



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**NÁTHALI MARIA MACHADO DE LIMA**

**DIVERSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM CROSTAS  
BIOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DE PERFIL CELULOLÍTICO E  
HEMICELULOLÍTICO**

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2016

**NÁTHALI MARIA MACHADO DE LIMA**

**DIVERSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM CROSTAS  
BIOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DE PERFIL CELULOLÍTICO E  
HEMICELULOLÍTICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Biologia e Sistemática de Microrganismos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc.  
2014/06245-8

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Zanini  
Branco

São José do Rio Preto

2016

Lima, Náthali Maria Machado de.

Diversidade de cianobactérias em crostas biológicas e avaliação de perfil celulolítico e hemicelulolítico / Náthali Maria Machado de Lima. -- São José do Rio Preto, 2016

98 f.: il.

Orientador: Luis Henrique Zanini Branco

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Cianobactéria - Classificação. 3. Biodiversidade. 4. Filogenia. 5. Cerrados. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 581.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

**NÁTHALI MARIA MACHADO DE LIMA**

**DIVERSIDADE DE CIANOBACTÉRIAS EM CROSTAS  
BIOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DE PERFIL CELULOLÍTICO E  
HEMICELULOLÍTICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Biologia e Sistemática de Microrganismos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc.  
2014/06245-8

**Comissão Examinadora**

**Prof. Dr. LUIS HENRIQUE ZANINI BRANCO**  
**UNESP – São José do Rio Preto**  
**Orientador**

**Prof. Dr. ORLANDO NECCHI JÚNIOR**  
**UNESP – São José do Rio Preto**

**Prof. Dra. CAMILA FRANCIELI DA SILVA MALONE**  
**IFSP – Instituto Federal de São Paulo**

São José do Rio Preto

31 de outubro de 2016

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus pela motivação diária, força e vida a mim proporcionadas!

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco pela paciência em me passar tão bons conhecimentos, pelo apoio, dedicação e amizade.

Agradeço aos meus amorosos pais, Angela Priscila e João por terem me passado valores que jamais adquiriria sozinha, pela paciência, carinho, amor e por me estimularem em todos os momentos.

Ao meu namorado Elder Eron, pela amizade, carinho e amor que me fazem tão bem.

Aos meus amigos de laboratório, que não são apenas colegas, pelas alegrias diárias, pelo companheirismo e carinho.

À UNESP, pela maravilhosa estrutura de ensino e pelo ambiente tão agradável.

À FAPESP pela confiança no projeto proposto e pelo incentivo à pesquisa.

*“Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

***Albert Einstein***

## **Resumo**

Crostas biológicas consistem de uma comunidade composta por cianobactérias, algas verdes, microfungos, bactérias, líquens e musgos. Estas ocorrem em uma variedade de solos e regiões climáticas ao redor do globo, exercendo funções importantes como a de conferir estabilidade e proteger o solo contra forças erosivas, acumular e aumentar o tempo de residência da água no solo, além de, favorecer a germinação e permitir a fixação de nitrogênio e carbono. Em crostas biológicas de regiões quentes e temperadas há o predomínio de líquens e cianobactérias, sendo que as cianobactérias são consideradas os primeiros organismos a estruturarem a crosta, sendo seguidas por outros grupos de organismos. A partir da investigação de cianobactérias em crostas biológicas, muitos novos gêneros e espécies têm sido descritos, o que também enfatiza a grande necessidade da investigação sobre tais comunidades. Devido às condições propícias do ambiente, em termos de exposição do solo e fitofisionomia, o bioma Cerrado (Savana) foi escolhido para ser o local de estudo de assembleias de cianobactérias de crostas. Além disso, devido a estudos prévios que relatam o potencial de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por cianobactérias heterocitadas e a presença comum deste tipo de organismos em crostas biológicas, também foram feitas análises para avaliar a produção de tais substâncias. Desse modo, os estudos objetivaram contribuir com conhecimento da biodiversidade de cianobactérias de crostas biológicas de solo e avaliar a capacidade de produção enzimática das cianobactérias encontradas em crostas biológicas de solo. Para isto, amostras de crostas foram coletadas nos Parques Nacionais da Serra da Canastra (MG) e da Serra do Cipó (MG), no Parque Estadual Furnas do Bom Jesus (SP) e na região de Caldas Novas (GO). As cianobactérias encontradas nas amostras foram estudadas morfológicamente a partir do material da natureza e também isoladas em cultivos artificiais, visando além do estudo morfológico, as análises moleculares e enzimáticas. No total, foram estudados 28 morfotipos, provenientes de 31 populações, dos quais 12 foram

identificados em nível específico (destes, três ainda exigem confirmação de identidade = cf) e 16 foram identificados apenas em nível genérico. Dezenove populações foram analisadas também em nível molecular por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, e completo da Região Espaçadora Interna Transcrita 16S-23S (ITS). Seis populações foram também investigadas quanto a produção de enzimas. Entre os gêneros encontrados, muitos são comuns em assembleias de cianobactérias de crostas biológicas em outras regiões do mundo, entretanto, algumas identificações em nível de espécie não foram possíveis por diferenças importantes com os táxons já descritos em literatura. As análises moleculares enfatizaram e contribuíram com a problemática polifilia de gêneros como *Leptolyngbya*, *Nostoc* e *Calothrix*, reafirmaram a existência de um novo gênero próximo a *Wilmottia* e *Microcoleus* e apresentaram um novo grupo composto até o momento por uma espécie representada por duas populações. Este grupo revelou sequências moleculares que se aproximam de *Brasilonema*, entretanto os indivíduos apresentam ramificações verdadeiras e, portanto, investigações mais aprofundadas são necessárias para definição da identidade das populações. Dessa forma, as análises morfológicas e moleculares demonstraram a grande diversidade não acessada em localidades e *habitats* pobremente investigados e enfatizaram a contribuição deste trabalho ao focar pela primeira vez a flora de cianobactérias de solo de Cerrado. As análises de atividade enzimática revelaram que não houve produção de tais proteínas, tendo como possíveis explicações a ausência de habilidade para produção deste tipo de enzimas por parte das cepas, ou a ineficiência do método utilizado. De qualquer forma os resultados enfatizaram a necessidade de estudo nesta área, principalmente pela dificuldade no encontro de cepas produtoras e o desconhecimento sobre quais poderiam ser os fatores a estarem influenciando certas cepas a ativarem ou selecionarem diferentemente seus metabolismos. Em linhas gerais, os resultados do presente estudo apresentam, pela primeira vez, a composição das cianobactérias de crostas biológicas do território brasileiro e indicam uma flora diversificada e, em grande parte, desconhecida. Esses resultados fornecem subsídios e abrem caminho para outras pesquisas dentro do campo do conhecimento da biodiversidade presente em crostas biológicas.



Complementarmente, estes trabalhos compõem a base para estudos sobre a ecologia de ambientes mais restritivos (como a caatinga ou o próprio Cerrado), permitindo abordagens como sucessão ecológica, produtividade primária, fluxos de nutrientes e dinâmicas de solo.

Palavras-chave: Atividade enzimática, Caracterização molecular, Caracterização morfológica, Cerrado.

## Abstract

Biological soil crusts (BSCs) are communities potentially composed of cyanobacteria, green algae, micro fungi, bacteria, lichens and mosses. They occur in a variety of soils and climatic regions around the world, playing important roles as giving soil stability protecting against erosive forces, accumulating and increasing residence time for water in soil, besides promoting germination and performing nitrogen and carbon fixation. Biological soil crusts from hot deserts are frequently composed of cyanobacteria and lichens, and the cyanobacteria are considered the first colonizers in structuring the crust, being followed by other groups of organisms. A lot of new genera and species have been described based on crusts investigations and this fact also emphasizes the necessity of works on those communities. Due to environmental conditions, as soil exposition and phytophysiology, the biome Cerrado (Savannah) was chosen to be the place for studies on cyanobacterial assemblages of biological soil crusts. Besides, due to previous studies that indicate the production capability of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by heterocytous cyanobacteria and the common presence of this kind of cyanobacteria in biological soil crusts, analyses of such production were also conducted. In this way, the studies aimed to contribute with knowledge about cyanobacterial biodiversity in biocrusts and evaluate the bioprospection capability of cyanobacterial from these biocrusts. Therefore, BSCs were sampled at the National Parks of *Serra da Canastra* (Minas Gerais State) and *Serra do Cipó* (Minas Gerais State), at the State Park of *Furnas do Bom Jesus* (São Paulo State) and in the region of the municipality of *Caldas Novas* (Goiás State). The cyanobacteria found in the samples had their morphology analyzed from the natural and cultivated conditions. Besides, molecular and enzymatic analysis were carried out. The results summarized 28 morphotypes from 31 populations, which 12 were identified at specie level (three of them need identity confirmation = cf) and 16 were identified only at genus level. Nineteen populations also were studied with

molecular methods, through partial sequencing of 16S rRNA gene and complete sequencing of the Internal Transcribed Space Region (16S-23S ITS). In addition, six populations also were explored as possible enzymatic producers. Among the found genera, many are cyanobacteria frequently found in BSCs distributed around the world, however, some identifications at specific level were not possible due to considerable divergences in comparison with described taxa. The molecular analysis reaffirmed and emphasized the polyphyletic nature of *Leptolyngbya*, *Nostoc* and *Calothrix*, reinforced the existence of a new genus close related with *Wilmottia* and *Microcoleus* and presented a new group composed, until now, of one species represented by two populations. This group showed molecular sequences related with *Brasilonema*, however, the specimens are true branched, what requires more detailed studies to confirm the identification of the populations. In this way, the morphological and molecular analyses showed the wide diversity whose has not been accessed in poorly investigated places and habitats and reinforced the contribution of this work in focusing the cyanobacterial flora of crusts of Brazilian savannah area for the first time. The enzymatic activity analysis revealed that the strains studied did not produce celullolitic or hemicelullolitic compounds, having as possible explanations the absence of the production ability or the inefficiency of the utilized method. Either way, the results emphasized the necessity of studies in this area, mainly because of the difficulty in find producer strains and the lack of knowledge about which could be the factors influencing the strains in activate or select differently their metabolism. In general, our results presented for the first time the cyanobacterial composition for BSCs from Brazil and indicated a diverse, and sometimes, unknown flora. These results provided foundation and opened doors to investigations inside the biodiversity knowledge with biological soil crusts. Complementary, these works compound the basis for investigations in the ecology of extreme environments (as Caatinga and Cerrado), permitting studies about successional ecology, primary productivity, flow of nutrients and soil dynamics.

Key-words: Brazilian savannah, Enzymatic activity, Molecular analysis, Morphological analysis.

## **Sumário**

Capítulo I - Considerações gerais	11
<b>Introdução geral</b>	<b>11</b>
<b>Hipóteses</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>Material e Métodos gerais</b>	<b>14</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>16</b>
Capítulo II - Cianobactérias de crostas biológicas de Cerrado: identificação segundo a taxonomia clássica	19
<b>Resumo</b>	<b>19</b>
<b>Introdução</b>	<b>20</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>21</b>
<b>Resultados e Discussão</b>	<b>24</b>
<b>Considerações finais</b>	<b>46</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>48</b>
Capítulo III – Análises moleculares e filogenia de cianobactérias de crostas biológicas	57
<b>Resumo</b>	<b>57</b>
<b>Introdução</b>	<b>58</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>59</b>
<b>Resultados e Discussão</b>	<b>62</b>
<b>Considerações finais</b>	<b>82</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>83</b>
Capítulo IV – Avaliação de atividade enzimática por cepas de Cianobactérias	90
<b>Resumo</b>	<b>90</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>93</b>
<b>Resultados e Discussão</b>	<b>94</b>
<b>Considerações finais</b>	<b>95</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>95</b>
Capítulo V – Considerações finais gerais	98

# Capítulo I - Considerações gerais

---

## Introdução geral

Crostras biológicas (CBs ou *biocrusts*), também chamadas crostras criptogâmicas, criptobióticas, microbióticas ou microfíticas (BENALP, 2002, 2005, 2006; LANGHANS et al., 2009), consistem em uma comunidade entrelaçada potencialmente composta por cianobactérias, algas verdes, microfungos, bactérias, líquens e musgos. Estas ocorrem em uma variedade de regiões climáticas ao redor do globo, estabelecendo-se em regiões em que a cobertura vegetal é escassa o suficiente para que a luz solar atinja a superfície (BELNAP, 2005), sendo mais comuns em zonas áridas e semiáridas.

CBs de desertos quentes geralmente são compostas por cianobactérias, enquanto as de desertos frios são dominadas por líquens e musgos. Nos desertos, onde a maioria das chuvas cai nas estações frias, as cianobactérias dominantes são do gênero *Microcoleus*, já em desertos quentes com verões chuvosos, os gêneros predominantes são *Scytonema*, *Nostoc* e *Schizothrix* (BELNAP, 2005).

As cianobactérias são de extrema importância para essas comunidades, pois são consideradas como pioneiras, sendo responsáveis por estruturarem o solo, tornando possível a colonização por outros grupos (SCOTT, 1982). Em algumas localidades, as CBs dominadas por cianobactérias podem cobrir até 95% da superfície do solo, como observado no Kalahari (Botsuana), por Thomas & Dougill (2007).

Novos gêneros e espécies de cianobactérias têm sido descritos com base em organismos encontrados em CBs, principalmente de ambientes áridos, pela aplicação da abordagem polifásica que inclui estudos morfológicos, ecológicos, ultraestruturais e moleculares (FLECHTNER et al., 2002; REHÁKOVÁ et al., 2007; FLECHTNER et al., 2008; DADHEECH et al., 2012).

A presença das CBs traz muitos benefícios para o solo, como por exemplo, estabilidade e proteção contra forças erosivas, que são exercidas devido à presença de cianobactérias e microfungos que se entrelaçam juntando partículas do solo e formando uma crosta coesa (GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006). A produção de exopolissacarídeos por alguns microrganismos, como as cianobactérias, por exemplo, auxiliam na estabilização do solo uma vez que agrega partículas, evitando a dispersão dos grãos e, conseqüentemente, a erosão

(GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006). Também exercem funções na fixação de nitrogênio e carbono (BELNAP, 2002, 2005, 2006), além de manterem férteis os espaços entre plantas que teriam pouca oportunidade de receber carbono, por meio da liberação de compostos ricos neste elemento e restituição de matéria orgânica após a morte (BELNAP, 2005).

Embora as CBs venham sendo bem estudadas, ainda há muita diversidade não acessada. BÜDEL et al. (2016) fizeram um levantamento sobre os estudos com riqueza de cianobactérias e mostraram que a maior parte dos estudos foram feitos para Europa, África, Ásia, e que há grande necessidade de mais estudos para as Américas, em especial para a América do Sul.

O estudo das cianobactérias que integram as CBs no território brasileiro é necessário considerando-se a importância do grupo para essas comunidades e para os ambientes onde ocorrem, bem como devido à ausência de trabalhos sistemáticos sobre a natureza e estrutura de assembleias de cianobactérias em CBs no Brasil. Para isto, o ambiente escolhido para ser explorado foi o bioma Cerrado (Savana), por ser um bioma propício à presença de CBs, devido às características fisionômicas da vegetação e às condições ambientais, muitas vezes extremas, a que está submetido.

## **Hipóteses**

Com base nos dados disponíveis e na expectativa em função das características do grupo e dos ambientes amostrados, algumas hipóteses foram formuladas e serão confrontadas com os dados obtidos ao final do projeto.

1. Será constatada a presença de variados grupos de cianobactérias em crostas biológicas de áreas de Cerrado. - Devido ao fato de as mesmas apresentarem um conjunto de adaptações adequado para ajustamento a este tipo de ambiente, que é ocasionalmente extremo quanto a características ambientais.

2. Serão registradas novas ocorrências taxonômicas para o Brasil, com probabilidade de existência de novas espécies (ou mesmo novos gêneros) para a Ciência. - Com base nos resultados de trabalhos atuais envolvendo análises moleculares e também no tipo de ambiente, que pode ser bastante seletivo e é muito pouco estudado no país.

3. Haverá detecção positiva de organismos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. - Considerando-se estudos anteriores feitos com cianobactérias heterocitadas e que estas são comumente registradas ocorrendo em CBs.

## **Objetivos**

Este trabalho visou contribuir com conhecimento da biodiversidade de cianobactérias no Brasil e das funções desenvolvidas pelas CBs, já que para conhecê-las é indispensável um sólido embasamento a respeito dos organismos que as compõem (GARCIA-PICHEL, 2001).

Dados em literatura indicam a possibilidade de produção enzimática (celulases e hemicelulases) por parte de cianobactérias heterocitadas (TAMOI et al., 2007; PRASANNA et al., 2008, 2010; GUPTA et al., 2010, 2011, 2012; CHAUDHARY et al., 2012; NATARAJAN et al., 2013). Dessa forma, este trabalho também objetivou avaliar algumas cepas neste sentido, considerando a presença comum deste tipo de organismos em crostas biológicas (WEBER et al., 2016) e, teoricamente, o papel importante da produção de tais enzimas em função do ambiente ocupado.

### **1. Objetivos gerais**

- a) Realizar o levantamento taxonômico de assembleias de cianobactérias integrantes de crostas biológicas de ambientes de Cerrado.
- b) Caracterizar populações/espécies selecionadas quanto às características morfológicas, ecológicas e moleculares.
- c) Avaliar a capacidade de utilização de cianobactérias por estudos de bioprospecção.

### **2. Objetivos específicos**

- a) Estudar a composição florística de cianobactérias segundo critérios tradicionais e com base em amostras de campo e cultivo artificial.
- b) Realizar sequenciamento de cianobactérias de interesse, incluindo as informações em abordagens filogenéticas.
- c) Avaliar a capacidade de produção de celulases e hemicelulases através do fornecimento de substrato e reação de ativação enzimática com posterior quantificação de concentração de açúcares livres em solução.

## Material e Métodos gerais

### Áreas de estudo

Foram escolhidas quatro áreas de estudo (Figura 1), que incluem regiões de Cerrado situadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás: Parque Estadual (PE) Furnas do Bom Jesus (referido ao longo do texto como “Furnas”; 20°14'S, 47°27'W), Parque Nacional (PARNA) Serra da Canastra (referido como “Canastra”; 20°21'S, 46°38'W), PARNA Serra do Cipó (referido como “Cipó”; 19°20'S, 43°34'W) e região de Caldas Novas (referida como “Caldas Novas”, 17°47'S 48°42'W). Entre as variações fisionômicas do Cerrado, dentro de cada parque ou região, as áreas de campos foram preferencialmente amostradas.



Figura 1. Localização das áreas de amostragem. PARNAs Serra do Cipó e Serra da Canastra e PE de Furnas do Bom Jesus e região de Caldas Novas (fonte: Google Earth; <http://www.google.com/earth/index.html>).

### Atividade de coleta

As coletas de material biológico e dados foram realizadas uma vez em cada área. As amostragens na Canastra foram conduzidas de 21 a 22 de abril de 2013, em Furnas, de 23 a 24 de abril de 2013, no Cipó, de 24 a 25 de setembro de 2013 e em Caldas Novas, em 29 de dezembro de 2014. Além dessas coletas, houve amostragens adicionais procurando-se obter



informações complementares na Canastra, no período de 28 a 30 de janeiro de 2015, e em Furnas, de 05 a 06 de março de 2015.

Em cada uma das quatro localidades, foram demarcadas duas transeções paralelas com 200 m de comprimento e distando 20 m entre si. Ao longo das transeções, foram coletadas amostras de CBs a cada 20 m, totalizando 10 amostras para cada transeção e, portanto, 20 amostras por localidade (Figura 2). Também foram registrados dados de posicionamento global e altitude (GPS Garmin E-trex Vista) para cada área amostrada.

A coleta das crostas foi feita inserindo-se a parte inferior de uma placa de Petri (55 mm de diâmetro) invertida no solo, excisando a camada superficial e retirando uma amostra de cerca de 1cm de profundidade (GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL 2006, ZAADY et al. 2010). O material coletado, após secagem em temperatura ambiente durante o período necessário, foi adequadamente acondicionado, rotulado, identificado e mantido refrigerado.

Pensando em trabalhos futuros voltados à ecologia, foram escolhidos aleatoriamente cinco pontos entre as duas transeções utilizadas para a coleta das CBs (três de uma e dois da outra) e foram feitas leituras de umidade do solo a 1,0 cm e a 5,0 cm de profundidade. Após a medida de umidade, nos mesmos pontos foram recolhidas amostras de solo até 5,0 cm profundidade, com auxílio de uma pá de metal pequena, desprezando a camada superficial (entre 0,5 e 1,0 cm; região com crescimento das CBs). Em cada uma, foram medidos os valores de pH, a partir de uma solução do solo em água deionizada, na proporção 1:2, e a leitura foi realizada com pHmetro portátil após estabilização (STRAUSS et al. 2012).

Em cada parque, também foram tomados dados de temperatura e umidade relativa do ar (termo-higrômetro PeakTech 5090) e de irradiância (quantômetro Li-Cor).

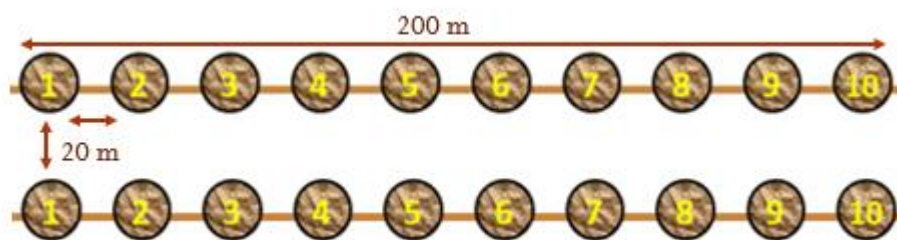


Figura 2. Esquema de demarcação dos pontos de amostragem aplicado nos três locais de coleta.

## Referências Bibliográficas

BELNAP, J. Crusts: Biological. In: HILLEL, D.; HATFIELD, J. H.; POWLSON, D. S.; ROSENZEIG, C.; SCOW, K. M.; SINGER, M. J. & SPARKS, D. L. (eds). *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Oxford U. K. Elsevier, 2005. 339-347 p.

BELNAP, J. Nitrogen fixations in biological soil crusts from southeast Utah, USA. **Biol. Fert. Soils**. v. 35, p. 128-135. 2002.

BELNAP, J. The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. **Hydrol. Process**. v. 20, p. 3159-3178. 2006b.

DADHEECH, P.K.; ABED, R.M.M.; MAHMOUD, H.; MOHAN, M.K. & KRIENITZ, L. Polyphasic characterization of cyanobacteria isolated from desert crusts, and the description of *Desertifilum tharensense* gen. et sp. nov. (Oscillatoriales). **Phycologia**. v. 51, p. 260-270. 2012.

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

FLECHTNER, V.R.; JOHANSEN, J.R. & BELNAP, J. The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated system. **Western N. Amer. Nat.** v. 68, p. 405-436. 2008.

GUNDLAPALLY, S.R. & GARCIA-PICHEL, F. The community and phylogenetic diversity of biological soil crusts in the Colorado Plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation. **Microb. Ecol.** v. 52, p. 345-357. 2006.

GUPTA, V.; PRASANNA, R.; NATRAJAN, C.; SRIVASTAVA, A. K.; SHARMA, J. IDENTIFICATION, characterization and regulation of a novel antifungal chitosanase (cho) in *Anabaena* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 76, p. 2769–2777. 2010.

GUPTA, V.; NATARAJAN, C.; KUMAR, K. & PRASANNA, R. Identification and characterization of endoglucanases for fungicidal activity in *Anabaena laxa*. **J. Appl. Phycol.** v. 23, p.73–81. 2011.

GUPTA, V.; PRASANNA, R.; CHAUDHARY, V. & NAIN, L. Biochemical, structural and functional characterization of two novel antifungal endoglucanases from *Anabaena laxa*. **Biocatal. Agri. Biotechnol.** v. 1, p.338–347. 2012.

LANGHANS, T.M.; STORM, C. & SCHWABE, A. Biological soil crusts and their microenvironment: impact on the emergence, survival and establishment of seedlings. **Flora** 204. p. 157-168. 2009.

NATARAJAN, C.; GUPTA, V.; KUMAR, K & PRASANNA, R. Molecular characterization of a fungicidal endoglucanase from the cyanobacterium *Calothrix elenkinii*. **Biochem. Gen.** v. 51, p. 766-779. 2013.

PRASANNA, R.; GUPTA, V.; NATARAJAN, C. & CHAUDHARY, V. Bioprospecting for genes involved in the production of chitosanases and microcystin-like compounds in *Anabaena* strains. **World J. Microb. Biot.** v. 26, p.717–724. 2010.

PRASANNA, R.; NAIN, L.; TRIPATHI, R.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; MIDDHA, S.; JOSHI, M.; ANCHA, R. & KAUSHIK, B. D. Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of extracellular filtrates of cyanobacteria – possible role of hydrolytic enzymes. **J. Basic Microbiol.** v. 48, n. 3, p. 186-194. 2008

REHÁKOVÁ, 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** v. 46, p. 481-502. 2007

SCOTT, G. M. Desert bryophytes. In: Smith A. J. E. (ed) *Bryophyte ecology*, Chapman and Hall London, 1892. 105-122 p.

STRAUSS, S.L.; DAY, T.A. & GARCIA-PICHEL, F. Nitrogen cycling in desert biological soil crusts across biogeographic regions in the Southwestern United States. **Biogeochemistry.** v. 108 p. 171-182. 2012.

TAMOI, M.; KUROTAKE, H. & FUKAMIZO, T.  $\beta$ -1-4-Glucanase-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 is a  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase and functions in salt stress tolerance. **Biochem. J.** v. 405, p. 139-146. 2007.

THOMAS, A.D. & DOUGILL, A.J. Spatial and temporal distribution of cyanobacterial soil crusts in the Kalahari: Implications for soil surface properties. **Geomorphology**. v. 85, p. 17-29. 2007.

WEBER, B.; BÜDEL, B.; BELNAP, J. (eds) Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands, Springer Switzerland, 2016. 549 p.

ZAADY, E.; BEN-DAVID, E.A.; SHER, Y.; TZIRKIN, R. & NEJIDAT, A. Inferring biological soil crust successional stage using combined PLFA, DGGE, physical and biophysiological analyses. **Soil Biol. Biochem.** v. 42, p. 842-849. 2010.

## Capítulo II - Cianobactérias de crostas biológicas de Cerrado: identificação segundo a taxonomia clássica

---

### Resumo

Tradicionalmente, os sistemas de classificação das cianobactérias têm sido baseados exclusivamente em dados morfológicos e/ou reprodutivos; entretanto, nos últimos anos houve a introdução da ultraestrutura e biologia molecular como ferramenta taxonômica o que permitiu, a partir de então, um avanço nas pesquisas com cianobactérias e um rearranjo sistemático do grupo. Entretanto, a morfologia continuou sendo essencial para uma investigação mais abrangente, tendo entre as principais vantagens, a independência do estabelecimento de culturas. Neste trabalho, as análises morfológicas foram tomadas como estudo básico, por serem consideradas essenciais em estudos de taxonomia de cianobactérias, juntamente com critérios moleculares, bioquímicos, ecológicos e ultraestruturais, através do conceito chamado de “abordagem polifásica”. Dessa forma, a partir do material proveniente de quatro regiões de Cerrado, foram feitas investigações morfológicas segundo os critérios taxonômicos usuais e utilizando a classificação sistemática mais atual. Como resultado foram estudadas 31 populações, divididas em 28 morfotipos, das quais 12 foram identificadas em nível específico (destas três ainda exigem confirmação = cf) e 16 foram identificadas apenas em nível genérico. Estas pertenceram a três ordens, sendo que dentro de Nostocales foram registrados sete gêneros, de Oscillatoriales três gêneros e em Synechococcales dois gêneros. A quantidade de populações estudadas com base nos critérios tradicionais, e não identificadas em nível específico, comprovam a complexidade desses grupos e a presença de morfotipos ainda desconhecidos para ambientes pouco explorados. Porém, muitas identificações de gêneros e espécies se mostraram comuns para crostas biológicas, como são os casos de *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema ocellatum*, *Calothrix*, *Microcoleus vaginatus*, *Leptolyngbya* e *Schizothrix*.

## Introdução

Tradicionalmente, os sistemas de classificação das cianobactérias têm sido baseados exclusivamente em dados morfológicos e/ou reprodutivos, como os trabalhos de Thuret (1875), Bornet & Flahault (1886-1888), Gomont (1892), Geitler (1932) e Bourrelly (1970).

Um dos principais trabalhos na área é o de Geitler (1932), que levantou a flora de cianobactérias, principalmente da Europa Central, apresentando aproximadamente 1300 espécies de cianobactérias distribuídas em 145 gêneros, 20 famílias e três ordens. Em seu estudo, além das características morfológicas e métricas, foram considerados também os aspectos ecológicos. Como esse, outros trabalhos importantes foram realizados de maneira semelhante, como Frémy (1929-1933, 1930), Elenkin (1935, 1938-1949), Geitler (1942), Desikachary (1959), Starmach (1966) e Bourrelly (1970). Outro marco na trajetória dos sistemas de classificação, foi o trabalho de Anagnostidis & Komárek (1985), que utilizando informações da microscopia eletrônica (principalmente o arranjo dos tilacoides), passou a considerar também a ultraestrutura como um critério taxonômico para a separação de grupos em nível de ordem.

Nos últimos anos houve a introdução da biologia molecular como ferramenta taxonômica e, por meio do trabalho de Hoffmann e colaboradores (2005) estes dados foram compilados e confirmados como ferramenta válida em estudos de filogenia. A partir de então, as pesquisas com cianobactérias cresceram e produziram dados para que fosse feito um rearranjo sistemático do grupo.

Mesmo após a introdução destas novas ferramentas de estudo, a morfologia clássica continua sendo parte essencial em estudos de taxonomia de cianobactérias, porém juntamente com critérios moleculares, bioquímicos, ecológicos e ultraestruturais, através do conceito chamado de “abordagem polifásica”, introduzido no grupo por Anagnostidis & Komárek (1985, 1988, 1990), Komárek & Anagnostidis (1986, 1989).

Entre as principais vantagens das análises morfológicas está o acesso à uma flora mais abrangente, principalmente pela independência do estabelecimento de culturas e de acesso ao DNA, o que muitas vezes é dificultado por barreiras físicas do próprio organismo (ex. polissacarídeos - PORTER et al. 1988).

Sabe-se da limitação das análises morfológicas, principalmente pelos já comprovados casos de espécies crípticas (BOYER et al., 2002; CASAMATTA et al. 2003; PREMANANDH et al., 2009, HARLER et al., 2012) porém, cabe-se considerar que se não há possibilidade de estudos genéticos, as análises morfológicas sempre terão utilidade em registros de biodiversidade. Estes estudos mesmo baseados apenas em dados morfológicos proverão, pelo menos, dados básicos sobre

o organismo (este dado é ainda mais considerável se provém de regiões pouco exploradas – MARES, 2010)

Embora muitos autores considerem as análises moleculares “autossuficientes”, os estudos com o gene 16S rRNA vêm mostrando que há limitações. O gene mostrou-se suficientemente variável para separar os organismos em nível genérico, porém insuficiente na delimitação sub-genérica. Dessa forma, algumas vezes, a separação se baseia no estudo polifásico, inserindo dados morfológicos e ecológicos para este tipo de separação (KOMÁREK, 2010).

Dentre gêneros comuns a crostas, *Stigonema*, por exemplo, tem muitos de seus estudos limitados a investigações morfológicas, principalmente pela dificuldade de cultivo (HOFFMANN, 2005). *Porphyrosiphon* é outro exemplo, por apresentar, até o momento, apenas caracterização morfológica, não tendo sequências de DNA publicadas em nenhum banco de dados. Por fim temos, *Trichocoleus* que até 2014 havia sido caracterizado apenas através da morfologia, e foi a partir da mesma, que pesquisadores conseguiram buscar outros organismos relacionados e começar uma investigação molecular (MÜHLSTEINOVÁ et al. 2014).

Nos estudos de diversidade em crostas biológicas a morfologia é amplamente utilizada, o que pode ser comprovado pela verificação de estudos com descrição de novos gêneros e espécies. Esta é analisada em conjunto com outros fatores consideráveis para a abordagem polifásica (REHÁKOVÁ et al., 2007; FLECHTNER et al., 2008; DADHEECH et al., 2012).

Dentro deste contexto, esta análise objetivou contribuir para o conhecimento da biodiversidade de cianobactérias de crostas biológicas de Cerrado aplicando conceitos da taxonomia tradicional (morfologia e ecologia) para a identificação das populações encontradas.

## **Material e Métodos**

As amostras provenientes diretamente de campo foram estudadas segundo o protocolo de Garcia-Pichel et al. (2001). As crostas coletadas foram reidratadas com água destilada e examinadas para verificação e identificação dos organismos presentes. Inicialmente, as amostras foram observadas sob microscópio estereoscópico (Olympus, modelo SZX7) e microscópio fotônico (Leica, modelo DFC320) para reconhecimento de morfotipos.

As cianobactérias encontradas foram avaliadas segundo os critérios taxonômicos usuais e o sistema de classificação seguido para posicionamento dos táxons encontrados foi o de Komárek et al. (2014).

Conjuntos representativos de parte dos organismos identificados foram preservados com solução de formaldeído 4% e incorporados ao Herbário SJRP (IBILCE/UNESP – campus de São José do Rio Preto – THIERS, 2016) para testemunho.



Tabela 1. Origem das cianobactérias estudadas

Organismo	Amostra	Procedência	Latitude (S)	Longitude	Coletor	Data de Coleta
<i>Hapalosiphon luteolus</i>	1CAN	PARNA SERRA DA CANASTRA	20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Nostoc</i> sp.1	2CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Scytonema hoffimanii</i>	3CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Scytonema shimidtii</i>	4CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Scytonema</i> cf. <i>bohneri</i>	5CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Stigonema ocellatum</i>	6CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Stigonema</i> sp.1	7CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Stigonema</i> sp.2	8CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Calothrix</i> sp.1	9CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Leptolyngbya</i> sp.1	10CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Leptolyngbya</i> sp.2	11CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Microcoleus vaginatus</i>	12CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Phormidium</i> sp.1	13CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Janeiro/2015
<i>Phormidium</i> sp.2	14CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Janeiro/2015
<i>Schizothrix thelephoroides</i>	15CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Schizothrix</i> sp.1	16CAN		20°17'51.2''S	46°31'18.5''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
cf. <i>Hapalosiphon</i> sp.	1FUR	PE FURNAS DO BOM JESUS	20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Nostoc commune</i>	2FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Nostoc</i> sp.2	3FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Brasilonema</i> sp.1	4FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Calothrix</i> sp. 2	5FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>henningsii</i>	6FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Leptolyngbya</i> sp.3	7FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Março/2015
<i>Microcoleus vaginatus</i>	8FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Porphyrosiphon notarisi</i>	9FUR		20°13'02.0''S	47°26'38.4''W	Branco, L.H.Z et al.	Abril/2013
<i>Desmonostoc muscorum</i>	1CIP	PARNA SERRA DO CIPÓ	19°20'00''S	43°34'00''W	Branco, L.H.Z et al.	Setembro/2013
<i>Stigonema ocellatum</i>	2CIP		19°20'00''S	43°34'00''W	Branco, L.H.Z et al.	Setembro/2013
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>frigida</i>	3CIP		19°20'00''S	43°34'00''W	Branco, L.H.Z et al.	Setembro/2013
cf. <i>Hapalosiphon</i> sp.	1GO	CALDAS NOVAS	17°47'10.8''S	48°42'10.8''W	Machado-de-Lima, N.M.	Dezembro/2014
<i>Nostoc</i> sp.3	2GO		17°47'10.8''S	48°42'10.8''W	Machado-de-Lima, N.M.	Dezembro/2014
<i>Brasilonema</i> sp.2	3GO		17°47'10.8''S	48°42'10.8''W	Machado-de-Lima, N.M.	Dezembro/2014

## Resultados e Discussão

Foram estudadas 31 populações, divididas em 28 morfotipos, das quais 12 foram identificadas em nível específico (destas quatro ainda exigem confirmação = cf) e 16 foram identificadas apenas em nível genérico por diferirem das espécies já descritas em algumas características morfométricas e/ou quanto ao *habitat* (Tabela 1).

### Descrição dos táxons encontrados

#### NOSTOCALES

#### Hapalosiphonaceae

##### *Hapalosiphon luteolus* West & West

J. Bot. 35: 241. 1897

(Figuras 1 e 2)

Filamentos emaranhados, cilíndricos, lateralmente ramificados, mesmo diâmetro ao longo de todo comprimento, 8,0-12,0  $\mu\text{m}$  diâm. Ramos com a mesma morfologia do ramo principal, diferentes comprimentos, geralmente arqueados ou flexuosos. Bainha fina, homogênea e incolor nas regiões mais jovens e amarelada nas mais velhas. Tricomas unisseriados, não atenuados nos ápices, constrictos nas paredes celulares. Células vegetativas cilíndricas ou em forma de barril, isodiamétricas ou mais curtas ou mais longas que largas, 4,0-16,0  $\mu\text{m}$  compr. Heterócitos intercalares, solitários, 7,0-12,0  $\mu\text{m}$  compr.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *H. luteolus* quanto à morfologia e características métricas descritas por Komárek (2013), diferenciando-se apenas com relação ao *habitat*, sendo que a população estudada é aerofítica e *H. luteolus* é aquática. Entretanto, Büdel (1999) registrou a mesma ocorrendo em *inselbergs* na América do Sul.

Segundo Komárek (2013), a espécie já foi registrada em águas paradas, usualmente com plantas aquáticas ou entre outras algas. No Brasil, *H. luteolus* foi registrada ocorrendo em planície de inundação no alto Rio Paraná (PR, FONSECA & RODRIGUES, 2005).

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (1CAN).

##### cf. *Hapalosiphon* sp.

(Figuras 3-4)

Filamentos emaranhados, ramificados lateralmente, 5,0-10,0  $\mu\text{m}$  diâm. Ramos levemente mais finos que o ramo principal, 7,0-9,0  $\mu\text{m}$  diâm. Bainha hialina e incolor. Tricomas

unisseriados, distintamente constrictos nas paredes celulares, levemente atenuados nos ápices. Células vegetativas em forma de barril, isodiamétricas, mais curtas ou mais longas que largas, 5,0-8,5  $\mu\text{m}$  compr. Heterócitos intercalares, solitários, 5,0-10,0  $\mu\text{m}$  compr.

**Comentários:** A população estudada se assemelhou à *H. arboreus* West & G.S. West quanto à morfologia e características métricas descritas por Komárek (2013), entretanto, distinguem-se quando ao comprimento dos heterócitos, que se mostrou menor que o descrito para a espécie (9,0-11,0  $\mu\text{m}$  compr.). Também diferencia-se quanto ao *habitat*, que, segundo Komárek & Anagnostidis (2005), somente há registros de *H. arboreus* para pântanos e água paradas.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (1FUR) e Caldas Novas (1GO).

### Nostocaceae

*Desmonostoc muscorum* C. Agardh ex Bornet & Flahault

Ann. Sci. Nat., Bot., Sér. 7: 200. 1888.

(Figura 5-6)

Colônias hemisféricas quando jovens, posteriormente amorfas, verde escuras, posteriormente verde-oliva. Tricomas flexuosos, emaranhados, 3,0-4,0  $\mu\text{m}$  diâm. Células em formato de barril ou elipsoides, 3,5-5,0  $\mu\text{m}$  compr.. Heterócitos, na maioria das vezes, esféricos ou alongados, 4,0-7,0  $\mu\text{m}$  compr., 5,0-7,0  $\mu\text{m}$  diâm. Acinetos ovais, 7,0-8,0  $\mu\text{m}$  compr., 4,0-5,5  $\mu\text{m}$  diâm., parede celular espessa e incolor.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Desmonostoc muscorum* (Agardh ex Bornet et Flahault) Hrouzek et Ventura quanto à morfologia, métrica e ecologia descritas por Komárek (2013). A parede celular dos acinetos da população estudada apresentou-se incolor, em concordância com Hrouzek et al. (2013), embora seja comumente descrita como amarelada.

A população estudada apresentou colônias esféricas com periderme firme nos estágios iniciais do ciclo de vida e heterócitos terminais frequentes, o que não ocorre em *Desmonostoc*, porém este fato pode ter se dado devido à condição de cultivo.

Segundo Komárek (2013), a espécie foi registrada em solos úmidos, entre musgos, em rochas, em águas termais e ambientes salinos, sendo considerada cosmopolita. No Brasil, a espécie foi registrada ocorrendo em ambientes lóticos e semilóticos (PR/MT; FONSECA & RODRIGUES, 2007) e em córrego na cidade de Cedral (SP; PEREIRA & BRANCO, 2010).

*Nostoc muscorum* já foi registrada em crostas biológicas no deserto de Sonora e Mojave na América do Norte (ROSENTER & BELNAP, 2003), no Chaco argentino (BÜDEL, 2003), no norte da Europa (BÜDEL, 2003b) e também na região do Mar Cáspio na Ásia (BÜDEL, 2003c).

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Cipó (1CIP).

### *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault

Ann. Sci. Nat., Bot., Sér. 7: 203. 1888.

(Figuras 7-8)

Colônias esféricas quando jovens, posteriormente amorfas, azul-esverdeadas, sem periderme. Tricomas flexuosos, emaranhados, 3,0-5,0  $\mu\text{m}$  diâm. Células em formato de barril, isodiamétricas, mais curtas ou mais longas que largas, 2,5-5,0  $\mu\text{m}$  compr. Heterócitos, na maioria das vezes, esféricos ou em forma de barril, 4,0-6,0  $\mu\text{m}$  compr., 4,0-6,0  $\mu\text{m}$  diâm. Acinetos não observados.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Nostoc commune* quanto à morfologia, características métricas e ecologia descritas por Komárek (2013), diferindo somente quanto à morfologia de periderme firme apenas nos estágios iniciais de desenvolvimento, característica que é mantida durante todo ciclo de *N. commune*, porém este fato pode ter se dado devido à condição de cultivo.

Segundo Komárek (2013), a espécie foi registrada em ambientes aerófitos, em solos arenosos úmidos, campinas e semidesertos. No Brasil, há registros de ocorrência em planície de inundação do alto do rio Paraná (PR, FONSECA & RODRIGUES, 2005).

*Nostoc commune* também já foi encontrada em crostas biológicas distribuídas por todo globo, como, por exemplo, em Baja California, (México), nos desertos de Mojave, Chihuahuan e Great Basin (E.U.A.; ROSENTER & BELNAP, 2003), no Chaco argentino (BÜDEL, 2003a), na ilha grega Euboea (ROUSSOMOUSTAKAKI, 1983) e em semidesertos e desertos dos cursos baixos do rio Volga em Ural, China, Mongólia (BÜDEL, 2003c), entre outros.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (2FUR).

### *Nostoc* sp.1

(Figuras 9-10)

Colônias esféricas quando jovens, posteriormente amorfas, verde-escuras, posteriormente verde claras. Tricomas retos ou flexuosos, 4,0-6,0 µm diâm. Células em formato de barril ou elipsoides, 3,5-8,5 µm compr. Heterócitos, na maioria das vezes, esféricos, podendo se apresentar levemente alongados, 4,0-11,0 µm compr., 4,0-6,0 µm diâm. Acinetos ovais, muitas vezes soltos e aglomerados em determinado estágio de cultivo, 9,0-12,0 µm compr. 6,0-7,0 µm diâm., parede celular espessada, incolor.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Nostoc passerianianum* (DeNotaris) Bornet et Thuret ex Bornet e Flahault quanto à morfologia, diferindo levemente no comprimento e diâmetro celular descritos por Komárek (2013; 5,0-7,0 µm compr., 4,0 µm diâm.). Os acinetos da população estudada apresentaram comprimento celular acima do descrito para a espécie (6,0-8,0 µm). Com relação à parede celular, a população estudada a apresentou incolor, enquanto, a literatura registra a ocorrência de parede amarelada para os acinetos da espécie.

*Nostoc passerianianum* foi descrita por Komárek (2013) como habitando regiões de solos molhados, diferentemente da região da população estudada, que foi coletada em crostas biológicas de solo. Além disso, não há registro de *N. passerianianum* para crostas biológicas, sendo a espécie descrita principalmente para Europa.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (2CAN).

### *Nostoc* sp.2

(Figuras 11-12)

Colônias esféricas, sem periderme quando jovens, posteriormente amorfas, castanho-amareladas. Tricomas flexuosos, emaranhados, 3,5-4,0 µm diâm. Células em formato de barril, 3,5-6,0 µm compr., muitas vezes soltas assemelhando-se a cianobactérias cocoides. Heterócitos, na maioria das vezes, esféricos, 4,0-6,0 µm compr., 4,5-5,0 µm diâm. Acinetos ovais, 5,0-8,0 µm compr., 5,0-5,5 µm diâm.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Nostoc sphaericum* Vaucher ex Bornet et Flahault quanto à morfologia, diferindo levemente quanto ao diâmetro celular (3,5-5,0 µm diâm.), aos acinetos (6,0-8,0 µm compr; 4,0-6,0 µm diâm) e aos heterócitos (6,0-8,0 µm compr; 4,0-6,0 µm diâm) descritos por Komárek (2013).

Além disso, *N. sphaericum* foi descrita por Komárek (2013) como habitando regiões aquáticas, sendo que os registros para campinas de desertos necessitam confirmação.

A presença de células soltas pode estar relacionada a condição de cultivo.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (3FUR).

### *Nostoc* sp.3

(Figura 13)

Colônias esféricas azul-esverdeadas escuras a enegrecidas, sem periderme quando jovens, posteriormente amorfas, verde-oliva. Tricomas flexuosos, emaranhados, 4,0-5,5 µm diâm. Células em formato de barril a cilíndricas, 3,5-6,0 µm compr., muitas vezes soltas assemelhando-se a cianobactérias cocoides, variando muito em tamanho. Não foram observados heterócitos e acinetos.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Nostoc punctiforme* (Kützing ex Hariot) Hariot quanto a algumas características descritas por Komárek (2013), como coloração da colônia e diâmetro celular (2,6-5,5). Entretanto, a identificação específica da população se torna impossível devido à ausência de heterócitos e acinetos que são estruturas muito importantes para serem analisadas em identificações de Nostocales.

A presença de células soltas pode estar relacionada a condição de cultivo.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Caldas Novas (2GO).

## Scytonemataceae

### *Brasilonema* sp.1

(Figura 14)

Filamentos dispostos paralelamente, 11,0-15,0 µm diâm., raras ramificações scytonematoides, extremidades dos filamentos livres. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas cilíndricos, constrictos nas paredes celulares, 7,0-10,0 µm diâm. Células em forma de barril, 0,5-2,8 vezes mais longas que largas. Foi observado um heterócito intercalar, solitário, cilíndrico, 15,0 µm compr..

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Brasilonema sennae* (Komárek) Sant'Anna & Komárek quanto à morfologia, entretanto, o diâmetro dos tricomas apresentou intervalo levemente diferente do descrito para a espécie (6,0-12,5 µm diâm.). O comprimento celular se apresentou menor ou distintamente maior que o descrito (maior que 1,6 vez mais longas que largas), enquanto o heterócito apresentou diâmetro menor que o descrito (10,2-11,2 µm diâm.).

Observação: População em amostra ambiental.

Ocorrência nas áreas estudadas: Furnas (4FUR).

### **Brasilonema sp.2**

(Figuras 15-16)

Filamentos dispostos paralelamente, 13,0-17,0  $\mu\text{m}$  diâm., ramificações tolypothericoides e scytonematoides, extremidades livres. Bainha firme, incolor nas regiões mais jovens e amarelada nas mais velhas, lamelada. Tricomascilíndricos, não constrictos nas paredes celulares, 8,0-17,0  $\mu\text{m}$  diâm. Células cilíndricas, 0,5-2,8 vezes mais longas que largas. Heterócitos intercalares, solitários, cilíndricos, 4,0-10,0  $\mu\text{m}$  compr.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Brasilonema roberti-lamyi* (Bourrelly) Sant'Anna et al. quanto à morfologia, entretanto, difere da espécie quanto à presença de constrição nos tricomas, de bainha colorida e da ocorrência de muitas ramificações tolypothericoides ao longo dos filamentos

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Caldas Novas (3GO).

### ***Scytonema cf. bohneri* Schmidle**

Ber. Deut Bot. Ges. 60. 1901

(Figura 17)

Filamentos emaranhados, 6,0-8,0  $\mu\text{m}$  diâm., ramificações falsas. Bainha levemente espessa, incolor, lamelada. Tricomas não ou levemente constrictos nas paredes celulares, esverdeados, 5,5-8,0  $\mu\text{m}$  diâm. Células isodiamétricas ou mais curtas ou mais longas que largas, 0,7-2,0 vezes mais longas que largas. Células apicais cilíndrico-arredondadas. Heterócitos solitários, cilíndricos, amarelados, 10,0-15,0  $\mu\text{m}$  compr.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Scytonema bohneri*, quanto à morfologia e dimensões. O único aspecto que distingue a população estudada da descrita é o *habitat*, que na primeira é aerofítico e na segunda é aquático, sobre rochas de riachos.

Komárek (2013) caracterizou a espécie apresentando diferenças entre os diâmetros de filamento de acordo com sua orientação (filamentos prostrados: 10,0-12,0  $\mu\text{m}$  diâm, filamentos eretos: 8,0-11,0  $\mu\text{m}$  diâm), entretanto, esta diferenciação não foi observada na população estudada.

A espécie já foi registrada em rochas em Camarões, Brasil, Myanmar e Índia. Os registros para Argentina precisam ser confirmados (KOMÁREK, 2013).

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (5CAN).

***Scytonema hoffmanni* Agardh ex Bornet et Flahault**

Ann. Sci. Nat., Bot., Sér. 5, 51: 129. 1887.

(Figura 18)

Filamentos emaranhados entre outras cianobactérias, 14,0-15,0 µm diâm., ramificações falsas. Bainha levemente espessa, alaranjada, lamelada paralelamente. Tricomas não constrictos nas paredes celulares, azul esverdeados, 7,0-9,0 µm diâm. Células, nas regiões mais velhas, isodiamétricas ou mais longas que largas e, nas regiões mais novas, mais curtas que largas, 0,2-0,8 vez mais longas que largas. Heterócitos solitários e cilíndricos, 9,0-14,0 compr.

**Comentários:** Os espécimes observados estão de acordo com a descrição morfológica da espécie feita por Komárek (2013), apenas diferindo quanto ao diâmetro do filamento (13,0 µm) e comprimento do heterócito (4,6-10,0 µm compr.).

Segundo Komárek (2013), a espécie ocorre em paredes úmidas, solos, rochas, raramente em substratos de madeira velhos. É considerada cosmopolita, mas com morfologia muito variável, são comuns na Eurásia e América do Norte. No Brasil a espécie foi registrada em ambiente aerofítico na região noroeste do estado de São Paulo (LEMES-DA-SILVA et al., 2012).

*Scytonema hoffmanni* é uma das espécies mais comuns em crostas biológicas no deserto de Mojave e de Chihuahuan (ROSENTRETER & BELNAP, 2003) tendo sido também registrada em crostas biológicas do Chaco argentino (BÜDEL, 2003a) e do Vale do Mar Morto no Oriente Médio (GALUN & GARTY, 2003).

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (3CAN).

***Scytonema schmidtii* Gomont**

Myxophyceae hormogoneae. Bot. Tidsskrift. 24: 210. 1901.

(Figuras 19-20)

Filamentos emaranhados, 10,0-12,0µm diâm., numerosas ramificações falsas. Bainha fina a levemente espessa, incolor, homogênea a lamelada paralelamente. Tricomas constrictos nas paredes celulares, esverdeados, 8,0-10,0µm diâm. Células, na maioria, mais curtas que largas,



0,2-0,6 vez mais longas que largas. Células apicais cilíndrico-arredondadas. Foi observado um heterócito, solitário, cilíndrico, amarelado.

**Comentários:** Os espécimes observados estão de acordo com a descrição morfológica da espécie feita por Komárek (2013), apenas diferindo quanto à bainha, que se mostrou incolor e podendo ser lamelada na população estudada, enquanto a espécie é descrita com bainha amarelo-acastanhada e homogênea.

Segundo Komárek (2013), a espécie ocorre em solos úmidos, rochas e cascas de árvore. No Brasil, a espécie foi registrada na Ilha do Cardoso e no município de Bertioga (KOMÁREK et al., 2013), entretanto esta população apresentou bainha pigmentada e estriada. Também há registros para crostas biológicas no deserto da Grande Bacia (Nevada) na América do Norte (ROSENRETER & BELNAP, 2003) e na Índia, na região de Tiruchirapalli (TIRKEY & ADHIKARY, 2006).

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (4CAN).

### Stigonemataceae

#### *Stigonema ocellatum* (Dillwyn) Thuret ex Bornet et Flahault

Ann. Sci. Nat., Bot., Sér. 5, 51: 129. 1886

(Figuras 21- 24)

Filamentos emaranhados, prostrados, irregulares, esverdeados a castanhos, 29,0-50,0 µm diâm., irregularmente ramificados. Ramos longos, curvos, mesmo diâmetro e morfologia do ramo principal. Bainha ampla, incolor nas regiões mais jovens e alaranjada, nas mais velhas, lamelada paralelamente. Tricomas uni a bisseriados. Células vegetativas isodiamétricas, 11,2-28,0 µm diâm., envelope individual incolor (exceto para população 6CAN). Hormogônio nas extremidades dos ramos, células curtas. Heterócito intercalar ou lateral, geralmente do mesmo diâmetro que células vegetativas, 17,2-27,0 µm diâm.

**Comentários:** As populações estudadas estão de acordo com a morfologia, características métricas e ecológicas descritas por Komárek (2013) para *S. ocellatum*.

Segundo Komárek (2013), esta espécie é considerada cosmopolita e é encontrada comumente em regiões tropicais, como África, Madagascar, Brasil e Venezuela. No Brasil, a espécie foi registrada ocorrendo no Pará (DROUET, 1938), em fitoplâncton na Lagoa Bonita (DF; CAMPOS & SENNA, 1988), em fragmentos de floresta semidecidual (SP; LEMES-DA-

SILVA et al., 2012), em regiões da mata atlântica (SP; FERREIRA et al., 2013) e também em riachos no bioma Cerrado (GO; ISHIBASHI, 2013).

Komárek (2013) descreve esta espécie como podendo habitar regiões de solo seco e Büdel (1994) registrou esta espécie em crostas biológicas na savana húmida na Venezuela. Em posterior revisão, este autor descreve a espécie como habitando crostas de inselbergs na América do Sul e África (BÜDEL, 1999).

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (6CAN) e Cipó (2CIP).

### ***Stigonema* sp.1**

(Figuras 25-26)

Filamentos emaranhados, prostrados, esverdeados, 26,4-34,4 µm diâm., irregularmente ramificados. Ramos curtos, mesmo diâmetro e morfologia do ramo principal. Bainha estreita, amarela a castanha, lamelada paralelamente. Tricomas uni a tetrasseriados. Células vegetativas arredondadas ou ovaladas, 8,8-20,0 µm diâm. Hormogônio nas extremidades dos ramos, células curtas. Heterócitos intercalares ou laterais, geralmente do mesmo diâmetro que as células vegetativas.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Stigonema informe* Kützing ex Bornet et Flahault quanto à morfologia e caracteres métricos, exceto pelo diâmetro do filamento, que para *S. informe* é descrito por Komárek (2013) como maior que 45,0 µm.

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (7CAN).

### ***Stigonema* sp.2**

(Figuras 27-29)

Filamentos solitários entre as partículas de solo, irregulares, mais ou menos curvos, 36,0-56,0 µm diâm. Ramos longos, curvos, mesmo diâmetro e morfologia do ramo principal. Bainha incolor nas regiões mais jovens e alaranjada, nas mais velhas, lamelada paralelamente. Tricomas bi a trisseriados. Células vegetativas esféricas ou ovaladas, 5,6-13,6 µm diâm., envelope individual incolor. Hormogônio nas extremidades dos ramos, células curtas. Heterócitos intercalares ou laterais, geralmente do mesmo diâmetro que as células vegetativas.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Stigonema intermedium* Kondratieva quanto à morfologia e caracteres métricos. exceto nos heterócitos, que nesta são indiferenciáveis das células normais, sendo raramente desenvolvidos.

Também há semelhança com *Stigonema turfaceum* (Persoon) Cooke ex Bornet et Flahault quanto à morfologia e caracteres métricos, exceto pelo fato da população estudada não apresentar atenuação nos ápices dos filamentos, e ter diâmetro de filamento maior que o descrito por Komárek (2013) para *S. turfaceum*. (27,0-37,0 µm diâm).

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (8CAN).

## Rivulariaceae

### *Calothrix* sp.1

(Figura 30)

Filamentos emaranhados, raramente dois por bainha, 8,0-13,0 µm diâm próximo à base. Bainha ampla, fechada, lamelada, incolor. Raras ramificações falsas. Tricomas curtos, até 400,0 µm compr., constrictos nas paredes celulares, 4,0-6,5µm diâm. na parte média, estreitando até o ápice, sem formação de pelos hialinos. Células, em maioria, mais curtas que largas, 2,0-10,0 µm compr. Heterócitos basais, isolados, raramente intercalares, esféricos ou mais ou menos triangulares, 6,0-7,0 µm diâm, 5,5-7,0 µm compr.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *C. flamulorum* Sant'Anna, Silva et Branco quanto à morfologia, diferenciando-se com relação ao diâmetro do filamento próximo à base descrito (10,0-12,0 µm), e ao comprimento máximo do filamento (75,0 µm). Não foram observados dois heterócitos apicais para o mesmo filamento, sendo tal característica relatada na descrição original.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (9CAN).

### *Calothrix* sp.2

(Figura 31)

Filamentos agregados, 9,0-12,0 µm diâm próximo à base. Bainha fina e aberta. Raras ramificações falsas. Tricomas na maioria das vezes curtos, podendo chegar a 400,0 µm compr., constrictos nas paredes celulares, 3,0-7,0 µm diâm. na parte média, estreitando até o final, sem formação de pelos hialinos. Células, em maioria, mais curtas que largas, 2,5-8,0 µm compr. Heterócitos basais, um, esféricos ou mais ou menos triangulares, 5,5-7,0 µm diâm, 5,0-8,0 µm compr.

Comentários: A população estudada é semelhante à *C. aeruginosa* Voronichin quanto à morfologia, se diferenciando com relação ao diâmetro do heterócito (8,0-9,0 µm), por não apresentar heterócitos intercalares, quanto ao *habitat*, que na primeira é aerofítico e na segunda aquático ou de solos úmidos e quanto ao filamento que em *C. aeruginosa* é descrito como curto.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (5FUR).

## OSCILLATORIALES

### Microcoleaceae

#### *Microcoleus vaginatus* Gomont ex Gomont

Ann. Sci. Nat., Bot. ser. 7, 15: 352. 1892

(Figuras 32-33)

Filamentos emaranhados, apenas um tricoma por bainha. Tricomas verde-azulados a verde-escuros, 4,0 – 4,5 µm diâm., não constrictos nas paredes celulares. Células isodiamétricas ou levemente mais longas que largas, 4,0-11,0 µm compr., 0,36 a 1,1 vez mais longas que largas. Célula apical cônico-arredondada, com caliptra.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *M. vaginatus* quanto à morfologia, métrica e ecologia descritos por Komárek & Anagnostidis (2005). Quando comparado à literatura clássica, o comprimento celular apresentou-se menor que o descrito (células 0,5-2,0 vezes mais longas que largas) (GOMONT, 1892).

Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), esta espécie é cosmopolita e, no Brasil, já foi descrita em biolaminoides em borda de lagoa em Cabo Frio (RJ; SILVA et al., 2005; IESPA & SILVA, 2005) e no rio Preto, noroeste do estado de São Paulo (NECCHI et al., 1994).

*Microcoleus vaginatus*, juntamente com *M. chthonoplastes*, é uma das espécies mais frequentes em crostas biológicas, tendo sido registrada em várias regiões do globo (GARCIA-PICHEL, 2001; GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006; BÜDEL et al., 2009; VERNER et al., 2014; SCHULZ et al., 2016; DULIC et al., 2016).

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (8FUR) e Canastra (12CAN).

#### *Porphyrosiphon notarisii* Kützing ex Gomont

Ann. Sci. Nat., Bot, Sér. 7, 15:331. 1892.

(Figura 34)

Filamentos agregados, curvos, 17,0-20,0µm diâm. Bainha firme, fina e incolor nas regiões mais jovens e espessa, lamelada e alaranjada, nas mais velhas. Tricomas azul-esverdeados, 13,0-17,0 µm diâm, constrictos nas paredes celulares. Células isodiamétricas ou 0,2 – 0,7 vezes mais longas que largas, 5,0-12,0 µm diâm. Célula apical arredondada, sem caliptra.

**Comentários:** Os espécimes observados estão de acordo com a descrição morfológica, métrica e ecológica da espécie feita por Gomont (1892) e Komárek & Anagnostidis (2005).

De acordo com Komárek & Anagnostidis (2005), *P. notarisii* ocorre em ambientes aerofíticos e provavelmente é cosmopolita. Esta espécie já foi identificada habitando solo e cascas de árvores da Nova Caledônia na França (COUTÉ et al., 1999) e presente sobre rochas e solo no estado de São Paulo (SANT'ANNA & AZEVEDO, 1995; BRANCO et al., 2009).

A espécie foi registrada em crostas biológicas de savanas secas no sudeste da África, dentre as cianobactérias filamentosas presentes em levantamento relatado por Ullmann & Büdel (2003) *P. notarisii* se mostrou dominante.

Em outro estudo com crostas biológicas, realizado por Williams & Büdel (2012) em diferentes regiões da *Mulga lands* na Austrália, *P. notarisii* também se mostrou abundante em todas as regiões amostradas.

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (9FUR).

### Oscillatoriaceae

#### *Phormidium* sp.1 (Gomont) Anagnostidis & Komárek

Arch. Hydrobiol. Suppl. 80: 407. 1988

(Figuras 35-36)

Filamentos retos, emaranhados entre outras algas, 5,0-7,0 µm diâm. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas azul-esverdeados, 4,5-5,0 µm diâm., constrictos, não atenuados no ápice.

Células isodiamétricas a 0,8-2,2 vezes mais longas que largas, 4,0-9,0 µm compr. Conteúdo celular com grânulos grandes. Células apicais cilíndrico-arredondas a levemente cônicas, sem caliptra. **Comentários:** A população estudada é semelhante à *Phormidium aerugineo-coeruleum* (Gomont) Anagnostidis & Komárek quanto à morfologia e caracteres métricos descritos por Komárek & Anagnostidis (2005), entretanto diverge quanto ao *habitat*, que na população estudada é aerofítico e na literatura é descrito como aquático.

A espécie já foi registrada na Europa, África, América do Norte, Argentina, Austrália, Brasil, Índia, Japão, etc. Registros para troncos de árvores, solos úmidos e minerais e águas termais precisam ser revistos (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005).

Observação: População observada apenas em cultura de solo.

Ocorrência nas áreas estudadas: Canastra (13CAN).

### ***Phormidium* sp.2**

Ann. Sci. Nat., Bot. Sér. 7, 16: 175. 1892.

(Figuras 37-38)

Filamentos retos ou levemente curvos, emaranhados entre outras algas. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas azul-esverdeados, 5,0-6,0 µm diâm., constrictos, não atenuados no ápice. Células mais longas que largas ou isodiamétricas (0,8-2,3 vezes), 5,0-11,0 µm compr. Células apicais cônico-arredondadas ou truncadas, sem caliptra.

**Comentários:** A população estudada assemelha-se à *Phormidium retzii* Kützing ex Gomont quanto à morfologia, apresentando um intervalo menor de comprimento celular quando em comparação ao descrito por Gomont (1892; 4,0-9,0 µm compr.) e Komárek & Anagnostidis (2005; 3,2-9,0 µm compr.).

Outro fator que distingue a população estudada da descrição da espécie na literatura é o *habitat*. A espécie é tipicamente aquática, ocorrendo em ambientes de água corrente, contrastando com o *habitat* em que a população foi encontrada neste estudo, que é aerofítico.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (14CAN).

## **SYNECHOCOCCALES**

### **Leptolyngbyaceae**

#### ***Leptolyngbya* cf. *frigida* (Fritsch) Anagnostidis & Komárek**

Arch. Hydrobiol. Suppl. 80: 390. 1988

(Figura 39)

Filamentos flexuosos, não arrançados paralelamente. Tricomas verde-oliva, 1,0-1,5 µm diâm., distintamente constrictos nas paredes celulares. Células cilíndricas, 0,6 a 3,0 vezes mais longas que largas, 1,0-3,5 µm compr. Conteúdo celular homogêneo, sem ou com um único grânulo em cada lado das paredes celulares. Célula apical cônico-arredondada.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *L. frigida* quanto à morfologia e caracteres métricos descritos por Komárek & Anagnostidis (2005), apenas divergindo quanto ao comprimento celular, que apresentou um intervalo maior que o descrito para *L. frigida* (1-2x mais longas que largas). Quanto ao ambiente, a população diverge da descrição da espécie, que é aquático e de ambientes frios, principalmente Antártico, porém a espécie já foi registrada em ambiente aquático na reserva natural de Otamendi/Argentina (IZAGUIRRE et al., 2004) e em ambiente semilótico em Porto Rico/PR (BIOLO & RODRIGUES, 2011), tendo sido identificada como *Pseudoanabaena frigida* devido à ausência de bainha.

Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), a espécie já foi registrada em ambiente de água doce corrente e parada na Antártica e também em águas oligotróficas, limpas e frias no Ártico, Ucrânia, Letônia e Suécia. Os autores pontuam que registros em ambientes que não frios e límpidos exigem revisão.

Também há registro de *Pseudoanabaena cf. frigida* para crostas biológicas na reserva *Succulent Karoo* em Zâmbia (DOJANI et al., 2014).

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Cipó (3CIP).

#### ***Leptolyngbya cf. henningsii* (Lemmermann) Anagnostidis**

Preslia 73: 367. 2001.

(Figura 40)

Filamentos retos ou levemente curvos. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas azul-esverdeados, 1,5-3,0 µm diâm, distintamente constrictos nas paredes celulares. Células moniliformes, 0,5-2,0 vezes mais longas que largas, 1,0-4,0 µm compr., sem granulações nas paredes celulares. Célula apical cônico-arredondada.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Leptolyngbya henningsii* quanto à morfologia e caracteres métricos, entretanto, o diâmetro do tricoma apresentou-se levemente diferente da variação descrita por Komárek & Anagnostidis (2005; 1,8-2,5 µm diâm.). As amostras estudadas apresentaram, na maioria dos casos, um grânulo em cada lado da parede celular, enquanto *L. henningsii* não apresenta granulações nas paredes celulares.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Furnas (6FUR).

#### ***Leptolyngbya sp.1***

(Figura 41-42)

Filamentos densamente emaranhados. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas verde-escuros, 2,0-3,5  $\mu\text{m}$  diâm, constrictos nas paredes celulares, não a levemente atenuados no ápice. Células moniliformes, 0,6-2,0 vezes mais longas que largas, 1,5-4,0  $\mu\text{m}$  compr., sem granulações nas paredes celulares. Conteúdo celular homogêneo a levemente granuloso. Célula apical cônico-arredondada. Presença de ramificações falsas plectonematoides.

**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Leptolyngbya* “Albertano/Kovacik-green” Albertano & Kovácik quanto à morfologia e caracteres métricos descritos por Komárek & Anagnostidis (2005), diferindo quanto ao diâmetro de tricoma, com intervalo maior que o descrito (1,4-2,9  $\mu\text{m}$ ). Além disso, Komárek & Anagnostidis (2005) descrevem a espécie como habitando solos úmidos e sombreados, *habitat* diferente do da população estudada.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (10CAN).

### *Leptolyngbya* sp.2

(Figura 43)

Filamentos emaranhados, algumas vezes retos e arranjados paralelamente. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas azul-esverdeados, 1,5-3,0  $\mu\text{m}$  diâm, distintamente constrictos nas paredes celulares, não atenuados no ápice. Células moniliformes, 0,5-2,5 vezes mais longas que largas, 1,0-2,5  $\mu\text{m}$  compr., sem granulações nas paredes celulares. Conteúdo celular granuloso, grânulos esparsamente distribuídos. Célula apical cilíndrica.

**Comentários:** As amostras se assemelham às características morfológicas e métricas descritas para *Leptolyngbya faveolarum* (Gomont) Anagnostidis & Komárek por Komárek & Anagnostidis (2005). Diferenciam-se pelo comprimento celular com intervalo maior que o descrito para a espécie (comprimento mínimo celular é de 0,8  $\mu\text{m}$ ). Segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *L. faveolarum* foi registrada em regiões calcárias, solos úmidos, rochas submersas, margens de nascentes de águas mineral e termal, condições distintas sob as quais o material estudado foi coletado.

**Observação:** População observada apenas em cultura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (11CAN).

### *Leptolyngbya* sp.3

(Figura 44)



Filamentos emaranhados. Bainha fina, firme, incolor. Tricomas azul-esverdeados, 1,5-2,0  $\mu\text{m}$  diâm, distintamente constrictos nas paredes celulares, não atenuados no ápice. Células moniliformes, 0,6 a 3,0 vezes mais longas que largas, 1,5-6,0  $\mu\text{m}$  compr, um grânulo em cada lado das paredes celulares. Célula apical cônico ou cilíndrico-arredondada. **Comentários:** A população estudada é semelhante à *L. subcapitata* (Boye-Petersen) *Anagnostidis* quanto à morfologia e caracteres métricos descritos por Komárek & *Anagnostidis* (2005), diferindo quanto aos intervalos de diâmetro de tricoma (1,8-2,2  $\mu\text{m}$  para a espécie) e comprimento celular (2,0-6,0  $\mu\text{m}$ ) e quanto à presença de grânulos nas paredes (ausente em *L. subcapitata*). Além disso, segundo Komárek & *Anagnostidis* (2005), a espécie foi registrada apenas para ambientes úmidos próximos a águas termais e ambientes congelados.

**Observação:** População observada apenas em tura de solo.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Fur (7FUR).

### Schizothricaceae

#### *Schizothrix thelephoroides* Gomont

Ann. Sci. Nat., Bot., Sér. 7, 15: 263. 1890.

(Figura 45)

Filamentos densamente agregados, tortuosos, longos, 30,0-36,0  $\mu\text{m}$  diâm., 1-3 tricomas. Tricomas azul-esverdeados, 8,0-10,0  $\mu\text{m}$  diâm, constrictos. Bainha incolor nas regiões jovens e alaranjada nas mais velhas, lamelada, fechada nas extremidades. Células isodiamétricas ou levemente mais curtas ou mais longas que largas, 4,0-11,0  $\mu\text{m}$  compr. Células apicais cônico-arredondadas.

**Comentários:** Os espécimes observados estão de acordo com a descrição morfológica, métrica e ecológica da espécie feita por Komárek & *Anagnostidis* (2005). Quando comparados à literatura clássica apresentaram comprimento celular com intervalo levemente menor que o descrito por Gomont (1892; 6,0-14,0  $\mu\text{m}$  compr.).

Segundo Komárek & *Anagnostidis* (2005), a espécie já foi registrada em solos úmidos, rochas e entre musgos e *Trentepohlia*, também em quedas d'água nas Antilhas, Brasil, Porto Rico, Tailândia e Sri Lanka.

Büdel (1994) registrou *S. thelephoroides* em crostas biológicas na América do Sul e afirmou que a espécie desempenha papel importante no estabelecimento de crostas biológicas, sendo frequentemente a primeira cianobactéria a estabilizar solos jovens rochosos.

**Observação:** População em amostra ambiental.

**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (15CAN).

### **Schizothrix sp.1**

(Figura 46)

Filamentos emaranhados, ricos em pseudo-ramificações, 26,0-35,0  $\mu\text{m}$  diâm., 1-3 tricomas.

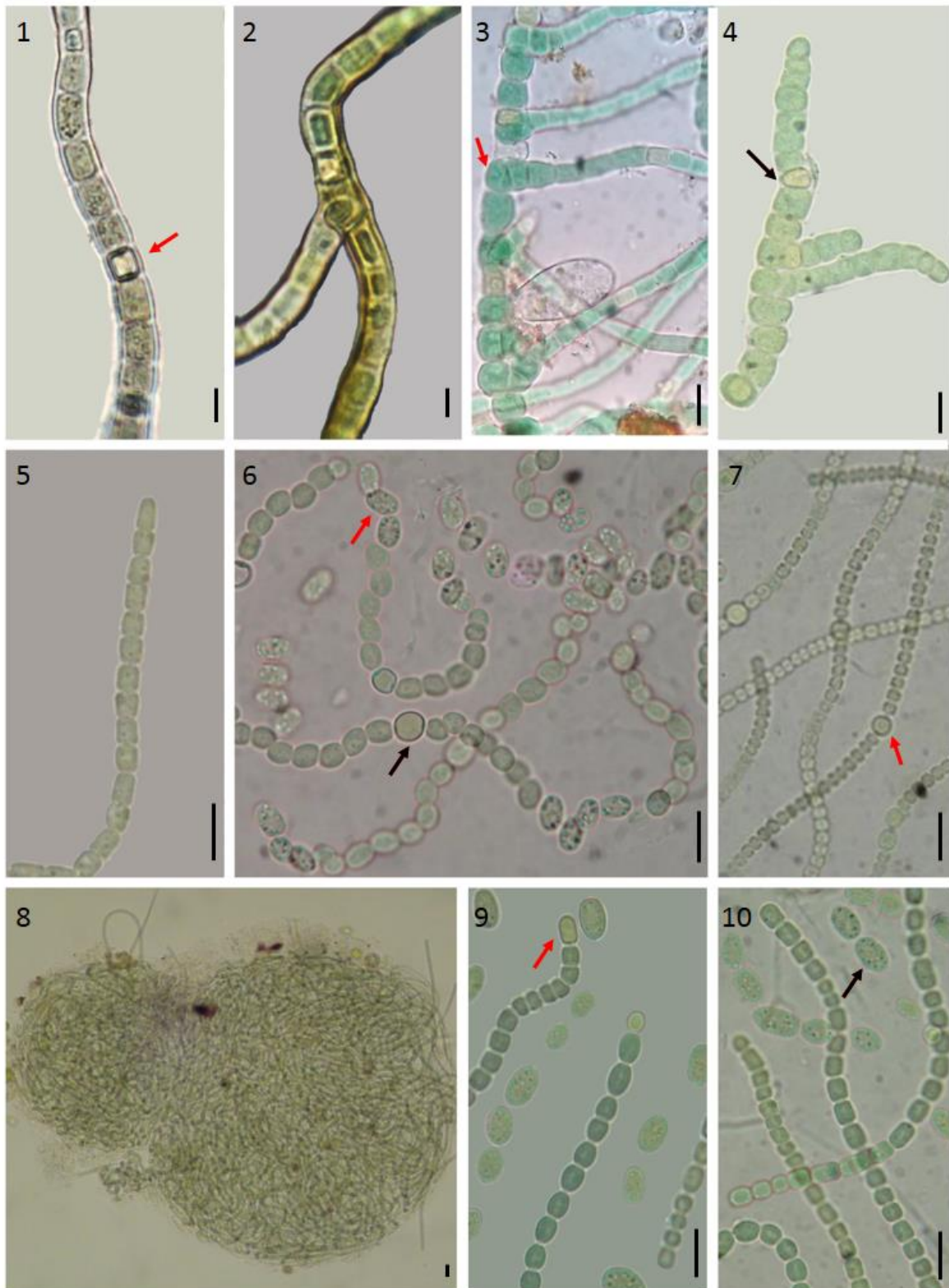
Tricomas azul-esverdeados, 2,0-4,0  $\mu\text{m}$  diâm. Bainha incolor nas regiões jovens e amarelada

nas mais velhas, lamelada, fechada nas extremidades. Células isodiamétricas ou 1 a 2,7 vezes mais longas que largas, 2,0-8,0  $\mu\text{m}$  compr. Células apicais cônico-obtusas a arredondadas.

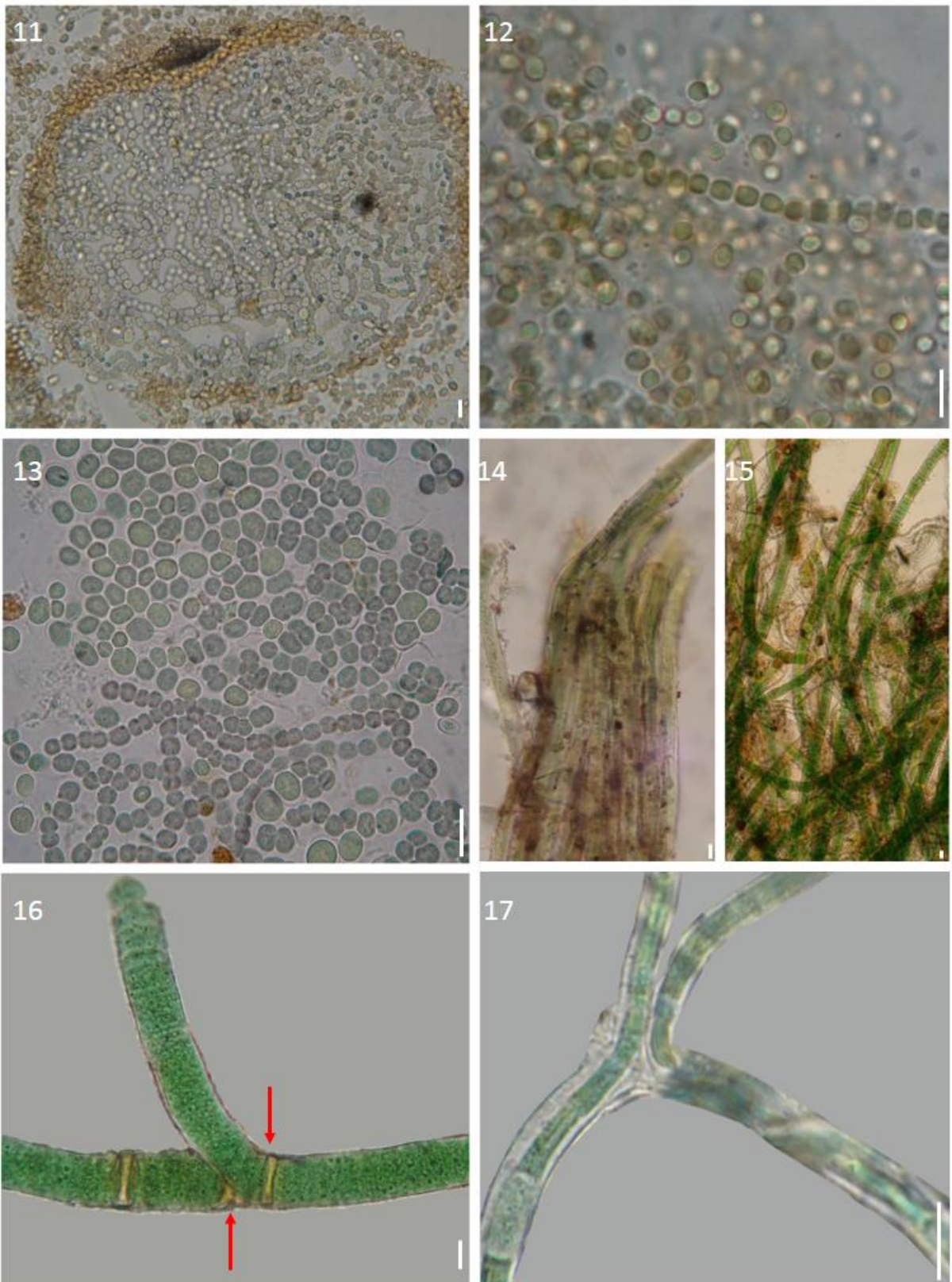
**Comentários:** A população estudada é semelhante à *Schizothrix ericetorum* Lemmermann, quanto à bainha e a morfologia da célula apical, no entanto, difere quanto à quantidade de tricomas por bainha (muitos tricomas), quanto ao diâmetro do tricoma e ao comprimento celular (2,0-2,7  $\mu\text{m}$  diâm e 3,0-5,5  $\mu\text{m}$  compr. em *S. ericetorum*). Além disso, segundo Komárek & Anagnostidis (2005), *S. ericetorum* foi registrada apenas em solos úmidos na Alemanha e os registros indianos precisam ser revisados.

**Observação:** População em amostra ambiental.

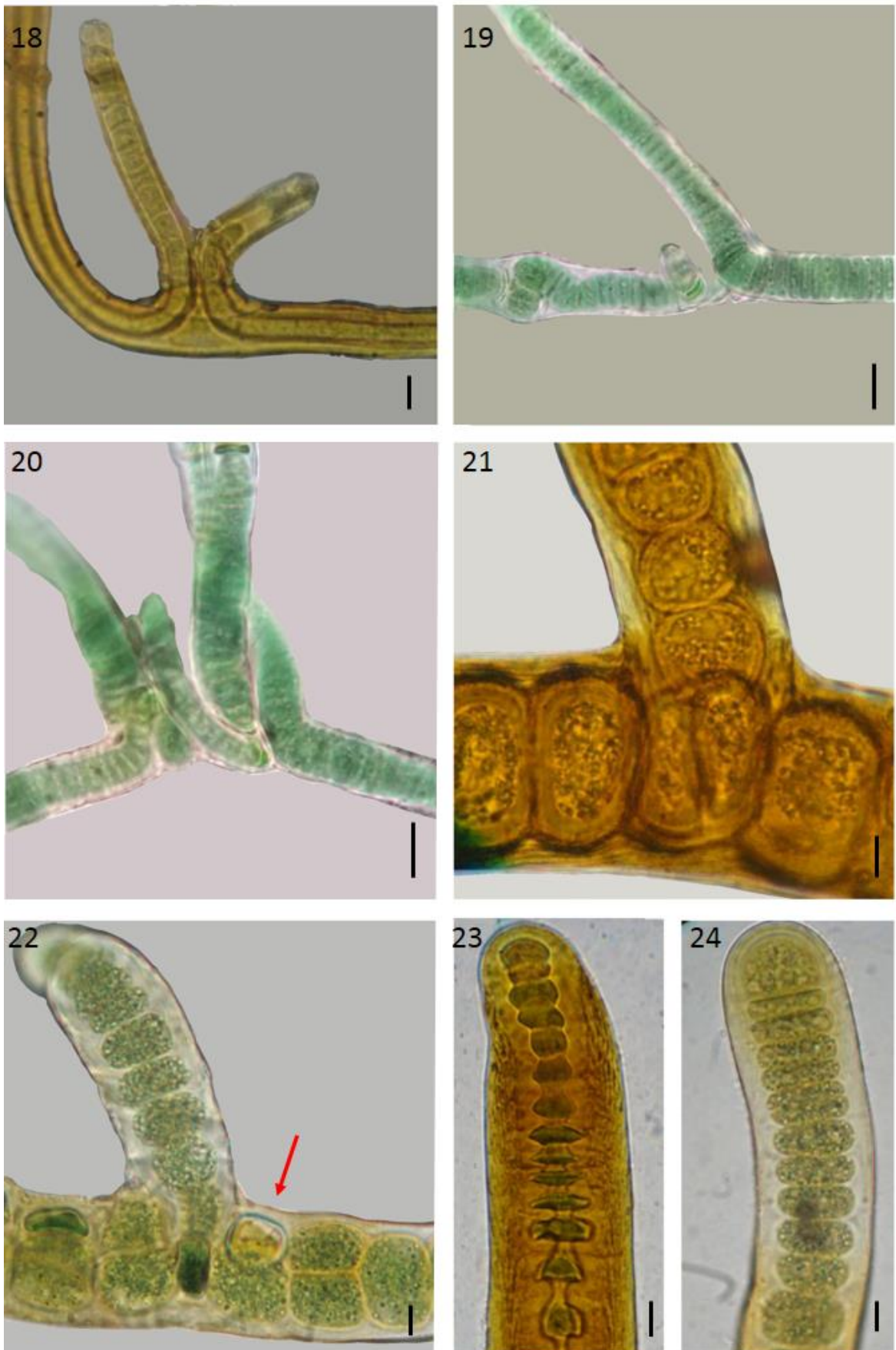
**Ocorrência nas áreas estudadas:** Canastra (16CAN).



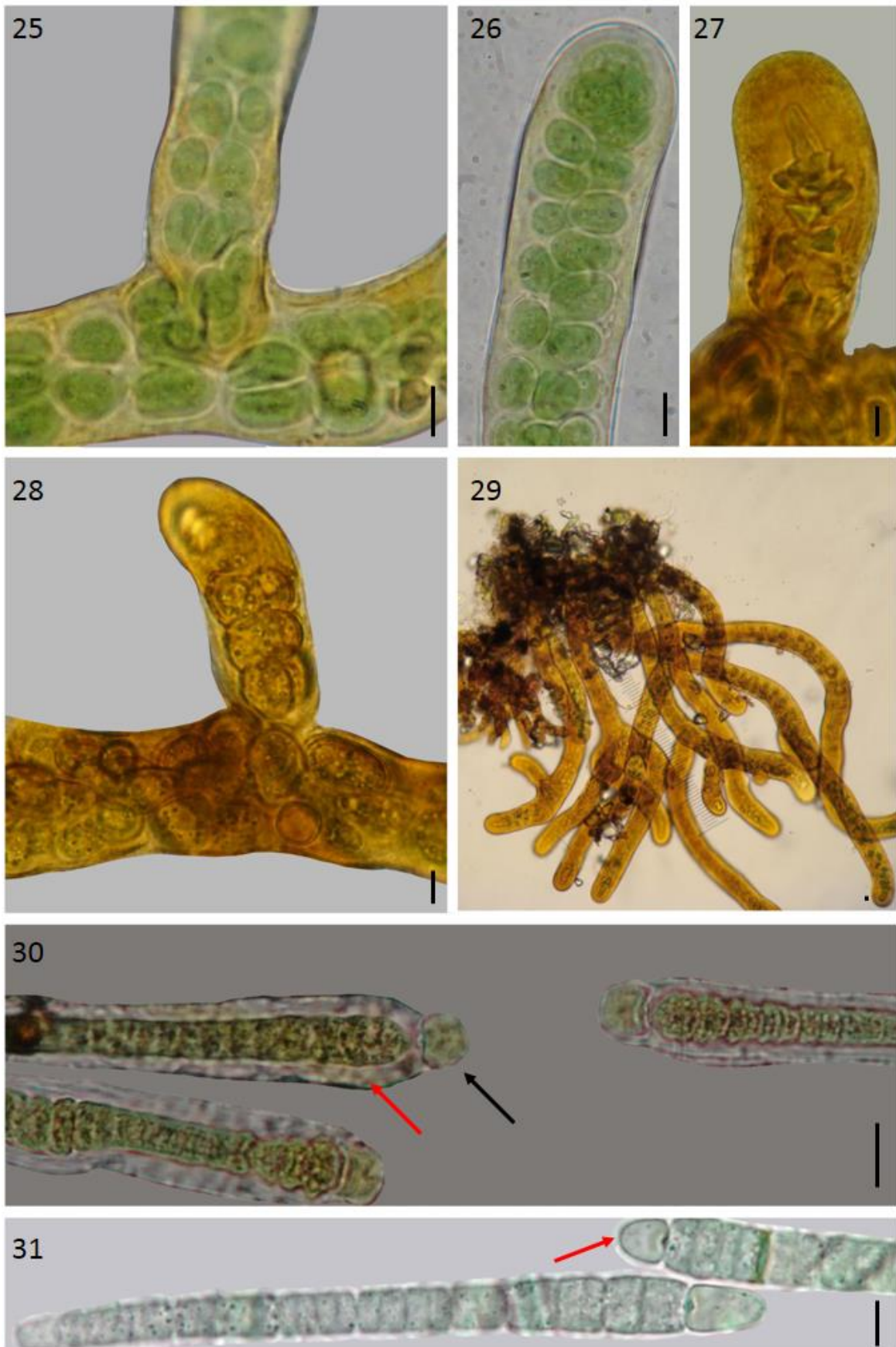
Figuras 1-10. 1-2 *Hapalosiphon luteolus*, seta: heterócito; 3-4 cf. *Hapalosiphon* sp., seta vermelha: ramificação verdadeira, seta preta: heterócito; 5-6 *Desmonostoc muscorum*, seta vermelha: acinete, seta preta: heterócito; 7-8 *Nostoc commune*, seta: heterócito; 9-10 *Nostoc* sp.1, seta vermelha: heterócito, seta preta: acinete. Escalas: 10µm.



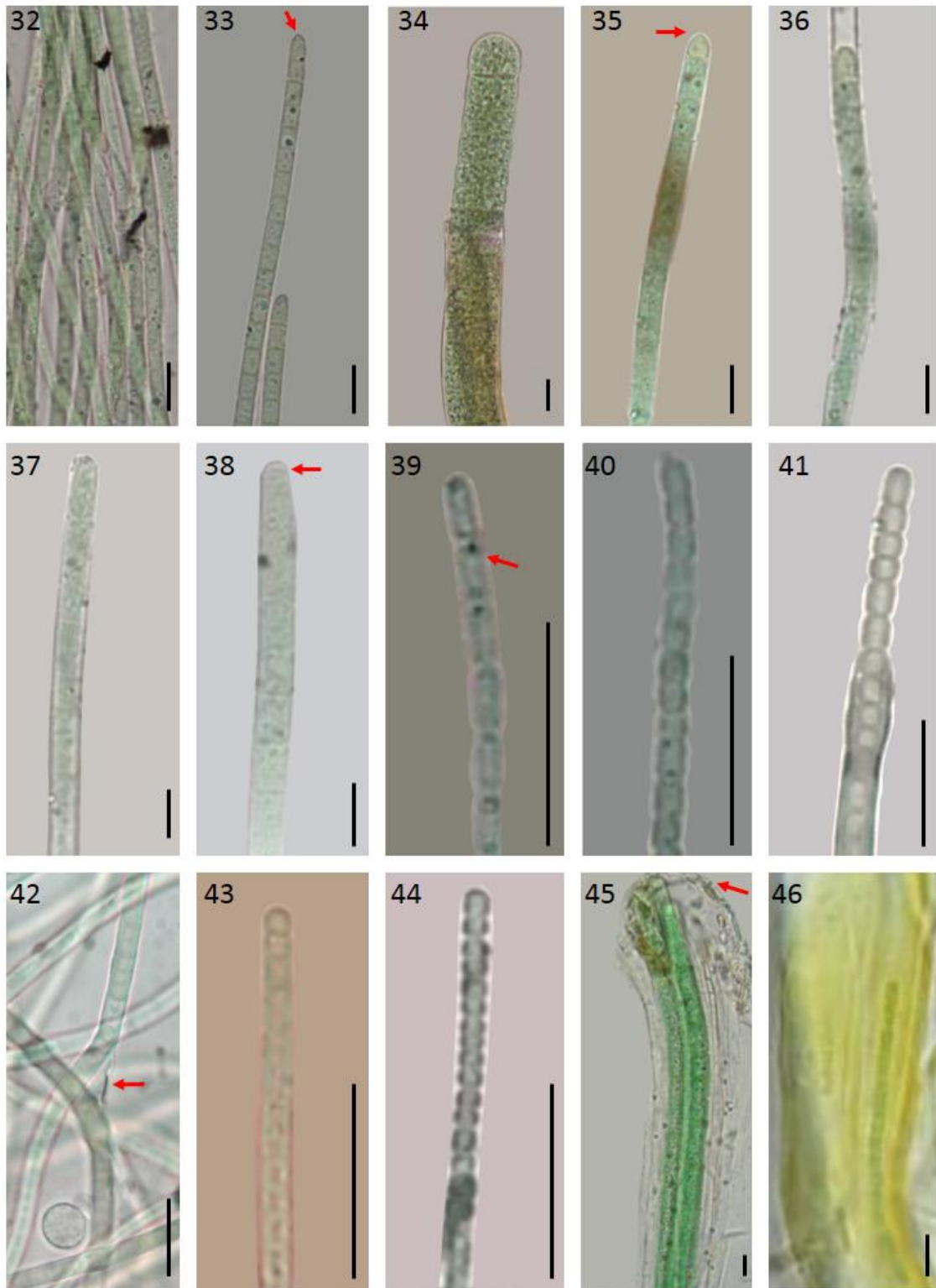
Figuras 11-17. 11-12 *Nostoc* sp.2; 13 *Nostoc* sp.3; 14 *Brasilonema* sp. 1; 15-16 *Brasilonema* sp.2, setas: heterófitos; 17 *Scytonema* cf. *bohneri*. Escalas: 10 $\mu$ m.



Figuras 18-24. 18 *Scytonema hoffmanii*; 19-20 *Scytonema schimdtii*; 21-24 *Stigonema ocellatum*, seta: heterócito. Escalas: 10 $\mu$ m.



Figuras 25-31. 25-26 *Stigonema* sp.1; 27-29 *Stigonema* sp.2; 30 *Calothrix* sp.1, seta vermelha: heterócito, seta preta: bainha mucilaginosa incolor; 31 *Calothrix* sp.2, seta: heterócito. Escalas: 10 $\mu$ m.



Figuras 32-46. 32-33 *Microcoleus vaginatus*, seta: caliptra; 34 *Porphyrosiphon notarisii*; 35-36 *Phormidium* sp.1, seta: célula apical cônica; 37-38 *Phormidium* sp.2, seta: célula apical truncada; 39 *Leptolyngbya* cf. *frigida*, seta: grânulo de parede; 40 *Leptolyngbya* cf. *henningsii*; 41-42 *Leptolyngbya* sp.1, seta: ramificação falsa; 43 *Leptolyngbya* sp.2; 44 *Leptolyngbya* sp.3; 45 *Schizotrrix* sp.1; 46 *Schizotrrix* sp.2, seta: bainha mucilaginosa fechada. Escala: 10µm.

## Considerações finais

Foram registrados muitos gêneros comuns a crostas biológicas de outras localidades mundiais, como são os casos de *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Calothrix*, *Microcoleus*, *Leptolyngbya*, *Schizothrix*, *Phormidium* e, em menor proporção, gêneros mais raros como *Hapalosiphon* e *Brasilonema*.

Dos gêneros registrados muitos são considerados taxonomicamente complexos, como é o caso de *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Schizothrix*, *Nostoc*, *Stigonema* e *Calothrix*.

*Leptolyngbya* é um gênero que apresenta espécies com caracteres morfológicos extremamente sobrepostos e de difícil separação (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005), um dos motivos pelos quais algumas populações estudadas não foram identificadas. O gênero já foi registrado em vários trabalhos com crostas biológicas (BÜDEL et al., 2009; MAESTRE et al., 2006; BÜDEL et al., 2014; HAGEMANN et al., 2015; SCHULZ et al., 2016), e embora não tenha sido possível a identificação específica de algumas populações encontradas, este registro é uma informação importante, se considerarmos que tais organismos são colonizadores iniciais. Embora *Microcoleus* seja considerado o principal colonizador em crostas, principalmente em estudos na América do Norte (GARCIA-PICHEL, 2001; GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006; BÜDEL et al., 2009; HAGEMANN et al., 2015; SCHULZ et al., 2016; DULIC et al., 2016), há estudos mostrando *Leptolyngbya* como o gênero dominante nestas assembleias, em ambientes glaciais como Svalbard (Arquipélago norueguês – KASTOVISKÁ et al., 2005) e áreas de deserto (Deserto de Mojave - ALWATHNANI & JOHANSEN, 2011).

*Phormidium* tem destaque dentre os gêneros de Phormidiaceae pois é considerado o gênero taxonomicamente mais complexo e com o maior número de morfoespécies descritas entre as cianobactérias (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005). Um grande ponto conflitante nos estudos taxonômicos do gênero *Phormidium* é a consideração de aspectos, tais como distribuição geográfica e hábito, para a delimitação de determinadas espécies e a desconsideração dos mesmos para outras. Devido a este conflito, muitas das amostras que se assemelhavam morfometricamente a espécies descritas foram ainda mantidas sem identificação específica. O gênero é comum para crostas biológicas, já tendo sido registrado em todos os continentes (WEBER et al., 2016).

O registro de três populações de *Stigonema* com duas identificações limitadas em nível genérico reflete a complexidade do gênero. Esta complexidade se dá pela presença de múltiplos morfotipos, variando de filamentos uni a multisseriados, diferentes tipos de ramificação, além de ramificações isopolares ou heteropolares (SANT'ANNA et al., 2013).



*Stigonema* está entre as principais cianobactérias formadoras de crostas (juntamente com *Microcoleus*, *Nostoc* e *Scytonema* – WEBER et al., 2016) e a espécie *S. ocellatum* acumula registros na América, Austrália, Ásia e Antártica (WEBER et al., 2016). Possivelmente estes organismos desempenhem papéis parecidos com aqueles desenvolvidos por *Scytonema*, *Calothrix* e outras cianobactérias de bainhas pigmentadas, sendo colonizadores de topo de crostas e estando em contato direto com a radiação UV (EVANS et al., 2003; GARCIA-PICHEL et al., 2003). Além disso a presença de bainhas espessas favorece o desenvolvimento destas em regiões secas como o Cerrado.

Outro gênero registrado, também problemático quanto à morfologia foi *Nostoc*. Os estudos taxonômicos com este gênero enfrentam muitos problemas principalmente pela necessidade do acompanhamento do ciclo de vida da população para que seja feita uma identificação correta (RIPPKA, 1979). No nosso caso todas as populações estudadas tiveram crescimento apenas em cultura, o que dificulta ainda mais uma identificação profunda, pelo fato de haver uma modificação significativa nos caracteres morfológicos quando submetidos a crescimento artificial (HENTSCHKE & SANT'ANNA, 2015).

O registro de *Nostoc* não é um fato que surpreende, considerando que é um dos gêneros registrados como mais abundantes em crostas biológicas, principalmente naquelas que já atingiram um estado desenvolvido (YEAGER et al., 2004). A espécie *Desmonostoc muscorum* (antiga *Nostoc muscorum*) já foi reportada em crostas na América, Austrália, Ásia e Antártica, enquanto *N. commune* assemelha-se a *M. vaginatus* quanto à sua ampla distribuição, tendo sido registrada em todos os continentes (WEBER et al., 2016).

*Calothrix* é outro gênero de taxonomia complexa, entretanto, neste caso a morfologia se vê limitada não apenas a identificação das espécies, mas a de gênero em geral. O grupo é semelhante morfológicamente a *Tolypothrix* e *Rivularia* quando o crescimento ocorre em cultura, dessa forma a utilização de critérios moleculares é muito mais requisitada (BERRENDERO et al., 2011). Esse gênero é também extremamente comum em crostas biológicas, havendo registros para Austrália, Antártica, Ásia e Europa (WEBER et al., 2016). Como citado anteriormente, são descritos como organismos colonizadores da camada superficial do solo, principalmente pela presença de pigmentos nas bainhas e a consequente forte proteção contra radiação UV (ROSENTRETER & BELNAP, 2003; EVANS et al., 2003; GARCIA-PICHEL et al., 2003).

*Schizothrix* é um gênero estudado principalmente através da morfologia, que é dividido em dois subgêneros, para que haja a separação entre as *Schizothrix* típicas e os tipos calcificados. Algumas espécies, devido ao não enquadramento na característica típica do grupo, células

evidentemente mais longas que largas, levantam a questão se haveria necessidade de recombinação. É o caso de *S. thelephoroides*, que já são reconhecidas por Komárek & Anagnostidis (2005) como pertencente a *Symplocastrum*. O gênero já foi registrado em crostas biológicas para praticamente todos os continentes, estando ausente apenas em regiões congeladas e Austrália (BÜDEL, 2003d).

Outros gêneros, de filogenia melhor resolvida, registrados como comuns para crostas são *Microcoleus*, *Porphyrosiphon* e *Scytonema*.

Um dos gêneros mais comuns e dominantes em crostas, principalmente na América do Norte é *Microcoleus*. Em estudos de desenvolvimento de crostas este geralmente aparece como o primeiro colonizador em solos instáveis, principalmente pela sua habilidade de se mover e agregar partículas de solo por meio de sua bainha mucilaginosa (BELNAP & LANGE, 2003; GARCIA-PICHEL, 2001; GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006).

*Porphyrosiphon*, com bainha pigmentada e também colonizador de topo de crostas, já foi registrado anteriormente para assembleias de crostas como organismo dominante (Austrália – WILLIAMS & BÜDEL, 2012; África – BELNAP, 1996). Além disso, é considerado um importante recolonizador em superfícies afetadas por longos períodos de seca, exatamente a situação em que se encontrava o ambiente amostrado durante o período de coleta. As coletas foram feitas logo após o período de chuva, ou seja, quando as populações estavam novamente tendo condições para se desenvolverem e, portanto, recolonizarem o ambiente.

Também é comum o registro de espécies de *Scytonema* em crostas biológicas, principalmente para aquelas que já atingiram um estágio desenvolvido (YEGER et al., 2004).

Os dados obtidos a partir do estudo florístico e pela identificação dos morfotipos com base nos critérios clássicos (morfologia e ecologia) revelam que muitos táxons anteriormente registrados em outras localidades também ocorrem no Brasil. Entretanto, a quantidade de populações, morfologicamente estudadas, não identificadas em nível específico comprovam a complexidade desses grupos e a presença de morfotipos ainda desconhecidos para ambientes pouco explorados.

## Referências Bibliográficas

ALWATHNANI, H. & JOHANSEN, J.R. Cyanobacteria in soil from a Mojave Desert Ecosystem. **Monogr. West. N. Am. Nat.** v. 5, p. 71-80. 2011.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 – Introduction. *Algol. Stud.*, v. 38-39, p. 291-302. 1985.

ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 3 – Oscillatoriales. *Archiv. Für. Hydrobiol./Algol. Stud.* v. 50–53, p. 327–472. 1988.

ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5 – Oscillatoriales. *Archiv. Für. Hydrobiol./Algol. Stud.* v. 59, p. 1–73. 1990.

BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003. 503 p.

BELNAP J. Soil surface disturbances in cold deserts: effects on nitrogenase activity in cyanobacterial-lichen soil crusts. *Biol. Fertil. Soils.* v. 23, p. 362–367. 1996.

BERRENDERO, E.; PERONA, E. & MATEO, PILAR. Phenotypic variability and phylogenetic relationships of the genera *Tolypothrix* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*v. 61, p. 3039-3051. 2011.

BIOLO, S. & RODRIGUES, L. Composição de algas perifíticas (exceto Bacillariophyceae) em distintos substratos naturais de um ambiente semilótico, planície de inundação do Alto Rio Paraná. *Revista. Brasil. Bot.* v. 34, n. 3, p. 307-319. 2011.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Révision des Nostocacées hétérocystées, contenues dans les principaux herbiers de France. *Ann. Sci. Nat. Bot.* v. 1, sér. 3, p. 323-381; sér. 4, p. 343-373; ser. 5, p. 51-129; sér. 7, p. 177-262, 1886-1888.

BOURRELLY, P. *Les algues d'eau douce: initiation à la systématique. Tome III. Les algues bleues et rouges*, Paris: Boubée, 1970. 512 p.

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

BÜDEL, B.; DARIENKO, T.; DEUTSCHEWITZ, K.; DOJANI, S.; FRIEDL, T.; MOHR, K. I.; SALISCH, M.; REISSER, W. & WEBER, B. Southern African Biological Soil Crusts are Ubiquitous and Highly Diverse in Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency. *Microb. Ecol.* v. 57, p. 229-247. 2009.

BÜDEL, B. Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions. **Eur. J. Phycol.** v. 34, n. 4, p. 361-370, 1999.

BÜDEL, B.; LÜTTGE, U.; STELZER, R.; HUBER, O. and MEDINA, E. Cyanobacteria of rocks and soils of the Orinoco Lowlands Guayana Uplands, Venezuela. **Bot. Acta.** v. 107, p. 422-431. 1994.

BÜDEL, B. Biological Soil Crusts of South America. In: Belnap, J. & Lange, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003a. 51-55 p.

BÜDEL, B. Biological Soil Crusts in European Temperate and Mediterranean Regions. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003b. 75-86 p.

BÜDEL, B. Biological Soil Crusts of Asia Including the Don and Volga Region. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003c. 87-94 p.

BÜDEL, B. Synopsis: Comparative Biogeography of Soil-Crust Biota. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003d. 141-152 p.

BÜDEL, B.; COLESIE, C.; GREEN, A. T. G.; GRUBE, M.; SUAU, R. L.; LOWEN-SCHNEIDER, K.; MAIER, S.; PEER, T.; PINTADO, A.; RAGGIO, J.; RUPRECHT, U.; SANCHO, L. G.; SCHROETER, B.; TÜRK, R.; WEBER, B.; WEDIN, M.; WESTBERG, M.; WILLIAMS, L. & ZHENG LINGHUAN. Improved appreciation of the functioning and importance of biological soil crusts in Europe: The Soil Crust International Project (SCIN). **Biodivers. Conserv.** v. 23, p. 1639-1958. 2014.

BÜDEL, B.; DÚLIC, T.; DARIENKO, T.; RYBALKA, N. & FRIEDL, T. Cyanobacteria and Algae of Biological Soil Crusts. In: WEBER, B.; BÜDEL, B.; BELNAP, J. (eds) *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands*, Springer Switzerland, 2016. 55-80 p.

COUTÉ, A.; TELL, G. & THÉRÉZIEN, Y. Cyanophyceae (Cyanobacteria) aérophiles de Nouvelle-Calédonie. *Cryptogamie, Algol.* v. 20, p. 301-344, 1999. DULIC, T.; MERILUOTO, J.; MALESEVIC, T. P.; GAJIC, V.; VAZIC, T.; TOKODI, N.; OBREHT, I.; KOSTIC, B.; KOSIJER, P.; KHORMALI, F. & SVIRCEV, Z. Cyanobacterial diversity and toxicity of biocrusts from the Caspian Lowland loess deposits, North Iran. *Quatern. Int.* v. 30, p. 1-12. 2016.

DESIKACHARY, T. V. Cyanophyta. New Delhi, Indian Council of Agricultural Research. 1959. 686p.

DOJANI, S.; KAUFF, F.; WEBER, B. & BÜDEL, B. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria in biological soil crusts of the Succulent Karoo and Nama Karoo of Southern Africa. *Microb. Ecol.* v. 67, p. 286-301. 2014.

DROUET, F. The Brazilian Myxophyceae. II. *Am. J. Bot.* v. 25, n. 9, p. 657-666. 1938.

ELENKIN, A. A. Ob osnovnykh principakh sistemy Cyanophyceae. About the main principles of the system of Cyanophyceae. *Sov. Bot.* v. 4, p. 51-83, 1935.

\_\_\_\_\_. Monographia algarum cyanophycearum aquis dulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum [Sinezelenye vodorosli SSSR], Pars spec. v. 2, n. 1-2, Izd. Na SSSR, Moskva-Leningrad, 1938-1949. 1908 p.

EVANS, R. D.; BELNAP, J.; GARCIA-PICHEL, F. PHILLIPS, S. L. Global Change and the Future of Biological Soil Crusts. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds) *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003. 417-429 p.

FONSECA, I. A. & RODRIGUES, L. Cianobactérias perifíticas em dois ambientes lênticos da planície de inundação do alto Rio Paraná, PR, Brasil. *Rev. Brasil. Bot.* v. 28, n.4, p. 821-834. 2005.

\_\_\_\_\_. Periphytic Cyanobacteria in different environments from the upper Paraná river floodplain, Brazil. *Acta. Limnol. Bras.* v. 19, n. 1, p. 53-65. 2007.

FRÉMY, P. Les Cyanophycées de Côtes d'Europe. *Mém. Soc. natn Sci. nat. Math. Cherbourg.* v. 41, p. 1-234, 1929-1933. \_\_\_\_\_. Les Myxophycées de l'Afrique équatoriale française. *Arch. Bot. Mém.*, v. 3, n. 2, p. 1-493, 1930.

GALUN, M. & GARTY, J. Biological Soil Crusts of the Middle East. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003. 95-106 p.

GARCIA-PICHEL, F.; JOHNSON, S. L.; YOUNGKIN, D. & BELNAP, J. Small-scale vertical distribution of bacterial biomass and diversity in biological soil crusts from arid land in the Colorado Plateau. *Microb. Ecol.* v. 46, p. 312-321. 2003.

GARCIA-PICHEL, F.; LÓPEZ-CORTÉS, A. & NÜBEL, U. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 67, p. 1902-1910. 2001.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST'S Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. 2. Aufl. Leipzig, Akademische. Verlagsgesellschaft. v. 14, 1196p. 1932.

GEITLER, L. Schizophyta (Klasse Schizophyceae). In: ENGLER; PRANTL. *Nat. Pflanzenfam.*, 1942. v. 1b, 232 p.

GOMONT, M. M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). *Ann. Sci. nat. Bot.*, sér. 7, v. 15, p. 263-368; v. 16, p. 91-264; 1892.

GUNDLAPALLY, S.R. & GARCIA-PICHEL, F. The community and phylogenetic diversity of biological soil crusts in the Colorado Plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation. *Microb. Ecol.* v. 52, p. 345-357. 2006.

HAGEMANN, M.; HENNINGSEN, P.; FELDER, V. J. M. N. L.; DRAHORAD, S. L.; BERKOWICZ, S. M.; FELIX-HENNINGSEN, P. & KAPLAN, A. Cyanobacterial Diversity

in Biological Soil Crusts along a Precipitation Gradient, Northwes Negev Desert, Israel. *Microb. Ecol.* v. 70, p. 219-230. 2015.

HENTSCHKE, G. S. & SANT'ANNA, C. L. Current trends and prospects for cyanobacterial taxonomy – are only cultured populations enough? *Algol. Stud.* v. 147, p. 3-6. 2015.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Algol. Stud.* (Cyanobacterial Research) 117: 95-115, 2005.

HROUZEK, P.; LUKESOVÁ, A.; MAREŠ, J. & VENTURA STEFANO. 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*. v. 13, n. 2, p. 201-213. 2013

IESPA, A. A. C. & SILVA, L. H. S. Laminitos microbianos e cianobactérias na lagoa Pernambuco, neógeno do Rio de Janeiro, Brasil. *Geociências*. v. 10, n. 6, p. 5-10. 2005.

ISHIBASHI, T. H. Macroalgas lóxicas do Parque Nacional Chapada dos Veadeiros e arredores (GO): Levantamento florístico e distribuição ecológica das comunidades. 2013. 99f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Rio Claro. 2013.

IZAGUIRRE, I.; O'FARRELL, I.; UNREIN, F. SINISTRO, R.; AFONSO, M. S. & TELL, G. Algal assemblages across a wetland, from a shallow lake to relictual oxbow lakes (Lower Paraná River, South America). *Hydrobiologia*. v. 511, p. 25-36. 2004.

KASTOVSKÁ, K.; ELSTER, J.; STIBAL, M. & SANTRUCKOVÁ, H. Microbial assemblages in soil microbial succession after glacial retreat in Svalbard (High Arctic). *Microb. Ecol.* v. 50, p. 396-407. 2005.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 – Chroococcales. *Archiv. Für. Hydrobiol./Algol. Stud.* v. 43, p. 157–226. 1986.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. *Archiv. Für. Hydrobiol./Algol. Stud.* v. 56, p. 247– 345.

KOMÁREK, J. Cyanoprokaryota 3. Teil: Heterocytous Genera. In: BÜDEL, B.; GÄRTNER, G.; KRIENITZ, L.; SCHAGERI, M. (eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. 1130 p.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Heidelberg: Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759p.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J. & JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using polyphasic approach. **Preslia**. v. 86, p. 295-335. 2014.

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**. v. 639, p. 245-259. 2010.

LEMES-DA-SILVA, N. M.; BRANCO, L. H. Z. & NECCHI, O. Corticolous cyanobacteria from tropical forest remnants in northwestern São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Bot.** v. 35, n.2, p. 169-179. 2012.

MAESTRE, F. T.; MARTIN, N.; DÍEZ, B.; LÓPEZ-POMA, R.; SANTOS, F.; LUQUE, I. & CORTINA, J. Watering, fertilization, and slurry inoculation promote recovery of biological crust function in degraded soils. **Microb. Ecol.** v. 52, p. 365-377. 2006.

MAREŠ, J. *Anabaena fuscovaginata* (Nostocales), a new cyanobacterial species from periphyton of the freshwater alkaline marsh of Everglades, South Florida, USA. **Fottea**. v. 10, n. 2, p. 235-243. 2010.

MÜHLSTEINOVÁ, R. JOHANSEN, J. PIETRASIAK, N. MARTIN, M. P. OSORIO-SANTOS, K. & WARREN, S. D. Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*. **Phytotaxa**. v. 163, n. 5, p. 241-261. 2014.



- NECCHI, O. J.; BRANCO, L. H. Z. & DIP, M. R. Uso de macroalgas para avaliação de poluição orgânica no Rio Preto, Noroeste do Estado de São Paulo. *An. Acad. Bras. Ciênc.* v. 66, n. 3, p. 359-371. 1994.
- PEREIRA, J. L. & BRANCO, L. H. Z. Macroalgas em nascentes e arredores de riachos na região noroeste do Estado de São Paulo. *Hoehnea*. v. 37, n.3, p. 435-444. 2010.
- PORTER R.D.. DNA transformation. *Methods in Enzymology*. v. 167, p. 703–712. 1998.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* v. 111, p. 1-61. 1979.
- ROSENTRETER, R. & BELNAP, J. Biological Soil Crusts of North America. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds) *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, 2003. 31-50 p.
- ROUSSOMOUSTAKAKI, M. Cyanophyta from soils of Euboea Island (Hellas). 1983. Tese – Universidade de Atenas, Departamento de Biologia. Atenas. 1983.
- SANT'ANNA, C. L. & AZEVEDO, M. T. P. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State. *Nova Hedwigia*. v. 60, p. 19-58.
- SANT'ANNA, C. L.; KAŠTOVSKÝ, J.; HENTSCHKE, G. S. & KOMÁREK, J. Phenotypic studies on terrestrial stigonematacean Cyanobacteria from the Atlantic Rainforest, São Paulo State, Brazil. *Phytotaxa*. v.89, n. 1, p. 1-23. 2013.
- SCHULZ, K.; MIKHAILYUK, T.; DREBLER, M.; LEINWEBER, P.; KARSTEN, U. Biological soil crusts from coastal dunes at the Baltic Sea: Cyanobacterial and algal biodiversity and Related Soil Properties. *Microb. Ecol.* V. 71, p. 178-193. 2016.
- SENNA, P. A. C. & CAMPOS, I. F. P. Nostocophyceae (Cyanophyceae) da Lagoa Bonita, Distrito Federal, Brasil. Parte 1. *Acta Bot. bras.* v. 2, p. 7-30. 1988.

SILVA, L. H. S.; DAMAZIO, C. M. & IESPA, A. A. C. Registro de biolaminoides poligonais na lagoa de Aruruama, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista de Geologia*. v. 18, n. 2, p. 153-158. 2005.

STARMACH, K. Cyanophyta – sinice, Glaucophyta – glaukofity. **Flora slodkow**. Polski, Pwn Warszawa. v. 2, p. 1-808. 1966.

THIERS, B. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

THURET, G. Essai de classification des Nostochinées. **Ann. Sci. Nat. Bot.** v. 1, sér. 6, p. 372-382, 1875.

TIRKEY, J. & ADHIRAKY, S. P. Blue green algae in the biological soil crusts of different regions of india. **Feddes Repert.** v. 117, p. 280-306. 2006.

ULLMANN, I. & BÜDEL, B. Biological soil crusts of Africa. In: BELNAP, J. & LANGE, O. L. (eds). *Biological Soil Crusts: structure, function, and management*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003. 107-118 p.

WEBER, B.; BÜDEL, B.; BELNAP, J. (eds) *Biological Soil Crusts: an organizing principle in drylands*, Springer Switzerland, 2016. 549 p.

WILLIAMS, W. J. & BÜDEL, B. Species diversity, biomass and long-term patterns of biological soil crusts with special focus on Cyanobacteria of the *Acacia aneua* Mulga Lands od Queensland, Australia. **Algol. Stud.** v. 140, p. 23-50. 2012.

YEAGER, C. M.; KORNOSKY, J. L.; HOUSMAN, D. C.; GROTE, E. E.; BELNAP, J. & KUSKE, C. R. Diazotrophic community structure and function in two sucessional stages of biological soil crusts from Colorado Plateau and Chihuahuan Desert. **App. Environ. Microbiol.** v. 70, n.2, p. 973-983. 2004.

## Capítulo III – Análises moleculares e filogenia de cianobactérias de crostas biológicas

---

### Resumo

Após as décadas de 1980 e 1990 os sistemas de classificação tradicionais para cianobactérias começaram a sofrer mudanças mais profundas, que se deram pelo emprego de uma abordagem chamada “polifásica”. A partir desta abordagem começaram a ser utilizadas informações do gene 16S rRNA, que resultaram na separação de muitas espécies crípticas e na ampliação dos conhecimentos sobre a filogenia de cianobactérias. Entretanto, mesmo após a superação da tradicional taxonomia e a aplicação da abordagem polifásica (considerando a biologia molecular), a principal questão ainda continua sendo quais seriam os melhores métodos para a definição de entidades taxonômicas. Limites que consideravam porcentagens para que se fosse definida a relação entre duas sequências de 16S rRNA têm-se demonstrado falhos, e o mesmo gene passou a ter sua acuracidade questionada para análises em nível subgenérico. Portanto, atualmente tem sido proposta a utilização de segundos marcadores moleculares, como a região espaçadora interna transcrita (ITS) 16S-23S. Considerando este contexto, análises moleculares foram geradas com o objetivo de caracterizar as populações selecionadas, confirmar ou não as identificações morfológicas feitas anteriormente e fornecer informações em abordagens filogenéticas. Para isto cepas cultivadas tiveram seus materiais genéticos acessados por meio da amplificação e sequenciamento do gene 16s rRNA e do ITS 16S-23S. As sequências geradas foram submetidas a análises filogenéticas, sendo as de 16S rRNA alinhadas com várias outras sequências de banco de dados (*GenBank*) e posteriormente utilizadas para a geração de árvores filogenéticas a partir de critérios de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB). Foram obtidas 19 sequências de 16S rRNA, separadas em 13 clados compostos por sequências de *Leptolyngbya* (quatro clados), *Porphorosiphon*, *Phormidium* (clado previamente proposto como gênero novo), *Calothrix*, *Brasilonema*, *Stigonema*, *Nostoc* (três clados) e *Desmonostoc*, além de, provavelmente, um gênero novo. Já as sequências de ITS 16S-23S tiveram suas estruturas secundárias geradas e comparadas entre si, se mostrando informativo para alguns clados. As análises moleculares, portanto, enfatizaram e contribuíram com a problemática polifilia encontrada em inúmeros gêneros, reafirmaram a existência de um novo gênero próximo a *Wilmottia* e *Microcoleus* e propuseram a definição de outro novo gênero. Confirmando assim, a necessidade da manutenção e ampliação dos estudos com crostas biológicas, por estas serem comunidades pouco exploradas e que devem guardar grande diversidade não acessada.

## Introdução

Os sistemas de classificação tradicionais para cianobactérias, basicamente alicerçados na morfologia (THURET, 1875; BORNET & FLAHAULT, 1886-1888; GOMONT, 1892; GEITLER, 1932 e BOURRELLY, 1970), começaram a sofrer mudanças mais profundas nas décadas de 1980 e 1990. Jiří Komárek e Konstantinos Anagnostidis desenvolveram uma extensa revisão, utilizando além dos morfológicos, critérios bioquímicos, ecológicos e ultraestruturais, empregando uma abordagem chamada “polifásica” para a classificação das cianobactérias. O resultado foi um novo sistema baseado em estudos com ferramentas de diferentes naturezas e construído segundo critérios mais atualizados (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1985; 1990; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989; 1998; 2005). No trabalho publicado em 1985, Anagnostidis e Komárek dividiram o grupo em quatro ordens, Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales.

Em 2005, Hoffmann et al. readequaram o sistema de classificação anterior principalmente utilizando as informações do 16S rRNA, o que resultou em muitas linhas evolutivas compostas por organismos cocoides e filamentosos e na monofilia de todos os organismos heterocitados. A partir dessa ferramenta muitas espécies foram consideradas como crípticas e separadas (BOYER et al., 2002; CASAMATTA et al. 2003; PREMANANDH et al., 2009), comprovando a limitação dos dados morfológicos e ampliando ainda mais os conhecimentos sobre a filogenia de cianobactérias.

Entretanto, mesmo após a superação da tradicional taxonomia e a aplicação de uma abordagem polifásica considerando a biologia molecular, a principal questão ainda continua sendo quais seriam os melhores métodos para a definição de entidades taxonômicas.

Limites baseados no método de hibridização DNA-DNA para 16S rRNA em bactérias, que consideravam porcentagens para que se fosse definida a relação entre duas sequências, têm-se demonstrado falhos (KASTOVSKÝ et al., 2014; REHÁKOVÁ et al., 2014; BOHUNICKÁ et al., 2015). A utilização do mesmo gene (16S rRNA) para análises filogenéticas em nível subgenérico passou a ter sua acuracidade questionada, devido ao fato de ser um gene muito conservado (FOX et al., 1992; LU, 1999; ITEMAN et al., 2000; BOYER et al., 2001). Portanto, atualmente tem sido proposta a utilização de marcadores moleculares adicionais, como é o caso da região espaçadora interna transcrita (ITS) 16S-23S (ITEMAN et al., 2000; BOYER et al., 2001).

O ITS 16S-23S é a região menos conservada entre as regiões da menor ou da maior subunidade do RNA ribossômico, tendo vantagem sobre o gene 16S rRNA (JOHANSEN et al., 2011). Além disso, as estruturas secundárias do mesmo têm se mostrado muito mais

conservadas do que a própria sequência (FOX, 1975), configurando-se em uma boa ferramenta para análises filogenéticas.

Para as análises de ITS 16S-23S também são relevantes a presença ou ausência de RNA transportadores (tRNA), pois eles têm se mostrado uma ferramenta informativa para análises filogenéticas. Esta afirmação é embasada, por exemplo, no estudo de Boyer et al. (2001) que enumerou dados relevantes, como os encontrados em Archaea, em que membros de Crenarchaeota não apresentam tRNA, enquanto os membros de Euryarchaeota apresentam tRNA<sup>Ala</sup>; também como entre os Eubacteria, em que os membros primitivos de Aquificales e Thermotoga apresentam ambos tRNA<sup>Ile</sup> e tRNA<sup>Ala</sup>.

Considerando este contexto, análises moleculares com material previamente identificado em nível taxonômico foram geradas com objetivo de caracterizar as populações selecionadas, confirmar ou não as identificações morfológicas feitas anteriormente e fornecer informações em abordagens filogenéticas.

## **Material e Métodos**

### **Cultivo**

A separação de espécimes para cultivo foi realizada sob microscópio estereoscópico a partir das crostas coletadas, mas também porções de solo foram inoculadas. Os espécimes isolados e as porções de solo foram inoculados nos meios de cultura BG11 (RIPPKA et al. 1979) e/ou Bold (NICHOLS 1973). As condições de crescimento foram temperatura 20°C ±1°C, irradiância 50 μmol fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. Periodicamente (cerca de 20 dias), os cultivos foram inspecionados e, quando necessário, procedimentos de isolamento foram feitos pelo método de “pescaria” (RIPPKA, 1988).

### **Extração de DNA genômico e amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do gene 16S rRNA e da região espaçadora interna transcrita 16S-23S (ITS)**

A partir de culturas uniespecíficas e utilizando-se uma maior massa de indivíduos, o DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit *MoBio PowerSoil DNA Isolation* (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

Também foram realizadas extrações de DNA a partir de poucas células. A obtenção de cinco a 10 células isoladas ou de pequenas porções de tricomas foi feita pelo método de

“pescaria”, seguindo as orientações de Rippka (1988), e utilizando tampão TBE. A partir do conjunto inicial de células, foi utilizado o *kit Illustra Single Cell Genomiphi DNA Amplification* (GE Healthcare Life Sciences) para a amplificação do genoma total do organismo, de acordo com as instruções do fabricante.

A amplificação dos genes 16S rRNA e ITS 16S-23S foi realizada utilizando-se os *primers* 359F (NÜBEL et al., 1997) e 23S30R (TATON et al., 2003). Cada reação consistiu em 5 µL de tampão de PCR 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 µmol de cada iniciador, 1,5 U de *Platinum® Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 10 ng de DNA, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para um volume final de 25 µL. A termociclagem foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1,5 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. O resultado da amplificação foi verificado em gel de agarose 1% após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5 X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Como padrão de tamanho de DNA, foi utilizado o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

### **Clonagem, transformação e PCR de colônias**

A clonagem das sequências produzidas na PCR foi feita utilizando-se o *kit* de clonagem *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita por meio de choque térmico, segundo as orientações de Sambrook et al. (1989). Após o plaqueamento em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) contendo ampicilina e X-Gal, cinco colônias de cor branca foram selecionadas e utilizadas para novas reações de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 µL de reação de PCR (conforme descrito no item 3.4.1.), contendo os iniciadores CYA359F, CYA781a e CYA781b (NÜBEL et al., 1997). O ciclo utilizado para amplificação foi de 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 7 minutos.

### **Extração do DNA plasmidial**

As colônias brancas selecionadas foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido e cultivadas por 15 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm. Após este período de incubação, foi iniciada a extração de plasmídeo das células de *E. coli* DH5α com o *kit GeneJET™ Plasmid Miniprep* (Fermentas Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante.

iniciada a extração de plasmídeo das células de *E. coli* DH5 $\alpha$  com o kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante.

### **Sequenciamento e processamento das sequências**

A reação PCR para o sequenciamento dos fragmentos dos genes 16S rRNA e ITS 16S-23S foi feita usando-se o *kit Big Dye Terminator*, versão 3.0 (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados foram 359F (NÜBEL et al., 1997), 704R, 1114F, 1494R (NEILAN et al., 1997) e 23S30R (TATON et al., 2003).

Posteriormente, os microtubos com as reações precipitadas foram enviados para sequenciamento em empresa comercial.

### **Análises filogenéticas do gene 16S rRNA**

As sequências de 16S rRNA obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; ALTSCHUL et al., 1990). A partir destas sequências e de outras selecionadas no *GenBank*, foi realizado alinhamento por meio do programa ClustalW 1.8 (THOMPSON et al., 1994) implementado no programa MEGA 5.1 (TAMURA et al., 2011), com verificação manual posteriormente.

As árvores filogenéticas foram construídas com os critérios de *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB). Para a análise de NJ, utilizou-se o programa MEGA 5.1 (TAMURA et al., 2011) e, para a análise de ML, utilizou-se a ferramenta “RAxML-HPC2 Workflow on XSEDE” disponível em CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010). Em ambas, a robustez das árvores construídas foi estimada por meio da análise de reamostragem (*bootstrap*) para 1.000 replicações. Também foi gerada árvore segundo análise bayesiana, utilizando-se o programa *MrBayes 3.1.2* (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001), com os parâmetros fixados em duas corridas com 6.000.000 de gerações, quatro cadeias e amostragem a cada 1000 árvores. O nível de corte (*burn-in*) foi avaliado pelo programa *Tracer v1.4* (RAMBAUT & DRUMMOND, 2007). A linhagem *Gloeobacter violaceus* (acesso GenBank NR\_074282) figurou como grupo externo.

### **Região espaçadora interna transcrita 16S-23S (ITS)**

As regiões conservadas, D1-D1', D2, D3, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>ala</sup>, V4, Box-B e Box-A foram identificadas em cada sequência produzida, baseadas nos domínios conservados validados por

Iteman et al. (2000) (Figura 1). As regiões D2, D3, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, V4 e Box-A, raramente, apresentam modificação em alguns pares de bases, dessa forma, as identificações foram feitas baseadas apenas na semelhança entre as sequências produzidas e os domínios validados. Já as regiões D1-D1', Box-B e V3 são variáveis, sendo assim, as identificações foram confirmadas através da estrutura secundária (que deve formar hélices) geradas pelo programa Mfold versão 3.2 (ZUKER, 2003).



Figura 1. Esquema representativo das regiões conservadas da ITS 16S-23S modificado de Iteman et al. (2000).

## Resultados e Discussão

### Estudos de identificação

Foram estudadas 31 populações, das quais 19 tiveram o material genético acessado. Estas foram analisadas segundo critérios morfológicos e ecológicos e identificadas (Capítulo I) como seis diferentes gêneros, sendo *Hapalosiphon* (com duas espécies/morfotipos), *Nostoc* e *Leptolyngyba* (com cinco cada), *Stigonema* e *Calothrix* (com duas cada) e *Brasilonema*, *Phormidium* e *Porphyrosiphon* (com uma cada). Do total, seis linhagens foram identificadas em nível específico, enquanto 13, apenas em nível genérico, por não apresentarem similaridade morfológica e/ou ecológica com nenhuma espécie pertencente ao referido gênero.

### Análise das sequências de 16S rRNA e do ITS 16S-23S

Os estudos moleculares resultaram em 19 sequências de 16S rRNA e 18 de ITS 16S-23S, provenientes das 31 populações estudadas. As 18 sequências de ITS 16S-23S apresentaram entre 261 e 636 nucleotídeos, com as regiões mais conservadas correspondendo aos tRNA<sup>Ile</sup> e tRNA<sup>Ala</sup> (Tabela 7). Enquanto as sequências de 16S rRNA foram comparadas pela ferramenta *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) com outras sequências submetidas no *GenBank*, apresentando identidade variando de 96 a 99% (Tabela 1).



Foram então, geradas árvores filogenéticas pelos critérios de Neighbor Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB). A árvore de ML foi apresentada por ter apresentado menos parafilias, e compila os dados das demais análises (Figura 2).

Dos gêneros inseridos na análise, *Desmonostoc*, *Rohotiella*, *Stigonema*, *Brasilonema*, *Arthrospira*, *Wilmottia*, *Pantanalinema* e *Phormidesmis* formaram clados bem suportados e monofiléticos. As demais Nostocales, que não foram citadas anteriormente, principalmente *Nostoc* e *Calothrix*, apareceram em mais de um clado, indicando caráter polifilético. O mesmo foi observado para outras *Oscillatoriales*, principalmente para gêneros *Phormidium*, *Microcoleus* e *Leptolyngbya*.

Tabela 1. Identidade das sequências do 16S rRNA das linhagens estudadas comparadas com sequências de cianobactérias do GenBank (NCBI).

Organismo	Tamanho (pb)	I (%)	C (%)	Organismo mais próximo (nº de acesso)
1FUR	1167	97	100	<i>Brasilonema angustatum</i> (HQ847566.1)
1GO	1167	97	99	<i>Scytonema</i> sp. (KC854780.1)
1CIP	1166	99	100	<i>Desmonostoc</i> sp. (KF761564.1)
2FUR	1166	98	100	<i>Nostoc</i> sp. (KF359705.1)
2CAN	1165	97	100	<i>Nostoc muscorum</i> (HF678508.1)
3FUR	1108	97	99	<i>Nostoc</i> sp. (AM711543.1)
2GO	1165	98	99	<i>Nostoc</i> sp. (AM711543.1)
3GO	1166	99	100	<i>Brasilonema octagenarum</i> (HQ847562.1)
6CAN	1038	97	100	<i>Stigonema</i> sp. (KC854773.1)
7CAN	1165	98	100	<i>Stigonema dinghuense</i> (KJ786940.1)
9CAN	1165	98	100	<i>Calothrix</i> sp. (KT336448.1)
5FUR	1163	99	98	<i>Calothrix</i> sp. (AJ133164.1)
3CIP	1164	99	99	<i>Phormidium</i> sp. (EF654082.1)
6FUR	1163	96	99	<i>Phormidesmis</i> sp. (KJ939042.1)
10CAN	1108	97	99	<i>Leptolyngbya</i> sp. (AP017380.1)
11CAN	1164	96	99	<i>Leptolyngbya appalachiana</i> (EF429286.1)
7FUR	1165	97	99	Cyanobacteria não cultivada (DQ181685.1)
13CAN	1165	99	99	<i>Phormidium</i> sp. (EU196618)
9FUR	1455	98	100	Bactéria não cultivada (FJ230801.1)

I = Identidade; C= Cobertura; pb = pares de bases

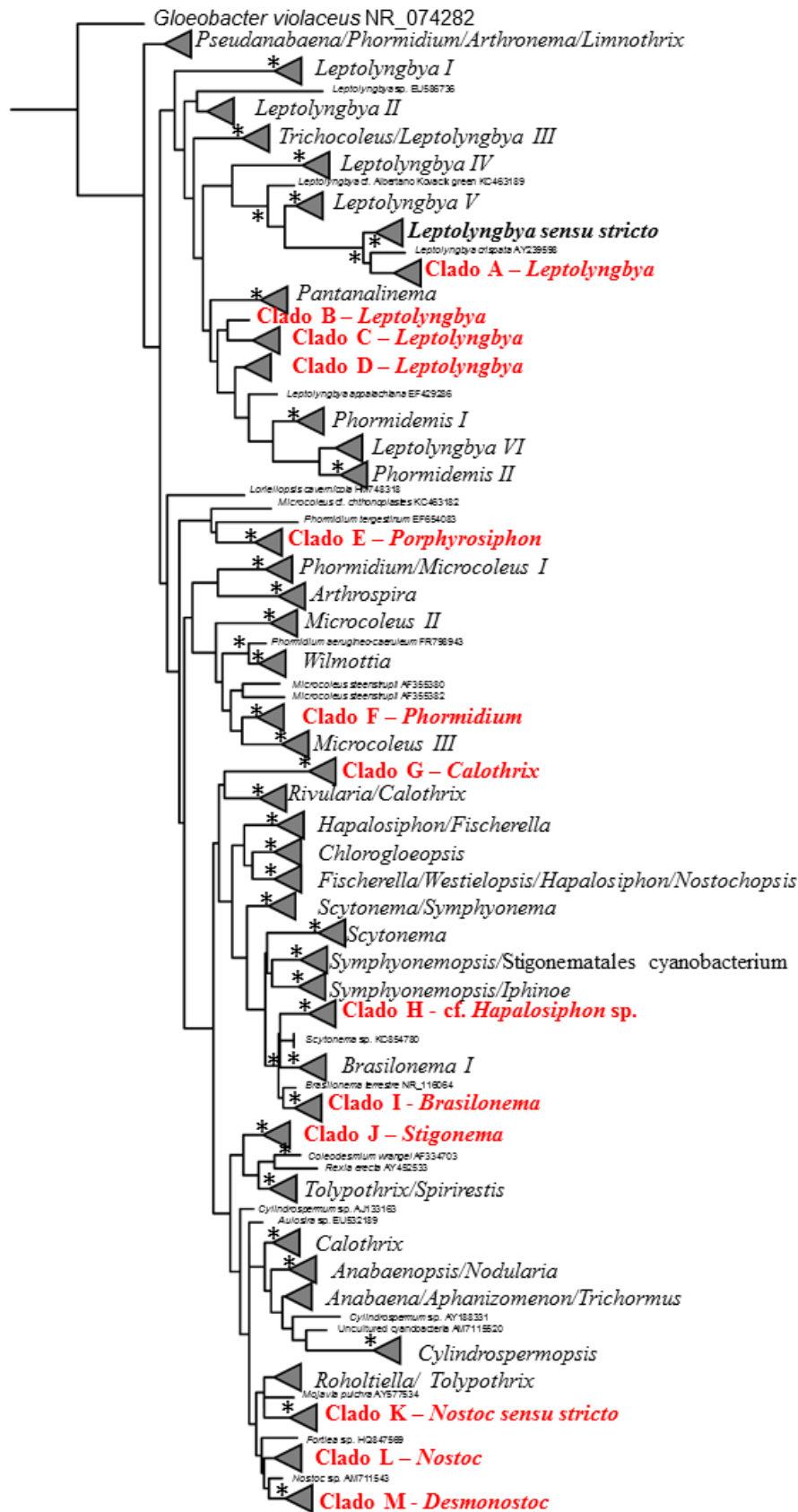


Figura 2. Árvore consenso construída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) do gene 16S de 19 linhagens sequenciadas neste estudo (inseridas nos clados destacados em vermelho) e 201 linhagens disponíveis no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* acima de 70% para os métodos de ML, NJ e de 0,7 de probabilidade posterior estão representados junto aos ramos por asterísco (\*). Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.

Entre as cinco amostras estudadas identificadas morfológicamente como pertencentes ao gênero *Leptolyngbya*, nenhuma se dispôs dentro do clado de *Leptolyngbya sensu-stricto*, composto pela espécie tipo, *Leptolyngbya boryana* (Gomont) Anagnostidis & Komárek. Ao contrário, *Leptolyngbya* mostrou-se altamente polifilético, com representantes distribuídos em vários clados da árvore, confirmando estudos prévios (CASAMATTA et al., 2005; JOHANSEN et al., 2011) e enfatizando a necessidade de revisão do grupo e proposição de novos gêneros.

Das amostras estudadas quatro dispuseram-se em três diferentes clados (Figura 3 - Clados A, B, C) e 7FUR se posicionou sozinha e separada. A disposição dos clados foi confirmada pelas similaridades entre as sequências (Tabela 2).

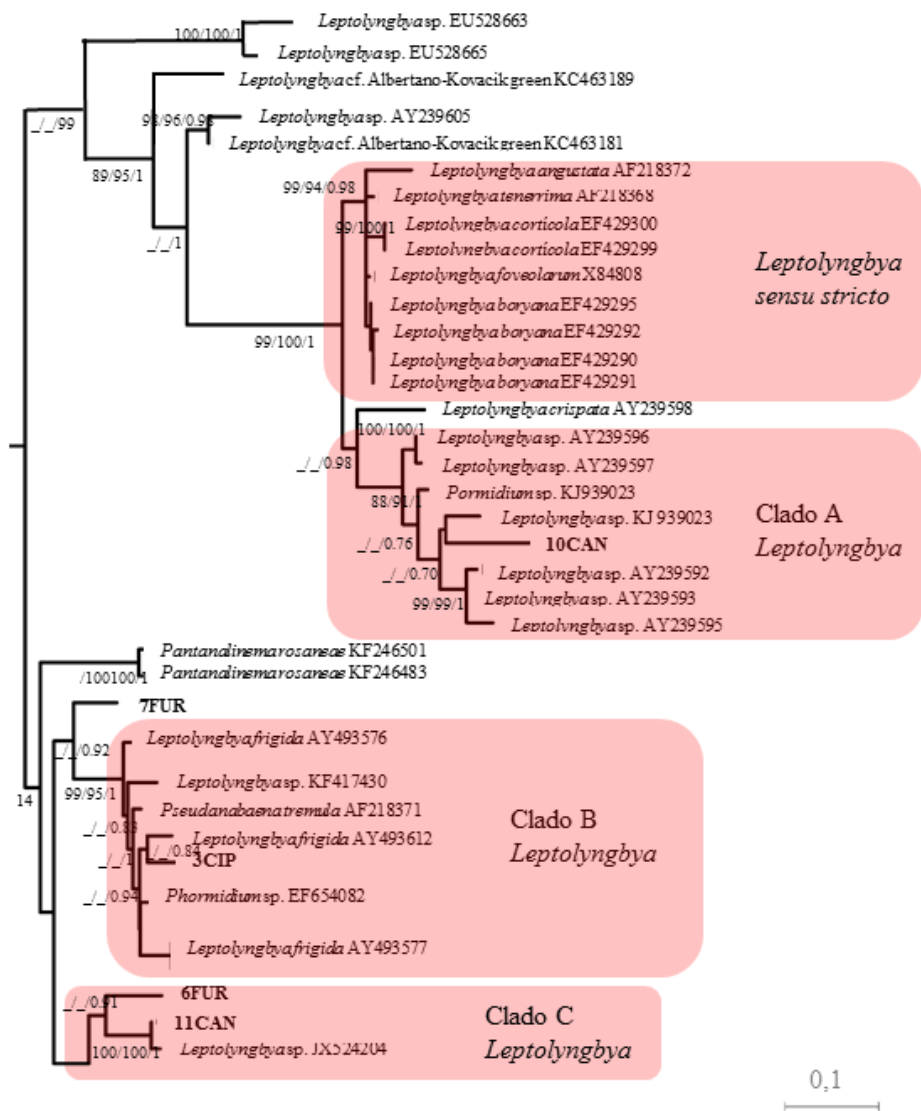


Figura 3. Detalhe dos clados A, B e C. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene 16S rRNA mostrando a posição das sequências obtidas neste estudo (negrito). Números próximos aos nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 70%, para os critérios de NJ e ML e maiores que 0,7 para os critérios de IB, respectivamente. Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.

A amostra 10CAN, morfológicamente identificada como *Leptolyngbya* sp.1 posicionou-se no clado A, um clado bem suportado estatisticamente e formado por outras linhagens de *Leptolyngbya* sp. provenientes de solo de deserto (*Leptolyngbya* SEV's – CASAMATTA et al., 2005).

O clado B (Figura 3) apresentou alto suporte e mostrou-se relacionado à amostra 7FUR (morfológicamente identificada como *Leptolyngbya* sp.3) porém esta relação apresentou baixo suporte para as análises de ML e BI, dessa forma, 7FUR foi considerada separada. Este fato também foi comprovado pela maior similaridade entre as sequências de 16S rRNA do clado B entre si do que em relação a amostra 7FUR (Tabela 2). Dentro do clado B, observou-se uma relação consistente entre a amostra 3CIP e outras linhagens de *L. frigida*, uma linhagem *Phormidium* sp. (EF654082), uma linhagem *Leptolyngbya* sp. (AY493612) encontrada em caverna de lava no Havaí e uma linhagem de *Pseudanabaena tremula* amostrada em substrato bentônico no Canadá, com morfologia também similar à *Leptolyngbya frigida*, todas provavelmente pertencentes à mesma espécie.

O clado C (Figura 3) foi formado pelas amostras 6FUR, 11CAN (morfológicamente identificadas como *Leptolyngbya* cf. *henningsii* e *Leptolyngbya* sp.2, respectivamente) e uma linhagem de *Leptolyngbya* sp. (JX524204) proveniente de uma caverna de lava no Havaí. O suporte foi baixo para as análises ML e NJ, entretanto, todas as análises mostraram forte relação entre 11CAN e *Leptolyngbya* sp.

As sequências de ITS 16S-23S para as amostras identificadas como *Leptolyngbya* registraram uma variação de 331 a 552 pb, todas apresentaram ambos os tRNA e foi possível notar um padrão coincidente com os resultados de 16S rRNA para as regiões D1-D1', em que a amostra 10CAN apresentou estrutura mais diferenciada quando em comparação com as outras amostras estudadas. Já as estruturas secundárias geradas a partir da região BOX-B e V3 mostraram-se arbitrarias, aproximando linhagens que se mostraram claramente separadas nas análises de 16S rRNA (Figuras 8, 10 e 11).

Tabela 2. Similaridade (porcentagem na porção inferior) e divergência de nucleotídeos (número absoluto na porção superior) entre as sequências de 16S rRNA das principais linhagens de *Leptolyngbya* no presente estudo

Espécie/linhagem (código <i>GenBank</i> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>1. 6FUR</b>	-	31	45	52	93	66	34	55	49	44
<b>2. 11CAN</b>	97.2	-	36	59	94	67	3	59	62	55
<b>3. 7FUR</b>	96.0	96.8	-	46	102	69	37	40	44	39
<b>4. 3CIP</b>	95.3	94.7	95.9	-	108	76	60	28	20	21
<b>5. 10CAN</b>	91.2	91.1	90.3	89.7	-	83	96	104	108	104
<b>6. <i>Phormidemis</i> sp. (KU219713)</b>	94.0	93.9	93.7	93.0	92.1	-	68	69	72	65
<b>7. <i>Leptolyngbya</i> sp. (JX524204)</b>	96.8	99.7	96.5	94.4	90.4	93.5	-	59	72	67
<b>8. <i>Leptolyngbya</i> sp. (KF417430)</b>	95.1	94.7	96.4	97.5	90.1	93.7	94.5	-	21	19
<b>9. <i>Leptolyngbya frigida</i> (AY493577)</b>	95.6	94.5	96.1	98.2	89.8	93.4	94.5	98.2	-	16
<b>10. <i>Leptolyngbya frigida</i> (AY493576)</b>	96.0	95.1	96.5	98.1	90.1	94.0	94.8	98.3	98.8	-
<b>11. <i>Leptolyngbya frigida</i> (AY493612)</b>	96.3	95.0	95.9	98.1	90.1	94.0	94.4	97.8	98.4	98.2
<b>12. <i>Phormidium</i> sp. (EF654082)</b>	95.8	95.1	96.5	98.7	89.8	93.3	95.0	98.4	99.1	98.8
<b>13. <i>Pseudanabaena tremula</i> (AF218371)</b>	95.5	94.6	96.4	98.2	89.3	93.4	94.9	98.5	98.8	98.7
<b>14. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239597)</b>	90.6	91.3	89.7	89.4	95.7	91.4	91.0	89.3	89.9	89.9
<b>15. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239596)</b>	90.8	91.5	89.9	89.6	95.9	91.7	91.2	89.5	90.1	90.1
<b>16. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (KJ939023)</b>	91.1	91.5	90.4	89.8	96.6	92.1	91.0	90.6	90.3	90.3
<b>17. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239598)</b>	90.0	91.5	89.7	90.3	94.7	91.9	91.5	90.2	90.1	90.1
<b>18. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239595)</b>	89.7	90.6	89.0	88.0	95.1	90.9	90.6	88.8	88.2	88.4
<b>19. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239592)</b>	90.1	91.0	89.4	88.6	96.1	91.7	91.0	89.2	88.8	88.8
<b>20. <i>Leptolyngbya boryana</i> (EF429291)</b>	91.9	92.3	91.3	91.2	95.1	92.2	91.6	91.6	91.8	91.6
<b>21. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239593)</b>	90.5	91.2	89.8	88.8	96.2	92.2	91.2	89.6	89.2	89.2
<b>22. <i>Leptolyngbya boryana</i> (EF429290)</b>	91.5	91.9	90.9	91.0	95.4	92.2	91.2	91.5	91.6	91.5

Tabela 2: cont.

Espécie/linhagem (código GenBank)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<b>1. 6FUR</b>	41	47	49	94	92	99	100	103	99	90	95	88
<b>2. 11CAN</b>	56	54	58	87	85	94	85	94	90	86	88	84
<b>3. 7FUR</b>	46	39	39	103	101	107	103	110	106	97	102	95
<b>4. 3CIP</b>	21	15	19	106	104	113	97	120	114	98	112	94
<b>5. 10CAN</b>	104	107	109	41	39	36	50	46	37	52	36	48
<b>6. <i>Phormidemis</i> sp. (KU219713)</b>	66	73	70	84	82	86	80	89	82	85	79	81
<b>7. <i>Leptolyngbya</i> sp. (JX524204)</b>	70	64	65	90	88	96	85	94	90	89	88	87
<b>8. <i>Leptolyngbya</i> sp. (KF417430)</b>	25	18	16	107	105	104	98	112	108	93	104	89
<b>9. <i>Leptolyngbya frigida</i> (AY493577)</b>	22	12	16	102	100	108	100	119	113	92	109	88
<b>10. <i>Leptolyngbya frigida</i> (AY493576)</b>	23	16	17	101	99	108	99	116	112	93	108	88
<b>11. <i>Leptolyngbya frigida</i> (AY493612)</b>	-	19	22	97	95	100	93	111	105	89	101	85
<b>12. <i>Phormidium</i> sp. (EF654082)</b>	98.5	-	12	104	102	109	96	119	113	96	111	92
<b>13. <i>Pseudanabaena tremula</i> (AF218371)</b>	98.3	99.1	-	104	102	107	100	116	112	98	108	94
<b>14. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239597)</b>	90.3	89.6	89.6	-	2	26	42	34	28	38	24	33
<b>15. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239596)</b>	90.5	89.8	89.8	99.8	-	24	42	32	26	36	22	32
<b>16. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (KJ939023)</b>	91.0	90.2	90.1	97.4	97.6	-	39	32	26	41	22	38
<b>17. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239598)</b>	90.7	90.4	90.0	95.8	95.8	96.1	-	46	38	38	38	37
<b>18. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239595)</b>	88.9	88.1	88.4	96.6	96.8	96.8	95.4	-	14	51	10	47
<b>19. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239592)</b>	89.5	88.7	88.8	97.2	97.4	97.4	96.2	98.6	-	43	4	29
<b>20. <i>Leptolyngbya boryana</i> (EF429291)</b>	92.0	91.4	90.9	96.2	96.4	96.3	96.2	94.9	95.7	-	41	0
<b>21. <i>Leptolyngbya</i> sp. SEV (AY239593)</b>	89.9	88.9	89.2	97.6	97.8	97.8	96.2	99.0	99.6	95.9	-	37
<b>22. <i>Leptolyngbya boryana</i> (EF429290)</b>	91.8	91.2	90.7	96.5	96.7	96.4	96.0	95.0	95.8	100	96.0	

O clado D (Figura 3) apresentou alto suporte (99%, 99%, 1) e foi formado pela amostra 9FUR, identificada como *Porphyrosiphon notarisii*, juntamente com uma linhagem ainda não publicada. Entretanto, esta última foi defendida em prévio estudo como também pertencente ao gênero, segundo características morfológicas e moleculares (MARTINS, 2014). Ambas apresentaram similaridade de 97,3% entre suas sequências, um valor considerável, mas que não permite a conclusão se ambas pertencem ou não à mesma espécie. Para isto, seriam necessárias mais linhagens para realização de análises mais bem suportadas (Figura 3- Clado D).

A amostra 13CAN formou um clado bem suportado para as três análises (Figura 3 - Clado E) com uma linhagem de *Phormidium* sp. (EU196618), linhagem esta amostrada no Brasil e citada em estudos prévios como relacionada a *Wilmottia* (LOKER, 2007; STRUNECKÝ, 2011), fato também observado neste trabalho (Figura 3).

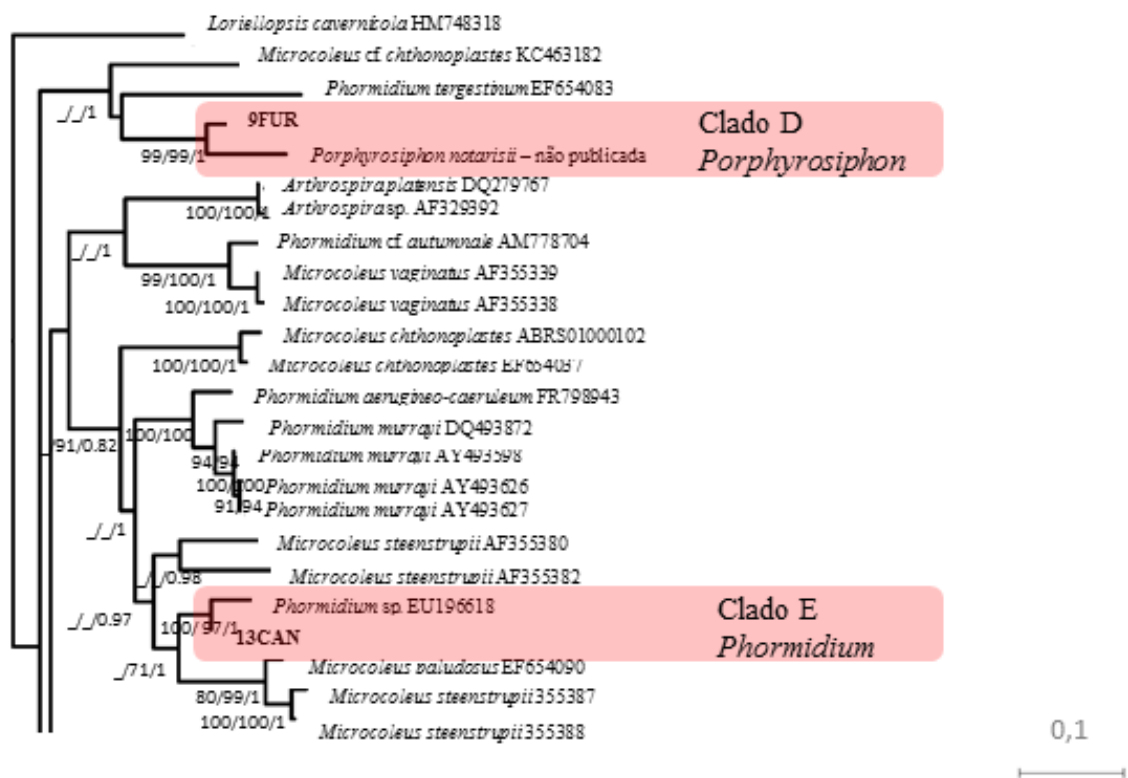


Figura 3. Detalhe dos clados D e E. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene 16S rRNA mostrando a posição das sequências obtidas neste estudo (negrito). Números próximos aos nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 70%, para os critérios de NJ e ML e maiores que 0,7 para os critérios de IB, respectivamente. Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.

Martins (2014) demonstrou a formação de um clado altamente suportado composto por linhagens identificadas como *Phormidium* sp. e pela linhagem do *GenBank* (*Phormidium* sp. - EU196618), e propôs a separação do mesmo como um gênero distinto. Dentre as

linhagens avaliadas pela autora, todas apresentaram morfologia similar à da amostra 13CAN, inclusive em relação à característica principal do grupo, células apicais cilíndrico-arredondas a levemente. As amostras 9CAN e 5FUR, identificadas respectivamente como *Calothrix* sp.1 e *Calothrix* sp.2, ficaram agrupadas no clado F, apresentando alto suporte para todas as análises (100%, 100%, 1 – Figura 4). As análises de similaridade entre as sequências de 16S rRNA para todas as linhagens do clado resultaram em uma variação de 95,1 a 99,7% (Tabela 3). Entretanto, outras sequências de *Calothrix* retiradas do banco de dados posicionaram-se em um clado diferente, coincidindo com estudos prévios em que foi comprovada a polifilia do gênero (SIHVONEN et al., 2007; BERRENDERO et al., 2008, 2011; VACCARINO et al., 2011). O trabalho de Sihvonen et al. (2007), por exemplo, sugeriu a presença de pelo menos cinco diferentes gêneros para o grupo.

O clado em que se posicionaram as sequências em questão também é composto por sequências do banco de dados de *Calothrix* sp. (X99213, EU009152, EU009154, HQ847581, HQ847580) e *Calothrix parietina* (AF334695, AF334696). Esta formação coincide com o Clado A e C dos estudos de Berrendero et al. (2008, 2011).

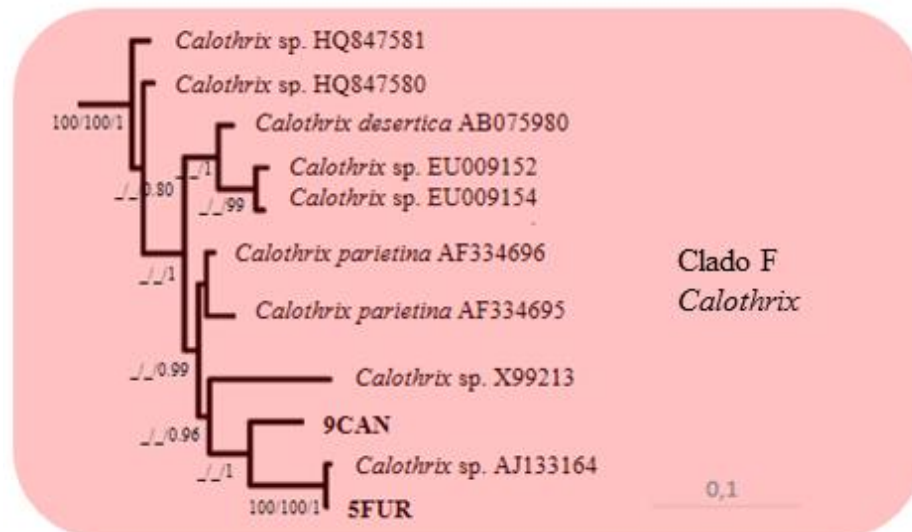


Figura 4. Detalhe do clado F. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene 16S rRNA mostrando a posição das sequências obtidas neste estudo (negrito). Números próximos aos nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 70%, para os critérios de NJ e ML e maiores que 0,7 para os critérios de IB, respectivamente. Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.



Para as análises de ITS 16S-23S, tanto 9CAN quanto 5FUR não apresentaram tRNA e os comprimentos de ITS 16S-23S foram de 326 e 331. As regiões conservadas não revelaram consideráveis similaridades entre as estruturas secundárias (Figuras 8, 10 e 11), havendo possivelmente uma separação específica. Esta possibilidade não é descartada pelos resultados de 16S rRNA em que, mesmo havendo uma considerável proximidade entre as linhagens, a similaridade entre 5FUR e AJ133164 mostrou-se muito maior (Tabela 3).

Tabela 3. Similaridade (porcentagem na porção inferior) e divergência de nucleotídeos (número absoluto na porção superior) entre as sequências de 16S rRNA das principais linhagens de *Calothrix* no presente estudo.

	1	2	3	4	5	6
<b>1. 9CAN</b>	-	23	22	30	53	35
<b>2. 5FUR</b>	97.9	-	3	42	60	47
<b>3. <i>Calothrix</i> sp. (AJ133164)</b>	98.0	99.7	-	41	72	46
<b>4. <i>Calothrix parietina</i> (AF334696)</b>	97.4	96.3	96.4	-	49	19
<b>5. <i>Calothrix</i> sp. (X99213)</b>	95.1	94.5	94.5	95.7	-	55
<b>6. <i>Calothrix parietina</i> (AF334695)</b>	96.9	95.8	95.9	98.1	95.0	-

As amostras 1FUR e 1GO apresentaram 99,9% de similaridade entre suas sequências de 16S rRNA, e formaram um clado monofilético bem suportado para todas as análises (99%, 100%, 1), indicando a presença de uma única espécie (Figura 5 - Clado G). Porém, diferentemente do esperado segundo as análises morfológicas, não apresentaram relação com *Hapalosiphon*. Ao invés disso, mostraram-se geneticamente mais relacionadas a *Brasilonema*.

As amostras apresentaram similaridade de 97 e 98% com linhagens de *Brasilonema* e *Scytonema* (que, provavelmente é uma *Brasilonema* identificada erroneamente), quando conferidas pela ferramenta *Blast*. Entretanto, a disposição dos ramos na árvore filogenética mostra que, embora estas sejam proximamente relacionadas a *Brasilonema*, elas mantêm-se separadas, indicando, assim, serem provavelmente um gênero diferente.

Para as análises de ITS 16S-23S, 1FUR e 1GO apresentaram a sequência com 377 e 636 pb, respectivamente. Além disso, 1GO apresentou ambos os tRNA, enquanto 1FUR não apresentou nenhum. Quando observadas as estruturas secundárias para as três principais regiões (Figuras 8, 10 e 11), todas mostraram-se diferentes e não foi possível a observação de um padrão. Dessa forma, pode-se considerar que o ITS 16S-23S não seja informativo para alguns grupos, pois não há como inferir uma separação específica tendo-se obtido dados tão altos de similaridade para outras análises (morfológica e 16S rRNA).

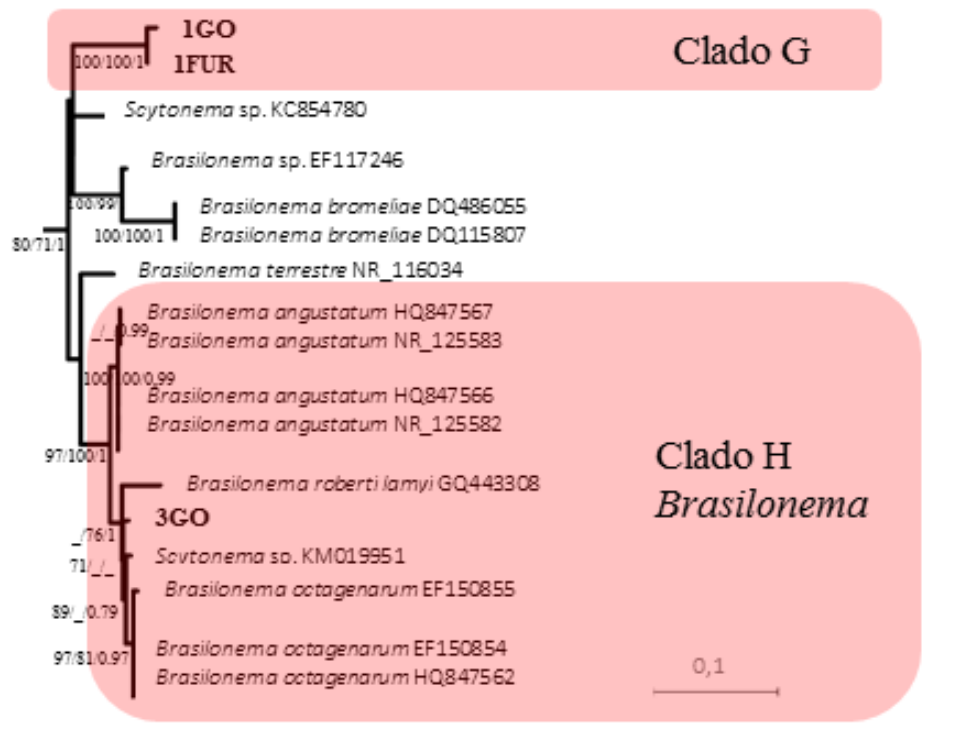


Figura 5. Detalhe dos clados G e H. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene 16S rRNA mostrando a posição das sequências obtidas neste estudo (negrito). Números próximos aos nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 70%, para os critérios de NJ e ML e maiores que 0,7 para os critérios de IB, respectivamente. Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.

A inclusão destas amostras permitiu uma nova visão do clado de *Brasilonema* (Figura 5). Todos os estudos prévios apontaram o clado como altamente suportado e monofilético, entretanto, em nossas análises, o gênero mostrou separação em quatro grupos. O primeiro composto por uma linhagem identificada como *Scytonema* sp. (KC854780), o segundo, pelas linhagens *B. bromeliae* e *Brasilonema* sp. EF117246 (o clado utilizado para a publicação do gênero – FIORE et al., 2007), o terceiro composto apenas pela linhagem *Brasilonema terrestre*, e o quarto, pelas linhagens *B. angustatum*, *B. octagerarum*, *B. roberti-lamyi*, *Scytonema* sp. KM019951 e a amostra 3GO.

Esta separação em grupos não é tão clara quando comparadas as similaridades entre as sequências de 16S rRNA. Pode-se observar que, na maioria das vezes, dentro dos grupos encontramos similaridades maiores que entre os grupos, porém há exceções (Tabela 4).

Não há como afirmarmos uma separação em nível genérico para estes grupos, entretanto, a presença destas duas novas linhagens (1FUR e 1GO), de morfologia totalmente diferenciada, incluindo a presença de ramificação verdadeira, e a proximidade entre elas e *Brasilonema*, com similaridades de 16S rRNA variando de 96.5 a 98.3%, levantam a questão e enfatizam a necessidade de estudos mais detalhados.

Tabela 4. Similaridade (porcentagem na porção inferior) e divergência de nucleotídeos (número absoluto na porção superior) entre as sequências de 16S rRNA das principais linhagens de *Brasilonema*, 1FUR, 1GO, 3GO e *Symphyonemopsis* sp. (AJ544085)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>1. 1FUR</b>	-	1	28	36	97.7	18	27	28	27	27	26	31	23	39
<b>2. 1GO</b>	99.9	-	28	36	97.6	18	27	28	27	27	26	35	24	39
<b>3. 3GO</b>	97.5	97.5	-	28	98.4	20	3	4	3	3	10	34	19	14
<b>4. <i>Symphyonemopsis</i> VAPOR (AJ544085)</b>	96.5	96.5	97.3	-	96.8	33	41	41	40	41	41	41	42	45
<b>5. <i>Scytonema</i> sp. (KC857480)</b>	97.7	97.6	98.4	96.8	-	17	18	19	18	18	18	29	16	26
<b>6. <i>Brasilonema terrestre</i> (NR116034)</b>	98.3	98.3	98.1	97.3	98.4	-	27	28	26	27	25	27	28	33
<b>7. <i>B. octagenarum</i> (HQ847562)</b>	97.6	97.6	99.7	96.7	98.4	97.9	-	1	3	0	12	49	32	16
<b>8. <i>B. octagenarum</i> (EF150854)</b>	97.4	97.4	99.6	96.7	98.2	97.8	99.9	-	4	1	13	40	33	10
<b>9. <i>Scytonema</i> sp. (KM019951)</b>	97.6	97.6	99.7	96.8	98.4	98.0	99.8	99.7	-	3	13	48	35	17
<b>10. <i>B. octagenarum</i> (EF150855)</b>	97.5	97.5	99.7	96.7	98.3	97.9	100	99.9	99.7	-	12	39	32	9
<b>11. <i>B. angustatum</i> (HQ846566)</b>	97.6	97.6	99.1	96.7	98.4	98.1	99.1	99.0	99.0	99.1	-	46	31	22
<b>12. <i>B. bromeliae</i> (NR115807)</b>	96.9	96.8	96.9	96.7	97.4	97.9	96.3	96.5	96.4	97.0	96.5	-	9	51
<b>13. <i>Brasilonema</i> sp. (EF117246)</b>	97.8	97.7	98.2	96.6	98.5	97.8	97.5	97.4	97.3	97.5	97.6	99.3	-	37
<b>14. <i>Brasilonema roberti-lamyi</i> (GQ443308)</b>	96.4	97.5	98.8	96.0	98.7	97.5	98.8	99.2	98.7	99.3	98.3	96.1	97.1	-

As amostras 6CAN e 7CAN, identificadas morfológicamente como *Stigonema ocellatum* e *Stigonema* sp.1, formaram um clado altamente suportado para todas as análises, juntamente com outras linhagens do mesmo gênero (Figura 6 - Clado I). Concordando com estudos prévios, o clado de *Stigonema* posicionou-se distante dos outros clados formados por organismos heterocitados e com ramificações verdadeiras (GUGGER & HOFFMANN, 2004). Porém, este fato não é incomum. Muitos estudos recentes têm mostrado que clados formados por organismos caracterizados morfológicamente por ramificações verdadeiras e clados formados por organismos caracterizados morfológicamente por ramificações falsas sempre se posicionam de maneira misturada (FIORE et al., 2007; ZAMMIT et al., 2010; HOWARDAZZEH et al., 2014).

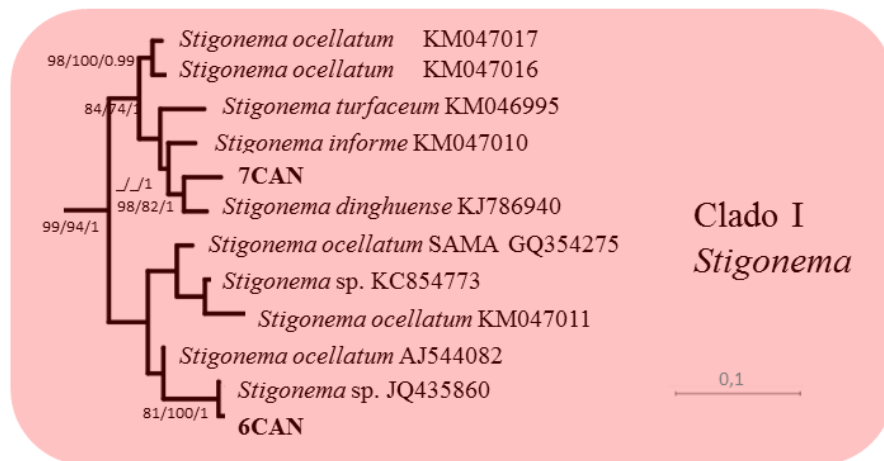


Figura 6. Detalhe do clado I. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene 16S rRNA mostrando a posição das seqüências obtidas neste estudo (negrito). Números próximos aos nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 70%, para os critérios de NJ e ML e maiores que 0,7 para os critérios de IB, respectivamente. Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.

A amostra 7CAN mostrou-se extremamente relacionada à *S. dinghuense* KJ786940, com similaridade de 16S rRNA de 99.3% (Tabela 5). Enquanto a amostra 6CAN, previamente identificada como *S. ocellatum*, mostrou-se relacionada à linhagem de *Stigonema* sp. JQ435860. Várias outras linhagens de *S. ocellatum* se mostraram distribuídas em mais de um ramo, dessa forma, não há como delimitar a espécie.

As análises de ITS 16S-23S para 6CAN e 7CAN apresentaram sequências com 567 e 411 pb, respectivamente, e ambas apresentaram tRNA para isoleucina. Em relação às estruturas secundárias, não houve similaridades para nenhuma das regiões, entretanto, a amostra 7CAN apresentou as mesmas estruturas de D1-D1' e Box-B que a linhagem

*Stigonema dinghuense*(KJ786940), o que, neste caso, pode indicar a separação específica, já que os dados de 16S rRNA também apontam para tal (Figuras 8, 10, 11).

Tabela 5. Similaridade (em porcentagem, na porção inferior) e divergência de nucleotídeos (em número absoluto, na porção superior) entre as sequências de 16S rRNA das principais linhagens de *Stigonema* no presente estudo.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 6CAN	-	42	38	38	40	37	16	3
2. 7CAN	96.0	-	8	17	22	22	30	37
3. <i>S. dinghuense</i> (KJ786940)	96.3	99.3	-	14	20	17	37	34
4. <i>S. informe</i> (KM047010)	96.2	98.3	98.6	-	23	17	27	33
5. <i>S. turfaceum</i> (KM046995)	96.0	97.9	98.1	97.7	-	22	34	35
6. <i>S. ocellatum</i> (KM47017)	96.3	97.9	98.3	98.3	97.9	-	21	33
7. <i>S. ocellatum</i> (AJ544082)	98.3	97.0	97.0	97.2	96.6	97.9	-	13
8. <i>Stigonema</i> sp. (JQ435860)	99.6	96.3	96.9	96.6	96.5	96.7	98.8	-

As cinco amostras estudadas identificadas como *Nostoc*, segundo critérios morfológicos, dispuseram-se em três clados bem suportados (Clados J, K e L; Figura 7). O clado J apresentou a amostra 2FUR relacionada com alto suporte (88%, 94%, 1) com as espécies representativas de *Nostoc sensu stricto*, incluindo *Nostoc commune* (EU586722) e *Nostoc calcicola* (AJ630447) (PAPAEFTHIMIOU et al. 2008; HROUZEK et al. 2013). Entretanto, além dos clados formados por sequências aqui estudadas, vários outros clados contendo linhagens identificadas como *Nostoc* foram formados, qualificando o gênero como polifilético e concordando com estudos prévios (HROUZEK et al., 2005; REHÁKOVÁ et al., 2007; PAPAEFTHIMIOU et al. 2008; HROUZEK et al. 2013).

As amostras 2CAN, 3FUR e 2GO, uma linhagem de *Nostoc* sp. (AM711547) isolada de campos de arroz e uma linhagem identificada como *Trichormus azollae*, supostamente também coletada em campos de arroz, formaram o clado K. As amostras 3FUR e 2GO apresentaram similaridade de 16S rRNA de 99,7% (Tabela 6) provando serem a mesma espécie. Porém, o clado como um todo apresentou suporte apenas para a análise de IB (0,99), com algumas das suas linhagens mostrando similaridades maiores com linhagens distantes do que com linhagens internas ao seu clado. Dessa forma, não há como considerar se todas as linhagens deste clado são ou não integrantes do mesmo gênero, sendo necessária a inclusão de mais sequências para a estruturação do grupo.

A amostra 1CIP, confirmando a identificação morfológica, posicionou-se, com alto suporte (94%, 90%, 1), dentro do clado de *Desmonostoc* (Clado L), um gênero descrito recentemente como filogeneticamente coerente, monofilético e bem separado do clado composto por *N. commune* (HROUZEK et al. 2013).

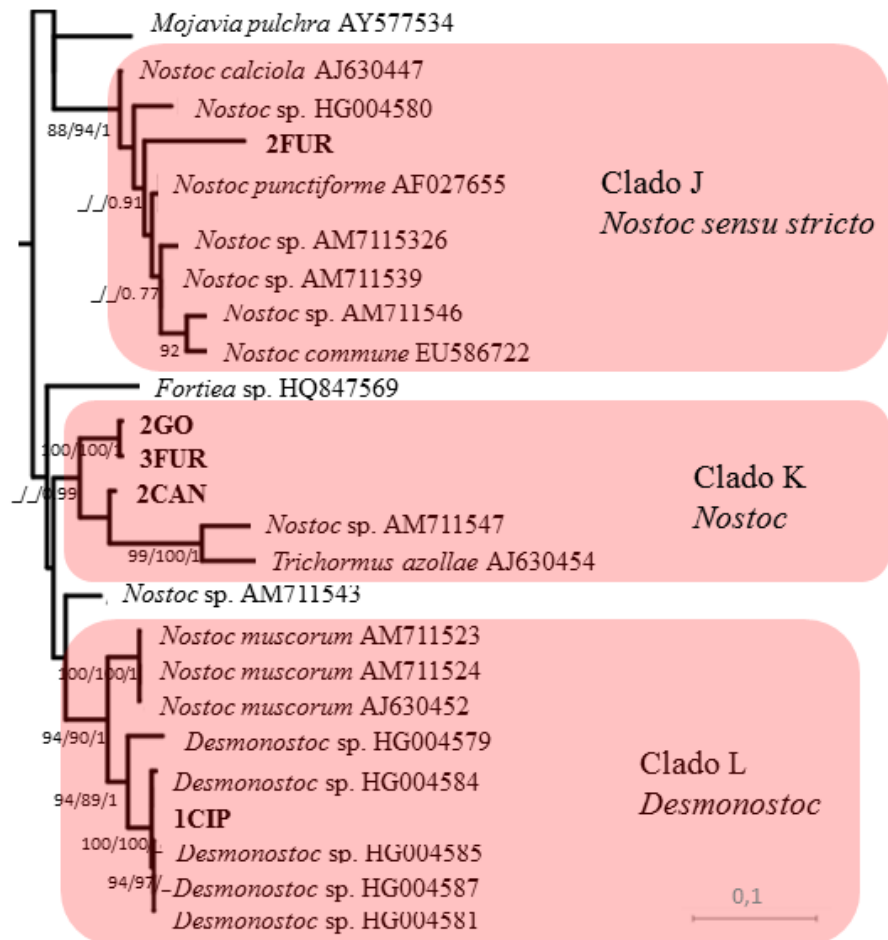


Figura 7. Detalhe dos clados J, K e L. Árvore de Máxima Verossimilhança do gene 16S rRNA mostrando a posição das sequências obtidas neste estudo (negrito). Números próximos aos nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 70%, para os critérios de NJ e ML e maiores que 0,7 para os critérios de IB, respectivamente. Barra: 0,1 substituições por posição de nucleotídeo.

Tabela 6. Similaridade (porcentagem na porção inferior) e divergência de nucleotídeos (número absoluto na porção superior) entre as sequências de 16S rRNA das principais linhagens de *Nostoc* e *Desmonostoc* no presente estudo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>1. 3FUR</b>	-	3	42	45	33	43	40	45	45	48
<b>2. 2GO</b>	99.7	-	41	43	21	42	39	44	43	46
<b>3. 2FUR</b>	96.0	96.3	-	45	42	22	23	32	45	63
<b>4. 1CIP</b>	95.7	96.1	95.9	-	36	42	40	49	0	48
<b>5. 2CAN</b>	97.9	98.1	96.2	96.7	-	39	35	43	36	37
<b>6. <i>Nostoc sp.</i> (HG004580)</b>	95.9	96.2	98.0	96.2	96.4	-	16	18	53	69
<b>7. <i>N. calciola</i> (AJ630447)</b>	96.2	96.4	97.9	96.3	96.8	98.8	-	24	51	79
<b>8. <i>N. commune</i> (EU586722)</b>	95.7	96.0	97.1	95.5	96.1	98.3	97.8	-	49	57
<b>9. <i>Desmonostoc sp.</i> (HG004584)</b>	95.7	96.1	95.9	100	96.7	96.0	96.1	95.5	-	67
<b>10. <i>Nostoc sp.</i> (AM711547)</b>	95.4	95.8	94.3	95.6	96.6	94.8	94.1	94.8	95.0	-

As análises de ITS mostraram sequências variando de 254 a 519 pb, com apenas as amostras 2CAN, 3FUR e 2GO apresentando ambos os tRNA. Este dado de tRNA coincide com as análises de 16S rRNA, que juntaram essas linhagens no clado K.

As estruturas secundárias a partir da região D1-D1' também suportaram a proximidade entre as linhagens do clado K, com 2CAN, 3FUR e 2GO apresentando exatamente a mesma estrutura. Esta estrutura também foi semelhante a de 1CIP, porém diferente da de 2FUR, que foi a única linhagem inserida dentro de *Nostoc sensu stricto*.

Com relação as outras regiões, BOX-B e V3 não se mostraram de acordo com as análises de 16S rRNA (Figuras 9, 10 e 11) e não foram informativas.

Tabela 7. Tamanho do espaçador intergênico (ITS) 16S-23S e de suas regiões entre as linhagens estudadas (em número de nucleotídeos). (-) indica ausência nos casos de tRNA. (\*) informação ausente.

Organismo	Total	D1-D1'	D2	D3	tRNA <sup>Ile</sup>	tRNA <sup>Ala</sup>	Box-B	Box-A	D4	V3
1FUR	377	81	10	3	-	-	29	12	13	45
1GO	636	99	10	3	73	72	28	12	13	44
1CIP	254	66	10	3	-	-	27	12	13	42
2FUR	261	68	10	3	-	-	28	12	13	39
2CAN	504	66	10	3	73	72	36	12	13	35
3FUR	519	66	10	3	73	72	37	12	13	50
2GO	519	66	10	3	73	72	37	12	13	36
3GO	*	67	10	3	-	-	12	12	13	*
6CAN	567	45	10	3	73	-	31	12	13	78
7CAN	411	61	10	3	73	-	29	12	13	37
9CAN	331	113	10	3	-	-	33	12	13	59
5FUR	326	63	10	3	-	-	38	12	13	69
3CIP	457	65	10	3	73	72	33	12	13	49
6FUR	562	63	10	3	73	72	37	12	13	80
10CAN	-	55	10	3	73	72	32	12	13	-
11CAN	556	63	10	3	73	72	41	12	13	95
7FUR	556	63	10	3	73	72	45	12	13	95
13CAN	398	57	10	3	73	-	37	12	13	50

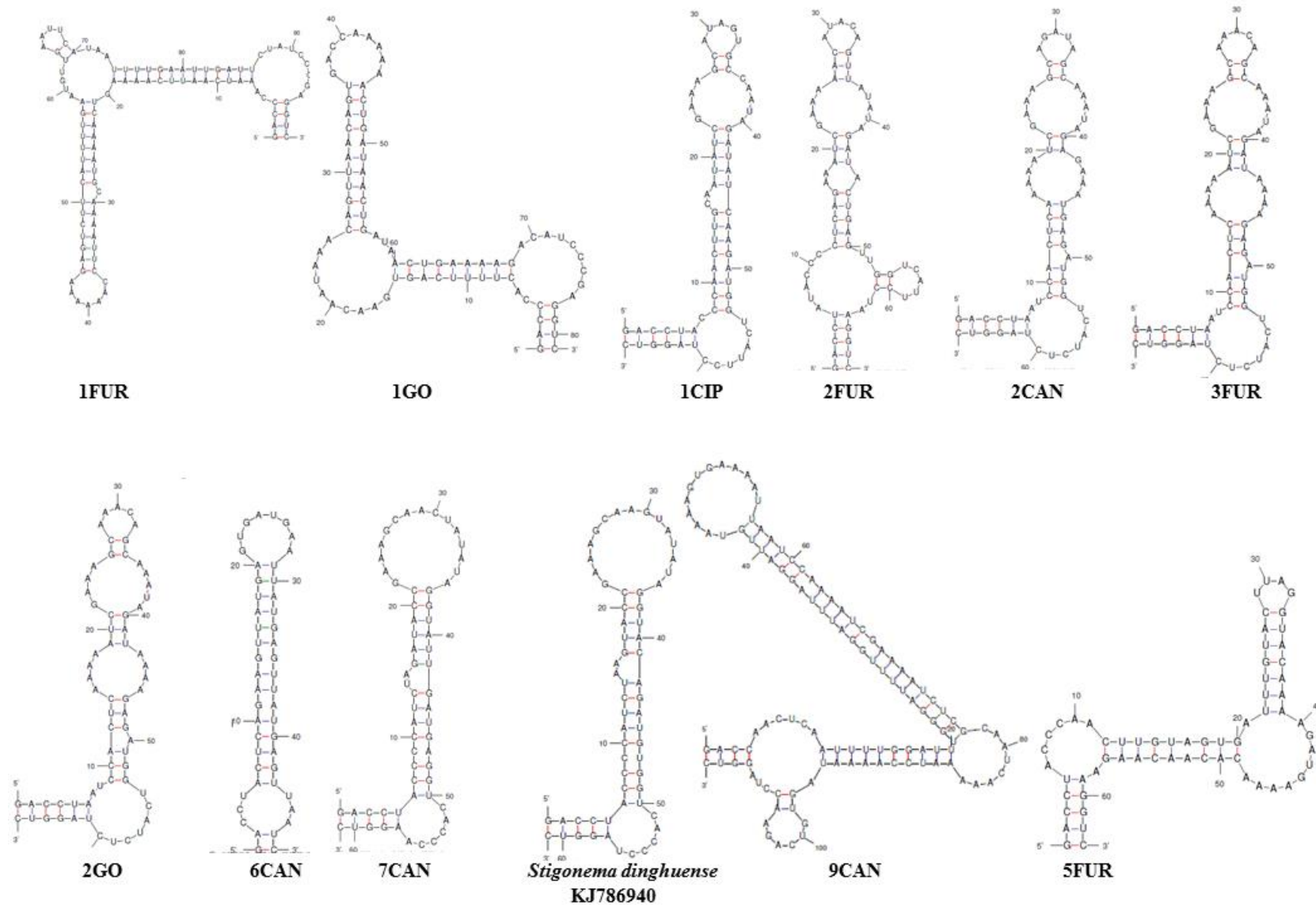


Figura 8. Estrutura secundária da hélice D1-D1' do ITS 16S-23S.



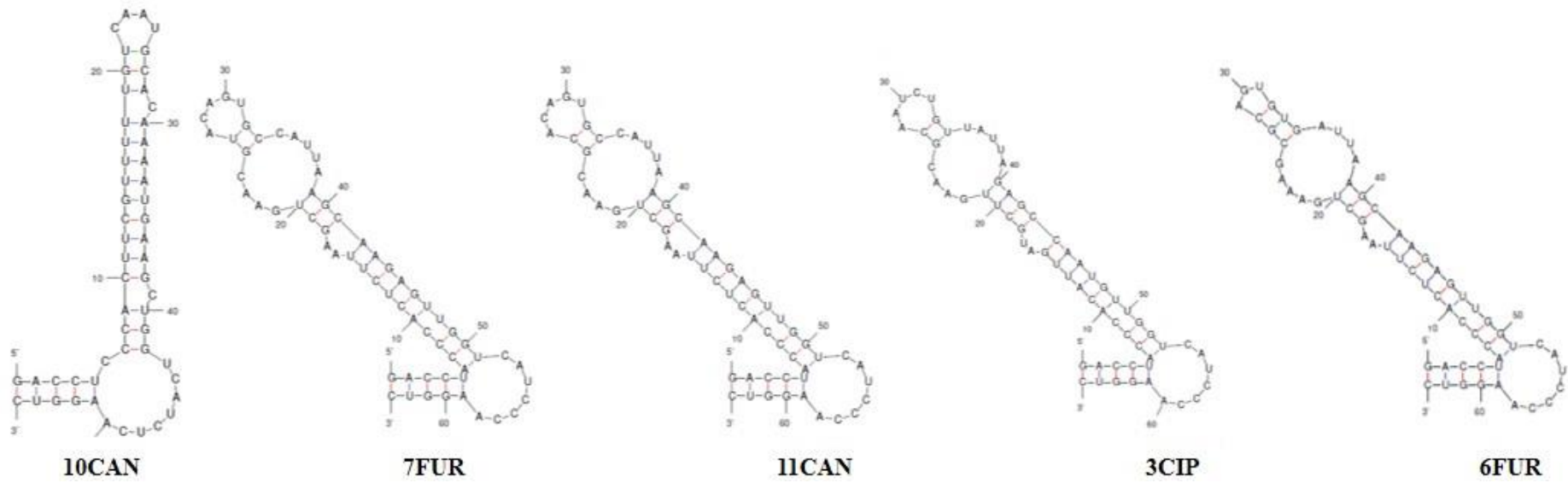


Figura 9. Estrutura secundária da hélice D1-D1' do ITS 16S-23S.

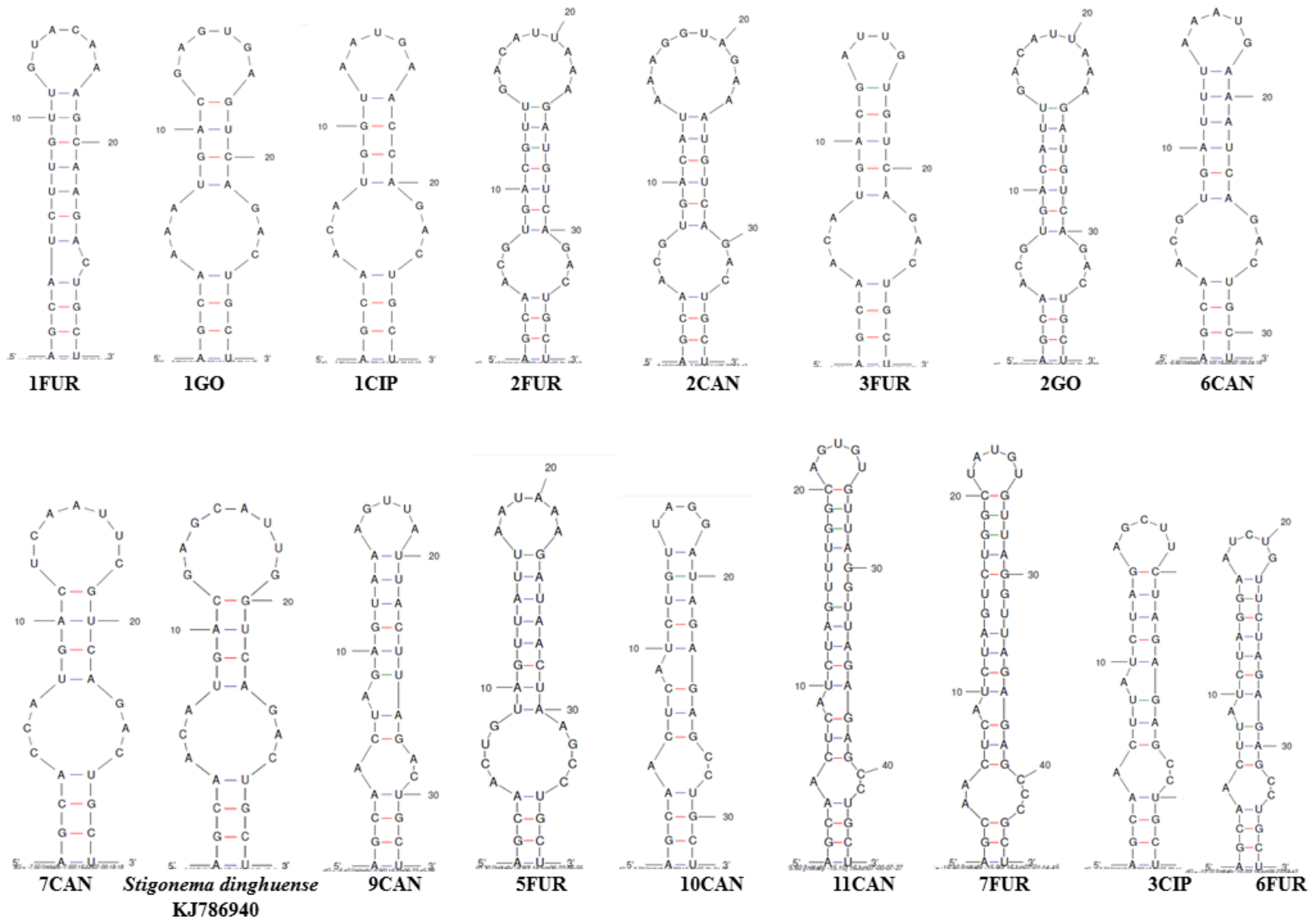


Figura 10. Estrutura secundária da hélice Box-B do ITS 16S-23S.

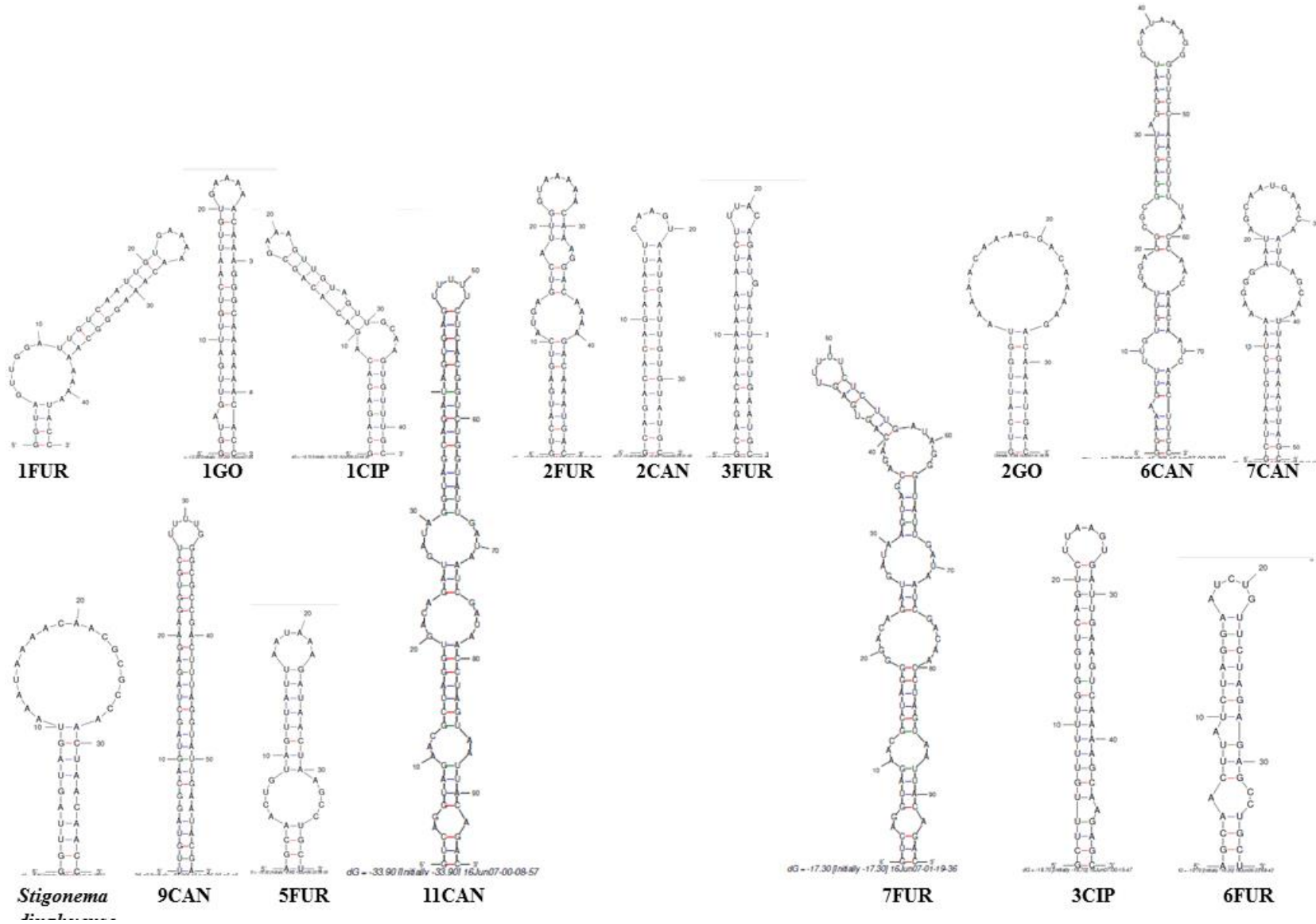


Figura 11. Estrutura secundária da hélice V3 do ITS 16S-23S.

## Considerações finais

A filogenia construída (Figura 1) corrobora a ideia de que o gene 16S rRNA é um marcador com bom sinal filogenético e mostra que grande parte dos clados incluídos na análise foram bem delimitados e apresentaram alto suporte.

As análises das estruturas secundárias de ITS 16S-23S mostraram a necessidade de mais estudos para a comprovação das mesmas como eficientes ferramentas moleculares, já que este se mostrou informativo apenas para algumas das relações investigadas.

Dentre os dados obtidos, muitos foram de acordo com estudos prévios, como foi o caso de *Leptolyngbya*, em que os resultados condisseram com a característica polifilética do gênero (CASAMATTA et al., 2005; JOHANSEN et al., 2011). O mesmo ocorreu para *Nostoc*, em que foi observada o estabelecimento de inúmeros clados e enfatizada a urgente investigação do grupo. Os resultados observados para *Calothrix* também confirmam estudos prévios, pois, embora as linhagens estudadas tenham se posicionado em um único e suportado clado, esta condição não extinguiu a necessidade de revisão do gênero, já que outras cepas retiradas do banco de dados demonstraram a polifilia do grupo (SIHVONEN et al., 2007; BERRENDERO et al., 2008, 2011; VACCARINO et al., 2011).

A obtenção de sequências moleculares para *Stigonema* foi um dado extremamente importante se considerarmos que as características moleculares do grupo ainda são pouco exploradas devido à grande dificuldade no estabelecimento de culturas. Trata-se de uma conquista que até 2008, em bancos de cultura, só tinha sido conseguida para cinco cepas (KORELUSOVÁ, 2008).

As duas populações (1FUR e 1GO) anteriormente registradas como cf. *Hapalosiphon*, trouxeram características morfológicas também semelhantes a *Westielopsis*, *Iphinoe* (LAMPRINO et al., 2011) e a duas populações registradas nas catacumbas de Maltese (ZAMMIT et al. 2010). Contudo, as análises filogenéticas demonstraram que não houve relação próxima com nenhum destes grupos, levantando a hipótese da presença de um gênero novo, mais relacionado a *Brasilonema* que a outros grupos compostos por organismos de ramificações verdadeiras. Este fato fortalece a evidência de que há muito o que se explorar nesses ambientes extremos, sendo este apenas um dos possíveis novos gêneros a serem descobertos.

A população identificada como pertencente a *Porphyrosiphon* contribuiu fortemente para a caracterização molecular do gênero, pois embora tenha sido utilizada outra sequência de *Porphyrosiphon* neste estudo relatada por Martins (2014), há extrema dificuldade no estabelecimento de culturas para o gênero, e este não contém nenhuma sequência molecular

em bancos de dados, tendo até o momento seus estudos restritos a dados morfológicos (KOMÁREK et al., 2014).

Também, a amostra 13CAN é um exemplo de novidade registrada para estes ambientes, sendo morfológicamente semelhante a *Phormidium*, mas pertencente a um gênero separado do mesmo, delimitado em trabalho anterior (MARTINS, 2014). O fato de sua morfologia ser equivalente a *Phormidium* e seu posicionamento filogenético a aproximar de *Microcoleus steenstrupii* pode ter levado a várias identificações equivocadas em estudos anteriores para crostas biológicas.

Concluindo, os dados moleculares vieram a confirmar algumas das análises morfológicas prévias, enfatizando a necessidade da investigação polifásica devido à limitação das duas análises. A descrição da diversidade de crostas biológicas para o Brasil, com o levantamento de 31 populações, demonstra a validade do estudo no preenchimento desta lacuna de conhecimento. Além disso, a descoberta de novas sequências e possíveis novos gêneros enfatiza a necessidade da manutenção e ampliação dos estudos com crostas biológicas, comunidades pouco exploradas e que devem guardar grande diversidade não acessada.

## Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v. 215, p. 403-410. 1990.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1 – Introduction. **Algol. Stud.**, v. 38-39, p. 291-302. 1985.

ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5 – Oscillatoriales. **Archiv. Für. Hydrobiol./Algol. Stud.** v. 59, p. 1–73. 1990.

BERRENDERO, E.; PERONA, E. & MATEO, P. Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 58, p. 447–460. 2008.

BERRENDERO, E.; ELVIRA, P. & MATEO, P. Phenotypic variability and phylogenetic relationships of the genera *Tolypothrix* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 61, p. 3039-3051.

BOHUNICKÁ, M.; PIETRASIAK, N.; JOHANSEN, J. R.; GÓMES, E. B.; HAUER, T.; GAYSINA, L. A. & LUKESOVÁ, A. *Roholtiella*, gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) – a tapering and branching cyanobacteria of the family Nostocaceae. **Phytotaxa**. v. 197, n. 2, p. 84-103. 2015.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Révision des Nostocacées hétérocystées, contenues dans les principaux herbiers de France. **Ann. Sci. Nat. Bot.** v. 1, sér. 3, p. 323-381; sér. 4, p. 343-373; ser. 5, p. 51-129; sér. 7, p. 177-262, 1886-1888.

BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce: initiation à la systématique. Tome III. Les algues bleues et rouges, Paris: Boubée, 1970. 512 p.

BOYER, S.L.; FLECHTNER, V.R.; JOHANSEN, J.R. Is the ITS 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for the use in molecular systematics and population genetics? A case study in Cyanobacteria. **Mol. Biol. Evol.** v. 18, n. 6, p. 1057-1069, 2001.

BOYER, S. L.; JOHANSEN, J. R.; FLECHTNER, V. R. Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis on the 16S rRNA gene and associate 16S-23S ITS region. **J. Phycol.** v. 38, p. 1222-1235, 2002.

FIORE, M. F.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; KOMARÉK, J.; KÁSTOWSKÝ, J.; SULEK, J. & LORENZI, A. S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **J. Phycol.** v. 43, p. 789–798. 2007.

CASAMATTA, D. A.; JOHANSEN, J. R.; VIS, M. L. & BROADWATER, S. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). **J. Phycol.** v. 41, p. 421-438. 2005.

CASAMATTA, D. A.; VIS, M. L. & SHEATH, R. G. Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Aquat Bot.** v. 77, p. 295-309. 2003.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, K.D.; JURTSCHUK, P.J. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Journal of Systematic Bacteriology** v. 42, p. 166-170, 1992.

FOX, G. E.; WOESE, C. R. The architecture of 5S rRNA and its relations to function. **J. Mol. Evol.** v. 6, p. 61-76, 1975.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST'S Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. 2. Aufl. Leipzig, Akademische. Verlagsgesellschaft. v. 14, 1196p. 1932.

GOMONT, M. M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). **Ann. Sci. nat. Bot.**, sér. 7, v. 15, p. 263-368; v. 16, p. 91-264; 1892.

GUGGER, M. F. & HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, p. 349-357. 2004.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Algol. Stud.** (Cyanobacterial Research) 117: 95-115, 2005.

HOWARD-AZZEH, M.; SHAMSEER, L.; SCHELLHORN, H. E. & GUPTA, R. S. Phylogenetic analysis and molecular signatures defining a monophyletic clade of heterocystous cyanobacteria and identifying its closest relatives. **Photosynth. Res.** v. 122, i. 2, p. 171-185. 2014.

HROUZEK, P.; LUKESOVÁ, A.; MARES, J. & VENTURA STEFANO. Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. Nov. including *D. muscorum* comb. Nov. as a distinct, phylogenetically coherent táxon related to the genus *Nostoc*. **Fottea.** v. 13, n. 2, p. 201-213. 2013

HROUZEK, P.; VENTURA, S.; LUKEŠOVÁ, A.; MUGNAI, M.A.; TURICCHIA, S. & KOMÁREK, J. Diversity of soil *Nostoc* strains: phylogenetic and phenotypic variability. **Algol. Stud.** v. 117, p. 1-14. 2005.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 745-755. 2001.

ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; MARSAC, N.T. & HERDMAN, M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of Cyanobacteria. **Microbiology.** v. 146, p. 1275-1286. 2000.

JOHANSEN, J. R.; KOVÁČIK, L.; CASAMATTA, D. A.; FUCIKOVÁ, K. & KASTOVISKÝ, J. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacteria taxa: *Lwptolyngbya corticola* sp. Nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). **Nova Hedwigia**. v. 92, i. 3-4, p. 283-302. 2011.

KASTOVSKÝ, J.; GOMES, E. B.; HLADIL, J. & JOHANSEN, J. R. *Cyanocohniella calida* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria: Aphanizomenonaceae) a new cyanobacterium from the thermal springs from Karlovy Vary, Czech Republic. **Phytotaxa**. v. 181, n. 5, p. 279-292. 2014.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil Chroococcales. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H. & Mollenhauer, D. (eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm. 1998. 548 p.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. **Archiv. Für. Hydrobiol./Algol. Stud.** v. 56, p. 247– 345. 1989.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B.; Krienitz, L.; Gärtner, G.; Schagerl, M. (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Heidelberg: Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, 2005. 759p.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J.; MARES, J. & JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using polyphasic approach. **Preslia**. v.86, p. 295-335. 2014.

Korelusová, J. Phylogeny of heterocytous Cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales). 2008. 33 f. Dissertação – University of South Bohemia. České Budejovice. Republika Checa. 2008.

Lamprinou, V.; Hernández-Mariné, M.; Canals, T.; Kormas, K.; Economou-Amilli, A. & Pantažidou, A. Morphology and molecular evaluation of *Iphinoe spelaebios* gen. nov., sp. nov. and *Loriellopsis cavernicola* gen. nov., sp. nov., two stigonematalean cyanobacteria from Greek and Spanish caves. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 61, p. 2907-2915. 2011.



LOKMER, A. Polyphasic approach to the taxonomy of the selected oscillatorian strains (Cyanobacteria). 2007. 61 f. Dissertação - University of South Bohemia. České Budejovice. República Checa. 2007.

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

MARTINS, M. D. Estudos polifásicos de populações de Phormidioideae (Oscillatoriales, Cyanobacteria). 2014. 161 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, São Paulo. 2014.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W. & SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. p. 1-8. 2010.

NEILAN, B.A.; JACOBS, J.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L., HAWKINS, P.R. COX, P.T. & GOODMAN, A.E. rDNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 47, p. 693-697. 1997.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F. & MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, n. 3, p. 3327-3332. 1997.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. Tracer v1.4. Disponível em <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>. Acesso em: 10 Jul. 2016.

REHÁKOVÁ, 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**. v. 46, p. 481-502. 2007.

REHÁKOVÁ, K.; MARES, J.; LUKESOVA, A.; ZAPOMELOVA, E.; BERNARDOVA, K. & HROUZEK, P. Nodularia (Cyanobacteria, Nostocaceae): a phylogenetically uniform genus with variable phenotypes. **Phytotaxa**. v. 172, p. 235–246. 2014.

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

RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods. Enzymol.** v. 167, p. 28-76. 1988.

PAPAEFTHIMIOU, D.; HROUZEK, P.; MUGNAI, M.A.; RASMUSSEN, U.; LUKEŠOVÁ, A.; TURICCHIA, S. & VENTURA, S. Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 58,, 0. 553-564. 2008.

PREMANANDH, J.; PRIYA, B.; PRABAHARAN, D. & UMA, L. Genetic heterogeneity of the marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* (Pseudanabaenaceae) evidenced by RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. **J. Plankton. Res.** v. 0, n. 0, p. 1-10. 2009.

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

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 diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 61, p. 74–84. 2007.

STRUNECKY, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium "*Phormidium*" *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. **Fottea**, v. 11, n. 1, p. 57-71. 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; DEWIT, R. & WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, n. 9, p. 5157-5169. 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. ClustalW: improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix. **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 4673-4680. 1994.

THURET. G. Essai de classification des Nostochinées. **Ann. Sci. Nat. Bot.** v. 1, sér. 6, p. 372-382, 1875.

VACCARINO, M. A. & JOHANSEN, J. R. *Scytonematopsis contorta* sp. nov. (Nostocales), a new species from the Hawaiian Islands. **Fottea.** v. 11, n. 1, p. 149-161. 2011.

ZAMMIT, G.; KASTOVSKÝ, J.; PATRIZIA, A. A first cytomorphological and molecular characterization of a new Stigonematalean cyanobacterial morphotype isolated from Maltese catacombs. **Algol. Stud.** v. 135, n. 1, p. 114-128. 2010.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research,** v. 31, n.13, p. 3406-3415. 2003.

## Capítulo IV – Avaliação de atividade enzimática por cepas de Cianobactérias

---

### Resumo

Nos últimos anos, as cianobactérias ganharam muita atenção como objeto de pesquisa por serem ricas em compostos bioativos. Em estudos recentes com cianobactérias heterocitadas, como *Anabaena*, foi demonstrada a atividade antifúngica pela síntese de enzimas hidrolíticas, além da presença de homólogos de quitosanases/endoglucanases em *Anabaena laxa*, *A. iyengarii*, *A. fertilissima*, *Calothrix elenkinii* e *Synechocystis* PCC6803. Porém, esta é uma área recente e muito pouco explorada, em que poucas cepas produtoras são conhecidas. Dessa forma, objetivou-se fazer o levantamento de potenciais organismos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas entre as cianobactérias das crostas estudadas nas duas primeiras etapas deste trabalho. Esta proposta partiu da grande quantidade de organismos heterocitados registrados em crostas e de um possível metabolismo diferenciado devido às condições restritivas em que se encontram estas comunidades. Seis cepas de cianobactérias foram utilizadas para esta análise, a partir de culturas axenizadas. As atividades enzimáticas foram mensuradas pelo método de Somogyi-Nelson, em que é oferecido o substrato glicosídico e, então, quantificado o produto clivado. Como resultado, foram obtidos valores baixos de absorbância que ficaram fora da curva de referência de glicose, ou seja, não houve produção enzimática por nenhuma das cepas estudadas. O resultado obtido pôde ser explicado pela incapacidade de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelas cepas, pelas condições a que as culturas foram submetidas e/ou pela falta de estimulação por meio de outros fatores.

## Introdução

Nos últimos anos, as cianobactérias ganharam muita atenção como objetos de pesquisa em função dos indicativos de serem organismos ricos em compostos bioativos (BHADURY & WRIGHT, 2004). Tais compostos teriam aplicações como agentes antivirais, antibacterianos, antifúngicos e anticancerígenos, além de outras, como na indústria de alimentos, combustíveis, fertilizantes e corantes, produção de vários metabólitos secundários, incluindo toxinas, vitaminas, enzimas e fármacos (ABED et al., 2008).

Em estudos recentes com colônias de *Anabaena*, foi demonstrada a atividade antifúngica devido à síntese de enzimas hidrolíticas (PRASANNA et al., 2008, CHAUDHARY et al., 2012). Além disso, homólogos de quitosanases/endoglucanases foram identificados e caracterizados em *Anabaena laxa*, *A. iyengarii*, *A. fertilissima*, *Calothrix elenkinii* e *Synechocystis* PCC6803. Muitos dos genes foram descritos e tiveram seu funcionamento avaliado sob diferentes condições ambientais (TAMOI et al., 2007; PRASANNA et al., 2010; GUPTA et al., 2010, 2011, 2012; NATARAJAN et al., 2013).

As enzimas encontradas nos estudos citados anteriormente são celulases, que fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações  $\beta$ -1,4 entre as moléculas de glicose (HAICHAR et al., 2007). Dentre estas enzimas encontramos as exo-endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanases (ou EC 3.2.1.91), que clivam unidades de celulose a partir das extremidades do polissacarídeo, as endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanases (ou EC 3.2.1.4), que clivam as cadeias de celulose internamente, principalmente a partir das regiões amorfas, resultando em terminais reduzidos e não reduzidos, além de produzir celobiose, e, finalmente, as  $\beta$ -glucosidases (ou EC 3.2.1.21), que hidrolisam celobiose a glicose (MAHESHWARI et al., 2000; ARO et al., 2005; FUKUDA et al., 2009). Para que haja a total hidrólise da celulose, todas essas enzimas agem combinadamente (Figura 8).

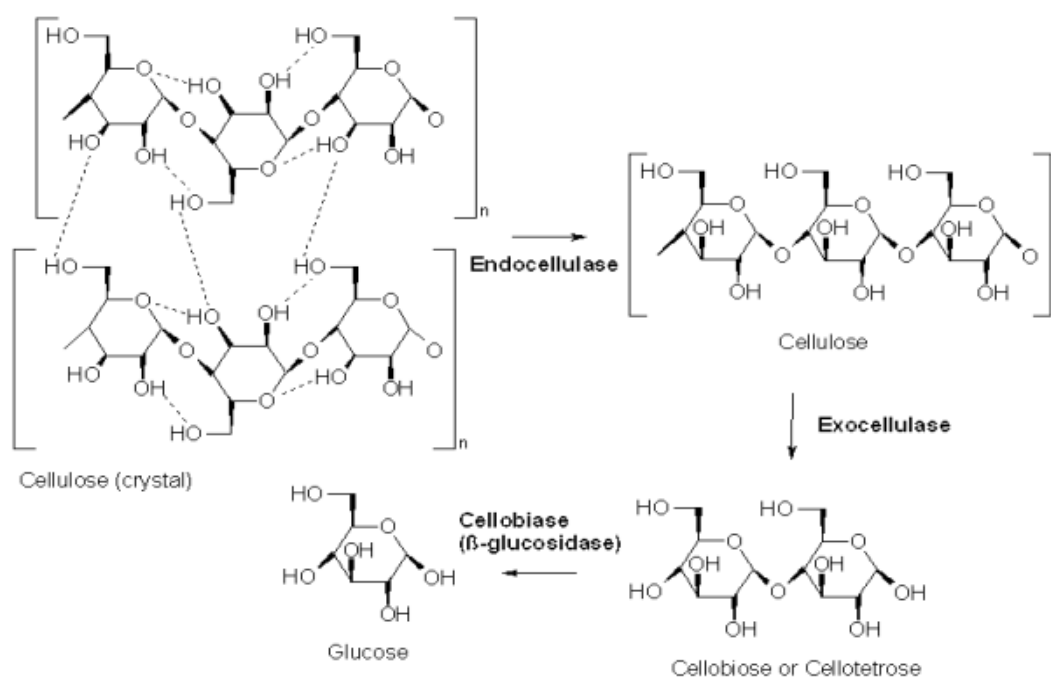


Figura 1. Representação esquemática de um sistema celulolítico.

Outro tipo de substrato encontrado em associação à celulose é a hemicelulose. Para a hidrólise das hemiceluloses, também é necessária a ação cooperativa de uma variedade de enzimas hidrolíticas, sendo a principal enzima a endo-1-4- $\beta$ -xilanase (EC 3.2.1.8). Sua ação ocorre na cadeia principal da xilana, gerando xilo-oligossacarídeos menores, substituídos ou não, que serão clivados pela exo-1-4- $\beta$ -xilanase (BIELY, 1985). Estes irão produzir dímeros de xilose, que geralmente são clivados pela  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37), liberando D-xilose como único produto da hidrólise (BIELY, 1985; SANDRIM et al., 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA, 2009).

Embora haja trabalhos prévios com cianobactérias envolvendo celulases, poucas cepas produtoras são conhecidas, além disso não há registros para produtoras de hemicelulases. Dessa forma, objetivou-se testar cepas quanto à capacidade de produção de celulases e hemicelulases. Para isso foram utilizadas cianobactérias provenientes de crostas biológicas de Cerrado e cultivadas na segunda etapa deste trabalho (Capítulo 2).

## Material e Métodos

### Axenização de culturas

Seis culturas uniespecíficas utilizadas em etapas anteriores deste trabalho (9CAN, 5FUR, 2CAN, 11CAN, 3CIP e 1CIP – Capítulo I, Tabela 1) foram submetidas a tratamento para eliminação de bactérias e fungos, procurando estabelecer condição apropriada para as análises de atividade de celulasas e hemicelulasas.

O tratamento utilizado foi a inoculação em meios de cultura BG11 (RIPPKA et al., 1979) acrescido de solução antibiótica e antimicótica (SIGMA) na concentração de 10 mL.L<sup>-1</sup> e 100 µl de cicloheximida (1 mg.mL<sup>-1</sup>) para cada poço de 6 ml, e crescimento durante sete dias em condições de temperatura 20°C ±1°C, irradiância 50 µmol fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. Após este período, foi feito teste de axenização por plaqueamento em meio de cultura LB e *Plate Count Agar* (Himedia) e crescimento por sete dias em condições de temperatura 37°C ±1°C, em escuro.

Quando observada a axenia, a amostra era reinoculada em meio de cultura comum e colocada novamente para crescer em condições normais de cultura. Após 30 dias de cultivo foi feita a primeira medição enzimática e após 60 dias, a segunda.

### Mensuração de atividade enzimática - Hemicelulase

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de 0,1 mL de meio de cultura com um mês de crescimento (fase superior do tubo de ensaio) e 0,9 mL de solução de xilana (1,0%, em solução tampão acetato 0,1 M, pH 5,0). A reação foi mantida a 45 °C por 10 minutos e, então, interrompida em banho de gelo. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de Somogyi-Nelson (1944), em que os açúcares liberados reagem com o arsenomolibdato, reduzindo-o e produzindo um composto de cor azul. Esta coloração é então considerada através de espectrofotometria e a absorbância obtida é convertida em concentração, através dos valores determinados anteriormente para a curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto, sob as condições de ensaio citadas.

### **Mensuração de atividade enzimática – Celulase**

A atividade de endoglucanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito para a atividade de xilanase utilizando-se, entretanto, 4% de carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) e 4-nitrophenyl b-D-glucopyranoside, como substrato.

### **Resultados e Discussão**

As seis amostras apresentaram absorvâncias negativas ou, quando positivas, dispostas fora da curva padrão de glicose. Dessa forma, os resultados revelaram que nenhuma das cepas analisadas apresentou atividade enzimática relacionada com celulases ou hemicelulases.

A proposta desta investigação e a hipótese de que seriam encontradas cepas produtoras de enzimas se deram pelo fato dos estudos anteriores terem sido desenvolvidos com cepas heterocitadas pertencentes aos gêneros *Anabaena* e *Calothrix*. Dessa forma, as análises, mesmo tendo sido limitadas às culturas uniespecíficas, foram focadas em organismos heterocitados.

Além disso, sabe-se pela literatura que organismos submetidos a condições de limitação fotossintética produzem maior quantidade de enzimas (GUPTA et al., 2010). Partindo desta ideia e considerando que o Cerrado é um ambiente extremo, levantou-se a questão se os organismos de crostas desta região não teriam, entre outras adaptações ao ambiente, produção enzimática e a característica de mixotróficos.

Além da incapacidade de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que os resultados parecem indicar, há outras possíveis explicações para os dados observados, como por exemplo, a idade da cultura. Embora as mesmas tenham sido reinoculadas em meio novo após a axenização, o período de axenização foi longo e a cultura já estava relativamente envelhecida. Essa possibilidade surge a partir do que foi verificado em estudo anterior (PRASANNA et al. 2008), em que, para alguns cultivos, a quantidade produzida de enzimas decaiu com o passar do tempo.

Além disso, não foi aplicada nenhuma condição conhecida como estimulante ao aumento de produção, pois o objetivo inicial era apenas a verificação da presença de atividade enzimática e não a produção em grande escala. Todavia, talvez estas cepas apenas produzam sob condições extremas, como, por exemplo, sob condição de restrição da atividade fotossintética (GUPTA et al. 2010).

As possíveis explicações ainda deixam abertas possibilidades para estudos futuros.



## Considerações finais

Os resultados negativos ainda não são totalmente conclusivos e deixam em aberto algumas alternativas que poderiam ter sido aplicadas anteriormente à mensuração, na tentativa de acelerar e facilitar a prospecção. Um exemplo seria a procura por determinados genes responsáveis pela produção ou o teste prático de inoculação de extrato em placas com fungos (PRASANNA et al., 2008; GUPTA et al., 2010, NATARAJAN et al, 2013).

De qualquer forma, é enfatizada a necessidade de estudo nesta área, principalmente pela dificuldade no encontro de cepas produtoras. Além disso, permanece a questão de quais poderiam ser os fatores a estarem influenciando esta produção quando nos organismos capacitados.

## Referências Bibliográficas

- ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S. & SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **J. Appl. Microbiol.** v. 106, p. 1-12. 2008.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 29, p. 719-739. 2005.
- BHADURY, P.; WRIGHT, P. C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta.** v. 219. p. 561-578. 2004.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends. Biotechnol.** v. 3, n. 11, p. 286-290. 1985.
- CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. & BHATNAGAR, A. K. Modulation of fungicidal potential of *Anabaena* strains by light and temperature. **Folia Microbiol.** v. 57, p. 199-208. 2012.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochem. Eng. J.** v. 44, p. 2-12. 2009.
- GUPTA, V.; PRASANNA, R.; NATRAJAN, C.; SRIVASTAVA, A. K.; SHARMA, J.

IDENTIFICATION, characterization and regulation of a novel antifungal chitosanase (cho) in *Anabaena* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 76, p. 2769–2777. 2010.

GUPTA, V.; NATARAJAN, C.; KUMAR, K. & PRASANNA, R. Identification and characterization of endoglucanases for fungicidal activity in *Anabaena laxa*. **J. Appl. Phycol.** v. 23, p.73–81. 2011.

GUPTA, V.; PRASANNA, R.; CHAUDHARY, V. & NAIN, L. Biochemical, structural and functional characterization of two novel antifungal endoglucanases from *Anabaena laxa*. **Biocatal. Agri. Biotechnol.** v. 1, p.338–347. 2012.

HAICHAR, F.Z.; ACHOUAK, W; CHRISTEN, R; HEULIN, T; MAROL. C.; MARAIS, M.F.; MOUGEL, C.; RANJARD, L.; BALESSENT, J. & BERGE, O. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. **Environ. Microbiol.** v. 9, p.625-634. 2007.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; MAHALINGESHWARA, K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiol. Mol. Biol.** v. 64, p. 461-488. 2000.

NATARAJAN, C.; GUPTA, V.; KUMAR, K & PRASANNA, R. Molecular Characterization of a Fungicidal Endoglucanase from the Cyanobacterium *Calothrix elenkinii*. **Biochem. Genet.** v. 51, p. 766-779. 2013.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** v. 153, p. 375-380. 1944.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. Production of xylanase by *Aspergilli* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **J. Ind. Microbiol. Biot.** v. 36, p. 149-155. 2009.

PRASANNA, R.; GUPTA, V.; NATARAJAN, C. & CHAUDHARY, V. Bioprospecting for genes involved in the production of chitosanases and microcystin-like compounds in *Anabaena* strains. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 26, p.717–724. 2010.

PRASANNA, R.; NAIN, L.; TRIPATHI, R.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; MIDDHA, S.; JOSHI, M.; ANCHA, R. & KAUSHIK, B. D. Evaluation of fungicidal activity of

extracellular filtrates of extracellular filtrates of cyanobacteria – possible role of hydrolytic enzymes. *J. Basic. Microbiol.* V. 48, n. 3, p. 186-194. 2008.

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

SANDRIM V. C.; RIZZATTI A. C. S.; TERENCEI H. F.; JORGE J. A.; MILAGRES A. M. F. & POLIZELI M. L. T. M. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process. Biochem.* v. 40, p. 1823-1828. 2005.

TAMOI, M.; KUROTAKI, H. & FUKAMIZO, T.  $\beta$ -1-4-Glucanase-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 is a  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase and functions in salt stress tolerance. *Biochem. J.* v. 405, p. 139-146. 2007.

## Capítulo V – Considerações finais gerais

---

O trabalho sumarizou 31 populações classificadas segundo à taxonomia clássica em 11 gêneros, sendo esta grande quantidade de grupos de cianobactérias encontradas nas crostas de Cerrado a confirmação da primeira hipótese do trabalho, que remetia a constatação da presença de variados grupos de cianobactérias nesta área.

Entre os grupos registrados muitos gêneros se mostraram comuns entre as assembleias de cianobactérias para crostas biológicas, entretanto, quando foram requisitadas identificações a nível de espécie, muitas populações não foram identificadas, fato este que confirmou a segunda hipótese proposta, a de que seriam registradas novas ocorrências taxonômicas para o Brasil.

As análises moleculares a partir de 19 sequências de 16S rRNA e 18 de ITS 16S-23S, enfatizaram e contribuíram com a problemática polifilia encontrada em inúmeros gêneros, como é o caso de *Leptolyngbya*, *Nostoc* e *Calothrix*. Também reafirmaram a existência de um novo gênero próximo a *Wilmottia* e *Microcoleus* e propuseram a definição de outro novo gênero, composto até o momento por duas populações. Além disso, enfatizaram a necessidade de uma investigação mais profunda para *Brasilonema*, gênero que teve sua estrutura levemente modificada após a inclusão destes novos dados.

Quanto às análises de atividade enzimática, embora tenham gerado resultados negativos até o momento, se fizeram importantes e ainda mais necessárias, principalmente pela dificuldade no encontro de cepas produtoras. Além disso deve-se buscar quais seriam os fatores que estariam permitindo cepas extremamente semelhantes, sobre as mesmas condições, selecionarem ou ativarem diferentemente seus metabolismos.

Os dois primeiros blocos de informação, portanto, demonstram a grande diversidade não acessada em ambientes extremos e pobremente investigados, e enfatizam a contribuição deste trabalho ao acessar pela primeira vez cianobactérias de solo de Cerrado.

Este levantamento também ressalta a necessidade de estudos em outros ambientes restritivos, como por exemplo a Caatinga, e compõe a base para futuras investigações em nível ecológico, como estudos de sucessão ecológica, produtividade primária, fluxos de nutrientes e dinâmicas de solo.

## **TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA**

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02/11/2016



---

Assinatura do autor