nostoc sp. CENA444	325	108	
	Nostoc sp. CENA451	325	108	
	Nostoc sp. CENA452	325	108	
	Dactylothamnos sp. CENA410	325	108	
	Dactylothamnos sp. CENA412	325	108	
	Dactylothamnos sp. CENA433	325	108	
	Calothrix sp. CENA427	325	108	
	Calothrix sp. CENA429	325	108	
	Calothrix sp. CENA445	325	108	
	Calothrix sp. CENA447	350	115	
	Calothrix sp. CENA449	325	108	

Tabela 18 - Linhagens de cianobactérias que tiveram fragmento do gene *nifH* sequenciado

Dentre as linhagens que apresentaram o fragmento do gene *nifH*, três pertecem ao grupo das unicelulares (Chroococcales), sete ao grupo das homocitadas (Pseudanabaenales e Oscillatoriales) e trinta e uma ao grupo das heterocitadas (Nostocales). A presença desse fragmento gênico indica o potencial genético dessas linhagens em realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN). A comparação entre as sequências de *nifH* geradas a partir das linhagens isoladas da Antártica e outras sequências disponíveis no *GenBank* do NCBI é apresentada (Tabela 19).

Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
Chroococcidiopsis sp. CENA401	99	98,7	Dermocarpa sp. (U73134)
	100	96,9	Chroococcidiopsis thermalis PCC 7203 (CP003597)
	89	96,2	Chroococcidiopsis sp. 'Bad Sachsa' (AJ620858)
Chroococcidiopsis sp. CENA408	99	99,0	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC19 (HQ112346)
	99	98,4	Cylindrospermopsis raciborskii UAM544 (JQ935001)
	99	98,4	Cylindrospermopsis raciborskii UAM520 (JQ935000)
	97	99,0	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC14 (HQ112345)
	99	98,1	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> LD-D clone 7109A02 (EU381361)
Stanieria sp. CENA421	100	92,3	Hyella sp. LEGE 07179 (KC256774)
-	97	91,7	Uncultured microorganism clone 20125A19 (EF174826)
	99	90,4	Myxosarcina sp. (U73133)
	97	90,8	Uncultured microorganism clone 20113A20 (EF174746)
	97	90,8	Uncultured microorganism clone 20113A05 (EF174733)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA402 (clone 1)	100	100	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC19 (HQ112346)
(clone 1)	99	99.3	Cylindrospermonsis raciborskii UAM544 (JO935001)
	99	99.3	Cylindrospermopsis raciborskii UAM520 (JO935000)
	97	100	<i>Cylindrospermopsis</i> raciborskii MVCC14 (HO112345)
	99	99,0	<i>Cylindrospermopsis</i> raciborskii LD-F clone 7111A03 (EU381360)
<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA402 (clone 2)	100	98,1	Uncultured bacterium clone Yushu-11 (AY601047)
()	100	97.8	Nostoc sp. LEGE 06158 (KC256765)
	100	97,5	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-2 (EF988452)
	100	97,5	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-18 (EF988396)
	99	97,5	Uncultured bacterium clone P72 (GU196864)
Leptolyngbya sp. CENA403	100	99,6	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC19 (HQ112346)
	99	99,0	Cylindrospermopsis raciborskii UAM544 (JQ935001)
	99	99,0	Cylindrospermopsis raciborskii UAM520 (JQ935000)
	97	99,6	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC14 (HQ112345)
	99	98,7	Cylindrospermopsis raciborskii LD-F clone 7111A03 (EU381360)
Leptolyngbya sp. CENA404	100	99,6	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC19 (HQ112346)
~ ~ ~ ~ .	99	99,0	Cylindrospermopsis raciborskii UAM544 (JQ935001)
	99	99,0	Cylindrospermopsis raciborskii UAM520 (JQ935000)
	97	99,6	Cylindrospermopsis raciborskii MVCC14 (HQ112345)
	99	98,7	Cylindrospermopsis raciborskii LD-F clone 7111A03 (EU381360)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nifH (±325 pares de base, sem iniciadores) geradas neste estudo e outras sequências depositadas no GenBank

Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
Pseudanabaena sp. CENA405	96	95,2	Uncultured bacterium _DNA4 (AB365416)
	99	93,8	Nostoc sp. LEGE 06150 (KC256764)
	99	93,8	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-10 (EF988407)
	99	93,5	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-4 (EF988453)
Leptolyngbya sp. CENA407	99	84,8	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone D11 (JF827764)
	99	84,8	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone B11 (JF827760)
	99	84,5	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone F11 (JF827763)
	100	84,0	Uncultured bacterium clone 08-I.88 (GU193778)
	95	84,5	Uncultured bacterium clone CP-46161 (DQ531690)
Leptolyngbya sp. CENA411	100	93,2	Anabaena sp. I1 (AF124378)
	98	92,8	Cylindrospermum stagnale PCC 7417(CP003642)
	98	92,2	Uncultured bacterium clone I-5.33 (GU192666)
	97	91,8	Uncultured bacterium clone I-1.24b (JF896989)
	97	91,5	Uncultured bacterium clone I-5.69b (JF897113)
Wilmottia sp. CENA395	99	85,1	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone D11 (JF827764)
	99	85,1	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone B11 (JF827760)
	99	84,8	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone F11 (JF827763)
	100	84,3	Uncultured bacterium clone 08-I.88 (GU193778)
	95	84,8	Uncultured bacterium clone CP-46161 (DQ531690)
Halotia branconii CENA390	100	93,5	Uncultured bacterium clone I-5.33 (GU192666)
	99	93,1	Uncultured cyanobacterium clone FALLSnif02H05 (DQ398462)
	100	92,6	Uncultured bacterium clone I-1.24b (JF896989)
	100	92,3	Uncultured bacterium clone I-5.69b (JF897113)
	98	92,5	<i>Nodularia sphaerocarpa</i> Up16f clone 7116A04 (EU381377)
Halotia wernerae CENA391	100	90,4	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	100	90,4	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	100	90,1	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU30 (HM140755)
	100	90,1	Nostoc punctiforme PCC 73102 (CP001037)
	100	90,1	Uncultured bacterium clone U1b-62 (AY819602)
Halotia branconii CENA392	100	93,8	Uncultured bacterium clone I-5.33 (GU192666)
	99	93,4	Uncultured cyanobacterium clone FALLSnif02H05 (DQ398462)
	100	92,9	Uncultured bacterium clone I-1.24b (JF896989)
	100	92,6	Uncultured bacterium clone I-5.69b (JF897113)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (±325 pares de base, sem iniciadores)geradas neste estudo e outras sequências depositadas no *GenBank*(continuação)

.

Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
	98	92,8	Nodularia sphaerocarpa Up16f clone 7116A04
			(EU381377)
Hydrocoryne sp. CENA393	100	96,6	Uncultured bacterium clone 07-I.94 (GU193525)
	98	95,3	Uncultured bacterium clone Damma-R70-L-28
			(EF988515)
	98	95,3	Uncultured bacterium clone Damma-R70-L-19
		<b>.</b>	(EF988509)
	99	94,7	Uncultured bacterium clone 123B_g10 (DQ338013)
	99	94,7	Anabaena cylindrica clone CC1085A1 (AY221813)
Nostoc sp. CENA394	99	94,7	(HM140768)
	99	94,4	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.4' (AF049044)
	100	92,9	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	100	92,6	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	100	92,3	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-7 (EF988413)
Nostoc sp. CENA397	100	99,0	Uncultured bacterium clone Yushu-11 (AY601047)
	100	98,7	Nostoc sp. LEGE 06158 (KC256765)
	100	98,4	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-2 (EF988452)
	100	98,4	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-18 (EF988396)
	99	98,4	Uncultured bacterium clone P72 (GU196864)
Hydrocoryne sp. CENA398	100	96,9	Uncultured bacterium clone 07-I.94 (GU193525)
	98	95,6	Uncultured bacterium clone Damma-R70-L-28
			(EF988515)
	98	95,6	Uncultured bacterium clone Damma-R70-L-19
			(EF988509)
	99	95,0	Uncultured bacterium clone 123B_g10 (DQ338013)
	99	95,0	Anabaena cylindrica clone CC1085A1 (AY221813)
Nodularia sp. CENA399	100	95,0	Nodularia spumigena CCY9414 (CP007203)
	99	95,0	Nostoc muscorum UTEX 1933 (U04054)
	97	94,0	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band C1 (GO441641)
	98	89,4	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	97	88,6	Uncultured bacterium clone AMCn10 (FN985168)
Nostoc sp. CENA400	100	96,6	Uncultured bacterium clone BC 04 d3 (JX628600)
Ĩ	100	96,6	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	99	96,5	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.5' (AF049046)
	99	96,2	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37
	00	06.2	(HM140/62)
	99	96,2	(EU915059)
Nostoc sp. CENA406	100	96,6	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	100	96,6	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	99	96,5	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.5' (AF049046)
	99	96,2	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37 (HM140762)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (±325 pares de base, sem iniciadores)<br/>geradas neste estudo e outras sequências depositadas no *GenBank*(continuação)

Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
	99	96,2	Uncultured Antarctic bacterium clone OraP20 (EU915059)
Nostoc sp. CENA418	100	99,0	Uncultured bacterium clone Yushu-11 (AY601047)
	100	98,7	Nostoc sp. LEGE 06158 (KC256765)
	100	98,4	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-2 (EF988452)
	100	98,4	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-18
			(EF988396)
	99	98,4	Uncultured bacterium clone P72 (GU196864)
Halotia longispora	98	93,4	Cylindrospermum stagnale PCC 7417(CP003642)
CENA420			
	98	93,1	Uncultured bacterium clone I-5.33 (GU192666)
	100	92,6	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU43
			(HM140768)
	100	92,6	Anabaena sp. I1 (AF124378)
	97	92,7	Calothrix sp. PCC 7507 (CP003943)
Nostoc sp. CENA423	100	96,0	Nostoc punctiforme PCC 73102 (CP001037)
	100	96,0	Nostoc commune UTEX 584 NOSMOFENIF (L23514)
	98	96,2	Uncultured bacterium MCn6 (FN985219)
	99	95,6	Nostoc muscorum UTAD_N213 (GQ443450)
	100	95,0	Nostoc sp. LEGE 06150 (KC256764)
Nostoc sp. CENA425	97	97,1	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.5'
			(AF049046)
	98	96,5	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	98	96,5	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37
			(HM140762)
	98	96,5	Uncultured Antarctic bacterium clone OraP20 (EU915059)
	97	96,8	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.6'
			(AF049042)
Nostoc sp. CENA430	98	97,5	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	97	96,8	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU30
			(HM140755)
	98	96,5	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.5'
			(AF049046)
	98	96,2	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	98	96,2	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37
	00	00.0	(HM140762)
<i>Nostoc</i> sp. CENA434	98	99,0	Uncultured bacterium clone Damma-R/0-P-10
	00	00.7	(EF988407)
	98	98,7	Uncultured bacterium clone Damma-R/0-P-4 (EF988453)
	98	98,7	Uncultured bacterium clone Damma-R/0-P-2 (EF988452)
	98	98,7	(EE089206)
	07	00.0	(EF700370) Unaulturad hastarium along P72 (CU106964)
Negtes on CENA 425	9/	99,0 00 0	Uncultured bacterium clone P/2 (GU190804)
wostoc sp. CEINA435	98 06	98,8 08 5	Nestee sp. I EGE 06158 (KC256765)
	90 00	90,J 06.9	Nostoc muscorum UTAD N212 ( $CO442450$ )
	99 02	90,0 00 1	Inositor muscorum 01AD_N215 (OQ445450)
	93	90,4	Oncultured bacterium cione Damma-K/0-P-2 (EF988452)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de nifH (±325 pares de base, sem iniciadores) geradas neste estudo e outras sequências depositadas no GenBank (continuação)

Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
	93	98.4	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-18
		,	(EF988396)
Nostoc sp. CENA436	99	93,8	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	99	93,2	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	100	92,9	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU43
			(HM140768)
	100	92,9	Uncultured Antarctic bacterium clone OraP20
	00	02.0	(EU915059)
	99	92,9	(HM140755)
Nostoc sp. CENA437	100	97.2	Uncultured bacterium clone BC 04 d3 (IX628600)
nosice sp. ellinnor	100	96.3	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU30
	100	,0,5	(HM140755)
	98	96,5	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.5'
			(AF049046)
	100	96,0	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)
	99	95,9	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37
			(HM140762)
Nostoc sp. CENA438	100	96,9	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	100	96,0	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU30
	0.0	06.0	(HM140755)
	98	96,2	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium Tee aggregate 3.5
	100	05.6	(AF049040) Uncultured bacterium clone M1a 5 (AV810601)
	99	95,0 95.6	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37
		,0	(HM140762)
<i>Nostoc</i> sp. CENA444 (clone 1)	100	97,2	Nostoc commune UTEX 584 NOSMOFENIF (L23514)
	99	96,9	Nostoc muscorum UTAD_N213 (GQ443450)
	98	96,8	Uncultured bacterium MCn6 (FN985219)
	99	96,2	Nostoc sp. 'J. Gallon' NOSNIFH (L15551)
	99	96,2	Nostoc muscorum clone CC1090A1 (AY221814)
<i>Nostoc</i> sp. CENA444 (clone 2)	97	96,8	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.5' (AF049046)
	98	96,2	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	98	96,2	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone OTU37 (HM140762)
	98	96,2	Uncultured Antarctic bacterium clone OraP20 (EU915059)
	97	96,5	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate 3.6' (AF049042)
Nostoc sp. CENA451	100	95,0	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone D11 (IF827764)
	100	95,0	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone B11 (IF827760)
	100	94,7	Uncultured heterocystous cyanobacterium clone F11 (JF827763)
	100	93,2	Uncultured soil bacterium clone 1BA04-15 (DQ776323)
	100	92,9	Uncultured soil bacterium clone 2BA04-17 (DQ776355)
Nostoc sp. CENA452	99	97,2	Nostoc punctiforme PCC 73102 (CP001037)
	98	95,9	Nostoc sp. N2 (AF124379)
	99	94,4	Uncultured bacterium clone BC_04_d3 (JX628600)
	99	94,1	Uncultured bacterium clone M1a-5 (AY819601)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (±325 pares de base, sem iniciadores)geradas neste estudo e outras sequências depositadas no GenBank(continuação)

Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
	98	94,0	Uncultured nitrogen-fixing eubacterium 'Ice aggregate
			3.5' (AF049046)
Dactylothamnos sp.	100	95,3	Uncultured bacterium clone SC_78 (JX628595)
CENA410			
	100	95,0	Uncultured bacterium clone BC_95_c2 (JX628596)
	99	95,0	Unidentified cyanobacterium (UCU43441)
	98	95,2	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone 3 (DQ995875)
	100	94,4	Uncultured bacterium clone BC_01_c8 (JX628593)
Dactylothamnos sp. CENA412	100	95,6	Uncultured bacterium clone SC_78 (JX628595)
	100	95,3	Uncultured bacterium clone BC 95 c2 (JX628596)
	99	95,3	Unidentified cyanobacterium (UCU43441)
	98	95,6	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone 3
		,	(DQ995875)
	100	94,7	Uncultured bacterium clone BC_01_c8 (JX628593)
Dactylothamnos sp. CENA433	100	95,6	Uncultured bacterium clone SC_78 (JX628595)
	100	95,3	Uncultured bacterium clone BC 95 c2 (JX628596)
	99	95,3	Unidentified cyanobacterium (UCU43441)
	98	95,6	Uncultured nitrogen-fixing bacterium clone 3 (DO995875)
	100	94.7	Uncultured bacterium clone BC 01 c8 (JX628593)
Calothrix sp. CENA427	99	91.0	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507 (CP003943)
L. L	100	90,7	Uncultured bacterium clone I-1.24b (JF896989)
	100	90,4	Uncultured bacterium clone I-5.69b (JF897113)
	99	90,4	Nostoc sp. LEGE 06150 (KC256764)
	100	90,1	Uncultured bacterium clone I-5.89 (GU192706)
Calothrix sp. CENA429	100	98,1	Uncultured bacterium clone Yushu-11 (AY601047)
	100	97,8	Nostoc sp. LEGE 06158 (KC256765)
	100	97,5	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-2 (EF988452)
	100	97,5	Uncultured bacterium clone Damma-R70-P-18 (EF988396)
	99	97.5	Uncultured bacterium clone P72 (GU196864)
Calothrix sp. CENA445	98	91.0	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7507 (CP003943)
L. L	100	90,7	Uncultured bacterium clone I-1.24b (JF896989)
	100	90,4	Uncultured bacterium clone I-5.69b (JF897113)
	99	90,4	Nostoc sp. LEGE 06150 (KC256764)
	100	90,1	Uncultured bacterium clone I-5.89 (GU192706)
Calothrix sp. CENA447	99	96,8	Anabaena sp. L-31 ANANIFHDU (L04499)
-	99	95,9	Uncultured bacterium clone ML34 (EU544222)
	98	95,3	Uncultured bacterium partial nifH GYMA-32A (AJ716235)
	99	92,8	Nostoc sp. PCC 7120 (BA000019)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (±325 pares de base, sem iniciadores)geradas neste estudo e outras sequências depositadas no GenBank(continuação)

8		r	()
Linhagem	C (%)*	I (%)**	Organismo mais próximo no GenBank (n.º de acesso)
	100	92,5	Nostoc sp. PCC 7107 (CP003548)
Calothrix sp. CENA449	99	91,0	Calothrix sp. PCC 7507 (CP003943)
	100	90,7	Uncultured bacterium clone I-1.24b (JF896989)
	100	90,4	Uncultured bacterium clone I-5.69b (JF897113)
	99	90,4	Nostoc sp. LEGE 06150 (KC256764)
	100	90,1	Uncultured bacterium clone I-5.89 (GU192706)

Tabela 19 - Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (±325 pares de base, sem iniciadores)geradas neste estudo e outras sequências depositadas no GenBank(conclusão)

\*Cobertura, \*\* Identidade

Os valores de identidade das sequências de *nifH* geradas a partir das linhagens isoladas da Antártica variaram de 84,8 a 100 % quando comparadas com sequências disponíves no banco de dados do NCBI (Tabela 19). As sequências de nucleotídeos de *nifH* obtidas e outras disponíveis no banco de dados do NCBI foram utilizadas para inferência filogenética utilizando o método de máxima verossimilhança (ML) (Figura 8). Essas sequências de nucleotídeos foram traduzidas em aminoácidos, resultando em fragmentos com tamanhos entre 97 e 115 aa.

Figura 8 - Análise filogenética de sequências de nifH usando o método de máxima verossimilhança sequências geradas nesse estudo estão em negrito. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens Deception respectivamente. preenchidos e vazados representam linhagens isoladas de ambientes aquáticos e terrestres ou aéreos, respectivamente. Os quadrados indicam as linhagens com origem desconhecida reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó



### 6.4 Triagem molecular de substâncias com interesse biotecnológico

O DNA genômico total das sessenta e oito linhagens de cianobactérias foi testado por PCR quanto à presença de seis fragmentos gênicos e/ou espaços intergêncios indicativos da produção de substâncias de interesse biotecnológico (Tabela 20).

 Tabela 20 - Triagem por PCR dos genes e ou espaços intergêncios indicativos da produção de substâncias de interesse biotecnológico
 (continua)

	Genes e ou espacos intergêncios testados					
Identificação morfológica	mcyD*	mcyE*	mcyG*	sxtI*	aerA-	mcnC-
	-	-	-		aerB**	mcnE**
Chroococcidiopsis sp. CENA401	+	+	+	+	+	-
Chroococcidiopsis sp. CENA408	-	+	-	-	-	-
Chroococcidiopsis sp. CENA416	+	+	-	-	-	-
Chroococcidiopsis sp. CENA440	-	-	-	-	-	-
Stanieria sp. CENA421	+	+	-	-	-	+
Leptolyngbya sp. CENA402	+	+	+	+	-	-
Leptolyngbya sp. CENA403	-	+	+	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA404	+	+	-	-	+	-
Pseudanabaena sp. CENA405	+	-	-	-	+	-
Leptolyngbya sp. CENA407	+	+	-	-	+	-
Leptolyngbya sp. CENA409	+	+	-	-	-	+
Leptolyngbya sp. CENA411	+	+	+	-	+	-
Nodosilinea sp. CENA414	+	-	-	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA415	+	+	-	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA419	+	+	-	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA422	-	+	+	-	+	-
Leptolyngbya sp. CENA426	+	-	+	-	+	-
Nodosilinea sp. CENA432	+	+	+	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA439	-	-	-	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA446	+	+	-	-	-	-
Leptolyngbya sp. CENA453	+	+	-	-	+	-
Leptolyngbya sp. CENA454	-	-	+	-	+	-
Leptolyngbya sp. CENA455	+	+	-	-	-	+
Leptolyngbya sp. CENA456	-	-	-	-	+	-
Leptolyngbya sp. CENA457	-	-	+	-	-	-
Wilmottia sp. CENA395	-	-	-	+	+	+
Microcoleus sp. CENA396	-	-	-	-	-	-
Microcoleus sp. CENA413	+	-	-	-	-	+
Microcoleus sp. CENA417	+	+	-	-	-	-
Phormidium sp. CENA424	+	+	+	-	+	+
Microcoleus sp. CENA428	+	+	+	-	-	-
Microcoleus sp. CENA431	+	-	+	-	-	+
Wilmottia sp. CENA441	-	-	-	-	-	-
Wilmottia sp. CENA442	-	-	-	-	+	+
Wilmottia sp. CENA443	-	-	-	-	+	-
Wilmottia sp. CENA448	-	-	+	-	-	-
Wilmottia sp. CENA450	-	+	-	-	+	-
Halotia branconii CENA390	+	-	-	-	-	-
Halotia wernerae CENA391	-	-	-	-	-	+
Halotia branconii CENA392	-	-	-	-	+	-
Hydrocoryne sp. CENA393	-	-	-	-	-	+
Nostoc sp. CENA394	-	-	-	+	+	-
Nostoc sp. CENA397	-	+	-	+	+	-
Hydrocorvne sp. CENA398	-	+	-	-	-	+
		•				•

	Genes e ou espaços intergêncios testados								
Identificação morfológica	mcyD*	mcyE*	mcyG*	sxtI*	aerA- aerB**	mcnC- mcnE**			
Nodularia sp. CENA399	-	-	-	-	-	-			
Nostoc sp. CENA400	-	-	-	+	-	+			
Nostoc sp. CENA406	-	-	-	-	-	+			
Nostoc sp. CENA418	+	+	-	-	+	+			
Halotia longispora CENA420	-	-	+	-	-	-			
Nostoc sp. CENA423	+	+	+	-	+	-			
Nostoc sp. CENA425	+	+	+	-	-	-			
Nostoc sp. CENA430	+	+	+	-	-	-			
Nostoc sp. CENA434	-	-	-	-	-	+			
Nostoc sp. CENA435	-	-	-	-	+	+			
Nostoc sp. CENA436	-	-	-	-	-	-			
Nostoc sp. CENA437	-	-	-	-	-	-			
Nostoc sp. CENA438	-	-	-	-	-	+			
Nostoc sp. CENA444	-	-	-	-	-	-			
Nostoc sp. CENA451	-	-	+	-	+	-			
Nostoc sp. CENA452	+	-	+	-	+	-			
Dactylothamnos sp. CENA410	-	+	-	-	-	-			
Dactylothamnos sp. CENA412	+	-	-	-	-	-			
Dactylothamnos sp. CENA433	-	-	-	-	-	+			
Calothrix sp. CENA427	+	-	+	-	-	+			
Calothrix sp. CENA429	+	-	-	-	+	+			
Calothrix sp. CENA445	-	-	+	-	+	-			
Calothrix sp. CENA447	-	+	-	-	+	-			
Calothrix sp. CENA449	-	-	-	-	+	-			

 Tabela 20 - Triagem por PCR dos genes e ou espaços intergêncios indicativos da produção de substâncias de interesse biotecnológico
 (conclusão)

\* Fragmentos gênicos; \*\*espaços intergênicos. Genes envolvidos na síntese de microcistina (*McyD*, *mcyE* e *mcyG*) e saxitoxina (*sxtI*). Espaços intergênicos envolvidos na produção de inibidores de protease, *aeruginosina* (*aerA- aerB*) e cianopeptolina (*mcnC- mcnE*) (+) positivo, (-) negativo

Resultados positivos de amplificação foram obtidos em 45,6 % (mcyD), 42,6 % (mcyE), 30,9 % (mcyG), 8,8 % (sxtI), 39,7 % (aerA- aerB) e 29,4 % (mcnC- mcnE) das linhagens testadas. Os produtos amplificados desses fragmentos gênicos e/ou espaços intergêncios não foram utilizados nos passos subsequentes visando o sequenciamento dos mesmos.

### 6.5 Monitoramento contínuo da atividade da nitrogenase

Dentre as quarenta e uma linhagens de cianobactérias que apresentaram potencial genético para realização da fixação biológica do nitrogênio (FBN), dezessete e dezoito delas foram avaliadas quanto à atividade da nitrogenase em resposta a diferentes concentrações de oxigênio e a irradiância, respectivamente (Tabela 21). O perfil da atividade da nitrogenase de cada uma das linhagens é apresentado abaixo (Gráficos 1 a 18).

Ordom	Linhagam	Meio de	Atividade da nitrogenase en	m resposta à
Oldelli	Linnagem	cultivo	concentração de oxigênio	irradiância
	Chroococcidiopsis sp. CENA401	BG-11	+	+
Chroococcales	Chroococcidiopsis sp. CENA408	BG-11	nd	nd
	Stanieria sp. CENA421	SWBG-11	+	+
	Leptolyngbya sp. CENA402	BG-11	nd	nd
	Leptolyngbya sp. CENA403	BG-11	nd	nd
Deaudanahaanalaa	Leptolyngbya sp. CENA404	BG-11	nd	nd
Pseudanabaenales	Pseudanabaena sp. CENA405	BG-11	nd	nd
	Leptolyngbya sp. CENA407	BG-11	+	+
	Leptolyngbya sp. CENA411	BG-11	+	+
Oscillatoriales	Wilmottia sp. CENA395	BG-11	+	+
	Halotia branconii CENA390	$BG-11_0$	+	+
	Halotia wernerae CENA391	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Halotia branconii CENA392	$BG-11_0$	+	+
	Hydrocoryne sp. CENA393	$BG-11_0$	+	+
	Nostoc sp. CENA394	$BG-11_0$	+	+
	Nostoc sp. CENA397	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
	Hydrocoryne sp. CENA398	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nodularia sp. CENA399	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
	Nostoc sp. CENA400	BG-11 <sub>0</sub>	nd	+
	Nostoc sp. CENA406	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nostoc sp. CENA418	$BG-11_0$	+	+
	Halotia longispora CENA420	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nostoc sp. CENA423	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
s	Nostoc sp. CENA425	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
ale	Nostoc sp. CENA430	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
toc	Nostoc sp. CENA434	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
los	Nostoc sp. CENA435	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
Z	Nostoc sp. CENA436	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nostoc sp. CENA437	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
	Nostoc sp. CENA438	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nostoc sp. CENA444	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nostoc sp. CENA451	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Nostoc sp. CENA452	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Dactylothamnos sp. CENA410	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
	Dactylothamnos sp. CENA412	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Dactylothamnos sp. CENA433	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Calothrix sp. CENA427	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Calothrix sp. CENA429	BG-11 <sub>0</sub>	+	+
	Calothrix sp. CENA445	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Calothrix sp. CENA447	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd
	Calothrix sp. CENA449	BG-11 <sub>0</sub>	nd	nd

Tabela 21 - Linhagens de cianobactéria com potencial genético para realização da FBN e testadas quando a atividade da nitrogenase



Gráfico 1 - Perfil da atividade de nitroganase em *Chroococcidiospsis* sp. CENA401 em resposta a diferentes concentrações de oxigênio.



Gráfico 2 - Perfil da atividade de nitroganase em *Leptolyngbya* sp. CENA407 em resposta a diferentes concentrações de oxigênio.



Gráfico 3 - Perfil da atividade de nitroganase em *Leptolyngbya* sp. CENA411 em resposta a diferentes concentrações de oxigênio.



Gráfico 4 - Perfil da atividade de nitroganase em *Stanieria* sp. CENA421 em resposta a diferentes concentrações de oxigênio



Gráfico 5 - Perfil da atividade de nitroganase em *Wilmottia* sp. CENA395 em resposta a diferentes concentrações de oxigênio.



Gráfico 6 - Perfil da atividade de nitroganase em *Halotia branconii* CENA390. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 7 - Perfil da atividade de nitroganase em *Halotia branconii* CENA392. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 8 - Perfil da atividade de nitroganase em *Hydrocoryne* sp.CENA393. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 9 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA394. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 10 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA397. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 11 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nodularia* sp. CENA399. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 12 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA400 em resposta à irradiância.



Gráfico 13 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA418. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 14 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA423 A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 15 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA434. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 16 - Perfil da atividade de nitroganase em *Nostoc* sp. CENA437. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 17 - Perfil da atividade de nitroganase em *Dactylothamnos* sp. CENA410. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.



Gráfico 18 - Perfil da atividade de nitroganase em *Calothrix* sp. CENA429. A – em resposta a diferentes concentrações de oxigênio; B – em resposta à irradiância.

Dentre as linhagens avaliadas quanto a atividade da nitrogenase em resposta a diferentes concentrações de oxigênio e à irradiância, as linhagens pertecentes aos grupos de unicelulares (Chroococcales) e de homocitadas (Pseudanabaenales e Oscillatoriales) não exibiram atividade da nitrogenase influenciada pela luz (irradiância). As demais linhagens heterocitadas (Nostocales) foram influenciadas pelo aumento da irradiância e, portanto, dessas foi possível derivar e calcular parâmetros relacionados à fisiologia do organismo em teste e dos fatores que possam estar envolvidos na limitação da fixação de N<sub>2</sub>. Os parâmetros NLuz (NL), NEscuro (NE), α e *I*k puderam ser derivados usando o modelo da hipérbola retangular aplicado às curvas de resposta da atividade da nitrogenase à irradiância (STAAL et al., 2002), enquanto que os parâmentros NTotal (NTot), NTot/NE, NL/NTot, NE/NTot foram calculados (Tabela 22). NLuz representa o máximo de atividade da nitrogenase sob efeito da luz; NEscuro indica a atividade da nitrogenase durante o escuro, suportada pela respiração; NTotal é a soma de NL e NE; NTot/NE representa a parcela da atividade da nitrogenase que é dependente da energia luminosa; NL/NTot revela a proporção da atividade da nitrogenase da luz em relação ao total; NE/NTot indica a proporção da atividade da nitrogenase no escuro em relação ao total; α é o coeficiente de afinidade pela luz; *I*k é o coeficiente de saturação luz e representa a irradiância na qual a atividade da nitrogenase dependente de luz (NL) alcançaria o máximo se a atividade da nitrogenase aumentasse linearmente com a luz.

Cond. do 0 *	Tomn **	a	11,	NLuz (NL)	NEscuro (NE)	NTotal (NTot)	NTot/NE	NL/NTot	NE/NTot
Colld. de $O_2$	Temp.	u	IK			C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> (µmol⋅mg chl a	$a^{-1} \cdot h^{-1}$ )		
				Halotia brar	iconii CENA390				
0.07.0	20 °C	0,11	6,99±2,05	0,73±0,05	0,00±0,05	0,73	-	1,00	0,00
$0\% O_2$	30 °C	0,05	30,77±0,99	$1,58\pm0,01$	$0,01\pm0,01$	1,59	128,31	0,99	0,01
	20 °C	0,03	6,61±2,01	0,18±0,01	$0,54\pm0,01$	0,72	1,34	0,25	0,75
$20\% O_2$	30 °C	0,04	23,23±4,16	0,83±0,04	0,96±0,03	1,79	1,87	0,46	0,54
				Halotia brar	iconii CENA392				
0 0 0	20 °C	0,08	6,47±1,87	0,49±0,03	0,00±0,03	0,49	-	1,00	0,00
$0\% O_2$	30 °C	0,04	27,13±1,36	1,22±0,01	$0,02\pm0,01$	1,24	56,30	0,98	0,02
20 % 0	20 °C	0,04	5,01±1,27	$0,18\pm0,01$	$0,57\pm0,01$	0,74	1,31	0,24	0,76
$20\% O_2$	30 °C	0,04	18,13±1,73	0,79±0,02	$0,92\pm0,02$	1,71	1,86	0,46	0,54
				Hydrocoryne d	ustralis CENA393				
0 0 0	20 °C	0,18	3,12±0,83	0,58±0,04	0,13±0,04	0,70	5,57	0,82	0,18
$0\% O_2$	30 °C	0,35	9,54±2,48	3,32±0,20	$0,02\pm0,20$	3,34	165,51	0,99	0,01
$20 \sigma$	20 °C	-0,04	-0,82±1,63	0,03±0,04	$0,54\pm0,04$	0,57	1,06	0,05	0,95
$20\% O_2$	30 °C	0,24	6,11±1,83	$1,44\pm0,10$	$1,83\pm0,10$	3,27	1,79	0,44	0,56
				Nostoc s	p. CENA394				
0 0 0	20 °C	0,06	19,41±3,91	1,23±0,06	0,00±0,05	1,23	-	1,00	0,00
$0\% O_2$	30 °C	0,04	60,92±9,55	2,59±0,10	$0,00\pm0,07$	2,59	-	1,00	0,00
$20 \sigma$	20 °C	0,11	6,98±3,30	0,79±0,09	$1,68\pm0,08$	2,46	1,47	0,32	0,68
$20\% O_2$	30 °C	0,09	24,71±3,50	2,16±0,07	1,29±0,06	3,45	2,67	0,63	0,37
				Nostoc s	p. CENA397				
0.07.0	20 °C	0,57	4,00±2,19	2,27±0,30	0,00±0,29	2,27	-	1,00	0,00
$0\% O_2$	30 °C	0,40	17,75±5,34	7,17±0,51	$0,00\pm0,47$	7,17	-	1,00	0,00
$20 \sigma$	20 °C	0,37	7,45±2,47	2,73±0,21	5,87±0,21	8,59	1,47	0,32	0,68
$20\% O_2$	30 °C	0,22	64,91±35,36	14,22±1,89	3,19±1,31	17,41	5,46	0,82	0,18
				Nodularia	sp. CENA399				
<i>M</i> 0	20 °C	0,97	6,48±2,23	6,26±0,51	0,00±0,49	6,26	-	1,00	0,00
% <b>O</b> <sub>2</sub>	30 °C	0,55	24,35±4,56	13,50±0,60	0,00±0,54	13,50	-	1,00	0,00
	20 °C	0,46	$5,46\pm 2,79$	$2,51\pm0,30$	$9,41\pm0,29$	11,91	1,27	0,21	0,79
$20 \% O_2$	30 °C	0,16	71,00±13,84	11,02±0,53	12,53±0,35	23,55	1,88	0,47	0,53
				Nostoc s	p. CENA400				
0.07.0	20 °C	0,46	2,03±0,62	0,94±0,07	0,24±0,07	1,18	4,85	0,79	0,21
$0 \% O_2$	30 °C	0,53	8,84±2,53	4,64±0,31	0,06±0,30	4,70	82,19	0,99	0,01
	20 °C	0,00	266,88±46,72	0,00±0,02	0,81±0,00	0,81	1,00	0,00	1,00
$20 \% O_2$	30 °C	0,08	8,65±3,51	0,69±0,07	3,08±0,06	3,77	1,23	0,18	0,82

Tabela 22 – Parâmetros derivados e calculados usando o modelo da hipérbola retangular aplicado às curvas de resposta da atividade da nitrogenase à irradiância (continua)

Cond. de $O_2^*$	Temp.**	α	Ik	NLuz (NL)	NEscuro (NE)	NTotal (NTot)	NTot/NE	NL/NTot	NE/NTot
		$C_2H_4 (\mu \text{mol} \cdot \text{mg chl } a^{-1} \cdot h^{-1})$							
				Dactylotham	os sp. CENA410				
$0 \% O_2$	20 °C	0,43	7,59±1,44	3,30±0,15	0,45±0,14	3,75	8,26	0,88	0,12
	30 °C	0,25	24,01±4,00	6,07±0,24	0,16±0,22	6,23	38,19	0,97	0,03
$20 \ \% \ O_2$	20 °C	0,06	7,20±3,71	$0,42\pm0,05$	2,19±0,05	2,61	1,19	0,16	0,84
	30 °C	0,10	14,53±6,68	1,41±0,15	2,56±0,14	3,97	1,55	0,35	0,65
				Nostoc s	p. CENA418				
$0 \% O_2$	20 °C	0,66	5,16±2,16	3,43±0,34	0,00±0,33	3,43	-	1,00	0,00
	30 °C	0,41	21,39±4,74	8,73±0,46	$0,00\pm0,42$	8,73	-	1,00	0,00
$20 \ \% \ O_2$	20 °C	0,51	7,75±41,29	3,96±4,96	5,53±4,78	9,48	1,72	0,42	0,58
	30 °C	0,51	15,32±2,37	7,75±0,29	7,67±0,27	15,43	2,01	0,50	0,50
				Nostoc s	p. CENA423				
$0 \% O_2$	20 °C	0,22	17,70±2,62	3,85±0,14	0,10±0,13	3,95	39,70	0,97	0,03
	30 °C	0,13	55,44±4,68	7,23±0,15	0,02±0,11	7,25	464,57	1,00	0,00
$20 \ \% \ O_2$	20 °C	0,07	21,72±0,37	1,47±0,01	2,00±0,01	3,46	1,74	0,42	0,58
	30 °C	0,09	31,00±1,16	2,69±0,02	2,16±0,02	4,85	2,25	0,56	0,44
				Calothrix	sp. CENA429				
$0 \% O_2$	20 °C	0,17	16,56±3,53	2,75±0,14	0,00±0,13	2,75	-	1,00	0,00
	30 °C	0,09	46,62±6,26	4,38±0,14	$0,00\pm0,11$	4,38	-	1,00	0,00
$20 \ \% \ O_2$	20 °C	0,17	15,06±2,63	2,60±0,11	$1,98\pm0,10$	4,59	2,31	0,57	0,43
	30 °C	0,12	43,86±2,06	5,44±0,06	1,67±0,05	7,10	4,26	0,77	0,23
				Nostoc s	o. CENA434				
$0 \% O_2$	20 °C	0,16	8,78±2,16	1,45±0,08	$0,00\pm0,08$	1,45	-	1,00	0,00
	30 °C	0,11	27,79±4,09	2,97±0,10	$0,00\pm0,09$	2,97	-	1,00	0,00
$20 \ \% \ O_2$	20 °C	0,04	190,60±1094,16	8,38±16,78	1,44±4,77	9,82	6,82	0,85	0,15
	30 °C	0,07	65,61±36,05	4,59±0,62	0,93±0,43	5,52	5,93	0,83	0,17
				Nostoc s	p. CENA437				
$0 \% O_2$	20 °C	0,50	7,17±2,01	3,59±0,24	0,24±0,23	3,83	15,75	0,94	0,06
	30 °C	0,28	26,98±4,01	7,49±0,26	0,13±0,23	7,62	57,07	0,98	0,02
$20 \ \% \ O_2$	20 °C	0,16	5,14±2,86	0,80±0,11	2,52±0,10	3,33	1,32	0,24	0,76
	30 °C	0,14	17,66±1,97	$2,55\pm0,07$	$2,65\pm0,06$	5,20	1,96	0,49	0,51

Tabela 22 – Parâmetros derivados e calculados usando o modelo da hipérbola retangular aplicado às curvas de resposta da atividade da nitrogenase à irradiância (conclusão)

\* Condições de  $O_{2e}$  de \*\* temperatura aplicados

## 6.6 Análises Independentes de Cultivo

#### 6.6.1 Coleta e extração de DNA ambiental das amostras de biofilme

Das 32 amostras de biofilme selecionadas para extração do DNA ambiental, oito apresentaram baixo rendimento de DNA. No entanto, todos os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação por PCR do gene que codifica para o RNAr 16S, espaço intergênio (ITS) e parte do gene que codifica para o RNAr 23S, apresentando amplificação com o tamanho de fragmento esperado (~2000 bp). Posteriormente, alíquotas da primeira reação de PCR foram utilizadas para realização da PCR com os iniciadores contendo os grampos GC. Novamente, todas as amostras apresentaram amplificação do fragmento com tamanho esperado (~450 pares de base) e foram submetidas à separação por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).

### 6.6.2 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Após a confirmação da amplificação da segunda reação de PCR em gel de agarose 1,2 % (v/m), os produtos amplificados foram aplicados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante de 45 - 55 % (uréia e formamida) (Figura 9).



Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante. M – Marcador molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen); \* Amostras 169AR e 177R extraídas com o *kit* PowerBiofilm<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc).

Baseando-se no perfil de eletroforese obtido em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante, o dendrograma de similaridade foi construído considerando a posição relativa das bandas encontradas (Figura 10).



Figura 10 – Dendrograma de similaridade obtido a partir do perfil eletroforético de DGGE das amostras de biofilme.\* Amostras 169AR e 177R extraídas com o *kit* PowerBiofilm<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc).

Ainda, levando-se em consideração a matriz de presença e ausência de bandas gerada pela análise de PCR-DGGE, realizou-se a ánalise de nMDS (Figura 11).



Figura 11 – Análise nMDS da comunidade de cianobactérias nas amostras de biofilme (Stress = 0,3051)

## 6.6.3 PCR quantitativo do gene nifH nas amostras de biofilme

A quantificação do gene *nifH* foi realizada em trinta e uma amostras de biofilme utilizando iniciadores específicos para cianobactéria. O valor de Ct (threshold cycle) de cada uma das triplicatas foi interpolado na curva padrão ( $R^2 = 0.9877$ ) e a média das repetições é apresentada para cada uma das amostras. A análise de variância ANOVA revelou haver diferença significativa entre as amostras e procedeu-se a comparação das médias aplicando o teste Scott-Knott (p < 0.01) (Figura 12).


Figura 12 – Quantificação por PCR do gene *nifH* nas amostras de biofilme. Barras em vermelho e azul indicam amostras provenientes de ambientes salgados/salobros e dulcícolas, respectivamente; e barra em preto indica amostra de ambiente terrestre. Barras com as mesmas letras correspondem a amostras que não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (p < 0,01).

## 6.6.5 Sequenciamento do gene que codifica para RNAr 16S nas amostras de biofilme

As sete amostras de biofilme selecionadas (150, 154, 157, 158, 165, 170 e 174) foram sequenciadas usando a plataforma *Ion Torrent*. Essas amostras são provenientes de ambientes distintos: água salgada/salobra (150, 165, 170 e 174) e água doce (154, 157 e 158); corpo d'água com ação geotermal (temp. 23,7 °C - 174) e sem ação geotermal (temp. de 5,2 a 10,7 °C - 150, 154, 157, 158, 165, 170).

Inicialmente, foram obtidas 252.017 sequências referente ao sequenciamento do fragmento do gene de RNAr 16S dessas amostras. Após o processamento, restaram 210.000 sequências com tamanho variando de 69 a 86 pb. Todas as amostras apresentaram altos índices de cobertura (95 a 98 %) (Figura 13, Tabela 23). Esses bons índices de cobertura demonstram que parcela significativa da comunidade de bactéria total foi amostrada e, portanto, permitem comparar os demais índices gerados com maior confiabilidade.



Figura 13 - Representação gráfica índices de cobertura obtidos

Tabela 23 - Índices de cobertura obtidos para cada uma das amostras de biofilme analisadas

Amostras	Cobertura
150	0,97 b
154	0,95 d
157	0,95 c
158	0,97 b
165	0,96 b
170	0,97 b
174	0,98 a

Utilizando comandos específicos no programa QIIME foi possível obter resultados referentes aos índices de diversidade alfa (Tabela 24), à composição da comunidade de bactéria total (Figura 14), da comunidade de cianobactérias (Figuras 15 e 16) e os indicadores de diversidade beta (Figuras 18 e 19). Dentre os índices relacionados à diversidade alfa, selecionaram-se os índices de Chao1 e Shannon os quais fornecem informações referentes à riqueza e diversidade das amostras, respectivamente; e também o número total de espécies observadas (UTOs, 97 % de identidade). O índice de Chao1 retrata em termos numéricos determinada categoria biológica (número de UTOs/espécies) presente nas amostras, enquanto que o índice Shannon além de considerar o número de categorias biológicas avalia a abundância (frequência) dessas categorias (número de indivíduos/sequências).

Amostras	Índice de Chao1	Espécies Observadas	Índice de Shannon
150	3464,83 c	1621,83 c	6,53 e
154	5483,83 a	2745,13 a	8,50 a
157	4578,70 b	2235,50 b	7,21 b
158	3218,82 c	1651,90 c	6,04 f
165	3545,88 c	1771,40 c	6,86 c
170	3346,47 c	1755,67 c	6,63 d
174	2133,90 d	933,10 d	5,52 g

Tabela 24 – Tabela contendo os índices de diversidade alfa e número de UTOs referentes às espécies observadas



Figura 14 - Composição da comunidade de Bacteria total em nível de filo

A análise da composição da comunidade presente nas amostras de biofilme revelou a presença dos domínios *Archaea* e *Bacteria* e como filos mais representativos os de Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria (mais cloroplasto), Bacteriodetes, Fusobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, e Acidobacteria (Figura 14). Em média nessas amostras, o filo Cyanobacteria foi representado em 19,9 % do total de sequências geradas. Individualmente as amostras 157, 165, 158, 154, 150, 174 e 170 apresentaram 19,6; 25,0; 6,3; 12,8; 20,7; 0,1 e 54,7 %, respectivamente, de sequências relacionadas ao filo Cyanobacteria.



Figura 15 – Composição da comunidade de *Cyanobacteria* total em nível de ordem e frequência de UTOs relacionadas a cloroplasto



Figura 16 - Composição da comunidade Cyanobacteria total em nível de família

Considerando apenas as UTOs de cianobactérias que receberam afiliação em nível de gênero pela comparação com o banco de dados do *Ribosomal DataBase Project* (RDP) foi realizada uma comparação entre as UTOs/gêneros detectadas com as linhagens isoladas das amostras correspondentes e de todo esforço de isolamento realizado nas duas ilhas amostradas (Tabela 25)

Tabela 25 – Comparação dos gêneros de cianobactérias detectados pelas técnicas de sequenciamento e isolamento considerando as mesmas amostras e o todo esforço de isolamento

	Amostras					Isolamonto		
UTUS	157	165	158	154	150	174	170	Isolamento
Anabaena sp.	0	0	0	0	0	0	M*	Hydrocoryne ?
Dolichospermum sp.	Μ	0	Μ	Μ	0	0	Μ	Hydrocoryne ?
Nostoc sp.	Μ	0	0	M / I**	Μ	0	M / I	Sim
Scytonema sp.	0	0	0	Μ	0	0	Μ	Não
Calothrix sp.	0	0	0	Μ	0	0	M / I	Sim
Microcystis sp.	0	0	0	0	0	Μ	0	Não
Chroococcidiopsis sp.	0	0	0	Μ	0	0	0	Sim
Microcoleus sp.	0	0	0	Μ	0	0	Μ	Sim
Oscillatoria sp.	0	0	0	0	0	0	Μ	Oscillatoria / Planktothrix ?
Phormidium sp.	Μ	0	Μ	Μ	0	Μ	Μ	Microcoleus e Wilmottia
Planktothrix sp.	0	0	0	Μ	0	Μ	0	Planktothrix / Oscillatoria ?
Symploca sp.	0	0	0	0	0	0	Μ	Não
Leptolyngbya sp.	Μ	0	M / I	M / I	0	Μ	M / I	Sim
Pseudanabaena sp.	Μ	0	Μ	Μ	0	0	Μ	Sim
Acaryochloris sp.	0	0	0	0	0	0	Μ	Não
Paulinella sp.	0	0	Μ	0	0	0	0	Não
Svnechococcus sp.	М	0	Μ	0	0	0	0	Não

\*M: Encontrado pelo sequenciamento do DNA metagenômico; \*\*I: Encontrado pela técnica de isolamento.

Com base nas sequências de cianobactérias obtidas pelo sequenciamento do gene de RNAr 16S de DNA metagenômico das amostras (420 sequências) e nas sequências obtidas das linhagens de cianobactérias isoladas das duas ilhas estudadas foi construída uma árvore filogenética na tentativa de reconstruir a relação entre as sequências originadas pelos métodos dependentes e independentes de cultivo (Figura 17).



Figura 17 – Árvore filogenética baseada em sequências do gene de RNAr 16S (69 pares de base) de DNA metagenômico e a partir das linhagens isoladas das ilhas Deception e Rei George, aplicando o método Neighbor -Joining (NJ) com 1000 reamostragens. Círculos vermelhos e azuis representam linhagens isoladas das ilhas Deception e Rei George, respectivamente. Cores verde e azul dos ramos indicam clados formados por sequências provenientes de cianobactérias cultivadas e não cultivadas, e por sequências provenientes apenas de cianobactérias não cultivadas, respectivamente. Os valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó

A beta diversidade das amostras foi analisada pela métrica UniFrac (*weighted* e *unweighted*) utilizando-se a análise de coordenadas principais (PCoA). Para melhor

visualização são apresentadas as figuras alterando-se o modo de apresentação dos dados (por amostras, por temperatura e por tipo de ambiente) (Figuras 18 e 19).





Figura 18 – Beta diversidade considerando a métrica UniFrac (*weighted*). A – Separação por amostras; B – Separação por temperatura da água; e C – Separação por ambiente (água salgada *versus* água doce)







PC1 (38 %)

Figura 19 – Beta diversidade considerando a métrica UniFrac *unweighted*. A – Separação por amostras; B – Separação por temperatura da água; e C – Separação por ambiente (água salgada *versus* água doce)

A correlação das amostras 150, 154, 170 e 174 com os dados físico-químicos correspondentes as amostras d'água foi efetuada usando diagrama de ordenação multivariada nMDS pelo método *User Distance* (Figura 20).



Figura 20 – Análise multivariada nMDS relacionado-se os dados bióticos e abióticos (Stress = 0)

, PC3 (14 35)

# 7 DISCUSSÃO

#### 7.1 Isolamento e caracterização das linhagens de cianobactérias

De acordo com o sistema de classificação proposto por Hoffmann e colaboradores (2005), sessenta e uma linhagens de cianobactérias isoladas das ilhas antárticas pertencem às ordens Chroococcales (gêneros *Chroococcidiopsis* e *Stanieria*), Pseudanabaenales (gêneros *Leptolyngbya, Nodosilenea* e *Pseudanabaena*), Oscillatoriales (gêneros *Phormidium, Microcoleus* e *Wilmottia*) e Nostocales (gêneros *Nodularia, Hydrocoryne, Nostoc* e *Calothrix*). Com base nos resultados morfológicos e filogenéticos, sete linhagens pertencem a dois novos gêneros (*Halotia* e *Dactylothamnos*) os quais se assemelham morfologicamente aos gêneros *Nostoc* e *Tolypothrix*, respectivamente (FIORE et al., 2013; GENUÁRIO et al., 2014<sup>1</sup>).

Embora a eficiência de recuperação de cianobactérias a partir dos diferentes meios de cultura utilizados não possa ser comparada, destaca-se que o maior número de linhagens foi obtido utilizando o meio de cultivo acrescido com forma inorgânica de nitrogênio, BG-11 (31 linhagens), seguidas dos meios BG-11<sub>0</sub> (16), 3NP (14), AA (6) e SWBG-11 (1). De acordo com critérios morfológicos houve predominio das formas heterocitadas (Nostocales) o que pode estar relacionado à capacidade desse grupo de micro-organismos em diferenciar células de resistência, os acinetos. Esses podem permacem latentes no ambiente por longos períodos e originar novos indivíduos quando transferidos para condições favoráveis de crescimento. Taton e colaboradores (2006a) isolaram 76 % de suas linhagens utilizando os meios de cultivo 2, 2NP, 3 e 3NP, os quais foram elaborados levando-se em consideração as características químicas de dois lagos antárticos. Esses mesmos autores isolaram o maior de número de linhagens de cianobactérias a 22 °C, seguida das temperaturas de 12 °C e 5 °C com respectivamente, 34, 23 e 2 linhagens (TATON et al., 2006a). No presente estudo, todas as linhagens foram isoladas em temperatura de incubação de  $24\pm1$  °C sob iluminação fluorescente com 40 µmol fótons m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> e com fotoperíodo de 14:10 horas de luz:escuro.

Apesar do isolamento do maior número de linhagens relacionadas a morfotipos da ordem Nostocales, as cianobactérias filamentosas homocitadas são os morfotipos mais comumente encontrados em ambientes polares aquáticos e terrestres, as quais pertencem,

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> GENUÁRIO, D.B.; VAZ, M.G.M.V.; HENTSCHKE, G.S.; SANT'ANNA, C.L.; FIORE, M.F. *Halotia* gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. Submetido ao **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.

principalmente, aos gêneros Leptolyngbya, Phormidium e Oscillatoria (COMTE et al., 2007; ELSTER, 2002; KOMÁREK, 1999; MUELLER et al., 2004). O levantamento da diversidade de cianobactérias por meio de observações ao microscópio óptico em amostras ambientais coletadas na Ilha Rei George reportou a presença dos gêneros Anabaena, Aphanocapsa, Asterocapsa, Blennothrix, *Calothrix*, *Chamaesiphon*, *Chlorogloea*, Chroococcus, Coelomoron, Cyanobium, Cyanodictyon, Cyanosarcina, Cyanothece, Dichothrix, Eucapsis, Gloeocapsa, Gloeocapsopsis, Gomphosphaeria, Heteroleibleinia, Jaaginema, Komvophoron, Leptolyngbya, Lyngbya, Microchaete, Microcoleus, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Planktolyngbya, Pseudanabaena, Romeria, Schizothrix, Stigonema, Symploca, Synechococcus, Synechocystis, Tolypothrix e Trichocoleus (KOMÁREK; KOMÁREK, 1999). Estudo similar em amostras de biofilme e mantos microbianos coletados em lagos da porção leste da Antártica revelaram os gêneros Aphanocapsa, Aphanothece, Asterocapsa, Chamaesiphon, Chondrocystis, Chlorogloea, Gloeocapsa, Rhabdoderma, Leptolyngbya, Phormidium, Pseudanabaena, Schizothrix, Jaaginema, Calothrix, Coleodesmium, Dichothrix, Nostoc e Petalonema (TATON; HOFFMANN; WILMOTTE, 2008). Também, morfotipos de Hydrocoryne cf. spongiosa foram encontrados em amostras de solo coletadas no sul de Victoria Land (CAMERON; DEVANEY, 1970; PRESCOTT, 1979) e em amostras de mantos microbianos do Lago Fryxell (McMurdo Dry Valleys) (TATON et al., 2003). Além disso, morfotipos dos gêneros Leptolyngbya, Chroococcidiopsis, Synechococcus e Gloeocapsa foram reportados e isolados a partir de amostras de rochas (epiliticamente e ou endoliticamente) coletadas em diversas regiões da Antártica (BANERJEE; WHITTON; WYNN-WILLIAMS, 2000; BILLI et al., 2011; EROKHINA et al., 2002; FRIEDMANN; HUA; OCAMPO-FRIEDMANN, 1988; YUNG et al., 2014). O estudo envolvendo a caracterização polifásica de linhagens de cianobactérias isoladas da Antártica evidenciou os gêneros Condrocystis, Leptolyngbya, Phormidium, Pseudophormidium/Schizothrix, Nostoc, Calothrix, Petalonema e Coleodesmium (TATON et al. 2006a, b). Mais recentemente, três linhagens heteropolares isoladas a partir de amostras coletadas no litoral de lagos de degelo da Ilha James Ross, Antártica foram, baseados na taxonomia polifásica, caracterizadas como pertecentes aos gêneros Hassallia e Calothrix (KOMÁREK; NEDBALOVÁ; HAUER, 2011). Dentre os gêneros reportados na literatura e os encontrados nesse trabalho, somente os gêneros Stanieria e Nodosilinea nunca foram mencionados para os ambientes antárticos. No entanto, como descrito abaixo, esse último gênero foi descrito considerando linhagens inicialmente descritas como pertencentes ao gênero Leptolynbya (PERKERSON et al., 2011). Similarmente, a diversidade filogenética de representantes antárticos de morfotipos

relacionados ao gênero *Phormidium* suportaram, respectivamente, a revisão e criação dos gêneros *Microcoleus* e *Wilmottia* (SIEGSMUND et al., 2008; STRUNECKY; ELSTER; KOMÁREK, 2011)

Os valores de identidade entre as sequências de RNAr 16S obtidas a partir de linhagens da ordem Chroococcales isoladas neste trabalho e sequências disponíveis no banco de dados variaram de 95,9 a 99,7 % (Tabela 4). O menor valor de identidade encontrado (95,9 %) foi obtido da comparação entre as sequências de *Chroococcidiopsis* sp. CENA408, CENA416 e CENA440 com sequências de cianobactérias cultiváveis e não cultiváveis. O maior valor de identidade (99,7 %) foi referente à comparação da sequência de *Chroococcidiopsis* sp. CENA401 com a sequência da espécie-tipo do gênero (*C. thermalis*), isolada a partir de amostra solo coletadas na Alemanha.

A análise filogenética das sequências de 16S RNAr geradas a partir das linhagens unicelulares revelou a formação de três clados contendo sequências obtidas nesse trabalho (Figura 4). No clado I, a sequência de Stanieria sp. CENA421 ficou agrupada (82 % de reamostagem) com sequências de Dermocarpa spp. (Dermocarpellaceae) obtidas de linhagens mantidas na Coleção de Cultura do Instituto de Biotecnologia Marinha do Japão. Informações sobre a origem dessas linhagens não foram encontradas no site da Coleção de cultura. Externamente relacionado a esse clado, ficou a sequência da linhagem Stanieria sp. PCC7301 (Dermocarpellaceae), isoladas de aquário marinho e inicialmente identificada como Dermocarpa sp. PCC7301. Ainda, como grupo irmão desse clado estão sequências de Pleurocapsa spp. (Hydrococcaceae), Myxosarcina spp. (Xenococcaceae) e Chroococcidiopsis sp. (Xenococcaceae) provevientes de ambientes marinhos e terrestres (solo e rochas). De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, o gênero Dermocarpa foi extinto e suas espécies transferidas para o gênero Stanieria (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1986). No Manual Bergey de Sistemática Bacteriana o gênero Dermocarpa não é válido, porém sua definição é apresentada como sendo idêntica ao do gênero Stanieria (RIPPKA et al., 2001). Além disso, de acordo com o manual, o gênero Stanieria pode ser dividido em três grupos e apresentar espécies de origem dulcícola e marinha. No primeiro grupo está a linhagem Stanieria cyanosphaera PCC7437 isolada de um tanque de água doce no Jardim Botânico de Havana em Cuba em 1965, e determinada como espécie tipo do gênero (RIPPKA et al., 2001). No segundo grupo está a linhagem Stanieria sp. PCC7301 coletada de um aquário marinho no Scripps Instituto de Oceanografia, na Califórnia em 1964 (RIPPKA et al., 2001). No terceiro grupo estão as linhagens Stanieria sp. PCC7302 e Stanieria sp. PCC7304, ambas provenientes de ambiente marinho e a primeira isolada de tanques marinhos, Estação Marinha Arizona, Puerto Penas, México em 1971 (RIPPKA et al., 2001). Além da separação desses grupos baseada no ambiente de coleta, o tamanho dos baeócitos também é utilizado para distinguir os grupos 2 e 3, os quais possuem tamanhos 3,0-4,0 µm e 1,5-2,0 µm, respectivamente. A comparação entre as sequências de 16S RNAr de Stanieria sp. CENA421 com sequências do grupo 1 e 2 de Stanieria (S. cyanosphaera PCC7437 e Stanieria sp. PCC7301) revelaram porcentagem de identidade de 92,7 e 97,6, respectivamente (Tabela 5). De acordo, com os valores de identidade estabelecidos para separação de gêneros e espécies (95 % e 97,5 %, respectivamente) (LUDWIG et al., 1998; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994), a linhagem Stanieria sp. CENA421 representa uma nova entidade genérica quando comparada com S. cyanosphaera PCC7437 (Stanieria, grupo 1) e a mesma espécie quando comparada com Stanieria sp. PCC7301 (Stanieria, grupo 2). Essa sequência também apresentou alta identidade (98,9 %) com a sequência de Dermocarpa sp. MBIC10768 e valores de identidade que variaram de 96,4 - 96,6 % com as sequências filogeneticamente mais relacionadas ao clado I. Com base nesses resultados, depreende-se que o gênero Stanieria é polifilético e que linhagens identificadas como Pleurocapsa sp., Myxosarcina sp. PCC7312 e Chroococcidiopsis sp. CCMP2733, as quais estão relacionadas ao clado I necessitam ser revisadas uma vez que podem representar diferentes espécies de Stanieria (grupo 2). As sequências dessas linhagens apresentaram valores de identidade menores de 95 % quando comparadas com a sequência de S. cyanosphaera PCC 7437 suportando a necessidade de separação dessas espécies juntamente com Stanieria sp. CENA421 em um novo gênero. Ecologicamente, a linhagem Stanieria sp. CENA421 foi isolada de ambiente marinho e, portanto apresenta a mesma distribuição descrita para linhagens dos grupos 2 e 3 de Stanieria, de acordo com o Manuel Bergey de Sistemática Bacteriana (RIPPKA et al., 2001). No entanto, morfologicamente essa linhagem possui baeócitos com tamanhos de 1,7 - 2,5 µm de diâmentro, ou seja, dentro do limite de tamanho estabelecido para o grupo 3 de Stanieria. Devido à inexistência de sequências de RNAr 16S relacionadas ao grupo 3 de Stanieria torna-se inviável a verificação da proximidade filogenética entre os membros dos grupos 2 e 3 de Stanieria e, consequentemente, confirmar o tamanho dos baeócitos como característica diácrita válida para separação entre esses grupos. No clado II, a sequência de Chroococcidiopsis sp. CENA408 ficou reunida (99 % de reamostragem) com sequências de bactérias não-cultivadas provenientes de amostras coletadas de sala de montagem de naves espaciais e de peles de pacientes com dermatite atópica (KONG et al., 2012; MOISSL et al., 2007). Ainda, uma sequência de linhagem não cultivável de cianobactéria aerofítica (parede de castelo na

Alemanha) ficou agrupada nesse clado (HALLMANN et al., 2013). Como sequências irmãs desse clado estão sequências de linhagens identificadas como Chroococcidiospis spp. isoladas de rochas coletadas no deserto na China, e de lagoa em Lahora no Paquistão. No entanto, a espécie tipo do gênero Chroococcidiopsis, C. thermalis está incluída no clado III, onde também estão reunidas três sequências geradas nesse estudo (Chroococcidiospis sp. CENA440, CENA416 e CENA401) com 96 % de reamostragem. Chroococcidiopsis thermalis foi isolada de amostra de solo na Alemanha em 1962, no entanto, membros desse gênero apresentam ampla distribuição ocorrendo em uma grande variedade de ambientes extremos, tais como poros de rochas na Antártica e desertos, ambientes marinhos e hipersalinos, águas termais e também em associações simbióticas (FEWER; FRIEDL; BÜDEL, 2002). Da ocorrência em diversos ambientes, da observação da árvore fiologenética gerada nesse trabalho e de dados disponíveis na literatura, observa-se que o gênero Chroococcidiopsis é polifilético e necessita de uma ampla revisão dos grupos não relacionados ao clado da espécie-tipo (BAHL et al., 2011; BILLI et al., 2001; CUMBERS; ROTHSCHILD, 2014; FEWER; FRIEDL; BÜDEL, 2002). Com base na comparação da sequência de RNAr 16S de Chroococcidiopsis sp. CENA408 (clado II) com a sequência da espécie-tipo do gênero e com a sequência da linhagem mais proximamente relacionada na árvore filogenética, nota-se valores de identidade inferiores àqueles estabelecidos como limite para separação de gênero (< 90,6 %, Chroococcidiopsis thermalis PCC 7203; < 94,2, Chroococcidiopsis sp. CC1) (Tabela 5). Portanto, essa linhagem pode representar um novo gênero de cianobactéria considerando os baixos valores de identidade encontrados e também devido a sua distinta posição na árvore filogenética em relação ao gênero Chroococcidiopsis. Diferentemente, as sequências de Chroococcidiopsis CENA401, CENA416 e CENA440 apresentaram alta identidade ( $\geq$  98,1 - 99,7 %) com a sequência da linhagem C. thermalis PCC7203, espécie-tipo do gênero (Tabela 5).

Entre as sequências das linhagens pertencentes à ordem Pseudanabaenales, os valores de identidade variaram de 91,7 a 99,9 %. O menor valor de identidade obtido foi entre a sequência da linhagem *Leptolyngbya* sp. CENA455 com uma sequência de bactéria não cultivada proveniente de pilares de musgo na Antártica (NAKAI et al., 2012). O maior valor de identidade foi obtido da comparação entre sequência da linhagem *Leptolyngbya* sp. CENA453 com a sequência da linhagem *Leptolyngbya* antarctica ANT.BFI.1, isolada a partir de amostras de água coletadas no lago Firelight, Ilha Sydney, Antártica (TATON et al., 2006a) (Tabela 4). Entre as sequências das linhagens incluídas na ordem Oscillatoriales, os valores de identidade variaram de 98,5 a 100 %. O menor valor de identidade resultou da

comparação entre a sequência da linhagem *Phormidium* sp. CENA424 com a sequência da linhagem *Oscillatoria* sp. 49 (*Planktothrix* sp. 49) isolada do lago Valkjärvi, Finlândia (LYRA et al., 2001). O maior valor de identidade foi obtido da comparação entre a sequência da linhagem *Wilmottia* sp. CENA441 com a sequência da linhagem *Phormidium* sp. CCAP 1462/11, isolada de solo proveniente da Ilha South Orkney, Antártica e mantida na Coleção de Cultura de Algas e Protozoários (CCAP) (Tabela 4).

A análise filogenética das sequências de 16S RNAr geradas a partir das linhagens homocitadas (Pseudanabaenales e Oscillatoriales) revelou a formação de dez clados contendo sequências obtidas nesse trabalho (Figura 5). Os clados de I a VII foram formados a partir de sequências relacionadas à ordem Pseudanabaenales enquanto que os clados VIII a X incluem sequências relacionadas à ordem Oscillatoriales.

No clado I, reuniram-se com 97 % de reamostragem quatro sequências de Leptolyngbya sp. (CENA455, CENA415, CENA439 e CENA409) geradas nesse trabalho com sequências de Leptolyngbya antartica, isoladas da Antártica (TATON et al., 2006a). Nesse clado também ficaram agrupadas três sequências obtidas de bactérias/cianobactérias nãocultivadas advindas de regiões antárticas (TATON et al., 2006a; 2006b; TATON el al., 2003; PRISCU et al., 1998; NAKAI et al., 2012). Externamente afiliada a esse clado está outra sequência de cianobactéria não-cultivada proveniente da Antártica. As sequências desse estudo foram geradas a partir de linhagens de cianobactérias isoladas de amostras coletadas nas ilhas Rei George e Deception. Taton e colaboradores (2006a) reportaram que esse clado reuniu oito sequências de L. antartica proveniente de cinco lagos distintos da Antártica e enfatizaram o endemismo desse grupo, uma vez que somente sequências de linhagens antárticas fazem parte do mesmo. A reconstrução filogenética obtida no presente estudo corrobora os dados gerados por esses autores. Morfologicamente, as linhagens que tiveram suas sequências incluídas nesse clado assemelham-se aos morfotipos do gênero Leptolyngbya. No entanto, filogeneticamente o clado I relaciona-se fracamente ao clado contendo morfotipos de Leptolynbya stricto sensu e aos clados correspondentes aos gêneros Plectolyngbya, Phormidesmis e Alkalinema (TATON et al., 2010; TURICCHIA<sup>2</sup> et al., 2009; VAZ<sup>3</sup> et al., 2014). A análise comparativa entre as sequências geradas nesse estudo com outras sequências de L. antartica contidas no clado I revelou identidade que variaram de 96,5 a 100 % (Tabela

phenotype evaluation of oscillatorialean cyanobacteria from alkaline marshes of northern Belize. 2009. In press. <sup>3</sup> VAZ, M.G.M.V.; GENUÁRIO, D.B.; ANDREOTE, A.P.D.; MALONE, C.F.S.; SANT'ANNA, C.L.;

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> TURICCHIA, S.; VENTURA, S.; KOMÁREK, J.; SOLDATI, E.; KOMÁRKOVÁ, J. Molecular and

BARBIERO, L.; FIORE, M.F. Pantanalinema gen. nov. and Alkalinema gen. nov.: two novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from Brazilian saline-alkaline lakes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Em preparação.

6). Considerando o valor de 97,5 % de identidade como limite para separação de espécies, constata-se, internamente ao clado I, a existência de, provavelmente, mais de uma espécie. Ainda, quando as sequências contidas no clado I são comparadas com as sequências dos grupos relacionados, os valores de identidade obtidos ficaram abaixo de 95 % (limite para separação entre gêneros) e, portanto, essas sequências antárticas podem representar uma nova entidade genérica. Destaca-se o baixo valor de identidade quando as sequências do clado I são comparadas com as sequências dos demais clados destacados nesse estudo. No clado II, associaram-se com 78 % de reamostragem quatro sequências de Leptolyngbya sp. (CENA402, CENA403, CENA411 e CENA422) com uma sequência obtida de Leptolyngbya frigida, isolada da Antártica (TATON et al., 2006a). As linhagens deste estudo e cujas sequências estão no clado II, foram isoladas a partir de amostras coletadas em diferentes localidades na Ilha Rei George. Como grupo irmão desse clado ficaram três outras sequências de Leptolyngbya frigida isoladas da Antártica, sequências de linhagens identificadas como Phormidium e Pseudanabaena, além de sequências de bactérias/cianobactérias não-cultivadas advindas de regiões antárticas (NAKAI et al., 2012; PRISCU et al., 1998; TATON et al., 2003; TATON et al., 2006a; 2006b). A análise comparativa entre as sequências de 16S RNAr geradas nesse estudo com sequências de L. frigida contidas no clado II revelou identidade  $\geq$  98,1 % (Tabela 7). Similarmente, as sequências das linhagens identificadas como Phormidium e Pseudanabaena apresentaram identidades superiores a 97,5 % e, portanto, todas as sequências desse clado e as contidas em seu grupo irmão, devem pertencer a uma única espécie. Sendo assim, a identificação morfológica dessas linhagens deve ser revista levando em consideração os valores de identidade apresentados. Comparação similar com sequência de Pantanalinema revelou identidade inferior a 95 %. No clado III, reuniram-se com valor de reamostragem de 94 % cinco sequências de Leptolyngbya sp. geradas nesse estudo (CENA457, CENA456, CENA453, CENA404 e CENA454) com a sequência Leptolyngbya antarctica ANT.BF1 (TATON et al., 2006a) e cinco sequências de bactérias/cianobactérias não-cultivadas advindas de amostras ambientais da Antártica e da Holanda (SEVERIN; ACINAS; STAL, 2010; TATON et al., 2003). As sequências geradas nesse estudo foram obtidas de linhagens isoladas das ilhas Rei George e Deception. As sequências desse clado relacionaram-se com sequências obtidas de linhagens de Leptolyngbya frigida (5 UTOs), Oculatella spp., de organismos não-cultivados e do clado IV. Nesse sentido, o clado III agregou seis sequências de organismos isolados e, portanto, até o momento, pode ser considerado endêmico da Antártica. Taton e colaboradores (2006a) reportaram o endemismo de sequências agrupadas neste clado. No entanto, mais

recentemente, sequências de bactérias não-cultivadas provenientes de outras partes do mundo ficaram reunidas nesse clado (SEVERIN; ACINAS; STAL, 2010). A análise comparativa entre as sequências de 16S RNAr contidas nesse clado com a sequência de Leptolyngbya antartica ANT.BF1 revelou identidade  $\geq$  99,6 % (Tabela 8). A mesma análise comparativa com os grupos relacionados indicou identidade  $\leq 91,8$  %. Portanto, as sequências contidas no clado III pertencem a uma única espécie, mas diferem-se a nível genérico dos demais grupos relacionados. No clado IV, com 93 % de reamostragem agruparam-se duas sequências de Leptolyngbya sp. geradas nesse trabalho (CENA426 e CENA446) com sequências de bactérias/cianobactérias não-cultivadas recuperadas da Antártica e do Mar Mediterrâneo (AISLABIE et al., 2006; FEINGERSCH et al., 2010; NAKAI et al., 2012; TATON et al., 2006a). As linhagens antárticas foram isoladas de duas ilhas distintas (Rei George e Deception). Relacionada a esse grupo está a sequência de cianobactéria não-cultivada encontrada em mantos microbianos coletados no lago Fryxell, na Antártica (TATON et al., 2003). Mais externamente a esse clado ficaram as sequências de Oculatella e Leptolyngbya frigida. A análise comparativa entre as sequências de RNAr 16S antárticas revelou identidade 99.4 % igual indicando pertencerem а mesma espécie (Tabela 8). Entretanto, a mesma comparação considerando as sequências mais externamente relacionadas (*Oculatella* e *L. frigida*) mostrou identidades  $\leq$  93,5 % e, portanto, as sequências antárticas representam uma entidade genérica distinta dos grupos filogeticamente mais relacionados. No clado V, com 99 % de reamostragem ficaram agrupadas duas sequências de Leptolyngbya sp. geradas nesse trabalho (CENA407 e CENA419) provenientes de linhagens isoladas de amostras coletadas na Ilha Rei George. Reunidas com essas sequências estão aquelas de bactérias/cianobactérias não-cultivadas origanárias da Antártica e da Holanda e sequências de linhagens isoladas da Antártica que foram morfologicamente identificadas como Leptolynbya, Phormidum priestleyi e Pseudophormidium (CHONG et al., 2012; DE LA TORRE et al., 2003; SEVERIN; ACINAS; STAL, 2010; TATON et al., 2003; TATON et al., 2006a; 2006b). Externamente relacionado a esse clado estão sequências de Leptolyngbya latu senso e Limnothrix redekei. A análise comparativa entre as sequências de 16S RNAr contidas nesse clado mostrou identidade  $\geq$  96,3 % indicando existir mais que uma espécie nesse clado (Tabela 9). Similarmente, a identidade dessas sequências com as mais externamente relacionadas mostrou identidade de 91,8 %, sugerindo ser esse clado uma nova entidade genérica distinta dos grupos filogeticamente mais relacionados. No Clado VI, com 95 % de reamostragem agruparam-se a sequência de Pseudanabaena sp. CENA405 gerada nesse trabalho com sequências de Synechococcus spp.e de cianobactérias não-cultivadas

recuperadas a partir de amostras ambientais de água doce e marinha coletadas na Nova Zelândia. Embora com alto valor de reamostragem, a sequência antártica mostrou-se fracamente afiliada a essas sequências. Morfologicamente, a linhagem da qual a sequência antártica foi obtida distingui-se por ser filamentosa homocitada enquanto que Synechoccoscus é unicelular, ou seja, pertecem a ordens distintas dentro do filo Cyanobacteria. A análise comparativa entre a sequência de RNAr 16S de Pseudanabaena sp. CENA 405 com as sequências de Synechococcus mostrou identidade que variaram de 96,1 a 96.3 % e de acordo com esses valores, essas sequências pertecem a espécies distintas de cianobactéria de um mesmo gênero (Tabela 10). Provavelmente, a afiliação entre essas sequências pode ser resultado do baixo valor de identidade entre elas e visto não haver sequências mais similares no banco de dados. A árvore filogenética baseada em sequências de 16S rRNA das linhagens homocitadas, revelou a formação de cinco clados contendo sequências de linhagens identificadas como Leptolyngbya (clado I a V). No entanto, nenhum desses clados corresponde ao grupo contendo sequências de Leptolyngbya stricto sensu. Ainda, baixos valores de identidade foram encontrados quando comparadas as sequências antárticas com sequências de linhagens de Leptolynbya stricto sensu. Disso conclui-se que apesar desses grupos apresentarem morfologia semelhante a representantes do gênero Leptolyngbya, geneticamente elas não pertecem a esse gênero. Conclusões semelhantes foram reportadas anteriormente na lituratura, sendo que estudos detalhados desses grupos filogeneticamente diferentes originaram novos gêneros de cianobactérias similares morfologicamente a Leptolyngbya stricto sensu tais como, Nodosilinea, Oculatella, Plectolyngbya, Halomicronema, Haloleptolyngbya, Alkalinema e Pantanalinema (ABED; GARCIA-PICHEL; HERNÁNDEZ-MARINÉ, 2002; DADHEECH et al., 2012; PERKERSON et al., 2011; TATON et al., 2010; VAZ<sup>4</sup>et al., 2014, ZAMMIT; BILLI; ALBERTANO, 2012). De acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, o gênero Leptolyngbya latu sensu serve unicamente como um repositório dos morfotipos filmentosos homocitados difíceis de serem identificados e que apresentam tamanho de tricomas reduzidos e sem motilidade evidente (CASTENHOLZ et al., 2001). Estes morfotipos foram incluídos por Rippka e colaboradores (1979) no grupo LPP (Lyngbya, Phormidium e Plectonema). No entanto, Anagnostidis e Komárek (1988) e Anagnostidis (1989) criaram diversos novos gêneros de cianobactéria, a partir deste grupo, incluindo o gênero Leptolyngbya, o qual inclui todas as

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> VAZ, M.G.M.V.; GENUÁRIO, D.B.; ANDREOTE, A.P.D.; MALONE, C.F.S.; SANT´ANNA, C.L.;

BARBIERO, L.; FIORE, M.F. Pantanalinema gen. nov. and Alkalinema gen. nov.: two novel

pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from Brazilian saline-alkaline lakes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Em preparação.

espécies com tricomas finos (CASTENHOLZ et al., 2001). Estudos filogenéticos recentes baseados principalmente em sequências de RNAr 16S têm mostrado que a diversidade genética desse gênero excede a diversidade morfológica e portanto, muitos gêneros novos têm sido criados a partir do amplo gênero Leptolynbya (ABED; GARCIA-PICHEL; HERNÁNDEZ-MARINÉ, 2002; DADHEECH et al., 2012; PERKERSON et al., 2011; TATON et al., 2010; VAZ<sup>5</sup> et al., 2014, ZAMMIT; BILLI; ALBERTANO, 2012). No Clado VII, com 99 % de reamostragem estão duas sequências de Nodosilinea sp. geradas nesse trabalho (CENA432 e CENA414) com outras sequências do gênero Nodosilinea (PERKERSON et al., 2011). As linhagens antárticas foram isoladas a partir de amostras de biofilme em água doce nas ilhas Rei George e Deception. Relacionado a esse clado, está o clado VI mencionado anteriormente. Perkerson e colaboradores (2011) determinaram como espécie tipo desse gênero, Nodosilinea nodulosa (anteriormente, Leptolyngbya nodulosa UTEX 2910), isolada de fitoplâncton marinho e definiram como característica diacrítica do gênero a formação de nódulos nos tricomas após a exposição das culturas a baixa intensidade luminosa. Os autores, no entanto, reconhecem a existência de outras espécies nesse gênero, isoladas de ambientes bentônicos marinhos, lagos de água doce, paredes rochosas, solos de deserto da Ásia, Europa e América do Norte. Embora esse novo gênero tenha sido criado como consequência de estudos filogenéticos de determinadas espécies do gênero Leptolyngbya, ainda não havia sido reportada a existência de sequências desse gênero para a Antártica. Portanto, esse é o primeiro relato do gênero *Nodosilinea* para as ilhas antárticas. A análise comparativa entre as sequência de RNAr 16S de Nodosilinea sp. CENA432 e CENA414 com as sequências da espécie tipo do gênero Nodosilinea e sequências do clado relacionado mostrou identidade  $\geq$  98,1 e  $\leq$  91,1%, respectivamente (Tabela 11).

No Clado VIII, com 100 % de reamostragem, a sequência de *Phormidium* sp. CENA424 ficou agrupada com sequências de linhagens identificadas como *Oscillatoria* spp. e *Planktothrix agardhii* PCC9637. A linhagem antártica foi isolada a partir de amostras de biofilme de água doce na Ilha Deception e a linhagem *Oscillatoria* sp. PCC 8926 foi isolada de poço contendo estrume na costa do Mediterrâneo na França. A origem das demais linhagens é desconhecida. Embora esse clado contenha sequências de *Oscillatoria*, o mesmo encontra-se fracamente relacionado ao clado contendo a espécie-tipo do gênero, *Oscillatoria princeps*). Contrariamente, a sequência da espécie tipo do gênero *Planktothrix (P. agardhii)* 

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> VAZ, M.G.M.V.; GENUÁRIO, D.B.; ANDREOTE, A.P.D.; MALONE, C.F.S.; SANT'ANNA, C.L.; BARBIERO, L.; FIORE, M.F. Pantanalinema gen. nov. and Alkalinema gen. nov.: two novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from Brazilian saline-alkaline lakes. **International Journal** 

of Systematic and Evolutionary Microbiology. Em preparação.

encontra-se neste clado e, portanto, a morfologia das linhagens identificadas como Oscillatoria cujas sequências estejam incluídas nesse clado devem ser revistas. A análise comparativa entre as sequência de RNAr 16S contidas no clado VIII revelou identidades ≥ 98,3 % e portanto, essas sequências pertencem a uma única espécie (Tabela 12). A comparação dessas sequências com os grupos mais relacionados filogeneticamente e com a espécie de tipo de Oscillatoria mostrou valores de identidade menores que 92,2 e 89,1 %, respectivamente (Tabela 12). Baseando-se nesses valores e no posicionamento filogenético das sequências contidas no clado VIII, sugere-se que essas linhagens pertençam a morfotipos do gênero *Planktothrix* e não do gênero *Oscillatoria*. Ainda, de acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, o clado VIII corresponde ao grupo 5 do gênero Oscillatoria, o qual foi transferido para o gênero Planktothrix. Morfologicamente, espécies representantes desse gênero são similares às de Oscillatoria, diferenciando-se por apresentarem aerótopos em abundância e por serem planctônicas (CASTENHOLZ et al., 2001). Portanto, baseando-se nesses resultados, a linhagem CENA424 deve ser renomeada para Planktothrix sp. CENA424. No clado IX, com 93 % de valor de reamostragem, ficaram agrupadas cinco sequências de Microcoleus sp. (CENA396, CENA413, CENA428, CENA431 e CENA417) obtidas nesse trabalho. Além dessas sequências, estão nesse grupo as sequências de Microcoleus vaginatus, M. rushforthii, M. antarticus, Oscillatoria sp. 327/2 e Phormidium autumnale. As sequências antárticas foram geradas a partir de linhagens isoladas de amostras coletadas na Ilha Rei George. De acordo com Siegesmund e colaboradores (2008) todas as linhagens desse clado apresentam o tipo "oscilatoriáceo" de divisão celular. Internamente, esse clado dividiu-se em dois clados menores, sendo que no primeiro subclado reuniram-se quatro sequências geradas nesse trabalho com as sequências de Oscillatoria sp. 327/2, O. amoena e Microcoleus vaginatus provenientes de ambientes terrestres (SIEGESMUND et al., 2008). Curiosamente, as sequências antárticas foram geradas a partir de amostras terrestres coletadas na Ilha Rei George. No segundo subclado associaram-se uma sequência gerada nesse trabalho com sequências de Phormidium autumnale e mais externamente do ramo principal ficaram as sequências de M. rushforthii e M. antarticus. Segundo Siegesmund e colaboradores (2008), as linhagens pertencentes a esse subgrupo são originárias de ambientes aquáticos. Similarmente, a sequência antártica foi gerada de linhagem isolada a partir de amostras de água coletada na Ilha Rei George. Recentemente, linhagens de *Phormidium autumnale* foram transferidas para o gênero Microcoleus após estudo mais detalhado de caractériscas da estrutura dos tricomas (STRUNECKÝ; ELSTER; KOMÁREK, 2010). Esses autores determinaram como outra característica do gênero Microcoleus a presença de uma inserção de 11 pares de base na

sequência do RNAr 16S. De acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, esse gênero tinha como espécie tipo M. chthonoplastes isolada de ambientes salinos e M. vaginatus um representante de água doce (CASTENHOLZ et al., 2001). Recentemente, Siegesmund e colaboradores (2008) transferiram as espécies identificadas como M. chthonoplastes para o novo gênero Coleofasciculus e consequentemente redefiniram como espécie tipo do gênero Microcoleus, M. vaginatus. Sendo assim, o clado IX agrega sequências de linhagens representantes do gênero Microcoleus. No Clado X, formado com valor de 100 % de reamostragem, reuniram-se seis sequências de Wilmottia sp. (CENA395, CENA448, CENA442, CENA450, CENA441 e CENA443) geradas neste estudo, com outras nove sequências da espécie Wilmottia murrayi isoladas da Antártica. As sequências antárticas geradas nesse estudo foram obtidas de linhagens isoladas a partir de amostras terrestres e aquáticas coletadas na Ilha Rei George. O gênero Wilmottia foi descrito recentemente a partir de uma revisão do gênero Phormidium considerando espécies antárticas anteriormente identificados como Phormidium murrayi (STRUNECKÝ; ELSTER; KOMÁREK, 2011). O grupo irmão desse clado é o também recém criado gênero Coleofasciculus (SIEGESMUND et al., 2008).

Os valores de identidade entre as sequências RNAr 16S de Nostocaceae isoladas da Antártica e sequências disponíveis no banco de dados variaram de 97,3 a 99,9 % (Tabela 4). O menor valor de identidade encontrado (97,3 %) foi obtido da comparação entre a sequência de *Halotia branconii* CENA392 com sequências de *Nostoc* sp. CENA160, gerada a partir de linhagem isolada de solo de manguezais brasileiros. O maior valor de identidade (99,9 %) foi referente à comparação da sequência de *Halotia wernerae* CENA391 com a sequência de *Nostoc* sp. CENA159, também isolada de solo de manguezais brasileiros (SILVA et al., 2014).

A análise filogenética das sequências de RNAr 16S geradas a partir das linhagens de nostocaceae revelou a formação de quatro clados contendo sequências obtidas nesse trabalho (Figura 6). No clado I ficou reunida sem valor de reamostragem a sequência de *Nodularia* sp. CENA399 com sequências de *Nodularia* spp. isoladas de ambientes terrestres e aquáticos (marinhos e dulcícolas) de diversas partes do mundo. Nesse clado está contida a sequência da espécie tipo do gênero *Nodularia, N. spumigena*, originada de uma linhagem isolada de solos alcalinos em Spotted Lake, Colúmbia Britânica, Canadá (RIPPKA et al., 2001). A sequência antártica foi obtida de linhagem isolada a partir de amostras de sedimento de Kroner Lake, na Ilha de Deception, um lago com ligação com o mar (água salobra) e com influência geotermal. Entretanto, essa linhagem é mantida em meio de cultura sem adição de sal e

formas assimiláveis de nitrogênio. Externamente relacionado a esse clado, ficaram sequências dos gêneros Anabaenopsis, Cyanospira e também a sequência de Nodularia harveyana. Esses gêneros são comuns em ambientes aquáticos (marinhos e dulcícolas) alcalinos (RIPPKA et al., 2001). De acordo com o Manual Bergey de Sistematica Bacteriana somente duas espécies devem ser formalmente reconhecidas no gênero Nodularia, N. spumigena e N. harveyana (RIPPKA et al., 2001). A análise comparativa da sequência de RNAr 16S de Nodularia sp. CENA399 com sequências inseridas e relacionadas ao clado I indicou identidade superior a 97,5 % com as sequências de outras espécies de Nodularia (Tabela 13). Portanto, considerando o limite estabelecido para separação de espécies, elas pertencem à mesma espécie. Valores abaixo de 97,5 % foram observados apenas entre a comparação da sequência Nodularia sp. CENA399 com as sequências de Cyanospira rippkae PCC9501 e Anabaenopsis sp. PCC9215 (97,0 - 97,3 %) (Tabela 13). Reitera-se que esses valores de identidade estão acima de 95 % (limite para separação de gêneros) e, portanto, geneticamente representam diferentes espécies de um mesmo gênero. Salienta-se também que a existência do gênero Cyanospira é questionada pelo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (MCNEIL et al., 2012) e pelo Manual Bergey de Sistemática Bacteriana (RIPPKA et al., 2001). Como grupo-irmão do clado I está o clado II. Nesse clado ficaram reunidas com 64 % de reamostragem quatro sequências antárticas (CENA390, CENA391, CENA392 e CENA420) com cinco sequências de Nostoc sp. CENA158, CENA159, CENA160, CENA184 e CENA186 obtidas a partir de linhagens de cianobacterias isoladas de amostras de solo e água coletadas em manguezais brasileiros (SILVA et al., 2014); além da sequência de Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-067' obtida de uma linhagem isolada de associação simbiótica com o fungo Peltigera didactyla com origem desconhecida (O'BRIEN; MIADLIKOWSKA; LUTZONI, 2005). As sequências antárticas foram geradas a partir de linhagens isoladas de amostras de biofilme crescidas sobre rochas e ossos de baleia em regiões sob influência marítima (Agat Point em direção à geleira Baranowski e praia em Punta Plaza na Ilha Rei George). Testes investigando a influência da salinidade sob o crescimento das linhagens cujas sequências ficaram incluídas nesse clado foram conduzidos, exceto em Nostoc sp. 'Mollenhauer 1:1-067'. De acordo com esses resultados (não apresentados) ficou demonstrado que concentrações de 1 a 10 % de NaCl foram toleradas pelas linhagens sem afetar significativamente a produção de biomassa. Nesse sentido, é importante resaltar que as linhagens cujas sequências ficaram contidas nos clados I e II toleram e ou requerem condições salinas para crescimento. A comparação das sequências de RNAr 16S de CENA390, CENA391, CENA392 e CENA420 com as sequências incluídas no clado II resultaram em

identidade que variaram de 96,3 - 99,8 %, indicando a existência de diferentes espécies (considerado o limite de 97,5 %) (Tabela 14). A comparação entre sequências incluídas no clado II com sequências de Nodularia, Anabaenopsis e Cyanospira (clado I) revelaram valores de identidade menores ou iguais a 96,1, 96,5 e 96,8, respectivamente. Morfotipos desses gêneros são bastante distintos morfologicamente em relação àqueles contidos no clado II. Contrariamente, alta semelhança morfológica é observada entre os morfotipos incluídos no clado II com membros de Nostoc stricto sensu, cujas sequências estão filogeneticamente em um clado não relacionado ao clado II. A comparação das sequências contidas no clado II com uma sequência representativa do clado de Nostoc stricto sensu (Nostoc edaphicum X) revelou identidade menor ou igual a 95,3 % e, portanto, próximo ao limite estabelecido para separação de gêneros (95 %). Comparação similar foi realizada entre as sequências incluídas no clado II, com uma sequência representante (Nostoc sp. PCC8112), pertencente ao clado mais próximo e que apresenta morfotipos semelhantes aos do clado II. Nessa comparação obtiveram-se valores menores ou iguais a 95,8 %, também próximo ao limite estabelecido para separação de gêneros. Morfologicamente, o gênero Nostoc é caracterizado por filamentos unisseriados, isopolares e não ramificados podendo suas células vegetativas diferenciar-se em acinetos, heterócitos e hormogônios (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989). Os acinetos são formados apoheterociticamente, enquanto que o desenvolvimento dos heterócitos ocorre nas posições terminais e intercalares (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989). A produção de colônias mucilaginosas e o ciclo de vida complexo são outras características comuns a todas as espécies deste gênero (HROUZEK et al., 2013; LAZAROFF; VISHNIAC, 1961; LAZAROFF, 1966; MATEO et al., 2011). Apesar de suas características morfológicas serem bem estabelecidas, geneticamente o gênero Nostoc é heterogêneo e análise filogenética baseada em seqüências do gene rRNA 16S revelaram que vários genótipos estão fora do grupo de Nostoc stricto sensu (GENUARIO et al., 2010; HROUZEK et al., 2005; HROUZEK et al., 2013; LUKEŠOVÁ et al., 2009; PAPAEFTHIMIOU et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005a; SILVA et al., 2014). Por isso, muitos estudos têm recomendado uma revisão deste gênero, levando em consideração principalmente dados filogenéticos. Como resultado, alguns morfotipos relacionados à Nostoc foram descritos como Mojavia e outros transferidos para o gênero Desmonostoc (HROUZEK et al., 2013; ŘEHÁKOVÁ et al., 2007). Nesse sentido, os resultados apresentados suportam a criação de um novo gênero, nomeado de Halotia levandose em consideração os baixos valores de identidade encontrados, a distinta posição filogenética em relação ao grupo de Nostoc stricto sensu e a habilidade dessas linhagens em suportar condições salinas de crescimento. Salienta-se a incapacidade de diferenciar as linhagens antárticas e de manguezais brasileiros dos morfotipos de Nostoc stricto sensu baseando-se unicamente nos caracteres morfológicos como já reportado nos trabalhos de Desmonostoc e Mojavia (HROUZEK et al., 2013; ŘEHÁKOVÁ et al., 2007). Ainda, a investigação das sequências do ITS dessas linhagens, suportou a separação das mesmas em três espécies distintas, H. branconii, H. longispora e H. wernerae (resultados não apresentados). No clado III, ficaram agrupadas com 66 % de reamostragem duas sequências de Hydrocoryne sp. geradas nesse trabalho (CENA393 e CENA398) com outras duas sequências antárticas (ANT-UFV-31 e ANT-UFV-32) além de sete sequências obtidas de linhagens identificadas como Anabaena spp. e Hydrocoryne spongiosa (Figura 6). As linhagens Hydrocoryne sp. CENA393 e Hydrocoryne sp. CENA398 foram isoladas de biofilme em uma poça de água doce próximo à geleira Baranowski na Ilha Rei George, enquanto que Hydrocoryne sp. UFV-ANT31 e UFV-ANT32 foram isoladas a partir de amostras de água doce em um córrego de degelo na Península Potter e amostras de solos encharcados em Cabo Lions Rump, Ilha Rei George (GENUÁRIO et al., 2013). As demais sequências incluídas nesse clado foram provenientes do Havaí, Mar Báltico, Alemanha, China, Japão e Portugal. Essas sequências ficaram relacionadas com a sequência de HA4387-MV2, cuja linhagem é considerada a espécie tipo do gênero Hydrocoryne (BORNET; FLAHAULT, 1886-1888). Hydrocoryne spongiosa HA4387-MV2 foi isolada a partir de detritos de madeira raspados em um córrego no Havaí e suas características ecológicas estão de acordo com as descritas para o gênero Hydrocoryne (VACCARINO, 2011). Representantes da espécie de H. spongiosa foram reportados em pântanos de água doce, lagos e reservatórios e aderidas à plantas submersas (raramente flutuando na superfície da água) (BORNET; FLAHAULT, 1886-1888; NIELSEN, 1953; KOMÁREK; HAUER, 2014). A inclusão de linhagens identificadas como Anabaena e Hydrocoryne no clado III evidencia novamente a dificuldade de identificar morfotipos semelhantes baseando-se unicamente em caracteres morfológicos. Representantes bentônicos de Anabaena e morfotipos de Hydrocoryne diferem-se morfologicamente apenas pela ocorrência de múltiplos tricomas em uma bainha em Hydrocoryne (BORNET; FLAHAULT, 1886-1888; KOMÁREK; HAUER, 2014). Similarmente, o gênero Wollea difere-se de morfotipos bentônicos de Anabaena pela estrutura colonial macroscópica de Wollea (KOZHEVNIKOV; KOZHEVNIKOVA, 2011). Sabe-se que caracteres morfológicos, tais como bainha e produção de mucilagem, podem ser perdidos quando linhagens são mantidas por longos períodos em condições artificiais de cultivo como aqueles empregados em coleções de cultura (ANAND, 1988; GUGGER et al., 2002). Acredita-se que mais de 50 % das linhagens incluídas em coleções de cultura estão

identificadas erroneamente em decorrência de modificações morfológicas (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989). Ainda, sabe-se que morfotipos planctônicos de Anabaena são filogeneticamente muito distintos e recentemente foram transferidos para cinco novos gêneros (KOMÁREK, 2008; RAJANIEMI et al., 2005a; 2005b; WACKLIN; HOFFMANN; KOMÁREK, 2009; ZAPOMĚLOVÁ et al., 2011, ZAPOMĚLOVÁ et al., 2012). Similarmente é mencionada na literatura que grupos bentônicos de Anabaena e Calothrix são diversos filogeneticamente podendo originar novos gêneros de cianobactérias (HALINEN et al., 2008; SIVONEN et al., 2007). Entretanto, acredita-se que o clado III reúna sequências de linhagens de Hydrocoryne que foram erroneamente identificadas como Anabaena devido à perda de bainha como consequência da manutenção dessas linhagens em cultura por longos períodos. No início dos procedimentos de isolamento do presente trabalho, os múltiplos tricomas em uma única bainha foram visualizados e registrados nas linhagens Hydrocoryne sp. CENA393 e Hydrocoryne sp. CENA398. No entanto, após dois anos de cultivo essa característica não foi mais visualizada. Contudo, a transferência dessas linhagens para meios de cultivos sólidos favoreceu o retorno dessa característica e pode novamente ser visualizada com auxílio de tinta nanquim (GENUÁRIO et al., 2013). A comparação entre as sequências de RNAr 16S incluídas no clado III mostrou valores altos de identidade (Tabela 15). Os valores obtidos foram superiores a 97,5 %, valor de referência para distinção de espécies e, portanto, indicam que todas as sequências provenientes das linhagens do clado III pertençam a uma única espécie. Esses resultados reforçam a suposição de que essas linhagens façam parte do gênero Hydrocoryne, além do fato de que essas sequências ficaram agrupadas com a sequência da espécie-tipo do gênero (H. spongiosa) e não com a espécie do tipo do gênero Anabaena (A. oscillarioides). A mesma análise comparativa entre as sequências incluídas no clado III com a sequência de A. oscillarioides indicou valores ≤ 96,3 % e a reconstrução filogenética mostrou que o clado contendo a sequência de A. oscillarioides é irmão do clado contendo as sequências de Hydrocoryne (clado III). No clado IV, ficaram agrupadas com valor de reamostragem de 60 %, quinze sequências de Nostoc sp. originadas de linhagens isoladas das ilhas Rei Geoge e Deception. As sequências antárticas ficaram reunidas com a sequência de Nostoc punctiforme, cuja espécie é considerada a tipo do gênero Nostoc (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDAMAN, 2001). Filogeneticamente, o clado IV é considerado o grupo no qual estão incluídas as sequências originadas de morfotipos verdadeiramente de Nostoc (Nostoc stricto sensu) como já mencionado em diversos trabalhos (GENUARIO et al., 2010; HROUZEK et al., 2005; HROUZEK et al., 2013; LUKEŠOVÁ et al., 2009; PAPAEFTHIMIOU et al., 2008; RAJANIEMI et al., 2005a; 2005b; SILVA et al.,

2014). Dentre as sequências reunidas nesse clado, estão àquelas obtidas a partir de linhagens isoladas de diferentes lagos antárticos (TATON et al., 2006a). Pela análise BLAST as sequências antárticas apresentaram identidade superiores ou iguais a 98,1 % com sequências de *Nostoc* cultivados e não-cultivados, ou seja acima de 95 % e 97,5 % estabelecidos para separação de gênero e espécie, respectivamente. A sequência de *Nostoc* sp. CENA400 não ficou afiliada a nenhuma sequência utilizada na construção da árvore filogenética, estando fracamente relacionada ao clado IV e a duas sequências de *Nostoc* sp. não cultivadas. Essas duas sequências foram as quais apresentaram a maior porcentagem de identidade (98,5 %) pela análise Blast e foram investigadas quanto a presença de genes envolvidos na produção de microcistina em associações simbióticas (KAASALAINEN et al., 2012).

No entanto, de acordo com os resultados de triagem molecular envolvendo genes e ou regiões intergênicas, a linhagem antártica apresentou potencial genético apenas para produção de saxitoxina e cianopeptolina.

Os valores de identidade entre as sequências RNAr 16S das linhagens das famílias Microchaetaceae e Rivulariaceae isoladas da Antártica e sequências disponíveis no banco de dados variaram de 91,8 a 99,6 % (Tabela 4). O menor valor de identidade encontrado (91,8 %) foi obtido da comparação entre a sequência de *Calothrix* sp. CENA449 com sequências de *Calothrix* sp. CCAP1410/14. O maior valor de identidade (99,6 %) foi referente à comparação da sequência de *Dactylothamnos* sp. CENA433 com a sequência de bactéria não cultivada AK4DE2\_01G, gerada a partir de amostras coletadas em áreas de retração de geleiras no Alasca (SATTIN et al., 2009) (Tabela 4).

A análise filogenética das sequências de RNAr 16S geradas a partir das linhagens heteropolares revelou a formação de dois clados contendo sequências obtidas nesse trabalho (Figura 7). No Clado I ficaram reunidas com 57 % de reamostragem três sequências de *Dactylothamnos* sp. (CENA410, CENA412 e CENA433) com sequências das espécies tipo dos gêneros *Hassallia* e *Tolypothrix* (*H. byssoidea* e *T. distorta*), incluídos na família Microchaetaceae. Externamente relacionada a esse clado ficou a sequência da espécie-tipo do gênero *Coleodesmium* (*C. wrangelli*) com 95 % de reamostragem. As linhagens antárticas foram isoladas a partir de amostras de biofilme coletados em poças de água doce nas ilhas Rei George e Deception. As demais sequências foram geradas a partir de linhagens isoladas de ambiente aéreo, aquático e associados a musgos provenientes da República Tcheca, Espanha e Estados Unidos da América. Morfologicamente, os gêneros incluídos nesse clado (e também os gêneros *Coleodesmium, Rexia* e *Spirirestis*) são muito similares ao gênero *Tolypothrix* 

apresentando alta frequência de ramificações na base dos heterócitos (BERRENDERO; PERONA; MATEO, 2011). Geneticamente esses gêneros compartilham identidade entre sequências do RNAr 16S acima de 95 % (BERRENDERO; PERONA; MATEO, 2011). No entanto, diferenças sutis nos processos de ramificação do filamento ou outras variações morfológicas são observadas (BERRENDERO; PERONA; MATEO, 2011). Basicamente, o gênero Coleodesmium apresenta a mesma morfologia que o gênero Tolypothrix diferindo-se apenas pela ocorrência de múltiplos tricomas em uma bainha (TATON et al., 2006a; WHITTON, 2002;). As delimitações morfológicas do gênero Hassallia têm sido amplamente discutidas, e de acordo com Hoffman e Demoulin (1985) as diferenças básicas são as células vegetativas curtas e o hábito aerofítico. Os gêneros Rexia e Spirirestis foram descritos mais recentemente (CASAMATTA; GOMEZ; JOHANSEN, 2006; FLECHTNER et al., 2002). O gênero *Rexia* distingue-se pela capacidade de diferenciação de hormogônios e de divisão celular em dois planos, enquanto que morfotipos do gênero Spirirestis apresentam tricomas espiralados (CASAMATTA; GOMEZ; JOHANSEN, 2006; FLECHTNER et al., 2002). A comparação entre as sequências de RNAr 16S de Dactylothamnos sp. CENA410, CENA412 e CENA433 com sequências das linhagens agrupadas no clado I e com sequências das espécies tipo relacionadas morfologicamente revelou identidade  $\geq 95$  % (Tabela 16). Portanto, levando em consideração o valor de 95 % para separação de gêneros, todas essas linhagens deveriam ser consideradas um único gênero. Nessa comparação também foram avaliadas as sequências das linhagens referência para o gênero Tolypothrix consideradas no Manual Bergey de Sistemática Bacteriana (Tolypothrix sp. PCC7504, grupo 1 e Tolypothrix sp. PCC7415, grupo2) (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDMAN, 2001), muito embora essas essas sequências não tenham apresentado filiação com as sequências antárticas na árvore filogenética (Figura 7). Apesar dos altos valores de identidade encontrados, sutis diferenças morfológicas justificaram a criação dos gêneros Hassallia, Coleodesmium, Rexia e Sperirestis (BORNET; FLAHAULT, 1886-1888; CASAMATTA; GOMEZ; JOHANSEN, 2006; FLECHTNER et al., 2002). Similarmente, as linhagens antárticas são distintas quando consideradas o tipo divaricado e curto das ramificações, o leve estreitamento do filamento em direção ao ápice e, ainda, a célula terminal arredondada (Komárek, comunicação pessoal). Filogeneticamente, essas sequências antárticas ficaram agrupadas com sequências de Dactylothamnos spp. oriundas de linhagens isoladas de filosfera de plantas de Mata Atlântica e de manguezais (ALVARENGA, 2011; ANDREOTE, 2014) (resultado não apresentado). Desse modo, os resultados morfológicos e filogenéticos apresentados confirmam o gênero Dactylothamnos como um novo gênero de cianobactéria (FIORE et al., 2013). No clado II,

com 100 % de reamostragem ficaram agrupadas cinco sequências de Calothrix sp. (CENA445, CENA447, CENA427, CENA429 e CENA449) geradas nesse trabalho com a sequência da linhagem *Calothrix elsteri* isolada da Ilha James Ross, Antárctica (KOMÁREK; NEDBALOVÁ; HAUER, 2011). Todas as linhagens do presente trabalho foram isoladas de água salobra na ilha Deception. Como grupo irmão do clado II, estão reunidas com 98 % de reamostragem sequências de linhagens referência para o grupo 1 de Calothrix (PCC7715, PCC7102, PCC7103 e PCC7714) provenientes de ambientes terrestres e aquáticos dulcícolas, considerando o Manual Bergey de Sistemática Bacteriana (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDMAN et al., 2001). Relacionados externamente a esses clados, estão outros dois clados contendo sequências geradas a partir de linhagens de Calothrix isoladas de ambientes marinhos ou salobros do Mar Báltico na Finlândia (SIVONEN et al., 2007). Ainda, mais externamente a esses clados, estão as sequências referências para o grupo 2 e 3 do gênero Calothrix (Rivularia sp. PCC7116 e Calothrix sp. PCC7507), provenientes de ambientes marinhos e de água doce, respectivamente (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDMAN et al., 2001). De acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, representantes marinhos de Calothrix foram transferidos para o gênero Rivularia, levando em consideração apenas a característica ecológica e ignorando atributos morfológicos como a atenuação do filamento em direção à extremidade do filamento (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDMAN et al., 2001).Uma das justificativas apresentadas é que essa característica morfológica apresenta alta plasticidade e é fortemente influenciado pela disponibilidade de fósforo encontrados no ambiente e/ou nos meios de cultura empregados para o cultivo das linhagens (RIPPKA; CASTENHOLZ; HERDMAN et al., 2001). Variações no grau de atenuação do filamento foram comprovadas experimentalmente em culturas de *Calothix* e *Tolypothrix* submetidas à baixa disponibilidade e nutrientes (BERRENDERO; PERONA; MATEO, 2008; 2011). Nesses estudos, os autores comprovaram que linhagens inicialmente identificadas como Calothrix (filamentos com atenuação) quando transferidas para meios de cultura com baixa disponibilidade de nutrientes, perderam a atenuação dos filamentos e ainda apresentaram o desenvolvimento de falsas ramificações (características de Tolypothrix) (BERRENDERO; PERONA; MATEO, 2011). A comparação entre as sequências de RNAr 16S de Calothrix sp. CENA445, CENA447, CENA427, CENA429, CENA449 com sequência da linhagem C. *elsterii* agrupada no clado II revelou identidade  $\geq$  99,6 % indicando pertecerem a mesma espécie (Tabela 17). Embora a sequência da linhagem Calothrix sp. CENA449 tenha sido agrupada no clado II, essa sequência apresentou baixo valor de identidade (95,3 %) com as demais sequências obtidas nesse estudo e com a sequência da linhagem de C. elsterii. O baixo

valor de identidade, no entanto, é resultado de uma quimera formada na sequência de RNAr 16S da linhagen *Calothrix* sp. CENA449. Considerando as demais sequências de RNAr 16S geradas, observam-se os baixos valores de identidade ( $\leq 94,1$  %) obtidos da comparação dessas sequências com sequências de linhagens presentes nos clados relacionados e mencionados acima (Tabela 17). Portanto, esse grupo de linhagens pode representar um novo gênero de cianobactéria proveniente de ambiente marinho e que filogeneticamente relacionase ao grupo verdadeiro de *Calothrix*. A sequência de *C. elsterii* foi gerada a partir de uma linhagem isolada de amostras de biofilme crescidos em rochas submersas (água doce) no lago Lachman na Ilha James Ross (KOMÁREK; NEDBALOVÁ; HAUER, 2011). Esse lago fica na região litorânea da ilha podendo estar sujeito a influência marinha por meio do *spray* marinho, embora, esteja a 10 m acima do nível no mar. Os resultados apresentados nesse estudo estão de acordo com aqueles obtidos por Sihvonen e colaboradores (2007) e Berrendero e colaboradores (2008), os quais discutem a condição polifilética do gênero *Calothrix* e sugerem a separação de novos gêneros a partir de *Calothix stricto sensu*.

De maneira geral, o valor de 95 % de identidade entre sequências de RNAr 16S foi estabelecido como limite para separação de gêneros entre grupos bacterianos (LUDWIG et al., 1998; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; WAYNE et al., 1987). Embora, esse valor não deva ser usado como único critério para separação de gêneros, em estudos taxonômicos de cianobactéria ele é um importante indicador para criação de novos gêneros (KOMÁREK, 2010). Nos últimos anos, a descrição de novas entidades genéricas tem sido suportada por valores inferiores ou iguais a 95 % de identidade entre sequências de RNAr 16S, combinado com ao menos uma característica citomorfológica autopomórfica diacrítica (KOMÁREK, 2010). Entretanto, alguns autores reconhecem variações menos rigorosas (até 99 %) desse limite para grupos de cianobactérias da ordem Nostocales, como aqueles utilizados para criação dos gêneros *Mojavia e Spirirestis* (FLECHTNER et al., 2002; REHÁKOVÁ et al., 2007).

### 7.2 Caracterização funcional dos isolados

As topologias das árvores filogenéticas baseadas em sequências de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *nifH* foram distintas e somente aquela construída com sequências de nucleotídeos será discutida (Figura 8). De acordo com essa árvore filogenética, os clados formados apresentaram três padrões diferentes de agrupamento. No primeiro deles, a filogenia

das sequências do gene *nifH* corresponde aquela mostrada na filogenia baseada em sequências de RNAr 16S; no segundo padrão, a filogenia do nifH evidencia a proximidade entre sequências derivadas de linhagens que apresentam morfologia semelhante, enquanto que no terceiro padrão, não existe qualquer correspondência entre as filogenias das sequências de nifH e RNAr 16S, e nem proximidade entre morfotipos. Esse último padrão pode ser resultado do baixo número de sequências disponíveis no banco de dados para comparação e também devido à relação das sequências antárticas com sequências de cianobactérias ou bactérias não cultivadas. Os padrões mencionados acima estão de acordo com aqueles reportados na literatura e que por sua vez refletem as forças de seleção envolvidas na distribuição de genes funcionais tais como o gene nifH (BOLHUIS et al., 2010; POSTEGATE; EADY, 1988; SWINGLEY; BLANKENSHIP; RAYMOND, 2008; YOUNG, 1992; YOUNG, 2000). A primeira hipótese aborda a transferência vertical dos genes relacionados à fixação biológica do nitrogênio a partir de um ancestral comum e, portanto, sua história evolutiva corresponderia à dos organismos em questão. Nessa visão, as topologias das árvores filogenéticas baseadas em sequências de RNAr 16S e nifH são semelhantes e por conseguinte refletem a proximidade morfológica dos organismos (BEN-PORATH; ZEHR, 1994; ZEHR; CAPONE, 1996; ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997; ZEHR et al., 2003). A segunda hipótese remete a transferência horizontal desses genes funcionais e é demonstrada em estudos envolvendo espécies da cianobactéria Microcoleus chthonoplastes (BOLHUIS et al., 2010). Nesse estudo, ficou demonstrado que os genes estruturais da nitrogenase de M. chthonoplastes agrupam-se filogeneticamente com sequências gênicas de representantes do grupo de Deltaprotobacteria, além de indicar a existência de duas regiões adjacentes ao operon *nif* com valores médios de G+C inferiores ao restante do genoma cianobacteriano, sugerindo a incorporação exógena desse fragmento de DNA (BOLHUIS et al., 2010). Ainda, Young (1992) em seu trabalho sobre a evolução molecular dos organismos diazotróficos apresenta três explicações para os casos em que a filogenia de um organismo, baseada no rRNA 16S, não é refletida pela análise dos genes envolvidos na fixação biológica do nitrogênio. Na primeira delas, enfatiza a transferência horizontal de determinados genes e consequente incoporação desses genes em genomas de organismos hospedeiros (YOUNG, 1992). A segunda possibilidade refere-se à comparação de sequências homólogas originadas por eventos de duplicação e/ou divergência genética originando, respectivamente sequências parálogas e ortólogas (YOUNG, 1992). A terceira explicação baseia-se no fato de que identidade alta entre sequências pode ser consequência de convergência evolutiva em resposta às pressões seletivas do ambiente (YOUNG, 1992). Swingley, Blankenship e Raymond

(2008) estudando filogenômica de famílias conservadas de proteínas em cianobactérias, destacaram que a capacidade fixadora de nitrogênio nas cianobactérias é uma característica parafilética uma vez que ocorre em pontos múltipos e dispersos em suas árvores filogenéticas. Esses autores sugerem que a habilidade de fixação de nitrogênio apareceu três vezes independentemente nesse grupo de micro-organismos. Mencionam, ainda, que a perda de genes, a transferência horizontal de genes e ou a combinação desses dois processos podem explicar a dispersão dos genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio nas cianobactérias (SWINGLEY; BLANKENSHIP; RAYMOND, 2008). Hilton e colaboradores (2013) estudando associações simbióticas entre espécies de cianobactérias e diatomáceas mostraram a grande plasticidade do genoma do cianobionte, *Richelia*. Nesse trabalho é destacada a manutenção de genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio em detrimento da perda de genes envolvidos na assimilação do nitrogênio (HILTON et al., 2013).

Independentemente dos mecanismos envolvidos na transferência do operon de *nif*, a presença de fragmento do gene *nifH* em espécies de cianobactéria evidencia o potencial genético das mesmas em realizar a fixação biológica do nitrogênio. Nesse sentido, parcela das linhagens de cianobactérias isoladas da Antártica e que apresentaram esse fragmento gênico foi avaliada quanto à atividade da nitrogenase usando a técnica de redução de acetileno com alta sensibilidade de detecção (STAAL et al., 2001).

Em geral, os testes investigando a influência do oxigênio sob a atividade da nitrogenase revelaram que as maiores taxas de atividade dessa enzima ocorreram entre 0 - 60 % de  $O_2$ levando em consideração todas as condições de temperatura e luminosidade empregadas (Gráficos 1 a 18). Considerando as formas não-heterocitadas (unicelulares e homocitadas), com exceção de Leptolyngbya sp. CENA411 observou-se a diminuição da atividade da nitrogenase a partir da concentração de 20 % de O2, enquanto que nas formas heterocitadas a redução da atividade da nitrogenase ocorreu a concentrações mais elevadas, após 60 % de O<sub>2</sub>. Com base nesses valores depreende-se que as linhagens não-heterocitadas apresentam reduzida atividade da nitrogenase quando expostas a teores baixos e moderados de oxigênio, e com o aumento da concentração de O2, o complexo enzimático desse grupo de linhagens é inibido pelo oxigênio molecular. Embora a inativação do complexo enzimático pelo oxigênio esteja de acordo com o reportado na literatura para esse grupo de cianobactérias (GALLON, 1992; WALSBY, 1985), observa-se que a concentração de O2 em que existe atividade da nitrogenase é mesma daquela encontrada normalmente na atmosfera terrestre (aeróbica) e está acima dos valores mencionados na literatura (anóxica e micro-aeróbica) para esse grupo de cianobactérias (BERGMAN et al., 1997; COMPAORÉ; STAL, 2010a). A existência de

atividade da nitrogenase em condições de maior concentração de O2 evidencia a adaptação dessas linhagens a ambientes bem oxigenados, tais como aqueles encontrados na Antártica. Similarmente, as linhagens heterocitadas exibiram atividade da nitrogenase em concentrações mais elevadas de oxigênio (60 %), favorecida principalmente pela presença dos heterócitos, células diferenciadas e especializadas na fixação biológica de nitrogênio. Nessas células, o complexo enzimático da nitrogenase fica protegido dos efeitos nocivos do oxigênio molecular, uma vez que a espessura do envoltório celular é aumentada dificultando a difusão dos gases para seu interior (BERGMAN et al., 1997). Ainda, os heterócitos carecem do fotossistema II (PSII) e, portanto, não liberam o O<sub>2</sub> resultante da fotossíntese, o qual por sua vez poderia inibir a atividade da nitrogenase (BERGMAN et al., 1997). Somadas a essas características, destaca-se também a atividade respiratória aumentada nessas células na tentativa de consumir o oxigênio residual (BERGMAN et al., 1997). Como consequência dessas vantagens morfológicas e fisiológicas, e baseando nos resultados apresentados fica demonstrada que as linhagens heterocitadas podem representar uma importante fonte de nitrogênio em ambientes com alta concentração de oxigênio como aqueles encontrados em sistemas aquáticos na Antártica. Inversamente, é sabido que as formas não-heterocitadas (unicelulares e homocitadas) de cianobactérias são a principal fonte de nitrogênio nos oceanos tropicais uma vez que a elevada salinidade e temperatura dessas águas favorecem um ambiente de baixa solubilidade de oxigênio, ou seja, uma condição menos prejudicial ao complexo enzimático da nitrogenase (STAAL; MEYSMAN; STAL, 2003; STAL, 2009). No geral, nos testes conduzidos a 5 °C, as linhagens não exibiram ou apresentaram valores de atividade da nitrogenase reduzidos em todas as condições de luminisidade e concentrações de O2. Esses resultados sugerem que a atividade metabólica dessas linhagens nessa temperatura é reduzida, sendo influenciada principalmente pela baixa atividade metabólica (VINCENT, 1988). Destaca-se que a temperatura de 5 °C foi escolhida e testada em função de ser a temperatura aproximada daquela medida no momento da coleta das amostras na natureza.

Os maiores valores de atividade da nitrogenase foram exibidos nas temperaturas de 20 e 30 °C dependendo da linhagem estudada. No entanto, independentemente da temperatura avaliada, houve aumento da atividade da nitrogenase em função do aumento da intensidade luminosa. Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Compaoré e Stal (2010b) que estudaram os efeitos da luz, temperatura e concentrações de oxigênio em duas espécies de cianobactérias heterocitadas. Detalhadamente, a influência do oxigênio sobre a atividade da nitrogenase foi específica para cada uma das linhagens estudadas e variou de acordo com as condições de temperatura e luminosidade testadas.

Os testes investigando a influência da irradiância sob a atividade da nitrogenase foram positivos somente para as linhagens heterocitadas (Gráficos 1 a18). Independentemente da concentração de O<sub>2</sub> utilizada, a atividade da nitrogenase total (NTot) foi maior na temperatura de 30 °C em relação a 20 °C. Esse aumento pode ser explicado pela maior atividade metabólica em temperaturas mais elevadas (COMPAORÉ; STAL, 2010b). Em geral, os valores de atividade da nitrogenase total (NTot) foram menores nos experimentos conduzidos em condição de ausência de oxigênio. Esses resultados indicam que a ausência de ATP gerado pela respiração pode ser o responsável pela diminuição da atividade da nitrogenase. Esse perfil difere daquele apresentado por Compaoré e Stal (2010b) estudando linhagens de *Nostoc* sp. PCC7120 e *Anabaena viriabilis* ATCC29413. Esses autores justificaram esse padrão afirmando que em condições com baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> pouco poder redutor disponível para fixação biológica do nitrogênio.

O experimento conduzido na ausência de  $O_2$  exclui o efeito da respiração sobre o comportamento da atividade da nitrogenase. Os altos valores das relações NTot/NE e NL/NTot indicam uma alta dependência da luz para realização da atividade da nitrogenase e mostram que de 79 a 100 % dessa atividade é mediada pela luz (Tabela 22). Curiosamente, a 20 °C, três linhagens (*Hydrocoryne* sp. CENA393, *Nostoc* sp. CENA400 e *Dactylothamnos* sp. CENA410) apresentaram atividade da nitrogenase durante o período de escuro na ausência de oxigênio, e portanto, algum mecanismo de conservação de energia independente da presença de oxigênio, tais como a fermentação, pode estar envolvido na atividade da nitrogenase nessas linhagens (STAL; MOEZELAAR, 1997).

Contrariamente, o experimento conduzido na presença de  $O_2$  inclui o efeito da respiração sob o comportamento da atividade da nitrogenase e, portanto, expõe simultaneamente os efeitos da fotossíntese e da respiração na atividade enzimática da nitrogenase. Valores menores para as relações NTot/NE e NL/NTot que os apresentados acima foram observados e indicam uma menor dependência da luz para realização da atividade da nitrogenase e que de 0 a 85 % dessa atividade é mediada pela luz (fotossíntese) enquando que 15 a 100 % é intercedida pela escuro (respiração). As três linhagens mencionadas anteriormente (*Hydrocoryne* sp. CENA393, *Nostoc* sp. CENA400 e *Dactylothamnos* sp. CENA410) apresentaram atividade da nitrogenase mediada pela respiração maior que 84 % a 20 °C.

Em condições de ausência e presença de O2, os valores da razão NTot/NE reportados na literatura podem ser infinitos e variar de 2 a 5, respectivamente (COMPAORÉ; STAL, 2010b). Valores tendendo ao infinito seriam encontrados quando a contribuição da atividade da nitrogenase no período escuro fosse pequena, tendendo a zero. Teoricamente, na presença de O<sub>2</sub>, o valor de 1 poderia ser encontrado, indicando que atividade da nitrogenase seria totalmente suprida pelo período escuro (respiração). No entanto, o valor igual a 1 nunca foi reportado na literatura (COMPAORÉ; STAL, 2010b). Os valores da razão NTot/NE apresentados para as linhagens testadas no presente trabalho obdeceram a tendência mencionada para as condições de ausência e presença de oxigênio e pela primeira vez o valor de 1 foi reportado e encontrado para a linhagem Nostoc sp. CENA400. Os valores de Ik encontrados ficaram abaixo de 70 considerando todos os tratamentos, exceto para as linhagens CENA400 e CENA434. Esses valores indicam que saturação do complexo enzimático da nitrogenase ocorre em irradiâncias baixas e evidenciam que essas linhagens estão adaptadas a condições de baixa luminosidade. Valores de saturação da nitrogenase em baixas irradiâncias foram também demostradas em Nostoc sp. PCC7120 e Anabaena viriabilis ATCC29413 (COMPAORÉ; STAL, 2010b).

De acordo com os resultados apresentados dos experimentos investigando a influência do oxigênio e da irradiância sob a atividade da nitrogenase, destaca-se que todas as linhagens de cianobactérias submetidas a esses testes foram capazes de exibir atividade da nitrogenase mesmo que em baixos níveis. Esses resultados confirmam a habilidade dessas linhagens em realizar fixação biológica do nitrogênio, previamente indicada pela presença de fragmento do gene nifH. Dentre esses resultados, salienta-se aqueles obtidos a partir de linhagens nãoheterocitadas (unicelulares e homocitadas, ordens Chroococcales, Pseudanabaenales e Oscillatoriales) em resposta a diferentes concentrações de O2 e que mostraram que essas linhagens exibem atividade da nitrogenase em quantidades baixas/moderadas na presença de O2. Disso, conclui-se que essas linhagens podem realizar fixação biológica do nitrogênio em condições aeróbicas. De acordo com os dados de literatura, até o momento, poucas espécies de gêneros não-heterocitados tiveram essa capacidade detectada e confirmada, tais como: Gloeocapsa, Gloeothece, Cyanothece, Synechococcus, Synechocystis, Chroococcidiopsis, Crocosphaera watsonii WH8501, Dermocarpa, Myxosarcina, Pleurocapsa, Xenococcus, Lyngbya, Phormidium, Plectonema, Symploca, Microcoleus, Oscillatoria, Pseudanabaena e Trichodesmium (BERGMAN et al., 1997; COMPAORÉ; STAL, 2010a). Também, os experimentos de atividade da nitrogenase em resposta a diferente concentrações de O<sub>2</sub> mostraram que as formas heterocitadas apresentam atividade da nitrogenase em altas

concentrações  $O_2$  indicando alta adaptação a ambientes oxigenados, e os experimentos de atividade da nitrogenase em resposta à irradiância revelaram que essas linhagens realizam fixação biológica do nitrogênio durante o período de escuro.

Com base nos resultados de amplificação de genes e ou regiões intergênicas envolvidas na produção de substâncias com interesse biotecnológico, destaca-se o elevado potencial genético das linhagens isoladas do ambiente antártico para produção dessas substâncias. Entre 30 e 45 % das linhagens apresentaram potencial genético para produção de microcistina, 8,8 % para produção de saxitoxina e entre 29 – 39 % para produção de inibidores de proteases. Dentre essas substâncias, somente as microcistinas já foram encontradas e reportadas em mantos microbianos contendo cianobactérias coletados em lagos antárticos (HITZFELD et al., 2000; JUNGBLUT et al., 2006; WOOD et al., 2008). Embora essas linhagens apresentem potencial genético para produção dessas substâncias, estudos futuros devem ser conduzidos a fim de confirmar sua produção e prospectar quimicamente essas substâncias.

#### 7.3 Análises independentes de cultivo

A técnica de PCR-DGGE permitiu analisar os perfis das comunidades de cianobactérias nas amostras dos biofilmes antárticos provenientes de diferentes ambientes. Considerando as amostras 169AR e 177R, as quais tiveram o seu DNA total extraído com diferentes kits (PowerSoil DNA Isolation e PowerBiofilm<sup>®</sup> DNA Isolation), notou-se um padrão diferencial de bandas para a amostra 177R o que não ocorreu para a amostra 169AR. Essa alteração pode estar relacionada à heterogeneidade das amostras de biofilme e falta de repetições biológicas e também a capacidade diferencial de extração de DNA usando métodos e kits diferentes.

Com base no dendrograma gerado a partir da matriz de presença e ausência de bandas, foi possível verificar o agrupamento de amostras coletadas a partir de ambientes com diferentes características de salinidade e temperatura, e também provenientes de pontos geográficos distintos, ou seja, não foi possível identificar padrões de agrupamento envolvido na distribuição das cianobactérias nos biofilmes antárticos. Dentre os inúmeros fatores abióticos que podem afetar a estrutura e distribuição de comunidades microbianas, temperatura e salinidade podem ser discutido nesse trabalho. Em relação à temperatura, as amostras 174 e 174R, provenientes do Ponto Quente em Telephone Bay (temperatura de 23,7 °C) encontram-se agrupadas com a amostra 164 (temperatura e 7,7 °C) em um mesmo clado. Desse resultado, demonstra-se a temperatura não é o principal regulador da comunidade de cianobactérias em biofilme antárticos. Lozupone e Knight (2007) demonstraram que a salinidade pode ser o principal fator modulador das comunidades microbianas em detrimento da temperatura, pH e ou outros fatores físico-químicos. Entretanto, no presente trabalho a salinidade dos ambientes nos quais as amostras de biofilme foram coletadas não influenciou na distribuição da comunidade de cianobactérias nos biofilmes, como demonstrado pela não separação de amostras provenientes de ambientes de água doce e de água salgada, Corroborando esses dados não foi possível identificar um padrão de ordenação entre as amostras pela análise multivariada nMDS (Figura 11). Embora não tenha havido a separação das amostras com base na temperatura, salinidade e distribuição geográfica, considerando o dendrograma foi possível selecionar amostras representativas dos clados formados as quais foram submetidas ao sequenciamento do rRNA 16S de DNA metagenômico.

A quantificação do gene nifH de cianobactérias revelou que todas as amostras contêm cópias desse gene, com exceção das amostras 166 e 167 que foram coletadas do mesmo local (Baía próxima a estação Argentina). No momento da coleta, visualmente esses pontos estavam dominados pelo crescimento massivo de algas com coloração alaranjada e que possivelmente não apresentavam crescimento de cianobactérias. De acordo com a análise estatística, a abundância do gene nifH nas demais amostras de biofilme não apresentou relação com a posição geográfica nem sofreu influência com o tipo de ambiente amostrado. Os resultados mostram que as amostras de biofilme são colonizadas por cianobactérias que apresentam ao menos um dos genes envolvidos na codificação do complexo enzimático da nitrogenase. Assim, evidencia-se o potencial genético desse grupo de micro-organismos para fixação biológica do nitrogênio e reforça a importância ecológica das cianobactérias como fornecedoras de nitrogênio. Em um estudo investigando a comunidade diazotrófica em solos úmidos em Dry Valley na Antártica foi observado que gene *nifH* de cianobactérias foi o mais abundante ( $10^3$  a  $10^7$  cópias do gene *nifH* por grama de solo) quando comparado com os grupos Delta e Betaproteobacteria (NIEDERBERGER et al., 2012). No presente estudo foram encontrados valores de abundância de  $10^{0.6}$  a  $10^{3.9}$  cópias do gene *nifH* por grama de biofilme, valores bastante abaixo daqueles reportados por Niederberger e colaboradores (2012). Estudos fisiológicos investigando a dinâmica do carbono e nitrogênio em amostras de manto microbiano/biofilme na Ilha Livingston (Shetland do Sul) apontaram não existir limitação nutricional desses elementos uma vez que a fixação de N medida por ARA nessas amostras é bastante reduzida (0,1 a 0,3 %) (DAVEY, 1993a; 1993b). Diferentemente, amostras de manto

microbiano/biofilme encontradas em McMurdo na Antártica continental são limitadas quanto à disponibilidade de N (HAWES; HOWARD-WILLIAMS; PRIDMORE, 1993) e, portanto, a fixação biológica de nitrogênio fornece ao menos um terço da necessidade de N nessas amostras (FERNÁNDEZ-VALIENTE et al., 2001). Mantos microbianos/biofilme presentes no solo apresentaram taxas elevadas de fixação biológica de nitrogênio e máxima taxa de incorporação de N em relação à clorofila *a* indicando elevada atividade fisiológica em comparação com mantos microbianos presentes em lagos e ou riachos na Antártica (FERNÁNDEZ-VALIENTE et al., 2007). Considerando as análises físico-químicas das amostras de água coletadas nos corpos d`água de onde os biofilmes foram retirados, observaram-se quantidades de formas reduzidas e oxidadas de nitrogênio ( $NO^{2^-}$ ,  $NO^3$  e  $NH_4^+$ ) variando de 5,91 a 33,45 mg/L. Com base nesses resultados e naqueles reportados na literatura, acredita-se que valores reduzidos na abundância de cópias do gene *nifH* por grama de biofilme pode estar relacionado a disponibilidade de formas reduzidas de nitrogênio e, consequentemente a baixa atividade metabólica das cianobactérias diazotróficas.

O sequenciamento das sete amostras de biofilme selecionadas (150, 154, 157, 158, 165, 170 e 174) permitiu a identificação da comunidade bacteriana complexamente estruturada com as cianobactérias e investigar as interações bióticas envolvidas na determinação de comunidades microbianas. Essas amostras representam biofilmes com características contrastantes como aqueles coletados em ambientes de água doce, salobra, salgada e sujeitos ou não a ação geotermal.

O índice de Chao1 variou de 2.100 a 5.500 nas amostras selecionadas, refletindo a diferença na riqueza das comunidades bacterianas nos biofilmes. O índice de Shannon variou de 5 a 8,5, retratando a alta diversidade encontrada nas amostras de biofilme antárticos. Curiosamente, os maiores índices (Chao1 e Shannon) e o maior número de espécies observadas foram observados na amostra 154, cujo biofilme foi coletado em um lago temporário (pequeno e raso) de água doce a 10,7 °C. Embora informações relacionadas à importância do vento na dispersão de micro-organismos não tenha sido objetivo do presente trabalho, a região da qual a amostra 154 foi coletada encontra-se em uma área aberta, conectada a praia e ladeada por morros o que favorece a canalização de ventos nessa zona. Portanto, acredita-se que índices elevados de Chao1 e Shannon e o maior número de espécies observadas possam estar relacionados à dinâmica eólica da região. Em um trabalho investigando a distribuição de cianobactérias em Taylor Valley na Antártica, os autores concluíram que ventos fortes contribuem para dispersão de micro-organismos dentro das bacias no vale (MICHAUD; ŠABACKÁ; PRISCU, 2012). Ainda esses autores, acreditam que
após o assentamento desses propágulos, pressões de seleção mediadas pela química e física do ambiente modelam a comunidade de micro-organismos e favorecem um ambiente rico em termos de biomassa e diversidade (MICHAUD; ŠABACKÁ; PRISCU, 2012).

Investigando somente a comunidade de cianobactérias, as amostras de biofilme 154, 157, 158 (ambiente doce) e 170 (ambiente salgado) foram as que apresentaram maior número de UTOs relacionadas às cianobactérias. Em geral, houve predominância de UTOs relacionadas às ordens Nostocales, Oscillatoriales e Pseudanabaenales (Figura 15). Destaca-se também, o elevado número de UTOs afiliadas a cloroplastos, originadas provavelmente de algas presentes nas amostras. Ainda, as famílias de cianobactérias mais encontradas nessas amostras foram Pseudanabaenaceae, Phormidiaceae, Nostocaceae e Rivulariaceae (Figura 16). Considerando apenas as UTOs de cianobactérias que receberam afiliação genérica pela comparação com o banco de dados do Ribosomal DataBase Project (RDP) foi realizada uma comparação entre as UTOs/gêneros detectadas na abordagem independente de cultivo com as sequências obtidas das linhagens isoladas das amostras correspondentes, bem como de todo esforço de isolamento realizado nas duas ilhas amostradas (Tabela 25). A comparação entre as UTOs que receberam filiação taxonômica em nível de gênero e as linhagens isoladas das amostras correspondentes revelou que somente os gêneros *Nostoc* (Nostocales, Nostocaceae), Rivulariaceae) Calothrix (Nostocales, e Leptolyngbya (Pseudanabaenales, Pseudanabaenaceae) foram encontrados pelas técnicas dependentes e independentes de cultivo (Tabela 25). No entanto, quando se considera todo o esforço de isolamento, incluindo o realizado em outras amostras coletadas na Ilha Deception e também na Ilha Rei George, outros gêneros puderam ser recuperados por ambas as técnicas utilizadas, tais como Chroococcidiopsis, Microcoleus, Pseudanabaena, além dos gêneros que têm passado por reclassificações recentes (Phormidium em Microcoleus e Wilmottia) e os semelhantes morfologicamente, mas geneticamente distintos (Anabaena e Dolichospermum em Hydrocoryne) e (Planktothrix e Oscillatoria), como mencionado anteriormente nesse trabalho (Tabela 25). Corroborando parcialmente esses resultados, em um estudo envolvendo a caracterização microestrutural de mantos microbiano coletados em McMurdo, Antártica, usando técnicas de microscopia, revelou-se a predominância de morfotipos de cianobactérias relacionados aos gêneros Leptolyngbya, Pseudanabaena, Phormidium e Nodularia (DE LOS RÍOS et al., 2004). A árvore filogenética contendo as sequências de cianobactérias geradas pelo sequenciamento de DNA ambiental e aquelas obtidas das linhagens de cianobactérias isoladas mostrou a formação de dois grandes clados (Figura 17). No primeiro deles, ficaram agrupadas somente sequências provenientes de cianobactérias não-cultivadas enquanto que no

outro clado ficaram sequências geradas de cianobactérias cultivadas (linhagens isoladas) e não-cultivadas, com exceção de um clado interno. Salienta-se que as sequências das cianobactérias isoladas da Ilha Rei George não ficaram agrupadas entre si nessa árvore filogenética e, portanto, demonstra não haver isolamento geográfico na comunidade de cianobactérias entre as ilhas Deception e Rei George. Embora com menor capacidade de afirmação sobre a distribuição dessas sequências nessas ilhas, resultado semelhante foi obtido considerando a filogenia das sequências de cianobactérias cultivadas. Dentre os mecanismos de dispersão mencionados para micro-organismos na Antártica podem ser citados aquelas mediados pelas aves e animais marinhos e aqueles intercedidos pelo vento e correntes oceânicas. (VINCENT, 2000).

A análise da diversidade beta mostrou padrões semelhantes quando considerados as métricas UniFrac *weighted* e *unweighted* com o ambiente e temperatura do qual as amostras foram coletadas (Figuras 18 e 19). Nesse sentido, as comunidades bacterianas parecem sofrer pressões de seleção mediadas pela química e física do ambiente em que se encontram. Variação de 69 % foi explicada pelos três eixos (X, 17%, Y, 38% e Z, 14%) considerando a métrica UniFrac *unweighted*, enquanto que usando a métrica UniFrac *weighted*, 86 % de variação foi explicada (X, 17%, Y, 59% e Z, 10%). Com base nesses resultados, conclui-se que a estrutura das comunidades bacterianas nessas amostras é influenciada pela abundância de UTOs específicas. Buscando um refinamento dos fatores abióticos que possam estar envolvidos na separação das amostras observada pela análise da diversidade beta, os parâmetros físico-químicos disponíveis para quatro amostras que foram sequenciadas (150, 154, 170 e 174), nota-se a correlação positiva com nitrato (NO<sup>3</sup>) (amostra 154), com carbono orgânico dissolvido e fosfato (amostra 170), com cátions e ânions de diversos elementos químicos (amostra 174) (Figura 20).

## 8 CONCLUSÃO

O presente estudo gerou informações sobre a comunidade de cianobactérias presentes em duas ilhas (Deception e Rei George) do Arquipélago Shetland do Sul, Antártica empregando técnicas dependentes e independentes de cultivo de forma complementar. A primeira foi aplicada considerando a caracterização polifásica das linhagens de cianobactérias isoladas, enquanto que a segunda foi empregada usando o sequenciamento massivo de sequências de RNAr 16S em amostras de biofilme selecionadas.

Gêneros anteriormente reportados apenas por meio de levantamento taxonômico da comunidade de cianobactérias com o uso de técnicas de microscopia foram isolados neste estudo e estão sendo mantidas em banco de cultura. O isolamento dessas linhagens possibilitou a investigação morfológica aliada à caracterização molecular, e a averiguação de papéis ecológicos desempenhados por essas linhagens por meio de seu potencial genético.

A análise filogenética baseada em sequências de RNAr 16S das linhagens isoladas revelou a existência de clado formado exclusivamente por sequência de cianobactérias obtida neste trabalho, de clados compostos somente por sequências antárticas oriundas desse trabalho e de outros trabalhos desenvolvidos em outras regiões antárticas, e de clados constituídos por sequências originárias de diversas regiões do mundo. Alguns desses clados podem representar novas entidades genéricas considerando suas posições filogenéticas em relação a sequências das espécies tipo e porcentagens de identidade, além de informações relativas a suas características morfológica diacríticas e fisiológicas. Portanto, conclui-se que a diversidade molecular de alguns grupos isolados é maior do que a diversidade baseada em caracteres morfológicos, sendo que ambas abordagens devem ser utilizadas em conjunto a fim de auxiliar a elaboração de um sistema de classificação único para o grupo das cianobactérias.

Fragmento do gene nifH foi encontrado na maioria das linhagens de cianobactérias antárticas e abrangeram as formas unicelulares (Chroococcales), homocitadas (Pseudanabaenales e Oscillatoriales) e heterocitadas (Nostocales). A presença desse fragmento gênico indica potencial genético para realização da fixação biológica do nitrogênio, o qual foi comprovado por meio da análise da atividade da nitrogenase, por meio da técnica de redução de acetileno com alta sensibilidade de detecção. Todas as linhagens testadas exibiram alguma atividade dessa enzima em resposta a diferentes concentrações de oxigênio e ou a luminosidade, em diferentes condições de temperatura. A filogenia baseada em sequências do gene nifH demonstrou haver três padrões distintos de agrupamento dessas sequências, agrupamentos congruentes com aquela apresentada na filogenia baseada em sequências do RNAr 16S; agrupamentos formados por cianobactérias relacionadas morfologicamente; e agrupamentos sem relação com a filogenia de sequência do RNAr 16S e sem relação com morfologia. Esses padrões podem estar relacionados aos eventos evolutivos envolvidos na distribuição e ou manunteção do gene *nifH*.

A presença de genes e ou regiões intergênicas evidencia o elevado potencial genético dessas linhagens para produção de substâncias com interesse biotecnológico. No entanto, estudos futuros devem ser conduzidos a fim de confirmar sua produção e prospectar quimicamente essas substâncias.

A abundância no número de cópias do gene *nifH* relacionado às cianobactérias nas amostras de biofilme sublinha a importância desse grupo de micro-organismos como fornecedoras de formas reduzidas de N para o ambiente antártico. Embora os valores do número de cópia estejam abaixo do reportado para solos antárticos, acredita-se que a comunidade diazotrófica nesses biofilmes esteja menos ativa metabolicamente em razão da existência de formas reduzidas de N nas amostras de água analisadas quimicamente.

A comunidade de cianobactéria revelada pela análise das sequências de RNAr 16S geradas evidenciou predominância de UTOs relacionadas às ordens Nostocales, Oscillatoriales e Pseudanabaenales, famílias Pseudanabaenaceae, Phormidiaceae, Nostocaceae e Rivulariaceae. Dente as UTOs que receberam afiliação em nível genérico, os gêneros Nostoc, Calothrix e Leptolyngbya foram encontrados nas amostras correspondentes pelas técnicas dependentes e independentes de cultivo. Considerando todo o esforço de isolamento, outros gêneros puderam ser recuperados por ambas as técnicas tais como Chroococcidiopsis, Microcoleus, Pseudanabaena, Phormidium (Microcoleus e Wilmottia), Anabaena, Dolichospermum (Hydrocoryne) e Oscillatoria (Planktothrix). A árvore filogenética contendo as sequências de cianobactérias recuperadas por sequenciamento e aquelas obtidas das linhagens de cianobactérias isoladas mostrou que somente parte da comunidade de cianobactérias em biofilmes foi acessada por isolamento enquanto que uma parcela bastante significativa ficou a ser recuperada. O estudo e elaboração de novos meios de culturas para cianobactérias e o emprego de diferentes condições de cultivo podem no futuro resultar em maior sucesso de isolamento da comunidade de cianobactérias antárticas. Reforça-se por fim a complementariedade entre as abordagens dependente e independente de cultivo para um entendimento mais global das comunidades microbianas.

## REFERÊNCIAS

ABED, R. M. M.; GARCIA-PICHEL, F.; HERNÁNDEZ-MARINÉ, M. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov. Archives of Microbiology, Berlin, v. 177, p. 361-370, 2002.

AISLABIE, J. M.; CHHOUR, K.; SAUL, D. J.; MIYAUCHI, S.; AYTON, J.; PAETZOLD, R. F.; BALKS, M. R. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 3041–3056, 2006.

ALLEN, M. M.; 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.

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

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVARENGA, D. O. Análise polifásica de cianobactérias da filosfera de *Avicennia schaueriana*. 2011. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ANAGNOSTIDIS, K. *Geitlerinema*, a new genus of oscillatorialean cyanophytes. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 164, p. 33-46, 1989.

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

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 1– Introduction. Algological Studies, Stuttgart, v. 38/39, p. 291-302, 1985.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes.5 – Stigonematales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.

ANAND, N. Culture studies and taxonomy of blue-green algae – certain identification problems. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 80, p. 141–147, 1988.

ANDREOTE, A. P. D. **Filosfera da Mata Atlântica**: isolamento e sistemática de cianobactérias, bioprospecção e caracterização da comunidade diazotrófica. 2014. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ARP, D. J. The nitrogen cycle. In: TRIPLETT, E. W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation**: a model system for the analysis of a biological process. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2000. p. 1-14.

ATLAS, R. M.; BERTHA, R. Microbial ecology: fundamentals and applications. 2. ed. Menlo Park, Benjamin/Cummings, 1981. 694 p.

BAHL, J.; LAU, M. C. Y.; SMITH, G. J. D.; VIJAYKRISHNA, D.; CARY, S. C.; LACAP, D. C.; LEE, C. K.; PAPKE, R. T.; WARREN-RHODES, K. A.; WONG, F. K. Y.; MCKAY, C. P.; POINTING, S. B. Ancient origins determine global biogeography of hot and cold desert cyanobacteria. **Nature Communications**, London, v. 2, p. 161–166, 2011.

BANERJEE, M.; WHITTON, B. A.; WYNN-WILLIAMS, D. D. Phosphatase Activities of Endolithic Communities in Rocks of the Antarctic Dry Valleys. **Microbial Ecology**, New York, v. 39, n. 1, p. 80-91, 2000.

BEN-PORATH, J.; ZEHR, J. P. Detection and chareacterization of cyanobacterial *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 880-887, 1994.

BERGMAN, B.; GALLON, J. R.; RAI, A. N.; STAL. L. J. N<sub>2</sub> fixation by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 19, p. 139-185, 1997.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.-B.; KÜPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, DC, v. 294, n. 5546, p. 1534-1537, 2001.

BERRENDERO, E.; PERONA, E.; MATEO, P. Phenotypic variability and phylogenetic relationships of the genera *Tolypothrix* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 3039–3051, 2011.

BERRENDERO, E.; PERONA, E.; MATEO, P. Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.447-460, 2008.

BILLI, D.; VIAGGIU, E.; COCKELL, C.S.; RABBOW, E.; HORNECK, G.; ONOFRI, S. Damage escape and repair in dried *Chroococcidiopsis* spp. from hot and cold deserts exposed to simulated space and martian conditions. **Astrobiology**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. 65-73, 2011.

BILLI, D.; FRIEDMANN, E. I.; HELM, R. F.; POTTS, M. Gene transfer to the desiccationtolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. Journal of Bacteriology, Washington, DC, v. 183, p. 2298–2305, 2001.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

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**, Lawrence, v. 32, n.3, p. 445-451, 1996.

BOLD, H. D.; WYNNE, M. J. Introduction to the algae, structure and reproduction. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985. 720 p.

BOLHUIS, H.; SEVERIN, I.; CONFURIUS-GUNS, V.; WOLLENZIEN, U. I. A; STAL, L. Horizontal tranfer of the nitrogen fixation gene cluster in the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 121-130, 2010.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 72, p. 2310-2314, 1975.

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. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: the *Archaea* and deeply branching and phototrophic Bacteria. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v. 1, 721 p.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Revision des Nostocacées hetérocystées contenues dans les principaux herbiers de France. Annales des Sciences Naturals, Botanique et Biologie Vegetale, Paris, v.7, p. 51–129, 1886-1888.

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

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

CADEL-SIX, S.; DAUGA, C.; CASTETS, A. M.; RIPPKA, R.; BOUCHIER, C.; MARSAC, N. T.; WELKER, M. Halogenase genes in non-ribosomal peptide synthetase gene clusters of *Microcystis* (Cyanobacteria): sporadic distribution and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 9, p. 2031-2041, 2008.

CAMERON, R. E.; DEVANEY, J. R. Antarctic soil algal crusts. Scanning electron and optical microscope study. **Transactions of the American Microscopical Society**, Lawrence, v. 89, p. 264–73, 1970.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Turkey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, p. 335-336, 2010.

CASAMATTA, D. A.; GOMEZ, S. R.; JOHANSEN, J. R. *Rexia erecta* gen. et sp. nov. and *Capsosira lowei* sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA). **Hydrobiologia**, The Hague, v. 561, p. 13–26, 2006.

CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Group I. *Cyanobacteria*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v.3, p. 1710–1728.

CASTENHOLZ, R. W. Culturing methods for cyanobacteria. In: Packer, L., Glazer, A.N. **Methods in Enzymology**, New York, v. 167, p. 68-95, 1988.

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

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

CASTENHOLZ, R. W.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; WILMOTTE, A. The Cyanobacteria: subsection III. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 474-487.

CHAO, A. Nonparametric estimation of a number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistics, Stockholm, v. 11, n. 4, p. 265-270, 1984.

CHOI, H.; OH, S. K.; YIH, W.; CHIN, J.; KANG, H.; RHO, J. R. Cyanopeptoline CB071: a cyclic depsipeptide isolated from the freshwater cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 56, p. 1191-1193, 2008.

CHONG, C. W.; CONVEY, P.; PEARCE, D. A.; TAN, I. K. P. Assessment of soil bacterial communities on Alexander Island (in the maritime and continental Antarctic transitional zone). **Polar Biology,** Berlin, v. 35, p. 387–399, 2012.

CLARKE, A. Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context. In: HUISKES, A. H. L.; GIESKES, W. W. C.; ROZEMA, J.; SCHORNO, R. M. L.; VAN DER VIES, S. M.; WOLFF, W. J. (Ed.). Antarctic Biology in a Global Context. Leiden: Backhuys Publishers, 2003. p. 3-17.

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

COMPAORÉ, J.; STAL, L. J. Oxygen and the light-dark cycle of nitrogenase activity in two unicellular cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 54-62, 2010a.

COMPAORÉ, J.; STAL, L. J. Effect of temperature on the sensitivity of nitrogenase to oxygen in two heterocystous cyanobacteria. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 46, p. 1172-1179, 2010b.

COMTE, K.; ŠABACKÁ, M.; CARRÉ-MLOUKA, A.; ELSTER J.; KOMÁREK, J. Relationships between theArctic and theAntarctic cyanobacteria;three *Phormidium* -like strains evaluated by a polyphasic approach. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, p. 366-376, 2007.

COWAN, D. A.; TOW, L. A. Endangered Antarctic Environments. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 58, p. 649-690, 2004.

CUMBERS, J.; ROTHSCHILD, L. J. Salt tolerance and polyphyly in the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* (Pleurocapsales). **Journal of Phycology,** Lawrence, v. 50, n. 3, p. 472-482, 2014.

DADHEECH, P. K.; MAHMOUD, H.; KOTUT, K.; KRIENITZ, L. *Haloleptolyngbya alcalis* gen. et sp. nov., a new filamentous cyanobacterium from the soda lake Nakuru, Kenya. **Hydrobiologia**, The Hauge, v. 691, p. 269-283, 2012.

DAVEY, M. C. Carbon and nitrogen dynamics in a maritime Antarctic stream. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 30, p. 319–330, 1993a.

DAVEY, M. C. Carbon and nitrogen dynamics in a small pond in the maritime Antarctic. **Hydrobiologia**, The Hauge, v. 257, p. 165–175, 1993b.

DAVEY, M. C. The effects of freezing and desiccation on photosynthesis and survival of terrestrial Antarctic algae and cyanobacteria. **Polar Biology**, Berlin, v. 10, p. 9-36, 1989.

DE LA TORRE, J. R.; GOEBEL, B. M.; FRIEDMANN, E. I.; PACE, N. R. Microbial Diversity of Cryptoendolithic Communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 7, p. 3858–3867, 2003.

DE LOS RÍOS, A.; ASCASO, C.; WIERZCHOS, J.; FERNÁNDEZ-VALIENTE, E.; QUESADA, A. Microstructural Characterization of Cyanobacterial Mats from the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 1, p. 569-580, 2004.

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

DREWS, G. Fine structure and chemical composition of the cell envelops. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Ed). **The biology of blue-green algae**. Berkeley: University of California Press, 1973. p. 99-116. (Botanical Monographs, v.9).

DYBLE, J.; PAERL, H. W.; NEILAN, B. A. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and cpcBA-IGS nucleotide sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 2567-2571, 2002.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, v. 2, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

ELSTER, J. Ecological classification of terrestrial algal communities in polar environments. In: BEYER, L.; BOLTER, M. (Ed.). **Geoecology of Antartic Ice-Free Coastal Landscapes**. Heidelberg: Springer Verlag, 2002. p. 303-326.

EROKHINA, L. G.; SHATILOVICH, A. V.; KAMINSKAIA, O. P.; GILICHINSKIĬ, D. A. The absorption and fluorescence spectra of the cyanobacterial phycobilins of cryptoendolithic lichens in the high-polar region of Antarctica. **Mikrobiologiia**, Moscow, v. 71, n. 5, p. 697-704, 2002.

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

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, New York, v. 56, n. 2, p. 340-373, 1992.

FEINGERSCH, R.; SUZUKI, M. T.; SHMOISH, M.; SHARON, I.; SABEHI, G.; PARTENSKY, F.; BÉJÀ, O. Microbial community genomics in eastern Mediterranean Sea surface Waters. **The ISME Journal**, London, v. 4, p. 78–87, 2010.

FERGUSSON, K. M.; SAINT, C. P. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, p. 4145-4148, 2000.

FERNÁNDEZ-VALIENTE, E.; CAMACHO, A.; ROCHERA, C.; RICO, E.; VINCENT, W. F.; QUESADA, A. Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula, Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, p. 377-385, 2007.

FERNÁNDEZ-VALIENTE, E.; QUESADA, A.; HOWARD-WILLIAMS, C.; HAWES, I. N<sub>2</sub>-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Microbial Ecology**, New York, v. 42, p. 338-349, 2001.

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

FEWER, D.; FRIEDL, T.; BÜDEL B. *Chroococcidiopsis* and Heterocyst-Differentiating Cyanobacteria are each other's closest living relatives. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 23, p. 82-90, 2002.

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.; ALVARENGA, D. O.; GENUÁRIO, D. B.; ANDREOTE, A. P. D.; HAUER, T.; KOMÁREK, J. *Dactylothamnos* gen.nov. A novel member of Microchaetaceae isolated from extreme environments. In: SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CYANOPHYTE RESERACH, 19., 2013, Cleveland, Ohio. Zagreb, Croatia, 2013.

FLECHTNER, V. R.; BOYER, S. L.; JOHANSEN, J. R.; DENOBLE, M. L. *Spirirestis rafaelensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 74, p. 1–24, 2002.

FLORES, E.; HERRERO, A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature Reviews**, London, v. 8, p. 39-49, 2010.

FRIEDMANN, E. I.; HUA M.; OCAMPO-FRIEDMANN, R. Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. **Polarforschung**, Kiel, v. 58, n. 2-3, p.251-259, 1988.

FU, Y.; SHAO, L.; TONG, L.; LIU, H. Ethylene removal efficiency and bacterial community diversity of a natural zeolite biofilter. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, p. 576-584, 2010.

GALLON, J. R. Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and oxygen. New Phytologist, Cambridge, v. 122, p. 571-609, 1992.

GENUÁRIO, D. B.; CORRÊA, D. M.; KOMÁREK, J.; FIORE, M. F. Characterization of freshwater benthic biofilm-forming *Hydrocoryne* isolates from Antarctica. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 49, p. 1142–1153, 2013.

GENUÁRIO, D. B.; SILVA-STENICO, M. E.; WELKER, M.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon**, Elmsford, v. 55, p. 846–854, 2010.

GLAZER, A. N. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Ed.). **The biochemistry of plants**: a comprehensive treatise. New York: Academic, 1981. p. 51-96.

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

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GUGGER, M.; LYRA, C.; HENRIKSEN, P.; COUTÉ, 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.

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

HALLMANN, C.; STANNEK, L.; FRITZLAR, D.; HAUSE-REITNER, D.; FRIEDL, T.; HOPPERT, M. Molecular diversity of phototrophic biofilms on building Stone. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 84, p. 355–372, 2013.

HALSEY, J. A. **Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo**. 2012. 114 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletronica**, Galway, v. 4, p. 1-9, 2001.

HAWES, I.; HOWARD-WILLIAMS, C.; PRIDMORE, R. D. Environmental control of microbial communities in the ponds of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. Archiv für Hydrobiologie, Supplementband, Algological Studies, Stuttgart, v. 127, p. 271–287, 1993.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification genes enconding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HILTON, J. A.; FOSTER, R. A.; TRIPP, H. J.; CARTER, B. J.; ZEHR J. P.; VILLAREAL, T. A. Genomic deletions disrupt nitrogen metabolism pathways of a cyanobacterial diatom symbiont. **Nature Communications**, London, v. 4, p. 1767, 2013.

HITZFELD, B. C.; LAMPERT, C. S.; SPAETH, N.; MOUNTFORT, D; KASPAR, H.; DIETRICH, D. R. Toxin production in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. **Toxion**, Elmsford, v. 38, p. 1731-1748, 2000.

HOFFMANN, L.; DEMOULIN, V. Morphological variability of some species of Scytonemataceae (Cyanophyceae) under different culture conditions. **Bulletin de la Societe Royale de Botanique de Belgique,** Brussels, v. 118, p. 189–197, 1985.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSCKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state 2004. Algological Studies, Stuttgart, v. 117, p. 95-115, 2005.

HOFF-RISSETI, C.; DÖRR F. A.; SCHAKER, P. D. C.; PINTO, E.; WERNER, V. R.; FIORE, M. F. Simultaneous detection of cylindrospermopsin and saxitoxin synthetase genes in Brazilian isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 8, e.74238, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.00742383.

HROUZEK, P.; LUKESOVA, A.; MARES, J.; VENTURA, S. Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. Fottea, Praha, v. 13, p. 201–213, 2013.

HROUZEK, P.; VENTURA, S.; LUKESOVÁ, A.; MUGNAI, M. A.; TURICCHIA, S.; KOMARÉK, J. Diversity of soil *Nostoc* strain: phylogenetic and phenotypic variability. **Archiv für Hydrobiologie, Supplementband, Algological Studies**, Stuttgart, v. 159, p. 251-264, 2005.

JUNGBLUT, A.; HOEGER, S. J.; MOUNTFORT, D.; HITZFELD, B. C.; DIETRICH, D. R.; NEILAN, B. A. Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. **Toxicon**, Elmsford, v. 47, p. 271–278, 2006.

KAASALAINEN, U.; FEWER, D. P.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 109, n. 15, p. 5886–5891, 2012.

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, n. 5, p. 205-213, 2001.

KOMÁREK J. Diversity of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) of King George Island, maritime Antarctica – a survey. Archiv für Hydrobiologie, Supplementband, Algological Studies, Stuttgart, v. 94, p. 181–193, 1999.

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

KOMÁREK, J. The cyanobacterial genus *Macrospermum*. Fottea, Praha, v. 1, p. 79–86, 2008.

OMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H. (Ed.). Süsswasserflora von Mitteleupora. Stuttgart: Gustave Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B. (Ed.). Süsswasserflora von Mitteleupora. Munchen: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1-759.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. Algological Studies, Stuttgart, v. 56, p. 247-354, 1989.

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

KOMÁREK, J.; HAUER, T. **CyanoDB.cz** – On-line database of cyanobacterial genera. České Budějovice, República Tcheca: University of South Bohemia; Institute of Botany ASCR, 2014. Disponível em: http://www.cyanodb.cz. Acesso em: 16 jun. 2014.

KOMÁREK, J.; NEDBALOVÁ, L.; HAUER, T. Phylogenetic position and taxonomy of three heterocytous cyanobacteria dominating the littoral of deglaciated lakes, James Ross Island, Antarctica. **Polar Biology**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 759-774, 2011.

KOMÁREK, O.; KOMÁREK, J. Diversity Diversity of freshwater and terrestrial habitats and their oxyphototroph microflora in the Arctowski Station region, South Shetland Islands. **Polish Polar Research/ Polish Academy of Sciences**, Warsaw, v. 20, n. 3, p. 259-282,1999.

KONG, H. H.; OH, J.; DEMING, C.; CONLAN, S.; GRICE, E. A.; BEATSON, M. A.; NOMICOS, E.; POLLEY, E. C.; KOMAROW, H. D.; NISC COMPARATIVE SEQUENCE PROGRAM; MURRAY, P. R.; TURNER M. L.; SEGRE J. A. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 22, p. 850–859, 2012.

KOZHEVNIKOV, I. V.; KOZHEVNIKOVA, N. A. Phylogenetic and morphological evaluation of *Wollea saccata* (Nostocales, Cyanobacteria) isolated from the Yenissei River basin (Eastern Siberia, Russia). **Fottea**, Praha, v. 11, p. 99–106, 2011.

LAMMERS, P. J.; HASELKORN, R. Sequence of the *nifD* gene coding for the alpha subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 80, p. 4723-4727, 1983.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Chichester: Wiley, 1991. p. 115–175.

LAZAROFF, N. Photoinduction and photoreversal of the Nostocacean developmental cycle. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 2, p. 7–17, 1966.

LAZAROFF, N.; VISHNIAC, W. The effect of light on the developmental cycle of Nostoc muscorum, a filamentous blue–green alga. **Journal of General Microbiology,** London, v. 25, p. 365–374, 1961.

LIMA, J. E. Diversidade de bactéria e *Archaea* em solos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo. 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. Globar patterns in bacterial diversity. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007.

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

LUKEŠOVÁ, A.; JOHANSEN, J. R.; MARTIN, M. P.; CASAMATTA, D. A. *Aulosira bohemensis* sp. nov.: Further Phylogenetic Uncertainty at The Base of The Nostocales (Cyanobacteria). **Phycologia**, Oxford, v. 48, p. 118-129, 2009.

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.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microoganisms**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2000.

MATEO, P.; PERONA, E.; BERRENDERO, E.; LEGANÉS, F.; MARTÍN, M.; GOLUBIĆ, S. Life cycle as a stable trait in the evaluation of diversity of *Nostoc* from biofilms in rivers. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 76, p. 185–198, 2011.

MAZUR, B. J.; CHUI, C. F. Sequence of the gene coding for the beta-subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 79, p. 6782-6786, 1982.

MAZUR, B. J.; RICE, D.; HASELKORN, R. Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. **Biochemistry**, New York, v. 77, p. 186-190, 1980.

MCNEILL, J.; BARRIE, F.R.; BUCK, W. R.; DEMOULIN, V.; GREUTER, W.; HAWKSWORTH, D. L.; HERENDEEN, P. S.; KNAPP, S.; MARHOLD, K.; PRADO, J.; PRUD'HOMME VAN REINE, W. F.; SMITH, G. F.; WIERSEMA, J. H.; TURLAND, N. J. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Aadopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Bratislava, Slovakia: International Association for Plant Taxonomy, 2012.

MEVARECH, M.; RICE, D.; HASELKORN, R. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 77, p. 6476-6480, 1980.

MICHAUD, A. B.; ŠABACKÁ, M.; PRISCU, J. C. Cyanobacterial diversity across landscape units in a polar desert: Taylor Valley, Antarctica. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam v. 82, n. 2, p. 1-11, 2012.

MILLHER, S. J.; FUNK, V. A.; WAGNER, W. L.; BARRIE, F.; HOCH, P. C.; HERENDEEN, P. Outcomes of the 2011 Botanical Nomenclature Section at the XVIII International Botanical Congress. **PhytoKeys**, Sofia, Bulgaria, v. 5, p. 1-3, 2011.

MÖHLENHOFF, P.; MÜLLER, L.; GORBUSHINA, A. A.; PETERSEN, K. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 169-173, 2001.

MOISSL, C.; OSMAN, S.; DUC, M. T. L.; DEKAS, A.; BRODIE, E.; DESANTIS, T.; VENKATESWARAN, K. Molecular bacterial communityanalysis of clean roomswhere spacecraft are assembled. **FEMS Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 509–521, 2007.

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

MUELLER, D. R.; VINCENT, W. F.; BONILLA, S.; LAURION. S. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, p. 73–87, 2004.

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water**: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon, 1999. p. 15-37.

NAKAI, R.; ABE, T.; BABA, T.; IMURA, I.; KAGOSHIMA, H.; KANDA, H.; KANEKIYO, A.; KOHARA, Y.; KOI, A.; NAKAMURA, K.; NARITA, T.; NIKI, H.; YANAGIHARA, K.; NAGANUMA, T. Microflorae of aquatic moss pillars in a freshwater lake, East Antarctica, based on fatty acid and 16S rRNA gene analyses. **Polar Biology**, Berlin, v. 35, p. 425–433, 2012.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. J. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, Hampshire, v. 17, p. 373-384, 1996.

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**, Washington, DC, v. 61, n. 11, p. 3875-3883, 1995.

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

NIEDERBERGER, T. D.; SOHM, J. A.; TIRINDELLI, J.; GUNDERSON, T.; CAPONE, D. G.; CARPENTER, E. J.; CARY, S. C. Diverse and highly active diazotrophic assemblages inhabit ephemerally wetted soils of Antarctic Dry Valleys. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 82, p. 376-390, 2012.

NIELSEN, C. S. The distribution of *Hydrocoryne* Born. & Flah. Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences, Gainesville, v.16, p.1–3, 1953.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 6, p. 3327-3332, 1997.

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

OLSON, J. B.; STEPPE, T. F.; LITAKER, R.W.; PAERL, H. W. N<sub>2</sub>-fixing microbial consortia associated with the ice cover of lake Bonney, Antarctica. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 231–238, 1998.

ORME-JOHNSON, W. H. Nitrogenase structure: Where to know? Science, Washington, D.C. v. 257, p. 1639-1640, 1992.

PAPAEFTHIMIOU, D.; HROUZEK, P.; MUGNAI, M. A.; LUKESOVA, A.; TURICCHIA, S.; RASMUSSEN, U.; VENTURA, S. Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 553–564, 2008.

PERKERSON, R. B.; JOHANSEN, J. R.; KOVÁCIK, L.; BRAND, J.; KAŠTOVSKÝ, CASAMATTA, D. A unique Pseudanabaenalean (Cyanobacteria) genus *Nodosolinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 47, p. 1397-1412, 2011.

POSTEGATE, J. R.; EADY, R. R. The evolution of biological nitrogen fixation. In: BOTHE, H.; DE BRUJIN, F. J.; NEWTON, W. E. (Ed.). Nitrogen fixation: hundred years after. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. p. 31-40.

POSTGATE, R. J. Nitrogen fixation. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 112 p.

PRESCOTT, G. W. A contribution to a bibliography of Antarctic and Subantarctic algae: together with a checklist of freshwater taxa reported to 1977. In CRAMER, J. (Ed.). **Bibliotheca Phycologica**. Vaduz, Liechtenstein: A.R. Gantner Verlag, 1979. p. 1–312.

PRISCU, J. C.; FRITSEN, C. H.; ADAMS, E. E.; GIOVANNONI, S. J.; PAERL, H. W.; MCKAY, C. P.; DORAN, P. T.; GORDON, D. A.; LANOIL, B. D.; PINCKNEY, J. L. Perennial Antarctic Lake Ice: An Oasis for Life in a Polar Desert. **Science**, Washington, DC, v. 280, p. 2095, 1998.

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

RAJANIEMI, P.; KOMÁREK, J.; WILLAME, R.; HROUZEK, P.; KAŠTOVSKÁ, K.; HOFFMANN, L.; SIVONEN, K. Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 371–391, 2005b.

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

ŘEHÁKOVÁ, K.; JOHANSEN, J. R.; CASAMATTA, D.; XUESONG, L.; VINCENT, J. Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia* pulchra gen. et sp. nov. **Phycologia**, Oxford, v. 46, p. 481–502, 2007.

RICE, D.; MAZUR, B. J.; HASELKORN, R. Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, p. 13157-13163, 1982.

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

RIPPKA, R.; CASTENHOLZ, R.; HERDMAN, M. The Cyanobacteria: subsection IV. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 562-589.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; CASTENHOLZ, R. The Cyanobacteria: subsection II. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 514-539.

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**, London, v. 111, p. 1-61, 1979.

ŠABACKÁ, M.; ELSTER, J. Response of cyanobacteria and algae from Antarctic wetland habitats to freezing and desiccation stress. **Polar Biology**, Berlin, v. 30, p. 31-37, 2006.

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

SATTIN, S. R.; CLEVELAND, C. C.; HOOD, E.; REED, S. C.; KING, A. J.; SCHIMIDT, S. K.; ROBESON, M. S.; ASCARRUNZ, N.; NEMERGUT, D. Functional Shifts in Unvegetaded, Perhumid, Recently-Deglaciated Soils Do Not Correlate with Shift in Soil Bacterial Community Composition. **Journal of Microbiology**, Heidelberg, v. 47, n. 6, p. 673-681, 2009.

SCHOPF, J. W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. Beihefte zur Nova Hedwigia, Lehke, v. 112, p. 13-32, 1996.

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

SCHOPF, J. W.; WALTER, M. R. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. The Biology of Cyanobacteria. Oxford: Blackwell, 1982. p. 543-564.

SEVERIN, I.; ACINAS, S. G.; STAL, L. J. Diversityof nitrogen-fixing bacteria in cyanobacterial mats. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 73, p. 514–525, 2010.

SHORT, S. M.; ZEHR, J. Nitrogenase gene expression in the Chesapeake Bay Estuary. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 1591-1596, 2007.

SIEGESMUND, M. A.; JOHANSEN, J. R.; KARSTEN, U.; FRIEDL, T. *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): Morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. Journal of Phycology, Lawrence, v. 44, p. 1572-1585, 2008.

SIHVONEN, L. M.; LYRA, C.; FEWER, D. P.; RAJANIEMI-WACKLIN, P.; LEHTIMÄKI, J. M.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K. Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversityand are distantly related *to Gloeotrichia* and *Tolypothrix*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 74–84, 2007.

SILVA, C. S. P.; GENUARIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; FIORE, M. F. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 37, p. 100–112, 2014.

SIVONEN, K.; HALINEN, K.; SIHVONEN, L. M.; KOSKENNIEMI, K.; SINKKO, H.; RANTASÄRKKÄ, K.; MOISANDER, P. H.; LYRA, C. Bacterial diversity and function in the Baltic Sea with an emphasis on cyanobacteria. **Ambio**, Stockholm, v. 36, p. 180–185, 2007.

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

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

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

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare"biosphere". **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

STAAL, M.; MEYSMAN, F. J. R.; STAL, L. J. Temperature excludes N<sub>2</sub>-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. **Nature**, London, v. 425, p. 504-507, 2003.

STAAL, M.; TE LINTEL-HEKKERT, S.; HARREN, F.; STAL, L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 343-351, 2001.

STAAL, M.; TE LINTEL HEKKERT, S.; HERMAN, P.; STAL; L. J. Comparison of models describing light dependence of  $N_2$  fixation in heterocystous cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, v. 69, n. 9, p. 4679-4683, 2002.

STACKEBRANDT, E.; 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, Ames, v. 44, p. 846-849, 1994.

STAL, L. J. Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1632-1645, 2009.

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

STAL, L. Nitrogen Fixation in Cyanobacteria Mats. **Methods in Enzimology**, New York, v. 167, p. 474-484, 1988.

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 Chrococcales). **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 35, p. 171-205, 1971.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 70 p. (Documentos, 93).

STRUNECKÝ, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? **Polar Biology**, Berlin, v. 33, p. 1419–1428, 2010.

STRUNECKÝ, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium "*Phormidium murrayi* = *Wilmottia murrayi*. Fottea, Praha, v. 1, p. 57-71, 2011.

SWINGLEY, W. D.; BLANKENSHIP, R. E.; RAYMOND, J. Integrating Markov Clustering and Molecular Phylogenetics to Reconstruct the Cyanobacterial Species Tree from Conserved Protein Families. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 25, n. 4, p. 643–654, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TANDEAU DE MARSAC, N. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 130, p. 82-91, 1977.

TANDEAU DE MARSAC, N.; HOUMARD, J. Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. **Methods in Enzymology**, New York, v. 167, p. 318-328, 1988.

TATON, A.; HOFFMANN, L.; WILMOTTE, A. Cyanobacteria in microbial mats of Antartctic lakes (East Antarctic) – A microscopic approach. Algological Studies, Stuttgart, v. 126, p. 173-208, 2008.

TATON, A.; STANA, G.; DAMIEN, E.; DOMINIC, A. H.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; MAININI, M.; LOSI, D.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 42, p. 1257-1270, 2006a.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, P.; HODGSON, D. A.; LAYBOURN-PARRY, J.; WILMOTTE, A. Biogeographical distributionand ecological ranges of benthic cyanobacteria in EastAntarctic lakes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, p. 272–289, 2006b.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; WIT, R. D.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p. 5157-5169, 2003.

TATON, A.; WILMOTTE, A.; ŠMARDA, J.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. *Plectolyngbya hodgsonii*: a novel filamentous cyanobacterium from Antarctic lakes. **Polar Biology**, Berlin, v. 34, n. 2, p. 181-191, 2011.

THIEL, T. Nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J. R.; NEWTON, W. E. Genetics and Regulation of Nitrogen Fixing Bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004.

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

VACCARINO, A. M. **Taxonomy of novel and unique Cyanobacteria from the Hawaiian Islands**. 2011. 127 p. Dissertação (Mestrado em Artes e Ciência) - John Carroll University, Cleveland, 2011.

VINCENT, W. F. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. Antarctic Science, Oxford, v. 12, p. 374-385, 2000.

VINCENT, W. F. Microbial ecosystem of Antarctic. In: \_\_\_\_\_ (Ed). Microbial ecosystem of Antarctic. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

VINCENT, W. F.; MUELLER, D. R.; BONILLA, S. Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham ice shelf in the high arctic. **Cryobiology**, San Diego, v. 48, p. 103-112, 2004.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 87-115, 1991.

WACKLIN, P.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J. Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (Ralfs ex Bornet et Flahault) comb. nova. **Fottea**, Praha. v. 1, p. 59–64, 2009.

WALSBY, A. E. The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 226, p. 345-366, 1985.

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.; STACKEBRAND, T. 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**, Ames, v. 37, p. 463-464, 1987.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H. Cyanobacterial peptides – nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam. v. 30, p. 530-563, 2006.

WHITTON, B. A. Phylum Cyanophyta (Cyanobacteria). In: JOHN, D. M.; WHITTON, B. A.; BROOK, A. J. (Ed.). **The Freshwater Algal Flora of the British Isles**. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. p. 25–122.

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

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant, D. A. (Ed.). **The moluecular Biology of the Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 1-25.

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

WOLK, C. P.; ERNST, A.; ELHAI, J. Heterocysts metabolism and development. In: BRYANT, D. A. (Ed.). Molecular Biology of the Cyanobacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 769-823.

WOOD, S. A.; MOUNTFORT, D.; SELWOOD, A. I.; HOLLAND, P. T.; PUDDICK, J.; CARY, S. C. Widespread Distribution and Identification of Eight Novel Microcystins in Antarctic Cyanobacterial Mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 23, p. 7243–7251, 2008.

WYNN-WILLIAMS, D. D. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 5, p. 1271-1293, 1996.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 43-86.

YOUNG, J. P. W. Molecular evolution in diazotrophs: do the genes agree? In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen Fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 161-164.

YUNG, C. C.; CHAN, Y.; LACAP, D. C.; PÉREZ-ORTEGA, S.; DE LOS RIOS-MURILLO, A.; LEE, C. K.; CARY, S. C.; POINTING S. B. Characterization of Chasmoendolithic Community in Miers Valley, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Microbial Ecology**, New York, 2014.

ZAMMIT, G.; BILLI, D.; ALBERTANO, P. The subaerophytic cyanobacterium *Oculatella subterranean* (Oscillatoriales, Cyanophyceae) gen. et sp. nov.: a cytomorphological and molecular description. **European Journal of Phycology**, Abingdon, v. 47, p. 341-354, 2012.

ZAPOMĚLOVÁ, E.; HROUZEK, P.; ŘEZANKA, T.; JEZBEROVÁ, J.; ŘEHÁKOVÁ, K.; HISEM, D.; KOMÁRKOVÁ, J. Polyphasic characterization of *Dolichospermum* spp. and *Sphaerospermopsis* spp. (Nostocales, Cyanobacteria): morphology, 16S rRNA gene sequences and fatty acid and secondary metabolite profiles. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 47, p. 1352–1363, 2011.

ZAPOMĚLOVÁ, E.; SKÁCELOVÁ, O.; PUMANN, P.; KOPP, R.; JANEČEK, E. Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysosporum* gen. nov.) and A. *tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). **Hydrobiologia**, The Hauge, v. 698, p. 353–365, 2012.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 539-554, 2003.

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

ZEHR, J. P.; CAPONE, D. G. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. **Microbial Ecology**, New York, v. 32, p. 263-281, 1996.

ZEHR, J. P.; TURNER P. J. Nitrogen fixation: nitrogenase genes and gene expression. **Methods in Microbiology**, San Diego, v. 30, p. 271-286. 2001.