

VIVIANI FERREIRA

Caracterização morfológica e diversidade molecular de
Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica
paulista com ênfase em organismos aerofíticos

São José do Rio Preto

2008

VIVIANI FERREIRA

Caracterização morfológica e diversidade molecular de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com ênfase em organismos aerofíticos

Dissertação apresentada 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.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco

São José do Rio Preto

2008

Ferreira, Viviani.

Caracterização morfológica e diversidade molecular de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com ênfase em organismos aerofíticos / Viviani Ferreira. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

79 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Luis Henrique Zanini Branco

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Microrganismos - Evolução . 2. Morfologia (Biologia). 3. Microrganismos - Filogenia. 4 Cyanobacteria - Cultivo. 5. Cyanobacteria - Diversidade molecular. I. Branco, Luis Henrique Zanini. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III.T.

CDU - 579.8

VIVIANI FERREIRA

Caracterização morfológica e diversidade molecular de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com ênfase em organismos aerofíticos

Dissertação apresentada 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.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco
Professor Assistente Doutor
UNESP - São José do Rio Preto/SP

Prof^a Dr^a Marli de Fátima Fiore
Professora Doutora
CENA/USP - Piracicaba/SP

Prof^a Dr^a Célia Leite Sant'Anna
Pesquisadora Científica nível VI
Instituto de Botânica de São Paulo - São Paulo/SP

São José do Rio Preto, 18 de março de 2008.

Aos meus queridos pais, Elisabete e José Pascoal, e irmãos, Patrícia e Juliano, por todo apoio e dedicação em todos os momentos de minha vida, pelos ensinamentos que me tornaram uma pessoa persistente e determinada na realização de todos os meus sonhos, pela confiança, admiração, companheirismo, amizade e amor, dedico.

A Marcelo, meu querido esposo, pela incansável ânsia em almejar um futuro de conquistas e realizações, juntos nesta caminhada, ofereço.

A Deus, que está sempre ao meu lado e me impulsiona para a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco pela incansável busca de conhecimentos, o que proporciona vastos e sábios ensinamentos aos seus alunos, pela confiança e dedicação, pela ânsia em superar os obstáculos das metodologias, pela perseverança e principalmente pela dedicação em construir pessoas dignas e éticas no meio científico.

Ao Prof. Dr. Orlando Necchi Júnior pelas amostras de cianobactérias aquáticas e por todos os seus conselhos.

Ao Prof. Dr. José Osmar Gaspar por autorizar o uso de seu laboratório e ceder os equipamentos que são indispensáveis nas etapas de quantificação e clonagem molecular e pelos inúmeros conselhos e ensinamentos.

À Prof. Dra. Marli Fiore e sua doutoranda Adriana Sturion Lorenzi do CENA/USP de Piracicaba pelo treinamento em técnicas de Biologia Molecular de Cianobactérias, que foi fundamental para o início desta etapa metodológica.

Às Prof^{as} Dr^{as}. Paula Rahal, Eleni Gomes e Neusa Taroda Ranga pela dedicação e inúmeros incentivos para que eu persistisse nesta longa caminhada.

À Técnica Maria Helena Carabolante pelo apoio e amizade nestes anos.

Ao pessoal do Laboratório de Fitovirologia, Aninha, Lívia, Tadaiti e Ricardo pelo inesquecível auxílio prestado no desenvolvimento das técnicas moleculares, e pela amizade.

A Carol, Fátima, Paola e Paulo do Laboratório de Estudos Genômicos pelo sequenciamento de minhas amostras.

A todos do laboratório de ficologia em especial: Nádia, Marcos, Jeferson, Anna Isabel e Carmélia, pela alegre rotina proporcionada no dia-a-dia de trabalho e principalmente pela grande amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e a CAPES, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I - Flora de Nostocales com ramificações verdadeiras com ênfase em ambientes aerofíticos da região de mata atlântica paulista	5
RESUMO	6
I - INTRODUÇÃO	7
II - OBJETIVOS	10
III - MATERIAL E MÉTODOS	10
1 - Coleta das cianobactérias	10
2 - Caracterização morfológica	12
IV - RESULTADOS	12
V - DISCUSSÃO	20
VI - CONCLUSÃO	22
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II - Variações de condições de cultivo para o crescimento de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista	28
RESUMO	29
I - INTRODUÇÃO	30
II - OBJETIVOS	32
III - MATERIAL E MÉTODOS	33
1 - Meios de cultivo.....	33
2 - Inóculo	34
3 - Manutenção dos cultivos.....	35
4 - Potencialização do crescimento dos cultivos.....	35
5 - Uso de antibióticos para a purificação dos cultivos.....	35
6 - Avaliação do desenvolvimento das cepas em cultivo.....	36
IV - RESULTADOS	38
V - DISCUSSÃO	41
VI - CONCLUSÃO	46
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
VIII - ANEXO	52

CAPÍTULO III - Caracterização molecular de populações de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com base no rRNA 16S	54
RESUMO	55
I - INTRODUÇÃO.....	56
II - OBJETIVOS.....	59
III - MATERIAL E MÉTODOS	59
A - Caracterização molecular das linhagens usando o rRNA 16S.....	59
1 - Extração do DNA genômico.....	59
2 - Amplificação do gene rRNA 16S	60
3 - Clonagem de produtos de PCR.....	61
4 - Sequenciamento do rRNA 16S	62
B - Processamento e análise filogenética das seqüências	63
IV - RESULTADOS	64
V - DISCUSSÃO	66
VI - CONCLUSÃO.....	70
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
VIII - ANEXOS	75

INTRODUÇÃO GERAL

As Cyanobacteria, também conhecidas como cianofíceas, cianoprocaríotos ou algas azuis, são organismos procariotos com clorofila *a*, sendo que alguns representantes, como *Prochloron*, *Prochlorothrix* e *Prochlorococcus*, possuem também clorofila *b* e outros, como *Acharyochloris*, sintetizam clorofila *d*. Esse grupo de organismos fotossintetizantes oxigênicos possuem fotossistemas I e II (ZEHR *et al.*, 1997). Por estas razões apresentam semelhanças desde bactérias até as plantas e, portanto, é evidente a importância deles na relação evolutiva entre as espécies viventes. Estima-se, a partir de registros fósseis, que tiveram origem há aproximadamente 3,5 bilhões de anos e que foram indispensáveis para a conversão da atmosfera terrestre primitiva na forma atual (HENSON *et al.*, 2002).

Podem ser unicelulares (solitárias ou agregadas), coloniais e filamentosos com ou sem ramificações, que podem ser do tipo falsa (simples ou duplas) ou verdadeira (V, T e Y, entre outras) (DESIKACHARY, 1959).

Considerando-se o grupo como um todo, são organismos ecologicamente bem distribuídos, presentes nos mais diversos tipos de biótopos, desde geleiras até às proximidades de vulcões e fontes termais. Podem ser aquáticos, marinhos ou dulcícolas, de corpos d'água lênticos ou lóticos, ou aerofíticos, vivendo aderidos a rochas, troncos ou mesmo partículas de solo.

A alta diversidade de habitats e a conseqüente divergência ecológica podem explicar a ampla diversificação de morfotipos (e especiação) dos tipos cianobacterianos. Esta diversificação é baseada, muito provavelmente, em uma adaptabilidade rápida e a estabilização genética de novos eco e morfotipos em novos ambientes (REJMANKOVA *et al.*, 2004). A longevidade do grupo também é um fator que pode ter papel importante na diversidade de formas e na ampla distribuição ecológica.

A importância das cianobactérias é destacada tanto pela significativa representação na biodiversidade e nos processos ecológicos do planeta quanto na produção de compostos secundários de ampla utilização industrial, como os biofertilizantes, por exemplo, (WHITTON, 2000). Atualmente diversos estudos têm sido realizados enfocando diferentes grupos das cianobactérias com o intuito de investigar suas qualidades e aplicabilidades na indústria de alimentos, têxtil e farmacêutica ou, ainda, no melhoramento dos processos agrícolas (SINGH, 1961; DOKULIL & TEUBNER, 2000; GRAHAM & WILCOX, 2000; WHITTON, 2000).

Apesar da importância ecológica, econômica e medicinal do grupo, estudos sobre cianobactérias aerofíticas não são muito abundantes e há relativamente poucas pesquisas publicadas sobre eles.

As relações filogenéticas entre as cianobactérias, por sua vez, vêm sendo estudadas pelos especialistas nas duas últimas décadas com a finalidade de construir o conhecimento sobre o parentesco entre estes organismos. Inicialmente as cianobactérias eram classificadas segundo suas características morfológicas, mas, a realização desta análise isoladamente não oferece credibilidade, segundo os estudiosos WILMOTTE & HERDMAN (2001). Atualmente, são observados outros aspectos, empregando ferramentas, que englobam análises do arranjo da ultraestrutura (principalmente dos tilacóides), estudos moleculares e ecologia, constituindo uma abordagem denominada polifásica.

Enquanto estudos ultraestruturais e ecológicos podem ser realizados sem muitas limitações, para estudos moleculares especificamente torna-se recomendável a manutenção das populações em bancos de cultura com condições adequadas para o crescimento das cianobactérias. Este é um aspecto crítico, pois muitas cianobactérias não se estabelecem em condições artificiais e, portanto, não são cultiváveis. A determinação de um meio de cultura e das condições específicas para o crescimento destes organismos é um dos grandes obstáculos nesta linha de pesquisa sobre as cianobactérias. No estudo do rRNA 16S, a ausência destas em meio de cultura, com a conseqüente necessidade de uso de amostras provenientes do campo, dificulta o processo de extração e amplificação do material genético pois, por exemplo, as bactérias presentes nas amostras, que apresentam condição celular semelhante, também têm o seu material genético amplificado. Assim, para se conseguir seqüências gênicas de amostras de campo é indispensável o procedimento de clonagem molecular, para que se possa encontrar o clone que contém o inserto (seqüência de DNA) de interesse. Culturas não axênicas também requerem o mesmo tipo de procedimento, embora seja considerada uma situação mais favorável do que o material proveniente diretamente do campo.

A Ordem Nostocales inclui os organismos mais complexos do Filo Cyanobacteria. São essencialmente filamentosos, podendo ser ramificados ou não e apresentam, quase que obrigatoriamente, uma célula diferenciada denominada de heterócito. Esta célula é responsável por abrigar e proteger do contato com o oxigênio uma importante enzima, a nitrogenase, que é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico em uma forma quimicamente mais simples e biologicamente assimilável. A reprodução é exclusivamente assexuada e se dá pela formação de hormogônios, hormocitos e acinetos (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1990; HOFFMANN *et al.*, 2005).

Neste estudo são abordados os organismos que apresentam ramificações verdadeiras, ou seja, que possuem células que se dividem em mais de um plano e que, em sistemas de classificação anteriores, eram colocados em uma ordem própria, Stigonematales

(ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1990). Entretanto, alguns estudos vêm demonstrando que a ocorrência de ramificações verdadeiras não é um critério filogeneticamente importante para a separação no nível Ordem. Segundo o sistema de classificação mais recente, proposto por HOFFMANN *et al.* (2005), os resultados de análises ultraestruturais e moleculares, têm revelado que todas as cianobactérias heterocitadas provavelmente possuíram um ancestral único e muitas análises filogenéticas apresentam estes organismos agrupados, constituindo uma mesma Ordem, Nostocales, independentemente da presença ou mesmo do tipo de ramificação (GUGGER & HOFFMANN, 2004). Tais dados indicam a relevância filogenética da ocorrência do heterócito em detrimento à capacidade de formar filamentos verdadeiramente ramificados.

São raros os estudos realizados com as cianobactérias com ramificação verdadeira, tanto aqueles que abordam análises morfológicas como os que enfocam aspectos moleculares. Provavelmente isto se deve à dificuldade na obtenção de uma condição específica de crescimento em laboratório destes organismos. Os dados genéticos disponíveis, por exemplo, são limitados, restringindo-se a seqüências (muitas delas parciais com menos de 1000 pb) de alguns poucos gêneros como *Capsosira*, *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Nostochopsis*, *Stigonema* e *Westiellopsis*. Este último é um dos gêneros de cianobactérias aerofíticas mais comuns e freqüentes em vários habitats e, paradoxalmente, possui somente uma espécie parcialmente seqüenciada e disponibilizada no GenBank.

Em razão de todo o exposto, torna-se evidente a necessidade de uma maior atenção para com as cianobactérias aerofíticas heterocitadas de ramificação verdadeira, buscando-se a obtenção de dados que ajudem a detalhar o conhecimento sobre estes organismos em termos de diversidade e ecologia, bem como de elementos que auxiliem a esclarecer suas relações filogenéticas.

Deste modo, o objetivo geral deste trabalho foi expandir os conhecimentos deste importante, complexo e pouco conhecido grupo de cianobactérias, as Nostocales com ramificações verdadeiras, por meio de estudos mais detalhados. Para isso, utilizaram-se dados morfológicos e ecológicos, testes de cultivo em diferentes meios e condições de cultura, procurando manter as células sob estas condições artificiais de crescimento. Por fim, foi feita a caracterização molecular de populações a partir do sequenciamento do gene rRNA 16S para a avaliação dos parentescos com outros organismos do grupo e também com os outros grupos dentro das Cyanobacteria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes.5-Stigonematales. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.
- DESIKACHARY, T.V. **Cyanophyta**. Indian Council Agricultural Research, New Delhi, 1959.
- DOKULIL, M.T.; TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 438, p. 1-12, 2000.
- GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. Algae, ed. **Prentice Hall**, p. 97-131, 2000.
- GUGGER, M.F.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales), **International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology**, Luxemburgo, v. 54, p. 349-357, 2004.
- HENSON, B.J.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences. **Current Microbiology**, v. 45, p. 161-164, 2002.
- HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) - state in 2004. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 95-115, 2005.
- REJMÁNKOVÁ, E.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Cyanobacteria - a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 189-199, 2004.
- SINGH, R.N. Role of blue-green algae in nitrogen economy of India. **Council of Agricultural Research**, New Delhi, Indian, 1961.
- WHITTON, B.A. Soils and rice fields. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (eds) **The Ecology of Cyanobacteria**. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 233-255, 2000.
- WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRN sequences. In GARRITY, GM (ed) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed. Springer, New York, p. 487-493, 2001.
- ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; HIORNS, W.D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary applications and potential applications to natural assemblages. **Microbiology**, v. 143, p. 1443-1450, 1997.

CAPÍTULO I

Flora de Nostocales com ramificações
verdadeiras com ênfase em ambientes
aerofíticos da região de mata atlântica paulista

Flora de Nostocales com ramificações verdadeiras em ambientes aerofíticos da região de mata atlântica paulista

RESUMO: Tradicionalmente, as cianobactérias são classificadas com base em sua morfologia, porém, exibem grande variação nas formas e dimensões em resposta às condições ambientais. Mais recentemente, informações sobre o hábitat passaram a ser mais relevantemente incluídas nas análises taxonômicas, pois se considera que diferentes unidades taxonômicas morfológicamente definidas possuem adaptabilidade ecológica restrita e que a idéia de ubiquidade das espécies não corresponde à realidade. Organismos com ramificações verdadeiras da Ordem Nostocales representam o mais alto grau de complexidade e diferenciação morfológica de organização do nível procariota. Comumente encontrados em ambientes aerofíticos como rochas, troncos de árvores e solos, constituem um grupo cuja taxonomia tem se revelado problemática, principalmente daqueles provenientes de regiões de clima tropical. Na região de mata atlântica paulista foram coletadas 21 amostras de cianobactérias aerofíticas, provenientes de 15 pontos amostrados, resultando no levantamento de 11 espécies, sendo duas do gênero *Hapalosiphon*, uma de *Nostochopsis*, uma de *Spelaeopogon* e sete de *Stigonema*. Em relação às características ambientais, foram mais freqüentemente encontradas em ambientes levemente ácidos (pH 4,0-5,0), com irradiância de 3 a 2740 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, temperatura de 18-38°C e umidade 62-94% e o substrato ocupado mais comum foi o rochoso. Devido à importância e representatividade desta ordem em comunidades aerofíticas pode-se dizer que os dados morfológicos integrados aos dados ecológicos e biogeográficos são indispensáveis para melhor definir e distinguir filogeneticamente os organismos da região de mata atlântica paulista.

I - INTRODUÇÃO

As Cyanobacteria fósseis datam de cerca de 3,5 bilhões de anos e são muito próximas às formas viventes existentes, o que sugere uma lenta taxa evolutiva sendo que estes organismos foram os responsáveis pela conversão de uma atmosfera primitiva anaeróbica em aeróbica, o que permitiu a diversidade de vida existente atualmente (HENSON *et al.*, 2002). São procariotos fotossintéticos que formam um grupo monofilético morfologicamente diverso dentro do domínio Bacteria (LITVAITIS, 2002). Podem apresentar-se de diferentes formas, unicelulares (solitárias ou agregadas), coloniais ou filamentosas, ramificadas ou não, podendo estas ser falsas ou verdadeiras (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1990). Outras características morfológicas de interesse taxonômico são, bainhas, pigmentação, dimensões, plano de divisão celular, forma da célula e número de células em uma colônia, entre outros, entretanto, muitas destas características podem ser variáveis devido a alterações das condições ambientais (SILVA & SANT'ANNA, 1996; LITVAITIS, 2002).

São organismos ecológica e biotecnologicamente importantes, pois são produtores primários e uma rica fonte de compostos secundários bioativos (CASTIGLIONI *et al.*, 2004). São exemplos disto, as associações simbióticas das cianobactérias com líquens e a produção de biofertilizantes e antibióticos, amplamente utilizados na agricultura e na indústria, respectivamente, verificados pelos trabalhos realizados por ANTARIKANONDA *et al.* (1994), WOERGOETTER (2002) e SOLTANI *et al.* (2005). Estudos recentes com um representante de Nostocales com ramificação verdadeira, *Fischerella* 43239, demonstram que esta cianobactéria é capaz de formar um biofilme que contém compostos inseticidas contra larvas de *Chironomus* sp. (insetos), comprovando o papel destes organismos como bioinseticidas naturais (BECHER & JUTTNER, 2005). MORALES *et al.* (2005) estudaram a biomassa e a taxonomia de comunidades de cianobactérias, incluindo espécies de *Stigonema*, de ambiente tropical que formam biofilmes com outros organismos como diatomáceas e outras microalgas eucariotas.

A hipótese que diferentes genótipos e morfotipos são estrita e ecologicamente delimitados (KOMÁREK, 1994) tem sido corroborada e entendida como a interpretação mais adequada sobre a distribuição ecológica das espécies. Teoricamente especiação ecológica pode ser devida à seleção natural em decorrência, por exemplo, de um isolamento geográfico (OGDEN & THORPE, 2002). REJMÁNKOVÁ *et al.* (2004) argumentam que a alta diversidade de habitats, principalmente a verificada nos trópicos e a conseqüente divergência ecológica podem explicar a ampla diversificação de morfotipos (e especiação) dos tipos cianobacterianos. Segundo estes autores, a diversificação é baseada muito provavelmente em uma adaptabilidade rápida e a estabilização genética de novos eco e morfotipos em novos ambientes.

Apesar da importância ecológica, econômica e medicinal do grupo, são escassos os estudos e/ou publicações sobre cianobactérias aerofíticas. Vários trabalhos encontrados em literatura foram principalmente realizados enfocando-se as cianobactérias de regiões tropicais do mundo como HOFFMANN (1986), SARTHOU *et al.* (1995), BÜDEL *et al.* (1997, 2002) e COUTÉ *et al.* (1999). No Brasil, alguns exemplos de estudos científicos são SANT'ANNA *et al.* (1991) que realizaram o levantamento da flora de cianobactérias de uma pequena caverna com escoamento de água em suas paredes (Gruta-que-chora, Ubatuba-SP) e registraram a ocorrência de 41 táxons sendo 51,1% refere-se às espécies heterocitadas e AZEVEDO (1991) que estudou a flora edáfica de cianobactérias do Jardim Botânico de São Paulo com base em material cultivado a partir de amostras de terra de três profundidades diferentes. Seus resultados revelaram a ocorrência de 24 táxons e o domínio qualitativo de Nostocales. Outros trabalhos também importantes são SANT'ANNA (1984), SANT'ANNA *et al.* (1991) e AZEVEDO (1991). Alguns artigos publicados com o único objetivo de descrever novos táxons são HOFFMANN (1991), AZEVEDO & SANT'ANNA (1994 a,b), ASECIO *et al.* (1996), BRANCO & NECCHI-JÚNIOR (1999), FLECHTNER *et al.* (2002), KOMÁREK (2003), BRANCO *et al.* (2006) e SANT'ANNA *et al.* (2007).

As relações filogenéticas entre as cianobactérias são ainda escassamente entendidas. Tradicionalmente são classificadas usando caracteres morfológicos e ecológicos (GEITLER, 1932; DESIKACHARY, 1959; LANE *et al.*, 1985). Estruturas morfológicas podem ser utilizadas para reconstruir a filogenia, pois são homólogas, porém estruturas distintamente diferentes podem ter uma origem comum ou estruturas similares podem ter diferentes origens, pois morfologia comum não necessariamente implica em descendente comum (HOFFMANN *et al.*, 2005). STANIER *et al.* (1978) e RIPPKA *et al.* (1979) argumentam que a sistemática das cianobactérias não deve basear-se somente nos métodos tradicionais da Botânica, mas também utilizando os organismos depositados em coleções de cultura permanentes como as *Bacteria*. É extremamente árduo definir as relações taxonômicas e filogenéticas das cianobactérias por causa das poucas distinções de características consistentes que suportam um esquema taxonômico seja este pelo sistema nomenclatural botânico ou bacteriano (ZEHR *et al.*, 1997; HENSON *et al.*, 2002). FIORE *et al.* (2007), em seu estudo com organismos do gênero *Brasilonema* aerofíticos de região tropical, descreveram os táxons combinando dados citomorfológicos e moleculares de acordo com os dois códigos nomenclaturais Botânico e Bacteriológico. Atualmente as cianobactérias são consideradas bactérias autotróficas com fotossíntese oxigênica (ISHIDA *et al.* 1997).

Segundo GOLÚBIC (1976), os organismos da ordem Stigonematales constituem os procariotos mais evoluídos em termos de organização do talo e diferenciação celular. Estes apresentam filamentos com ocorrência obrigatória de heterócitos e ramificação verdadeira em todas as famílias podendo ser combinada facultativamente com ramificação falsa (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1990), mas pouco se sabe sobre organismos desta ordem presentes nos ecossistemas brasileiros (SILVA & SANT'ANNA, 1996). São imprescindíveis estudos mais amplos sobre estes organismos em particular, devido a sua importância tanto na ecologia quanto na economia mundial.

O que caracteriza as Nostocales é a presença de uma célula especializada, denominada de heterócito, que protege a nitrogenase da oxidação pelo oxigênio. Segundo BERMAN-FRANK *et al.* (2003), as diversas estratégias para se superar o problema do oxigênio refletem na ampla flexibilidade e nichos ocupados por estas cianobactérias. Este se desenvolve em intervalos de aproximadamente 10-15 células vegetativas (ADAMS, 2000).

Em um passado recente a classificação das Nostocales com ramificações verdadeiras baseava-se no estudo realizado por ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK (1990) que as classificavam como ordem Stigonematales sendo esta subdividida em 8 famílias (Chlorogloeocapsaceae, Capsosiraceae, Stigonemataceae, Fischerellaceae, Borzinemataceae, Loriellaceae, Nostochopsaceae e Mastigocladaceae) e 48 gêneros (sendo vários deles não claramente definidos). A partir do alto grau de complexidade morfológica diferenciavam-nas pela estrutura do filamento, tipo de ramificação, posição de heterócito e processo de reprodução. Atualmente, a classificação de Nostocales baseia-se no trabalho publicado por HOFFMANN *et al.* (2005) que criaram um novo sistema de classificação baseado em dados polifásicos como: caracteres morfológicos (tipo de divisão celular, polaridade celular, tipo de ramificação, morfologia do talo, etc.), em muitos gêneros por dados moleculares, arranjo da ultraestrutura (tilacóides), características ecológicas, entre outros.

Há poucas coletas e estudos no país sobre cianobactérias aerofíticas, principalmente de Nostocales com ramificações verdadeiras, além disso, o fato destes ocorrerem geralmente em locais não poluídos, limita ainda mais sua distribuição, pois são muito sensíveis aos efeitos da poluição, sendo um dos primeiros organismos a desaparecerem quando afetados (SILVA & SANT'ANNA, 1996).

Segundo KOMÁREK (2006), estudos florísticos são pouco populares na pesquisa moderna ficológica, entretanto, estudos comparativos de populações provenientes de diferentes habitats (ou de habitats similares e diferentes regiões) são importantes para o entendimento do diverso mundo cianobacteriano. Diz ainda que os estudos florísticos e ecológico-taxômicos

devem considerar os conhecimentos modernos da taxonomia cianobacteriana e que estudos florísticos são particularmente importantes se combiná-los a análises fenotípicas e moleculares. Entretanto, segundo o mesmo autor, combinar estas diferentes metodologias pode ser complicado e consumir tempo, e requer uma ampla experiência com a diversidade morfológica cianobacteriana.

Nostocales com ramificações verdadeiras é uma das ordens mais freqüentes em ambientes terrestres (verificado, por exemplo, em trabalhos científicos de SANT'ANNA *et al.*, 1991; AZEVEDO, 1991 & ASECIO, 1996) e a taxonomia do grupo, principalmente em regiões tropicais tem se revelado uma problemática, e devido à esta importância e representatividade nas comunidades aerofíticas pode-se dizer que os dados morfológicos integrados aos dados ecológicos e biogeográficos são indispensáveis para melhor definir e distinguir filogeneticamente estes organismos em particular.

II - OBJETIVOS

- Ampliação do conhecimento taxonômico das cianobactérias aerofíticas com ramificações verdadeiras da região de mata atlântica paulista.
- Caracterização morfológica das populações encontradas.
- Levantamento de variáveis ambientais (substrato, pH, irradiância, temperatura e umidade) sob os quais as populações ocorrem.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Coleta das cianobactérias

Amostras de cianobactérias foram coletadas na região de mata atlântica ao longo do litoral norte paulista, na Serra do Mar (Figura 1), e a vegetação pode ser formalmente descrita como Floresta Ombrófila Densa. As temperaturas médias anuais variam de acordo com a altitude ao nível do mar oscilam entre 14 e 21°C e nas maiores altitudes, entre 18 a 19°C. A precipitação média anual é de 2100 mm ao nível do mar e 4600 mm nas regiões montanhosas e a umidade relativa do ar é superior a 80%. (SALATI FILHO & COTTAS, 2003).

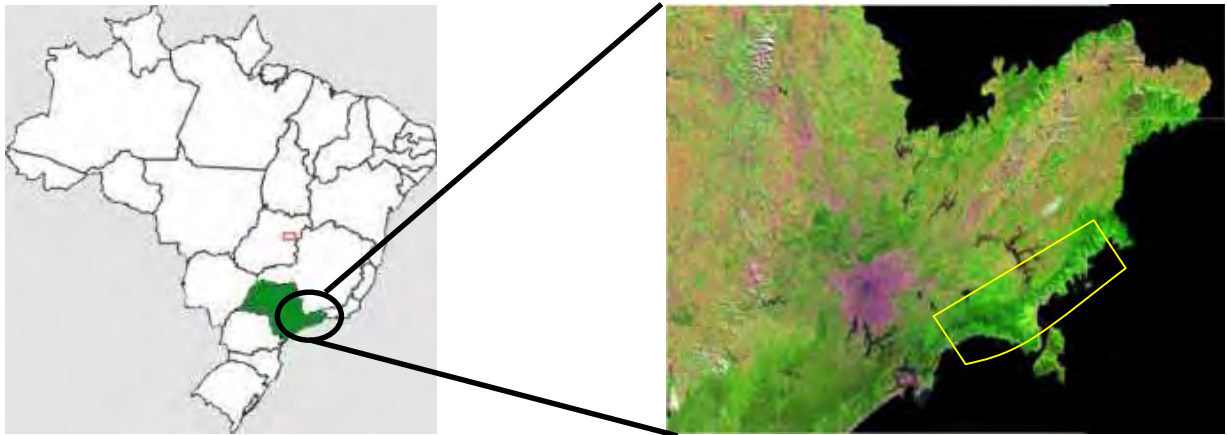


Figura 1. Esquema do estado de São Paulo, mostrando os remanescentes de Floresta Ombrófila (Imagem de satélite) e a área amostrada (circulado) (EMBRAPA).

As amostragens foram feitas ao longo das seguintes rodovias: Mogi-Bertioga, Tamoios, Osvaldo Cruz, Rio-Santos e Cunha-Parati (Tabela 1). Os locais amostrados foram visitados entre os dias 31 de março e 1º de abril de 2004, logo após o período de chuvas, 16 e 17 de outubro de 2006 e novamente nos dias 22 e 23 de novembro de 2007.

Tabela 1. Localização, coordenadas geográficas e altitude dos pontos de coleta.

PONTOS	LOCAIS E COORDENADAS
01	Rodovia Mogi-Bertioga (Km 62) - 46°10'08"W; 23°35'51"S - Altitude: 800 m
02	Rodovia Mogi-Bertioga (Km 76) - 46°05'52"W; 23°41'07"S - Altitude: 791 m
03	Rodovia Mogi-Bertioga (Km 76) - 46°05'52"W; 23°41'09"S - Altitude: 787 m
04	Rodovia BR-101 (Km 202) - 45°57'14"W; 23°46'21"S - Altitude: 22 m
05	Rodovia Tamoios (Km 78) - 45°26'43"W; 23°36'10"S - Altitude: 183 m
06	Rodovia Tamoios (Km 71) - 45°26'57"W; 23°35'16"S - Altitude: 600 m
07	Rodovia Rio-Santos (Km 79) - 45°14'47"W; 23°32'56"S - Altitude: 23 m
08	Rodovia Rio-Santos (Km 65) - 45°08'38"W; 23°29'39"S - Altitude: 66 m
09	Rodovia Rio-Santos (Km 65) - 45°07'56"W; 23°30'34"S - Altitude: nível mar
10	Rodovia Osvaldo-Cruz (Km 86) - 45°07'19"W; 23°23'06"S - Altitude: 122 m
11	Rodovia Osvaldo-Cruz (Km 85) - 45°07'07"W; 23°22'37"S - Altitude: 309 m
12	Rodovia Rio-Santos (Km 40) - 45°01'43"W; 23°24'50"S - Altitude: 77 m
13	Rodovia Cunha - Parati - 44°50'21"W; 23°09'54"S - Altitude: 1460 m
14	Paraibuna - rio Negro (Cachoeira) - 45°27'31"W; 23°33'48"S
15	Caraguatatuba - rio Massaguaçu - 45°19'31"W; 23°33'51"S

Massas visíveis de cianobactérias foram aleatoriamente coletadas com espátula ou canivete e, após o recolhimento, as amostras foram mantidas secas (em temperatura ambiente) em sacos de papel.

Além das características macroscópicas das massas, os seguintes parâmetros ambientais foram também anotados na primeira coleta: coordenadas geográficas e altitude (GPS - Global Positioning System), temperatura do ar e da massa de cianobactérias (termômetro), umidade do ar e da massa de cianobactérias (higrômetro), pH (phmetro) e irradiância (fotômetro).

Adicionalmente foram coletadas duas amostras de cianobactérias de ambientes lóticos (aquáticos), para comparar as possíveis diferenças de crescimento entre cianobactérias aerofíticas e aquáticas.

2 - Caracterização morfológica

As populações encontradas foram caracterizadas sob microscópio estereoscópio (Carl Zeiss Jena, modelo Laboval 3) e microscópio fotônico (Carl Zeiss Jena, modelo Jenamed), com câmara clara acoplada ao sistema óptico, segundo os critérios usuais da taxonomia morfológica, o que inclui parâmetros quali e quantitativos. Os organismos foram fotografados (Câmera Olympus PM-20, acoplada a microscópio fotônico Olympus - modelo BX-50), para ilustrar as características mais importantes para a taxonomia destes organismos.

Os táxons encontrados e identificados foram tratados sob o sistema de classificação proposto por HOFFMANN, KOMÁREK & KASTOVSKÝ (2005).

IV - RESULTADOS

1 - Caracterização das amostras de cianobactérias

Dos 15 pontos distintos de mata atlântica foram coletadas 21 amostras de cianobactérias aerofíticas resultando em 11 espécies da ordem Nostocales com ramificações verdadeiras, das quais, duas são do gênero *Hapalosiphon*, uma do gênero *Nostochopsis*, uma do gênero *Spelaeopogon* e sete do gênero *Stigonema*. As características dos pontos amostrados com relação a irradiância total (IT) e da massa (IM), temperatura do ar (TA) e da massa (TM) e umidade relativa do ar (URA) e sobre a massa (URAm) foram muito diversificadas entre os pontos amostrados (Tabela 2).

Tabela 2: Características ambientais selecionadas das amostras coletadas nos diferentes pontos: IT - Irradiância Total ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$); IM - Irradiância na Massa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$); TA - Temperatura do Ar ($^{\circ}\text{C}$); TM - Temperatura da Massa ($^{\circ}\text{C}$); URA - Umidade Relativa do Ar (%); URAm - Umidade Relativa do Ar sobre a massa (%).

Ponto	Amostra	pH	IT	IM	TA	TM	URA	URAm	Substrato
01	01	5,0	385	110	19,6	19,9	85,0	90,0	Solo
02	02	4,0	300	110	21,8	20,6	74,0	81,0	Solo
03	03	5,0	300	85	21,1	19,5	76,0	79,0	Rocha
04	04	10,0	800	260	27,4	28,1	83,0	84,0	Rocha
05	05	4,0	1900	1900	27,0	26,5	65,0	71,0	Rocha
06	06	4,0	1700	1700	26,0	36,0	55,0	62,0	Solo
	07	4,0	1700	1700	26,0	36,0	55,0	62,0	Solo
07	08	4,0	2740	2740	30,6	38,4	67,0	70,0	Rocha
08	09	4,0	680	330	27,7	23,9	74,0	81,0	Rocha
	10	4,0	680	330	27,7	23,9	74,0	81,0	Rocha
	11	4,0	680	35	27,7	22,9	74,0	75,0	Rocha
	12	4,0	680	280	27,7	24,0	74,0	77,0	Rocha
09*	13	-	-	-	-	-	-	-	Rocha
10	14	5,0	314	160	24,6	25,5	80,0	87,0	Rocha
11	15	4,0	65	30	22,3	21,7	92,0	94,6	Solo
12	16	5,0	10	3	25,1	23,8	90,0	93,0	Rocha
	17	5,0	10	4	25,1	25,5	90,0	141,0	Solo
13	18	5,0	2400	60	21,9	19,5	59,0	67,0	Rocha
	19	9,0	2400	2200	21,9	28,1	67,0	68,0	Rocha
14*	20	-	-	-	-	-	-	-	Aquática
15*	21	-	-	-	-	-	-	-	Aquática

* dados não coletados.

2 - Descrição das espécies

Hapalosiphon aureus W. West & G.S. West, J. Bot. 35: 241, 1897.

(Figuras 2-3)

Massa com filamentos emaranhados, cespitosa; filamentos sem distinção nítida entre filamento principal e ramificações, unisseriados, 7,0-15,0(-17,5) μm diâm.; ramificações geralmente de um único lado do filamento; bainha fina a moderadamente espessa, hialina a amarelo-acastanhado; tricomas constritos, 5,0-13,0 μm diâm.; células 4,0-10,0(-12,0) μm compr., 0,4 a 1,5 vezes mais longas do que largas; células contendo granulações, conteúdo azul-esverdeado; heterócitos não visualizados.

Condições ambientais: n = 1; amostra: 01; TA = 19,6 $^{\circ}\text{C}$, TM = 19,9 $^{\circ}\text{C}$, URA = 85%, URM = 90%, IM = 110 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, pH = 5, S = solo.

Hapalosiphon sp.

(Figuras 4-5)

Massa formada por filamentos densamente emaranhados, prostados, sem distinção nítida entre o filamento principal e as ramificações, unisseriado, 6,0-9,0(-10,7) μm diâm.; ramificações geralmente em um lado do filamento muito longas, ramificações falsas ocasionalmente presentes; bainha fina a moderadamente grossa, hialina a amarelo-acastanhado; tricomas constrictos, 5,0-7,2(-7,6) μm diâm.; células 5,0-7,0(-10,5) μm compr., 0,75 a 1,33(-1,6) vezes mais longas do que largas; células contendo granulações, conteúdo celular verde claro a verde-azul claro; heterócitos freqüentes, cilíndricos a sub-quadráticos, (4-)5,0-7,0(-10,0) μm compr., 5,0-8,0 μm diâm.; acinetos cilíndricos, as vezes em longas cadeias, usualmente com uma grande gota de óleo no seu interior, 8,0-11,0 μm de compr., 5,5-7,0 μm diâm., epispório espesso, liso, amarelo acastanhado escuro.

Condições ambientais: n = 1; amostra: 15; TA = 22.3°C, TM = 21.7°C, URA = 92%, URM = 94%, IM = 30 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH = 4, S = solo.

Comentário: esta população apresenta características muito próximas às de *H. hibernicus* e *H. welwitschii*. Assemelha-se à primeira em relação ao diâmetro dos filamentos, ocorrência freqüente de heterócitos, ramificações unilaterais contíguas longas, diferenciando-se pelo diâmetro e comprimento de suas células. Com a segunda, assemelha-se ao diâmetro do filamento, principalmente da variedade *vaginatus* (Ghose), porém nestas os heterócitos são raros e os ramos são curtos e afilados nas extremidades, características não encontradas no organismo em estudo. Foram encontrados somente na primeira coleta em período de seca.

Nostochopsis lobatus Geitler, L. Proc. Amer. Phil Soc., 11: 119, 1869.

(Figuras 6-9)

Massa gelatinosa mais ou menos irregular, verde-azulada ou verde-oliva com filamentos emaranhados, cespitosa, filamento principal fortemente constricto e distinto das ramificações, unisseriado, 8,0-10 μm diâm.; ramificações de ambos os lados do filamento, longas e estreitas no ápice; bainha delgada, hialina a esverdeada; células esféricas a elipsoidais, 8,0-12,0 μm compr., 6,0-8,0 μm diâm.; conteúdo celular verde claro a escuro, granuloso; heterócitos pouco numerosos, intercalares, laterais (sésseis) e terminais (pedicelados); hormogônios ocasionais, geralmente com 6 células.

Condições ambientais: n = 1; amostra de rio 2; S = rocha.

Spelaepogon sommierii Borzi, A. Bot. Ital. 24:107, 1917.

(Figuras 10-13)

Massa de filamentos emaranhados, cespitosa ou prostrada, ocasionalmente filamentos isolados ou em pequenos aglomerados crescendo em massas gelatinosas de outras cianobactérias; filamentos principais e secundários distintos, irregularmente ramificados, ramificações em T, ramificações falsas (Y) presentes, geralmente unisseriados, com regiões multisseriadas, 10,0-11,0 µm diâm.; bainhas mucilaginosas finas, hialinas; tricomas com constrição variável, (8-)9-10(-13) µm diâm.; células 10-12(-15) µm compr.; heterócitos presentes, intercalares ou terminais, (8-)10-12(-13) µm diâm., (9-)10-15(-16) µm compr..

Condições ambientais: n = 1; amostra 09; S = rocha

Stigonema hormoides Bornet & Flahault, Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 7, 5: 68, 1887.

(Figuras 14-17)

Massa formada por filamentos emaranhados, cespitosos, acastanhada a marrom escuro, ocasionalmente filamentos isolados ou em pequenos aglomerados crescendo em massas gelatinosas de outras cianobactérias; filamentos unisseriados, raramente bi (7,0-)9,0-17,5(-22,0) µm diâm.; ramificações geralmente curtas; bainha relativamente espessa, lisa, castanha; células de forma variável, subesféricas, discóides, esféricas, ovais ou arredondadas, 2,4-9,6(-14,0) µm compr., (-2,5)4,0-12,0 µm diâm.; conteúdo celular homogêneo ou granuloso, conteúdo verde-amarelado; heterócitos hemisféricos ou arredondados, laterais ou intercalares, 4,0-9,6 µm compr., 3,2-9,6 µm diâm.; hormogônios terminais, 25,0-30,0(-70,0) µm compr..

Condições ambientais: n = 9; amostras 3, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 15 e 19; TA = 21.1-30.6°C, TM = 19.5-38.4°C, URA = 65-92%, URM = 70-94%, IM = 30-2740 µmol fótons.m⁻².s⁻¹, pH = 4, 5 e 9, S = rocha e solo.

Stigonema informe Bornet & Flahault, Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 7, 5: 75, 1887.

(Figuras 18-19)

Massa formada por filamentos emaranhados, cespitosa, amarela a marrom; filamento principal prostrado, filamentos multisseriados com até 4 séries de células, 56,0-87,4 µm diâm.; ramificações 24,0-44,0 µm diâm.; bainha espessa, lisa, amarela a castanha; células comumente agrupadas, hemisféricas a oblongas, 7,2-16,0 µm compr., 6,4-12,0 µm diâm.; conteúdo celular verde-azulado, granuloso; heterócitos 7,2-12,0 µm compr., 3,2-11,2 µm diâm.; hormogônios terminais nas ramificações, 16,0-32,0 µm compr., 6,9-12,0 µm diâm..

Condições ambientais: n = 1; amostra 14; TA = 24.6°C, TM = 25.5°C, URA = 80%, URM = 87%, IM = 160 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH = 5, S = rocha.

Stigonema minutum C. Agardh ex Bornet & Flahault, Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 7, 5: 72, 1886.

(Figuras 20-21)

Massa formada por filamentos emaranhados, cespitosos (filamento principal prostrado e ramifica\u00e7\u00f5es eretas); filamento principal com tr\u00eas fileiras de c\u00e9lulas, 20,0-28,0 μm di\u00e2m.; filamentos secund\u00e1rios com duas fileiras de c\u00e9lulas, 14,0-18,2 μm di\u00e2m.; bainha ampla, lisa, amarela; c\u00e9lulas hemisf\u00e9ricas, 5,0-12,0(-15,0) μm compr., 5,0-13,0 μm di\u00e2m.; conte\u00fado celular verde-amarelado e granuloso; heter\u00f3citos hemisf\u00e9ricos, laterais, 7,0-11,0 μm compr. e 6,0-13,0 μm di\u00e2m.; hormog\u00f4nios pequenos e terminais nas ramifica\u00e7\u00f5es.

Condi\u00e7\u00f5es ambientais: n = 4; amostras 07, 12, 16 e 19; TA = 21.9-27.7°C, TM = 22.9-36.0°C, URA = 55-90%, URM = 62-93%, IM = 3-2200 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH = 4 e 5, S = rocha e solo.

Stigonema ocellatum Thuret ex Bornet & Flahault, Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 7, 5: 69, 1887.

(Figuras 22-24)

Massa formada por filamentos emaranhados, crescendo de maneira ereta, agrupada ou isolada em massas gelatinosas de outras cianobact\u00e9rias; filamentos com uma fileira de c\u00e9lulas, ocasionalmente duas, 18,0-45,0 μm di\u00e2m.; bainha ampla, lisa, hialina a castanha; c\u00e9lulas variadas, hemisf\u00e9ricas, ovais, quadradas, retangulares, mais comumente arredondadas 3,0-20,0 μm compr. e 4,0-25,6 μm di\u00e2m.; conte\u00fado celular amarelo a castanho com granula\u00e7\u00f5es; heter\u00f3citos arredondados e laterais, 8,7-21,6 μm compr. e 6,4-22,4 μm di\u00e2m.; hormog\u00f4nios terminais e grandes nas ramifica\u00e7\u00f5es, (20,0-)38,0-180,0 μm compr. e 9,6-20,0 μm di\u00e2m..

Condi\u00e7\u00f5es ambientais: n = 11; amostras 03, 04, 05, 06, 08, 10, 11, 12, 13, 14 e 18; TA = 21.1-30.6°C, TM = 19.5-38.4°C, URA = 55-83% (71%), URM = 62-87%, IM = 85-2740 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH = 4, 5 e 10, S = rocha e solo.

Stigonema robustum Gardner, University of California Publications in Botany 14(1): 9, 1927.

(Figuras 25-26)

Massa com filamentos intensamente emaranhados, cespitosos, r\u00edgidos e cori\u00e1ceos; ramifica\u00e7\u00f5es distintas do filamento principal; filamento principal multisseriado, (80,0-)100,0-160,0(-230,0) μm di\u00e2m.; ramos freq\u00fcentes, em ambos os lados do filamento, principalmente nas extremidades, \u00e1pices geralmente unisseriados, atenuados; bainha estreita, lisa, castanha a hialina nas partes jovens, homog\u00eanea; c\u00e9lulas hemisf\u00e9ricas a oblongas, a maioria quase t\u00e3o longa quanto

larga, (7,0-)8,0-15,0(-20,0) μm diâm., nas regiões multisseriadas, geralmente reunidas em grupos (geralmente de 4-6 células) envoltos por bainha comum, ocasionalmente mais escura ao redor das células; conteúdo celular azul-esverdeado a esverdeado-acastanhado, granulado; heterócitos raros e de difícil visualização; hormogônios não observados.

Condições ambientais: n = 1; amostra aquática de rio 1; S = rocha.

Stigonema turfaceum Cooke ex Bornet & Flahault, Ann. Sci. Nat. Bot., ser. 7, 5: 74, 1887.

(Figuras 27-31)

Massa formada por filamentos cespitosos, castanha a marrom escura; filamento com mais de quatro fileiras de células, (20,0-)26,0-35,0(-40,0) μm diâm.; ramificações delgadas no ápice; bainha ampla, lisa, às vezes com lamelação paralela, amarelo claro a castanho; células arredondadas a oblongas, 4,8-12,5 μm compr., 4,0-11,0 μm diâm.; conteúdo celular verde-azulado, granulado; heterócitos hemisféricos, laterais; hormogônios terminais, 9,5-45,0 μm compr., 4,0-11,0 μm diâm..

Condições ambientais: n = 5; amostras 02, 10, 11, 12 e 17; TA = 21.8-27.7°C, TM = 20.6-25.0°C, URA = 74-90%, URM = 75-141%, IT = 4-330 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pH = 4 e 5, S = rocha e solo.

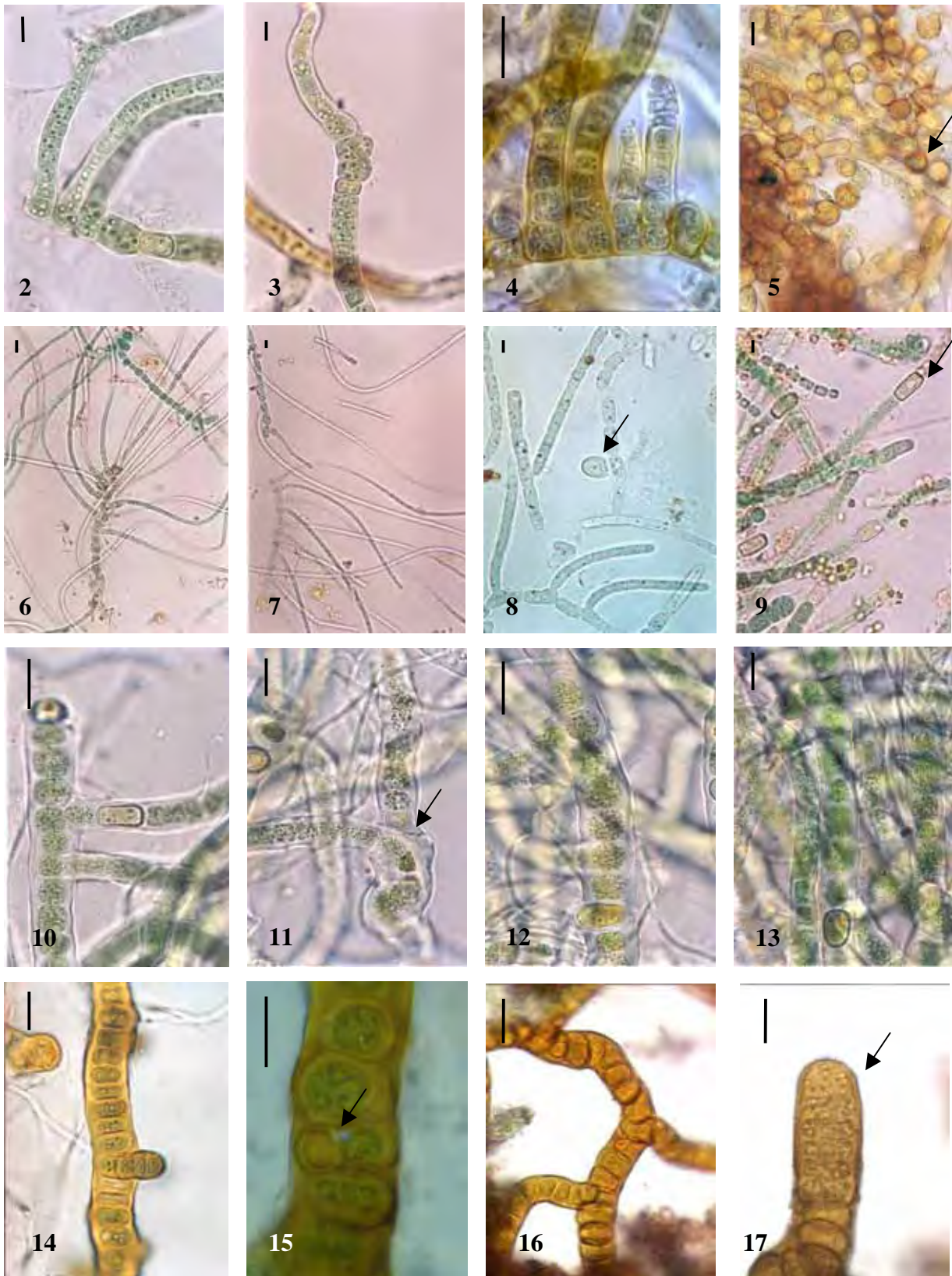
Stigonema sp.

(Figuras 32-33)

Filamentos isolados entre outras espécies de *Stigonema*, 8,0-12,8 μm diâm.; tricomas unisseriados, 4,0-7,2 μm diâm.; bainha ampla, lisa, hialina; células sub-quadráticas, 2,4-8,0 μm compr.; conteúdo celular verde-amarelado e homogêneo.

Condições ambientais: n = 1; amostra: 14; TA 24.6°C, TM 25.5°C, URA 80%, URM 87%, IM 160 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (5,0% da IT), pH = 5, S = rocha.

Comentários: esta população tem características muito próximas às de *Stigonema hormoides*, porém a medida do filamento é muito menos variável e tem valor inferior à média do diâmetro do filamento desta espécie (7-15 μm diâm.). Devido à escassez de material biológico disponível, ficou inviável a obtenção de análises morfológicas adicionais.



Figuras: 2-3. *Hapalosiphon aureus*; 4-5. *Hapalosiphon* sp.; 5: acinetos; 6-9. *Nostochopsis lobatus*; 8: heterócito pedicelado; 9: heterócito intercalar; 10-13. *Spelaopogon sommierii*; 11: ramificação falsa; 14-17. *Stigonema hormoides*; 15: heterócito arredondado; 17: hormogônio.
(Escala: 2-13, 15, 17: 10 μ m; 14, 16: 20 μ m).



Figuras: 18-19. *Stigonema informe*; 19: hormogônio; 20-21. *Stigonema minutum*; 22-24. *Stigonema ocellatum*; 25-26. *Stigonema robustum*; 25: heterócito intercalar; 27-31. *Stigonema turfaceum*; 31: hormogônio; 32-33. *Stigonema* sp.
 (Escala: 22, 32-33: 10µm; 18-19, 21: 20 µm; 23-25: 40 µm; 20, 28-31: 50 µm; 26-27: 60 µm).

Os resultados observados em relação às espécies da mata atlântica ao longo dos pontos amostrados demonstram que a riqueza de espécies de Nostocales com ramificações verdadeiras é pequena, variável e às vezes distinta, além de maior diversidade de espécies nos pontos de menores altitudes (Tabela 3). A maior riqueza de espécies foi verificada entre membros do gênero *Stigonema*, nas altitudes entre 22 a 600 m (chegando até 1460 m), enquanto organismos do gênero *Hapalosiphon* foram somente encontrados nas maiores altitudes, entre 300 e 800 m, diferindo amplamente dos organismos do gênero *Spelaeopogon* que somente foram encontrados no nível do mar. A espécie mais freqüente entre os pontos amostrados foi *Stigonema ocellatum* (n = 11).

Tabela 3. Distribuição de espécies em relação a altitude. I - *H. aureus*; II - *Hapalosiphon* sp.; III - *S. sommierii*; IV - *S. hormoides*; V - *S. informe*; VI - *S. minutum*; VII - *S. ocellatum*; VIII - *S. turfaceum*; IX - *Stigonema* sp.

Altitude / (Ponto)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Nível do mar			X						
22 m (04)							X		X
23 m (07)							X		
66 m (08)				X		X	X	X	X
77 m (11)						X		X	
122 m (09)				X	X				
183 m (05)							X		
309 m (10)		X		X					
600 m (06)						X	X		
787 m (03)				X					
791 m (02)									
800 m (01)	X								
1460 m (12)				X		X	X		

Em relação às características ambientais em que os organismos se encontravam, pode-se dizer que as cianobactérias estudadas foram mais freqüentes em lugares ácidos (pH entre 4,0 e 5,0), mas podendo ser encontradas em outros básicos (pH 9 a 10). A irradiância, a temperatura e a umidade nas massas de cianobactérias foram bem variáveis, oscilando entre 3 a 2740 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, de 18 a 38°C e de 62 a 94%, respectivamente, sendo o substrato mais comum o rochoso (Tabela 2).

V - DISCUSSÃO

No trecho de mata atlântica estudado foram encontrados 11 táxons de Nostocales com ramificações verdadeiras, duas pertencentes aos gêneros *Hapalosiphon*, uma do gênero

Nostochopsis (Família Hapalosiphonaceae), uma do gênero *Spelaeopogon* (Família Borzinemataceae) e sete do gênero *Stigonema* (Família Stigonemataceae).

Em comparação com o trabalho de HOFFMANN (1986), nota-se a ocorrência comum de duas espécies (*S. hormoides* e *S. minutum*), sendo que a pouca coincidência florística pode ser resultado da diferença geográfica abordada. Quando, entretanto, os resultados obtidos são comparados com os apresentados por COUTÉ *et al.* (1999), as semelhanças revelaram-se um pouco maiores, resultando em cinco táxons de ocorrência comum a ambos os trabalhos (*S. hormoides*, *S. minutum*, *S. ocellatum*, *S. informe* e *S. turfaceum*) e, neste caso, as semelhanças ambientais também são maiores visto que ambas as localidades são de clima tropical.

Considerando-se especificamente trabalhos realizados em território brasileiro, foi observada em SANT'ANNA *et al.* (1991), a ocorrência comum de quatro táxons, *S. sommierii*, *S. hormoides*, *S. minutum* e *S. ocellatum*. Essa baixa similaridade provavelmente é devida à diferença de escala geográfica, visto que o trabalho de SANT'ANNA *et al.* (1991) foi realizado em uma única localidade (Gruta-que-chora, Ubatuba) e o presente estudo abrangeu uma área muito mais ampla. Entretanto, fatores ambientais locais, como por exemplo, temperatura, umidade, irradiância e pH, podem também ter colaborado para esta diferenciação florística, pois sabe-se que as condições ambientais são altamente limitantes à distribuição das cianobactérias, sobretudo, a umidade, que é um parâmetro fundamental ao desenvolvimento destes organismos no ambiente terrestre (FRÉMY, 1930; GEITLER, 1932; DESIKACHARY, 1959).

Um outro fator a ser considerado quanto à biogeografia, é que as espécies apresentam amplitudes ecológicas relativamente estreitas, embora nem sempre limitação ecológica implica em limite geográfico restrito (KOMÁREK 1985, 1994). Ainda não está totalmente claro se populações morfometricamente semelhantes vivendo em ambientes distintos podem ou não ser o mesmo táxon específico, tornando o conhecimento da distribuição biogeográfica das espécies de cianobactérias um tema de difícil abordagem. Aspectos metodológicos, como áreas de amostragem, conceito de espécie utilizado e identificações taxonômicas duvidosas, tornam o trabalho de avaliação biogeográfica pouco preciso (HOFFMANN, 1994) e, até o momento, restringe-se às espécies mais bem delimitadas (HOFFMANN, 1994, 1996, 1999).

A taxonomia de cianobactérias passa por um momento de reavaliação. Acreditava-se que a ocorrência geográfica de cianobactérias era aleatória, o que hoje é considerado inadmissível, pois a caracterização de uma espécie particular propriamente dita depende não só de sua morfologia, mas também de sua ecologia. Atualmente, é difícil admitir que haja grande número de espécies de ocorrência ubíqua. Da mesma maneira, ainda não são claros os limites da variação fenotípica expressada pelo genótipo de determinadas espécies. Isto explica o uso freqüente de

“conferato” (cf.) nos trabalhos taxonômicos realizados nos últimos anos. O uso de sp. ocorre devido à ausência de estruturas indispensáveis ou até mesmo pela falta de material e à dificuldade em estimar variações fenotípicas, o que ocorreu com *Stigonema* sp. e *Hapalosiphon* sp. descritas neste trabalho.

O estudo de cianobactérias terrestres é relativamente recente (JOHANSEN & SHUBERT, 2001) e a maioria dos trabalhos realizados até hoje baseia-se apenas no uso de critérios morfológicos. São necessárias então, novas abordagens na classificação taxonômica, com a realização de trabalhos que enfoquem critérios ultra-estruturais e moleculares que respondam a estas peculiaridades, para que futuramente haja uma maior e melhor compreensão das relações filogenéticas e delineamentos taxonômicos.

Segundo GARCIA-PICHEL *et al.* (1996) e PALINSKA *et al.* (1996), a sistemática cianobacteriana ainda é muito confusa e a reorganização desta baseada somente na morfologia pode não ser o método mais adequado. Esses são alguns dos vários problemas existentes para a identificação de cianobactérias, por esta razão que diferentes análises (polifásicas) têm sido atualmente aplicadas para melhor distinguir os diferentes níveis taxonômicos (ITEMAN *et al.*, 2002; ZEHR *et al.*, 2003; RAJANIEMI *et al.*, 2005; MARUARDT & PALINSKA, 2007) combinando o fenótipo com o genótipo (STACKEBRANDT, 2001; WILMOTTE & HERDMAN, 2001; MARQUARDT & PALINSKA, 2007).

Desta forma, torna-se evidente a importância dos levantamentos de cianobactérias em diferentes biótopos de regiões tropicais, contribuindo para o conhecimento da variabilidade morfológica das espécies e, por consequência sua distribuição geográfica. Paralelamente, estudos com abordagens moleculares podem também esclarecer mais sobre a biogeografia das cianobactérias, cujos membros desempenham papel ecológico fundamental nos diversos ecossistemas onde ocorrem (BRANCO *et al.*, 2003).

VI - CONCLUSÃO

Na região de mata atlântica paulista foram encontrados 11 táxons de Nostocales com ramificações verdadeiras (9 aerofíticos e 2 aquáticos) são eles: *Hapalosiphon aureus*, *Hapalosiphon* sp. e *N. lobatus* (Família Hapalosiphonaceae), *Spelaopogon sommierii* (Família Borzinemataceae), *Stigonema hormoides*, *S. informe*, *S. minutum*, *S. ocellatum*, *S. robustum*, *S. turfaceum* e *Stigonema* sp (Família Stigonemataceae). Isto demonstrou a baixa riqueza de espécies desta ordem no trecho estudado.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.G. Heterocyst formation in cyanobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 618-624, 2000.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5-Stigonematales. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.
- ANTARIKANONDA, P.; SASSANARAKKIT, S.; AMARIT, P. Screening and improving genetic potential of N₂-fixing blue-green algal strains for use as biofertilizer to improve rice yield, **National Center for Genetic Engineering and Biotechnology** (Biotechnology and biology diversity), Bangkok, p. 4-49, 1994.
- ASENCIO, A.D.; ABOAL, M.; HOFFMANN, L. A new cave-inhabiting blue-green algae: *Symphyonema cavernicolum* sp. nova (Mastigocladaceae, Stigonematales). **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 83, p. 73-82, 1996.
- AZEVEDO, M.T.P. Edaphic blue-green algae from the São Paulo Botanical Garden, Brazil. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 64, p. 503-526, 1991.
- AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L. *Cyanostylon gelatinosus*, a new species (Chroococcaceae, Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p. 75-78, 1994.
- AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L. *Hormothece geltleriana*: A new edaphic chroococcal Cyanophyceae from São Paulo State, Brazil. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p. 79-83, 1994.
- BECHER, P.G.; JÜTTNER, F. Insecticidal compounds of the biofilm-forming cyanobacterium *Fischerella* sp. (ATCC 43239). **Wiley InterScience**, DOI 10.1002/tox.20113, p. 363-372, 2005.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 157-164, 2003.
- BORNET, E.; FLAHAULT, C. Révision des Nostocacées hétérocystées, contenues dans les principaux herbiers de France. **Annales des Sciences Natureles: Botanique**, ser. 7, Paris, v. 3, 4, 5, 7, p. 323-380, 343-373, 51-129, 171-262, 1886-1888.
- BRANCO, L.H.Z.; NECCHI JÚNIOR, O. New occurrence of the rare genus *Doliocatella* (Stigonematales, Cyanophyceae). **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 68, p. 393-397, 1999.
- BRANCO, L.H.Z.; SILVA, A.C.; MOURA, A.N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C. Biodiversidade e considerações biogeográficas das Cyanobacteria de uma área de manguezal do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 585-596, 2003.

BRANCO, L.H.Z.; KOMÁREK, J.; AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L.; WATANABE, M. The cyanobacterial genus *Cyanoarbor* Wang (Chroococcales, Entophysalidaceae) and its occurrence in Brazil. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 82, p. 365-380, 2006.

BÜDEL, B.; BECKER, U.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Cyanobacteria and cyanobacterial lichens from inselbergs of the Ivory Coast. **Botanica Acta**, New York, v. 110, p. 458-456, 1997.

BÜDEL, B.; WEBER, H-M.; POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. Cyanobacteria of inselbergs in Atlantic rainforest zone of eastern Brazil. **Phycologia**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 498-506, 2002.

CASTIGLIONI, B.; RIZZI, E.; FROSINI, A.; SIVONEN, K.; RAJANIEMI, P.; RANTALA, A.; MUGNAI, M.A.; VENTURA, S.; WILMOTTE, A.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, P.; CONSOLANDI, C.; BORDONI, R.; MEZZELANI, A.; BATTAGLIA, C.; De BELLIS, G. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7161-7172, 2004.

COUTÉ, A.; TELL, G.; THÉREZIEN, Y. Cyanophyceae (Cyanobacteria) aérophiles de Nouvelle-Calédonie. **Cryptogamie, Algologie**, Paris, v. 20, n. 4, p. 301-344, 1999.

DESIKACHARY, T.V. **Cyanophyta**. Indian Council Agricultural Research, New Delhi, 1959.

IORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema* gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 789-798, 2007.

FLETCHNER, 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**, Stuttgart, v. 74, p. 1-24, 2002.

FRÉMY, P. Les Myxophycées de l'Afrique équatoriale française. **Archives des Botanique Mémoire**, Paris, v. 3, p. 1-508, 1930.

GARCIA-PICHEL, F.; PRUFERT-BEBOUT, L.; MUYZER, G. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. **Application Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3284-3291, 1996.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. (ed.) **Kryptogamen-flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz**. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1932.

GOLÚBIC, S. Taxonomy of extant stromatolite-building cyanophytes. In: WALTER, M. R. (ed.) **Biology of stromatolites**. Elsevier, Amsterdam, p. 127-140, 1976.

HENSON, B.J.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Molecular differentiation of the heterocystous cyanobacteria, *Nostoc* and *Anabaena*, based on complete *nifD* sequences. **Current Microbiology**, v. 45, p. 161-164, 2002.

HOFFMANN, L. Cyanophycées aériennes et subaériennes du Grand-Duché de Luxembourg. **Bulletin Natural Plantentium Belgium**, Bruxelles, v. 56, p. 77-127, 1986.

HOFFMANN, L. Terrestrial Cyanophyceae of Papua New Guinea. II. *Cyanobotrys lambinonii* gen. et sp. nov. (Stigonematales). **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 64, p. 349-355, 1991.

HOFFMANN, L. Biogeography of marine blue-green algae. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p. 137-148, 1994.

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

HOFFMANN, L. Marine Cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. **European Journal of Phycology**, Londres, v. 34, p. 371-379, 1999.

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

ISHIDA, T.; YOKOTA, A.; SUGIYAMA, J. Phylogenetic relationships of filamentous cyanobacterial taxa inferred from 16S rRNA sequence divergence. **Journal Genetic Applied Microbiology**, v. 43, p.237-241, 1997.

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

JOHANSEN J. R.; SHUBERT L. E. Algae in soils. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 123, p. 297-306, 2001.

KOMÁREK, J. Do all Cyanophytes have a cosmopolitan distribution? Survey of the freshwater Cyanophyte flora of Cuba. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 71, p. 359-386, 1985.

KOMÁREK, J. Current trends and species delimitation in the cyanoprokaryote taxonomy. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p.11-29, 1994.

KOMÁREK, J. Two *Camptylonemopsis* species (cyanoprokaryotes) from “Mata Atlântica” in coastal Brazil. **Preslia**, Praga, v. 75, p. 223-232, 2003.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria, **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, v. 109, p. 305-325, 2003.

KOMÁREK, J. Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches (Review). **Algae**, v. 21, n. 4, p. 349-375, 2006

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

LIVAITIS, M.K. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: inferences from constraint analyses. **Hydrobiologia**, v. 468, p. 135-145, 2002.

MARQUARDT, J.; PALINSKA, K.A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 397-413, 2007.

MORALES, B.O.O.; ARCA, J.L.S.; CORTES, A.L. Biomass and taxonomic richness of epilithic cyanobacteria in a tropical intertidal rocky habitat. **Botanica Marina**, v. 48, n. 2, p. 16-121, 2005.

OGDEN, R.; THORPE, R.S. Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. **Proceedings of the National Academy of Science**, United Kingdom, v. 99, p. 13612-13615, 2002.

PALINSKA, K.A.; LIESACK, W.; RHIEL, E.; KRUMBEIN, W.E. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. **Archives of Microbiology**, v. 166, p. 224-233, 1996.

RAJANIEMI, R.; HROUZEK, P.; KASTOVSKA, K.; WILLAME, R.; RANTALA, A.; HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; SIVONEN, K. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1126, 2005.

REJMÁNKOVÁ, E.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Cyanobacteria - a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 189-199, 2004.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 111, p. 1-16, 1979.

SALATI FILHO, E.; COTTAS, L. R. Condicionantes do desenvolvimento sustentável do litoral norte paulista - o exemplo da bacia do Córrego da Lagoinha, Ubatuba, SP. **Holos Environment**, Rio Claro, v. 3, p. 15-32, 2003 (www.rc.unesp.br/ib/cea/holos, visitado em 20/09/2007).

SANT'ANNA, C.L. Flora de Cyanophyceae associada a briófitas, município de Campina Verde, MG. **Rickia**, São Paulo, v. 11, p. 129-142, 1984.

SANT'ANNA, C.L.; SILVA, S.M.F.; BRANCO, L.H.Z. Cyanophyceae da Gruta-que-chora, município de Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 18, p. 75-97, 1991.

SANT'ANNA, C. L.; BRANCO, L. H. Z. ; AZEVEDO, M. T. P. ; KOMÁREK, J. . New aerophytic morphospecies of *Nostoc* (Cyanobacteria) from São Paulo State, Brazil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, p. 95-101, 2007.

SARTHOU, C.; THEREZIEN, Y.; COUTÉ, A. Cyanophycées de l'inselberg des Nourages (Guyane Française). **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 61, p. 85-109, 1995.

SILVA, S.M.F.; SANT'ANNA, C.L. Stigonemataceae (Cyanophyceae) do estado de São Paulo, Brasil: gênero *Stigonema* Bornet & Flahault, **Hoehnea**, São Paulo, v. 23, p. 33-58, 1996.

SOLTANI, N.; NEJAD, R.A.K.; YAZDI, M.T.; SHOKRAVI, S.; VALIENTE, E.F. Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 5, p. 455-459, 2005.

STACKEBRANDT, E. Unifying phylogeny and phenotypic diversity. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; CHLEIFER, K.H. (eds.) **The Prokaryotes**, 2nd ed. Springer, New York, p. 583-624, 2001.

STANIER, R.Y.; SISTROM, W.R.; HANSEN, T.A.; WHITTON, B.A.; CASTENHOLZ, R.W.; PFENNIG, N.; GORLENKO, V.N.; ONDRATIEVA, E.N.; EIMHJELLEN, K.E.; WHITTENBURY, R.; GHERNA, R.L.; TRÜPER, H.G.; Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, p. 335-336, 1978.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRN sequences. In GARRITY, GM (ed) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed. Springer, New York, p. 487-493, 2001.

WOERGOETTER, E.S. Experimental microbiology of cultured mycobionts: facultative cyanotrophy of the tropical lichen *Cladonia verticillaris* and cultivation of the associated cyanobacteria. **Proceedings GAL4** (Universität Hamburg) v. 30-32, p. 271-282, 2002.

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

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

CAPÍTULO II

Variações de condições de cultivo para o crescimento de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista

Variações de condições de cultivo para o crescimento de Nostocales com ramificações verdadeiras

RESUMO: As Cyanobacteria são dominantes em diversos tipos de ambientes, são especialmente bem distribuídas e abundantes em ambientes terrestres e possuem importante função ecológica no ecossistema. Em ambientes aerofíticos, atuam como colonizadores primários e na economia na produção de compostos de interesse industrial como auxinas, antivirais, antifúngicos, antibacterianos, biofertilizantes, entre outros. Atualmente, para o estudo de cianobactérias tornou-se importante o cultivo laboratorial para que se consiga biomassa e controle de contaminantes. Porém, são escassos os trabalhos sobre o cultivo, em particular das Nostocales com ramificações verdadeiras, e vários dos poucos existentes relatam tentativas frustradas na obtenção de cultivos específicos demonstrando a forte resistência destes organismos ao crescimento em condições laboratoriais. Os resultados presentemente obtidos indicaram que *in vitro* as Nostocales com ramificações verdadeiras seguem as mesmas características de crescimento quando em hábitat natural: crescimento lento, baixa taxa de colonização e competição. Dentre as variações testadas, a diluição de 2:1 (tanto líquido quanto sólido) foi considerada a melhor concentração do meio de cultivo e a agitação em *shaker* resultou em melhorias para o crescimento. A realização ou não de repicagens não foi suficiente para o estabelecimento de coleções, pois estes organismos não resistem a muitos meses sob condições de cultura. O teste de antibióticos para o controle de contaminantes mostrou-se ineficiente e, portanto, não foi possível estabelecer quantidade segura para o seu emprego. As pesquisas em relação ao cultivo destes organismos são ainda muito escassas. Neste estudo pôde-se indicar um conjunto de condições de crescimento mais favoráveis para estes organismos, mas para um melhor estabelecimento das condições ainda são necessários estudos mais abrangentes e aprofundados.

I - INTRODUÇÃO

Cyanobacteria, segundo GALLON (2001), representam o maior grupo de organismos fototróficos amplamente distribuídos na natureza e, embora sejam procariotos, são caracterizados por realizar fotossíntese oxigênica, similar à verificada em algas e plantas.

Esses organismos são especialmente bem distribuídos e abundantes em ambientes terrestres e possuem função ecológica importante nos ecossistemas, como relatado no estudo de FLETCHER & MARTIN (1948), que demonstraram que massas incrustantes de cianobactérias promovem a retenção de limo e argila e acarretam um rearranjo das partículas de terra. Como colonizadores primários, promovem o desgaste de minerais e criam condições ligeiramente ácidas devido à produção de ácido carbônico gerado por meio da fotossíntese, o que os caracteriza como colonizadores primários (METTING, 1981). SCHWABE, já em 1972, havia demonstrado sua importância neste papel estudando a ecogênese da Ilha de Surtsey (Islândia).

As cianobactérias também apresentam importante papel funcional em ambientes alagados (McCORMICK *et al.*, 1996, 1998; REJMÁNKOVÁ & KOMARKOVÁ, 2000). O conhecimento e o entendimento da diversidade das espécies somados a função e as respostas destas sob alterações nos ecossistemas ambientais são necessários para efetivar a proteção e o potencial na utilização destes na população cianobacteriana (REJMÁNKOVÁ *et al.*, 2004).

Estudos evidenciam que estes organismos são produtores de substâncias promotoras de crescimento semelhantes a auxinas e também vitaminas, responsáveis em parte por maiores produções vegetais (VENKATARAMAN, 1975; WHITTON, 2000). Além disso, pesquisas têm demonstrado que as cianobactérias terrestres produzem compostos (SMITKA *et al.*, 1992; JAKI *et al.*, 1999; RESHEF & CARMELI, 2002), como os metabólitos secundários ativos (KREITLOW *et al.*, 1999), além de sintetizarem diversos compostos com atividade citotóxica, antifúngica e antiviral utilizados na medicina (PATTERSON & BOLIS, 1997; KUMAR *et al.*, 2000; BOKESCH *et al.*, 2003; JHA & MISHRA, 2005). JUNGBLUT & NEILAN (2006) estudaram, através de técnicas moleculares, o potencial de cianobactérias na formação de substâncias tóxicas em florações de cianobactérias produzindo compostos responsáveis pela promoção ou iniciação de tumores. Também têm sido investigadas produções de compostos capazes de degradar pesticidas lançados indiscriminadamente no ambiente (SMITKA *et al.*, 1992; JAKI *et al.*, 1999; RESHEF & CARMELI, 2002; JHA & MISHRA, 2005).

A taxonomia das cianobactérias é basicamente alicerçada nas características morfológicas e métricas. A amplitude de certas características expressadas é dependente da forma e do tamanho do organismo, sendo que, por exemplo, a formação de colônias e agregados é um fator

importante e determinante para a realização de processos fisiológicos das cianobactérias (DOKULIL & TEUBNER, 2000).

Condições ambientais também interferem no desenvolvimento dos organismos. As altas temperaturas, por exemplo, podem resultar em aumento da abundância de cianobactérias aquáticas especialmente durante o verão e, por outro lado, é baixo o requerimento de energia luminosa, que é um fator decisivo na formação de florações. Possuem ainda alta requisição de elementos-traço se comparado ao fitoplâncton eucarioto (DOKULIL & TEUBNER, 2000).

Segundo BERMAN-FRANK *et al.* (2003), uma especialização celular característica e altamente refinada do grupo das Nostocales é encontrada nos heterócitos. A trajetória evolutiva dos mecanismos adaptativos que protegem a nitrogenase do oxigênio molecular e espécies oxigênio-reativas pode ser distinguida por padrões de fisioecologia, da morfologia microbiana, bioquímica, fisiologia e estrutura da comunidade ao longo de um gradiente anaeróbio até um ambiente completamente aeróbio. A nitrogenase, segundo estes autores, é uma enzima que converte o nitrogênio atmosférico em uma forma assimilável pelo organismo, é confinada em uma célula micro-anaeróbia, o heterócito.

A distribuição das cianobactérias é comumente influenciada por diversos fatores ambientais como diferentes concentrações de fósforo, nitrogênio, razão N/P, luz, oxigênio e pH (WHITTON, 1992), por esta razão as espécies podem variar seus requerimentos ecológicos (PERONA *et al.*, 1998; BRANCO *et al.*, 2001). Segundo WHITTON (1992), as cianobactérias possuem a capacidade de se desenvolver em ambientes com média a baixa concentração de íons e, ao mesmo tempo, ter vantagens sob condições de estresse de nutrientes. PAERL *et al.* (1994, 1996) estudaram a limitação de ferro, a fixação de nitrogênio e a produção primária de cianobactérias marinhas que habitam oceanos oligotróficos e constataram que o ferro tem um importante papel no controle da produção primária de cianobactérias planctônicas e no fluxo de nutrientes em ambientes marinhos. Isto representa um dos diversos exemplos demonstrados na literatura (WEISBURG *et al.*, 1991; CASTIGLIONI *et al.*, 2004) da dificuldade de se reproduzir em laboratório as mesmas condições ambientais para se estabelecer uma condição de crescimento para estes organismos.

Estudos de microbiologia ambiental são muitas vezes limitados por dificuldades na identificação da diversidade de populações naturais porque o isolamento e cultivo de microrganismos de ambientes naturais são muitas vezes impossíveis (CASTIGLIONI *et al.*, 2004).

Atualmente, estudos sobre as características moleculares das cianobactérias utilizam amostras provenientes de bancos de cultura, mas relativamente poucas espécies têm crescimento

apropriado sob condições de cultura ou são mantidas em culturas axênicas (ZEHR *et al.*, 1997). Com relação especificamente as Nostocales com ramificação verdadeira, objeto deste estudo, apenas uns poucos morfotipos têm sido cultivados (GUGGER & HOFFMANN, 2004), indicando a complexidade e desconhecimento nos procedimentos para o estabelecimento de cultivos em condições adequadas. Entretanto, também se verifica a existência de trabalhos que se baseiam em amostras ambientais devido à grande dificuldade no isolamento e crescimento destes organismos em laboratório (CASTENHOLZ, 1992).

Um problema adicional com relação às culturas disponíveis em bancos é a imprecisão nas identificações taxonômicas, levando a um potencial equívoco na análise dos dados obtidos. Estima-se que mais de 50% das linhagens de cianobactérias existentes em coleções de cultura têm sido identificadas incorretamente ou sido colocadas erroneamente em alguns grupos taxonômicos (ANAGANOSTIDIS & KOMÁREK, 1990).

Entretanto, alterações morfológicas podem ser induzidas em condições de cultivo e esta plasticidade pode ser uma problemática para a taxonomia das cianobactérias baseadas unicamente na morfologia (CASAMATA *et al.*, 2003). Devido à variabilidade expressa pela morfologia, as características usadas para classificação de linhagens de cianobactérias em níveis de gênero ou espécie podem ser ambíguas, particularmente quando culturas de laboratório e amostras da natureza são comparados (NEILAN *et al.*, 1997).

Em resumo, investigações mais detalhadas sobre as cianobactérias de ambientes aerofíticos têm revelado a presença de táxons ainda desconhecidos e estes organismos podem desempenhar papel importante no entendimento das relações filogenéticas e biogeográficas do grupo. Para obtenção destes dados mais facilmente adquiridos, preferencialmente devem ser utilizadas cepas provenientes de cultivos e, por isto, torna-se recomendável o estabelecimento de um protocolo adequado, com o intuito de viabilizar abordagens mais refinadas.

II - OBJETIVOS

Com base na demanda de estudos mais detalhados sobre as cianobactérias de ambientes aerofíticos tropicais, principalmente aqueles envolvendo organismos da ordem Nostocales com ramificação verdadeira, é importante a construção de um banco de culturas com metodologia padronizada e adequada para o cultivo. Deste modo, com este estudo pretendeu-se:

- Realizar diferentes procedimentos de triagem e purificação dos organismos;
- Aplicar e testar diferentes protocolos de cultivo, visando obter condições de cultivo mais adequadas;
- Produção de culturas puras.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Meios de cultivo

Todos os meios utilizados, sólidos ou líquidos assim como tubos e placas de Petri, foram autoclavados a 120°C sob pressão de 1 atm por 20 minutos, com a finalidade de esterilização dos mesmos.

1.1 - Meio sólido

Foram realizadas culturas em meio sólido com agar-agar Powder Dab 6 da Merck (1%) utilizando-se diferentes meios específicos para o crescimento de cianobactérias: o meio BG-11 (ALLEN, 1968) e o meio ASM-1 modificado de AGUIAR & AZEVEDO (1992) (Anexo).

Como as Nostocales com ramificação verdadeira são organismos dotados de heterócitos e são capazes de obter nitrogênio combinado diretamente da atmosfera, testes com diferentes proporções de NaNO₃ (0%, 5%, 10%, 15%, 25% e 50%) em relação ao meio original, foram realizados com o meio BG-11 a fim de verificar se as baixas quantidades deste composto preveniam o crescimento de cianobactérias não heterocitadas, atuando, desta forma, como um agente seletivo. O meio de cultura sólido de BG-11 com 25% de NaNO₃ em relação ao meio original foi diluído em uma proporção de 1:1 e 2:1 com água destilada autoclavada.

Para verificar se o espaço físico é um fator limitante para o crescimento das cianobactérias, os meios sólidos testados, BG-11 e ASM-1, foram acondicionados em placas de Petri de diferentes dimensões, 100 e 60 mm (Figura 1), e, ainda, de forma inclinada em tubos com 200/20 mm altura/largura. Para diminuir a possível contaminação e perda de umidade do meio durante o tempo de incubação, todas as placas de Petri foram vedadas com filme de PVC ou Parafilm (American National Can), para se verificar qual era o mais eficiente. Os tubos foram fechados com tampa plástica e com tampões de algodão e gaze para se verificar a eficiência nas trocas gasosas e contra os contaminantes.

1.2 - Meio líquido

Foram realizados cultivos com os seguintes meios: BG-11, ASM-1 e água solo (NICHOLS, 1973), com a finalidade de testar a melhor condição nutricional de crescimento das cianobactérias em meio líquido estático. Assim como em meio BG-11 sólido, foram realizados testes com diferentes proporções de NaNO₃ (0%, 5%, 10%, 15%, 25% e 50%) em relação ao meio original como agente seletivo, baseando-se na presença de heterócito. Assim como em meio sólido, o meio de cultivo BG-11 com 25% de NaNO₃, em relação ao meio original, foi diluído nas proporções de 1:1 e 2:1 com água destilada autoclavada.

Foi realizado, ainda, teste de espaço físico com tubos de diferentes diâmetros: 100/10 mm altura/largura e 200/20 mm altura/largura (Figura 2), ambos em meio BG-11. Inicialmente os tubos também foram tampados com tampa plástica, e posteriormente com tampões de algodão e gaze, a fim de permitir as trocas gasosas, como feito em meio sólido inclinado.

2 - Inóculo

As amostras secas de cianobactérias, provenientes da coleta feita no campo, foram re-hidratadas por um período de 12 a 24 horas para que os organismos retomassem a atividade metabólica normal. Posteriormente, o material foi separado sob lupa, com auxílio de pinças e estiletos, com o intuito de minimizar os possíveis contaminantes (outras cianobactérias, macroalgas, briófitas, fungos, etc).

Depois de separados, os filamentos triados foram lavados repetidas vezes em água destilada e colocados em tubos com tampa de rosca, devidamente esterilizados, com 1/3 de seu volume ocupado com água destilada. Depois de fechado e com os filamentos em seu interior, o tubo foi vigorosamente agitado, visando desprender das células de cianobactérias outros possíveis organismos. Em seguida, o material foi novamente analisado sob lupa em placa de *Kline* com 12 escavações (6 x 8cm) (Figura 3), para maior limpeza a partir da técnica de “pescaria”. O material selecionado foi observado ao microscópio (em lâminas e lamínulas esterilizadas) para assegurar baixa frequência de contaminantes.

Os filamentos selecionados foram, então, inoculados em câmara de fluxo laminar (previamente esterilizada com luz UV por 30 minutos e aplicação de álcool 70% sob a superfície de trabalho) e com utilização de bico de *Bunsen* para a esterilização de todo o material usado no procedimento (Figura 4).

Todas as culturas foram constantemente acompanhadas (7, 15 30 e 60 dias), analisadas e repicadas com a finalidade de manter os cultivos puros e em bom estado para serem utilizados em estudos futuros.

Deve-se esclarecer que os inóculos iniciais não permitiram uma avaliação quantitativa da biomassa utilizada. Este fato deve-se às características peculiares do grupo, como as dimensões reduzidas e as pequenas quantidades de inóculo, com a finalidade de reduzir a quantidade de contaminantes. Outro aspecto que inviabilizou quantificação inicial é que, em geral, após triagem e limpeza, o material geralmente resultava em filamentos separados, não formando um tufo ou qualquer unidade que possibilitasse seu recolhimento e pesagem.

3 - Manutenção dos cultivos

Os cultivos tanto sólidos quanto líquidos foram mantidos em incubadoras com controle de temperatura (A402 Marconi). As condições de cultivo utilizadas foram temperatura 20-23°C +/-1°C, irradiância entre 40-70 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ constantes, com regime de 12:12 horas luz/escuro, e umidade relativa do ar entre 35-70% (Figura 5).

4 - Potencialização do crescimento dos cultivos

Com o intuito de testar m\u00e9todos para acelerar o crescimento das cianobact\u00e9rias foram realizados dois diferentes procedimentos de aera\u00e7\u00e3o nos cultivos.

4.1 - Sistema de aera\u00e7\u00e3o for\u00e7ada

Aparato similar ao fotobiorreator fechado (REICHERT *et al.*, 2006), este consiste em um sistema que realiza adi\u00e7\u00e3o de gases em cultivos feitos em diferentes erlenmeyers. Uma bomba envia o ar do ambiente para um cano delgado de pl\u00e1stico transparente principal (com algod\u00e3o em suas extremidades atuando como filtro contra contaminantes), que \u00e9 ligado a um regulador de aera\u00e7\u00e3o. Interligados a este regulador, s\u00e3o acoplados outros canos de pl\u00e1stico delgados e transparentes que adentravam nos erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio BG-11 com 25% de NaNO_3 (porcentagem previamente selecionada) tampados com rolhas de algod\u00e3o, gaze e Parafilm. A aera\u00e7\u00e3o foi, portanto, individual, direta e cont\u00ednua durante 8 horas di\u00e1rias, sob ilumina\u00e7\u00e3o junto a uma janela e temperatura ambiente (Figuras 6-7).

O aparato foi montado com tr\u00eas erlenmeyers, sendo que dois continham as esp\u00e9cies aerof\u00edticas de *Stigonema ocellatum* e *Stigonema turfaceum* e um com a esp\u00e9cie aqu\u00e1tica *Nostochopsis lobatus*.

4.2 - Agita\u00e7\u00e3o em shaker

Erlenmeyers de 250mL com 100mL de meio BG-11 com 25% de NaNO_3 foram agitados em incubadora refrigerada com placa agitadora (*shaker* MA830/A Marconi) a 100 rpm, sob temperatura de 24-27°C, com irradi\u00e2ncia entre 40-50 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ constantes e com regime de 12:12 horas luz/escuro por 15 dias consecutivos. (Figura 8).

As esp\u00e9cies aerof\u00edticas utilizadas foram: *S. hormoides*, *S. minutum*, *S. ocellatum*, *S. turfaceum*; e as esp\u00e9cies aqu\u00e1ticas *S. robustum* e *N. lobatus*.

5 - Uso de antibi\u00f3ticos para a purifica\u00e7\u00e3o dos cultivos

Os in\u00f3culos foram periodicamente analisados quanto \u00e0 presen\u00e7a de contaminantes (bact\u00e9rias, outras microalgas e fungos) e, quando presentes, novos procedimentos para a

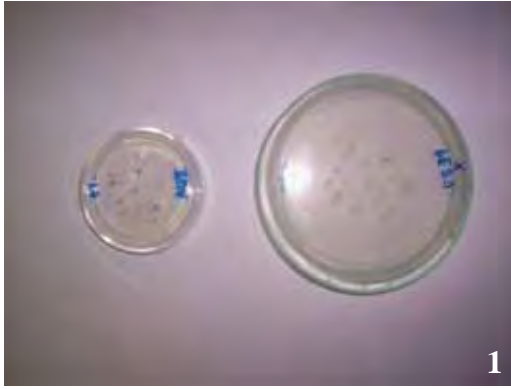
purificação das culturas foram realizados, como: limpeza, repicagens, lavagens, micropipetagem (Micropipet automática de 40-200 µL da Oxford) e agitação em *vórtex* (GV Lab da Gilson).

Soluções inibidoras de crescimento foram utilizadas tanto em meio líquido quanto em meio sólido para eliminação de contaminantes. Para eliminar o desenvolvimento de eucariotos, foi adicionado 0,05 g de cicloheximida (3-[2-(3,5-Dimetil-2-oxociclohexil)2 hidroxietil]glutarimide - Sigma) por litro de meio, em algumas situações também foi testada uma concentração duas vezes superior a esta. Para inibir a contaminação por bactérias foram acrescentados no meio de cultura, 100 µl de solução antibiótica 1 (0,6 g de Penicilina e 1 g de sulfato de estreptomicina em 200 mL de água destilada) e 100 µl de solução antibiótica 2 (7,5 mg de Penicilina G, 5 mg de Cloranfenicol, 6 mg de Neomicina e 5 mg de Polimixina B em 200 mL de água destilada).

6 - Avaliação do desenvolvimento das cepas em cultivo

Devido à impossibilidade de uma análise quantitativa da biomassa do pré-inóculo em razão da pequena quantidade de cianobactérias presentes na amostra de campo, analisou-se os dados obtidos de forma qualitativa no decorrer do tempo de cultivo. Estes dados foram definidos em quatro categorias de crescimento, verificadas abaixo, baseados em porcentagens estimadas por análise visual para melhor avaliação do crescimento das Nostocales com ramificações verdadeiras em cultivo.

Categorias	Valores quantitativos (%)
Insatisfatório	< 20
Regular	20-50
Satisfatória	50-80
Excelente	> 80



1



2



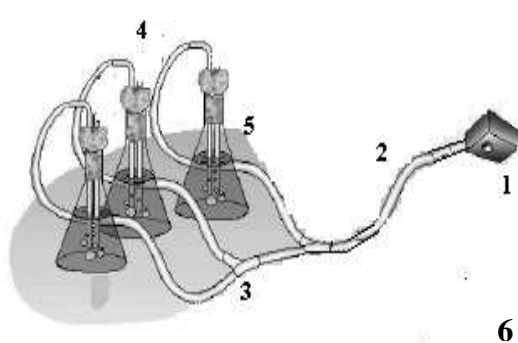
3



4



5



6



7



8

Figuras: 1 - Placas de Petri de 60 e 100 mm; 2 - Tubos de 100 e 200 mm; 3 - Placa de Kline (“pescaria”); 4 - Inóculo na Câmara de Fluxo; 5 - Placas e tubos na incubadora; 6-7 - Sistema de aeração forçada (fotobiorreator fechado): 1. Motor; 2. Cano delgado principal com algodão como filtro; 3. Regulador de aeração; 4. Canos delgados para aeração individual; 5. Erlenmeyers de 250 mL. (adaptado de REICHERT *et al.*, 2006); 8 - Erlenmeyers no shaker.

IV - RESULTADOS

1 - Meio de cultivo

1.1 - Crescimento das cianobactérias em meio sólido

Foram obtidos diferentes resultados com as culturas realizadas com os meios sólidos BG-11 e ASM-1.

Comparando o crescimento dos organismos aerofíticos e aquáticos observou-se crescimento 3% superior do último, ou seja, categoria de crescimento insuficiente, em meio sólido ASM-1. O mesmo tipo de crescimento também foi observado em meio BG-11 sólido, pois 95% das cianobactérias do gênero *Nostochopsis* morreram nestas condições. Em geral, comparando ambos os meios sólidos testados, qualitativamente, o meio BG-11 obteve melhores resultados.

Em relação ao teste de quantidade de NaNO_3 (0, 5, 10, 15, 25 e 50%) como agente seletivo observou-se que a contaminação por outras cianobactérias é realmente diminuída (aproximadamente 40%) em menores porcentagens de fonte nitrogenada, mas em ausência de nitrogênio o crescimento dos organismos em estudo é inibido, e em altas quantidades deste composto (50%) o número de cianobactérias contaminantes extrapola o número de cianobactérias da ordem Nostocales com ramificações verdadeiras. Verificou-se após diversas vezes inoculado e repicado em triplicatas que 25% de NaNO_3 é a quantidade mais adequada para o crescimento destes organismos com a inibição satisfatória dos contaminantes. As porcentagens entre 0 e 15% de NaNO_3 apresentaram resultados insatisfatórios se comparado a 25% de NaNO_3 .

O teste de espaço físico foi realizado com o melhor meio de cultura selecionado para estas cianobactérias (BG-11) em placas de Petri de 60 e 100 mm. Observou-se que a placa menor é melhor no manuseio e na redução do número de contaminantes, o que pode ser devido a sua menor área de exposição, mas entre 20 a 30 dias de cultura algumas placas apresentaram-se completamente secas, mesmo estando revestidas com filme de PVC, e a menor quantidade de ágar, portanto as placas de Petri de 100 mm são mais adequadas para o cultivo das cianobactérias. Em relação ao meio sólido inclinado, em tubos de vidro com 200/20 mm de altura/largura, demonstrou ser um método de cultura inaplicável para esse tipo de cianobactéria, pois algumas se fixaram tão fortemente ao substrato que foi impossível a sua retirada com a alça de platina durante os repiques, além de uma intensa contaminação por bactérias e leveduras. Esse tipo de cultura pode ser mais indicado a culturas de cianobactérias com morfologia unicelular.

Quanto ao teste de uso de filme de PVC e Parafilm para envolver as placas, verificou-se que o filme de PVC é mais adequado, pois o Parafilm por ser um excelente vedante proporciona

o acúmulo de gotículas de água no interior da placa, o que pode levar em poucos dias ao acúmulo de água no fundo da mesma, aumentando desta maneira a umidade interna da placa e propiciando o crescimento de fungos, além reduzir as trocas gasosas com o meio externo.

Inicialmente, o fechamento dos tubos foi realizado com tampas plásticas, o que provavelmente diminui as trocas gasosas. Portanto realizou-se posteriormente um tamponamento com chumaços de algodão enrolados em gaze que gerou melhores resultados.

O crescimento das diferentes espécies de cianobactérias com ramificações verdadeiras cultivadas em meio sólido pode ser definido como um crescimento com forma de “bola”, ou seja, os filamentos se emaranham-se fortemente, impossibilitando boa visualização do crescimento. Nos testes realizados, independente das condições utilizadas, o desenvolvimento das cepas foi insatisfatório e muito lento, sendo na maioria dos casos nulo, independente de estarem na superfície ou infiltrados no ágar. Mesmo com a realização de repicagens constantes e métodos de purificação periódicos (15, 30 e 60 dias), as Nostocales com ramificação verdadeira não resistiram às condições de cultivo.

No meio de cultivo diluído nas proporções de 1:1 e 2:1 de água destilada autoclavada e BG-11 com 25% de NaNO_3 em relação o meio original em ágar 1%, verificou-se que em ambas as proporções de diluições que em condições mais escassas de nutrientes o crescimento destas cianobactérias é regular (20%) se comparado a este mesmo meios não diluído. A quantidade de contaminantes também foi diminuída (50%), sendo também regular, porém em poucos meses de cultivo, mesmo realizando procedimentos de repicagem as cianobactérias não resistiram, assim como nos meios não diluídos.

1.2 - Crescimento das cianobactérias em meio líquido

As culturas em meio líquido foram realizadas com três diferentes meios: BG-11, ASM-1 e água-solo. Em geral, as cianobactérias obtiveram resultados semelhantes nos dois primeiros, e nulo em água-solo.

Houve crescimento regular dos organismos (30%), tanto aerofíticos quanto aquáticos, em meio líquido se comparado ao meio sólido. Porém não houve diferenças do crescimento entre aerofíticos e aquáticos.

A variação na concentração de NaNO_3 (0, 5, 10, 15, 25 e 50%) em meio BG-11 como agente seletivo resultou, assim como em meio sólido, em diminuição da contaminação por outras cianobactérias quando adicionadas menores porcentagens de NaNO_3 . Em maiores porcentagens de NaNO_3 (25% e 50%) resultaram em cultivos fortemente contaminados por outras cianobactérias. Já nas menores porcentagens de NaNO_3 (0, 5, 10 e 15%), o crescimento das Nostocales com ramificações verdadeiras foi reprimido. Por esta razão a proporção de 25% de

NaNO₃ foi considerada a mais satisfatória, assim como em meio sólido. Todas as cianobactérias aquáticas do gênero *Nostochopsis* morreram em poucos dias em meio líquido com 0% de NaNO₃, indicando que este organismo mesmo sendo heterocitado necessita de quantidades mínimas deste composto para seu estabelecimento.

O teste de espaço físico foi realizado com o meio definido como satisfatório para o crescimento das Nostocales com ramificações verdadeiras (BG-11), em tubos com 100/10 mm de altura/largura e 200/20 mm de altura/largura. Observou-se que há limitações de espaço físico para o crescimento dos organismos, pois nenhuma espécie resistiu nos tubos pequenos. Portanto, pode-se dizer que as cianobactérias testadas necessitam de amplo espaço para o crescimento, mesmo que este seja lento ou quase insignificante. Por esta razão as culturas foram mantidas em tubos grandes (200/20 mm).

Assim como para os tubos com meio sólido inclinado, foram colocados chumaços de algodão enrolados em gaze para o fechamento.

Em relação ao tipo de crescimento em meio líquido, tanto as espécies aerofíticas quanto as aquáticas, é caracterizado como regular e extremamente lento, o que foi confirmado microscopicamente devido à presença de novas ramificações, além da presença de hormogônios e, em alguns casos, de acinetos. Assim como em meio sólido as cianobactérias tendem a formar “bolas”, ou seja, vão se emaranhando, o que dificulta a visualização do crescimento.

A realização ou não de repiques a cada 15, 30 e 60 dias não é suficiente para que estas cianobactérias se estabeleçam por muitos meses às condições de cultivo. Portanto, também não se conseguiu estabelecer uma forma de mantê-las em culturas líquidas.

No meio de cultivo diluído nas proporções de 1:1 e 2:1 assim como descrito para o meio sólido, resultou que em condições mais escassas de nutrientes o crescimento destas cianobactérias também é regular (20%) se comparado a este mesmo meios não diluído. E que a quantidade de contaminantes também foi regular, porém em poucos meses de cultivo, mesmo realizando procedimentos de repicagem as cianobactérias não resistiram, assim como nos meios não diluídos.

2 - Potencialização do crescimento dos cultivos

O sistema de aeração forçada mostrou-se ineficaz devido ao aumento da presença de contaminantes. Em três dias de experimento, observaram-se colônias amareladas de bactérias por todo o líquido. Isto evidencia que o sistema de filtração (algodão nas duas extremidades do cano delgado transparente principal) não é eficiente contra a entrada de contaminantes do meio

externo para o interior dos erlenmeyers, resultando em uma técnica de aeração que não apresenta praticidade e eficiência, e, portanto, não aplicável.

A agitação em *shaker* foi realizada com seis erlenmeyers de 250mL com 100mL de meio líquido de BG-11, sendo quatro com as espécies aerofíticas *S. hormoides*, *S. minutum*, *S. ocellatum* e *S. turfaceum* e os outros dois com as espécies aquáticas *S. robustum* e *N. lobatus*. A velocidade de agitação foi de 100 rpm por 15 dias consecutivos. O teste apresentou resultados regulares. Observou-se crescimento de 25%, se comparado com as culturas estáticas tanto de meio sólido quanto líquido. Porém, assim como no sistema de aeração forçada, apresentou intensa contaminação por bactérias. Isto pode ser devido as culturas prévias não estarem axênicas, sendo, portanto, um resultado esperado, pois a aeração também favorece o crescimento de outros organismos. O crescimento de ambas as espécies aquáticas foi pouco mais expressivo (10%) se comparado ao crescimento obtido pelas aerofíticas. Comparativamente ao outro método de aeração testado, a agitação em *shaker* obteve melhores resultados.

3 - Uso de antibióticos para purificação dos cultivos

Devido à composição orgânica básica do ágar verificou-se alta contaminação por fungos (bolors e leveduras). Inicialmente foi adicionando 0,05 g/L de cicloheximida, para inibir o crescimento dos organismos eucarióticos, porém os resultados foram insatisfatórios. Portanto tentou-se adicionar o dobro desta quantidade (0,1 g/L) o que diminuiu, mas não eliminou totalmente os contaminantes eucariotos como os fungos e as leveduras. Em meio líquido a quantidade inicial de cicloheximida foi suficiente e, portanto, satisfatória no combate aos eucariotos.

A utilização de soluções antibióticas (1 e 2) para diminuir a contaminação por bactérias obteve resultados satisfatórios, pois não houve morte das cianobactérias, porém não foi estabelecido se essa quantidade poderá acarretar em danos celulares futuros nas cianobactérias, baseando-se no fato de também serem procariotas. Em razão disto, o controle de contaminantes como as bactérias foi dificultado, pois possuem fisiologia semelhante e, portanto, a utilização de antibióticos pode tornar-se fator de risco para o desenvolvimento das cianobactérias.

V - DISCUSSÃO

Segundo ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK (1990), Stigonematales (atualmente Nostocales com ramificação verdadeira segundo HOFFMANN *et al.*, 2005) é o grupo mais diferenciado de cianobactérias, possui ciclo de vida complexo, além de estrutura altamente

variável e organização complexa de filamentos. Possuem baixa atividade fisiológica, pouca habilidade na competição com outras cianobactérias, atividade metabólica reduzida, lentas taxas de colonização, além de possuir limitação e restrição de nutrientes. O talo bem elaborado é a causa provável da sua baixa atividade metabólica. Alguns poucos organismos, como *Stigonema informe*, são dominantes em biótopos com condições ecológicas muito especializadas (extremas). Representam um grupo de organismos procarióticos autotróficos altamente especializados devido as suas características biológicas, morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e filogenéticas.

Todas essas características de crescimento e metabolismo foram fortemente visualizadas em ambos os tipos de cultivo testados, sólido e líquido. O crescimento demasiadamente lento, às vezes quase nulo, a competição com outras cianobactérias, bactérias e organismos heterotróficos, além da baixíssima taxa de colonização, foi visualmente negativo para as cianobactérias em estudo. Isto também foi verificado em campo, pois, em hábitat natural, as Nostocales de ramificação verdadeira foram encontradas esparsamente entre grandes crescimentos de outras cianobactérias e muito raramente ocupavam grandes extensões, além de formarem crostas extremamente delgadas sobre o substrato. Desta forma, pode-se dizer que as cianobactérias em condições artificiais de crescimento (laboratório) responderam de maneira semelhante àquela em seu hábitat original.

Segundo ANDERSEN (2005), não é comum que as espécies cresçam nos estágios iniciais do isolamento, mas somente após uma ou muitas transferências de meio de cultura fresco. Isto pode ser reflexo de deficiência do meio de cultura a alguns elementos particulares ou compostos orgânicos existentes no seu hábitat natural, e, portanto, impossíveis de serem proporcionados em meio artificial. Isto pode ser descoberto muito tempo após a primeira cultura, podendo acarretar na perda da amostra e/ou do isolado original. De acordo com o mesmo autor, outro fator importante pode estar relacionado com o hábitat natural do organismo. O acúmulo de compostos tóxicos do ambiente pode causar a morte em cultura, pois na natureza estes resíduos geralmente são diluídos ou metabolizados por outros organismos (por exemplo, as bactérias). Isto de fato ocorreu ambos os representantes aquáticos *Nostochopsis lobatus* e *Stigonema robustum* que não suportaram as condições de cultura e com as aerofíticas *Hapalosiphon aureus* e *Hapalosiphon* sp. que também pode ser devido à pequena quantidade de biomassa inicial.

Adicionalmente, há numerosos relatos na literatura que indicam que alterações nos níveis de nutrientes, intensidade de luz, pH e temperatura podem modificar o crescimento e o metabolismo secundário das cianobactérias (ANDERSEN, 2005).

Comparando as duas formas de meio, sólido e líquido, os diferentes meios testados (BG-

11, ASM-1 e água solo) e as diferentes concentrações de NaNO₃, verificou-se que o meio líquido BG-11 com 25% da concentração original de NaNO₃ permitiu o melhor crescimento das cianobactérias da ordem Nostocales com ramificação verdadeira, também utilizado nos trabalhos de NEILAN *et al.* (1997), GUGGER & HOFFMANN (2004) e TATON *et al.* (2006) tendo como diferencial a ausência de NaNO₃.

Em relação à presença/ausência de NaNO₃ diluído no meio, constatou-se que a cianobactéria aquática *Nostochopsis lobatus* não sobrevive em meio isento de fonte nitrogenada. Segundo MORI *et al.* (2003), a nutrição por nitrogênio modula o estresse responsável pela regulação da expressão de proteínas, resultando então, em um potencial mecanismo de integração ambiental e de desenvolvimento.

As cianobactérias aquáticas foram às exceções quanto ao meio de cultura preferencial, pois também apresentaram crescimento em meio líquido ASM-1, assim como utilizado nos estudos de comparação fisiológica e morfológica de Nostocales de ramificação verdadeira por MARTIN & WYATT (1974).

Inicialmente, na elaboração do meio BG-11, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, visualizava-se um precipitado de coloração alaranjada. Isto foi um problema inicial crítico, pois compostos precipitados não são disponíveis, ou seja, não podem ser utilizados pelos organismos, o que resultou em estagnação do crescimento nos primeiros meses de cultura. O problema foi solucionado a partir da utilização da técnica de HUISMAN *et al.* (2002), segundo a qual os compostos K₂HPO₄.3H₂O, Na₂CO₃ e Fe(III) (NH₄)₃ têm, necessariamente, que ser autoclavados separadamente e somente misturados após total resfriamento, pois não são quelados pelos agentes presentes no meio (EDTA e Ácido cítrico) quando expostos a altas temperaturas, e, portanto, precipitam. Desta forma as fontes de ferro, potássio, fosfato e carbono estavam restritas.

Em meio líquido estático observou-se um sutil aumento do crescimento quando trocadas as tampas plásticas pelos chumaços de algodão e gaze, permitindo maior troca gasosa entre os meios externo e interno do tubo de cultura, confirmando que as trocas gasosas são fundamentais (YAMAMOTO & NAKAHARA, 2005).

A aeração forçada foi uma opção relativamente eficaz para acelerar o crescimento destes organismos. Tais resultados foram também observados nos trabalhos de FÁBREGAS *et al.* (1996), que estudaram métodos de cultivos para *Chorella autrophica*, de YUSOFF *et al.* (2001), sobre culturas de cianobactérias aquáticas, de DUARTE FILHO *et al.* (2002), analisando cultivos com *Spirulina platensis*, de LIU *et al.* (2005), induzindo o crescimento de *Nostoc flagelliforme* para obtenção de ácidos graxos, e de REICHERT *et al.* (2006), que realizaram

cultivo semicontínuo com *Spirulina platensis* em fotobiorreator fechado.

O ágar é rotineiramente utilizado como agente solidificante em meio de cultura para bactérias, mas possui impurezas e várias destas podem ser as responsáveis pela inibição do crescimento de várias cianobactérias (FERRIS & HIRSCH, 1991). Segundo ANDERSEN (2005), várias cianobactérias podem não crescer na superfície, mas embebidas no ágar. Neste estudo todas as cianobactérias plaqueadas não apresentaram crescimento.

O isolamento e caracterização de linhagens de cianobactérias de diversos biótipos, associada a técnicas de cultura e a análises baseadas no genótipo, é extremamente importante para o estudo da diversidade cianobacteriana. Isso permite uma ligação entre os aspectos do genótipo e do fenótipo ajudando a compreender a fisiologia, a autoecologia e o potencial biotecnológico das cianobactérias. Além disso, caracterizações baseadas em estudos polifásicos aperfeiçoam a resolução da taxonomia das cianobactérias, permitindo investigação de morfotipos e genótipos paralelamente (TATON, 2006).

Para um isolamento bem sucedido é necessário entender e proporcionar o que ocorre naturalmente em condições ambientais, além da eliminação de contaminantes, especialmente os que podem competir com as espécies em estudo. Técnicas de diluição, isolamento de uma única célula por micropipetagem e estrias em ágar são amplamente utilizadas, entre outros métodos, e ao final destes passos, requer ainda continuação do crescimento em sub-culturas. Várias espécies de cianobactérias são facilmente isoladas e cultivadas, enquanto outras são difíceis ou visivelmente incapazes de crescerem em meios de cultura artificiais, como visto no estudo realizado com as Nostocales de ramificação verdadeira da região tropical de mata atlântica. São raros os estudos de elaboração de culturas específicas de cianobactérias aerofíticas (ANDERSEN, 2005).

A purificação de Nostocales com ramificações verdadeiras é muito mais trabalhosa se comparada a organismos com outras formas morfológicas de cianobactérias, como as de forma cocóide, onde se utiliza a técnica de isolamento por estrias com êxito. Estes organismos apresentam forma robusta e muito ramificada o que resulta em abrigo a diversos tipos de contaminantes. Para efetuar a limpeza mecânica com agitação em *vórtex* ou manual, os filamentos, que são relativamente sensíveis, desmembram-se e distribuem-se esparsamente pelo líquido, o que dificulta a sua captura para o posterior inóculo. A técnica de micropipetagem não obteve sucesso, também pela espessura do filamento, pois ao pipetar um único filamento, cianobactérias incrustadas na bainha do filamento não são separados. A utilização de antibióticos para a prevenção de crescimento de contaminantes tanto procarióticos (bactérias) quanto eucarióticos (fungos) também não apresentou resultados muito satisfatórios, principalmente em

meio sólido. O problema na utilização de antibióticos para eliminar bactérias está na proximidade fisiológica destas com as cianobactérias. Antibióticos são efetivos contra cianobactérias, pois, assim como as bactérias, são procariotos (ANDERSEN, 2005). Diversos estudos trataram da utilização de antibióticos para eliminação de bactérias do meio de cultivo (FERRIS & HIRSCH, 1991; MORI *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-VÁSQUEZ *et al.*, 2004). Entretanto, não há na literatura a indicação de uma quantidade segura de antibiótico em cultura de cianobactérias, além do que cada organismo é sensível a uma determinada dose deste tipo de composto químico. SALOMON *et al.* (2003) estudaram inúmeras linhagens de bactérias que vivem sobre os filamentos das cianobactérias e verificaram que estas agem como “cianobactericidas”, podendo impedir em 38% o crescimento das cianobactérias sob cultivo.

O cultivo em laboratório pode causar alterações morfológicas nas cianobactérias (CASAMATA *et al.* 2003). Quando coletados, apresentam estágios típicos de desenvolvimento, mas devido às modificações de hábitat e diferentes concentrações de elementos químicos, várias espécies podem desestabilizar suas formas de crescimento gerando morfotipos atípicos, como formas semelhante a aglomerações cocóides, ausência de ramificações e tricomas atipicamente ramificados (ANDERSEN, 2005).

Neste estudo só foi observada leve alteração da morfologia da cianobactéria *Nostochopsis lobatus*. Quando retirada da natureza e analisada ao microscópio, observaram-se poucos heterócitos e coloração verde-clara. Após meses em cultura, independente do meio testado, foi verificado expressivo aumento na quantidade de heterócitos, sendo estes, na maioria, intercalares. Os filamentos dispuseram-se em intensos aglomerados e houve mudança da coloração para um verde mais escuro e vivo. As demais cianobactérias testadas, e principalmente as aerofíticas, não sofreram alterações morfológicas por causa do meio de cultivo no período estudado. Segundo LAKATOS *et al.* (2001), um tipo de xantofila, a Zeaxantina, tem papel importante de proteção em plantas contra a fotoinibição, e é especulado que possa ter papel similar em cianobactérias. Ainda segundo estes autores, o conteúdo deste pigmento pode ser relativamente alto em certas cianobactérias aquáticas e ser aumentado sob altas irradiâncias, e em várias cianobactérias terrestres não se encontram altas concentrações de Zeaxantina e isto não é aumentado em altas exposições de luz.

HOFFMANN & DEMOULIN (1985), em estudo sobre a variabilidade morfológica de várias espécies de Scytonemataceae (Nostocales com ramificações falsas) em diferentes condições de cultura, relataram pouca variação em meio líquido e que a composição do meio pode afetar ou não a presença do heterócito.

Há interesse intenso da sociedade científica na busca de métodos mais detalhados,

específicos e realmente eficazes para o cultivo das cianobactérias em geral, sendo várias delas recentes como os realizados por: YUSOFF *et al.* (2001), GUPTA *et al.* (2002), TATON *et al.* (2003), MARTÍNEZ-VÁZQUEZ *et al.* (2004), KURANO & MIYACHI (2005) e YAMAMOTO & NAKAHARA (2005). Com o meio BG-11, considerado pelo estudo em questão como o ideal para o crescimento das Nostocales com ramificação verdadeira, existem alguns trabalhos atuais que o utilizaram como os de GAO & YE (2003), LIU *et al.* (2005) & TATON *et al.* (2006).

Os gêneros *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Mastigocladus* são membros desta ordem mais freqüentemente representados em cultura. Entretanto, são poucos os estudos com estes organismos tanto de biótipos aerofíticos como aquáticos, e apenas dois gêneros são bem caracterizados em culturas unicianobacterianas, *Fischerella* e *Chlorogloeopsis* (GUGGER & HOFFMANN, 2004).

Atualmente, em estudos sistemáticos, é imprescindível a utilização de abordagens polifásicas com a combinação de análises fenotípicas, moleculares e ultraestruturais. Somente com os dados destes parâmetros pode-se elucidar satisfatoriamente a diversidade de cianobactérias como um todo (KOMÁREK & KASTOVSKY, 2003). Para isto, o estabelecimento de métodos de cultura e meios de cultivo eficazes para crescimento de linhagens de cianobactérias é bastante recomendável e, principalmente com os organismos da ordem Nostocales de ramificação verdadeira, ainda é um procedimento que deve ser melhor estudado e detalhado.

VI - CONCLUSÃO

In vitro, as Nostocales de ramificação verdadeira seguem as mesmas características de crescimento quando em hábitat natural: crescimento lento, baixa taxa de colonização e competição. O meio líquido ou em sólido a diluição de 2:1 de água destilada e BG-11 com 25% de NaNO₃ (em relação ao meio original) foi considerada uma condição de cultivo regular para o crescimento destas cianobactérias, assim como o sistema de aeração de agitação em *shaker*. Repicagens constantes ou a não realização deste procedimento não foram suficientes para o estabelecimento de coleções de cultura, pois as Nostocales de ramificação verdadeira não resistem a muitos meses sob as condições de cultura testadas. Também não se conseguiu estabelecer quantidade segura de antibiótico para eliminação de outros procariotos contaminantes nos cultivos de Nostocales de ramificação verdadeira.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.G.; AZEVEDO, S.M.F.O. Produção de toxina por *Microcystis aeruginosa* em diferentes fases de cultivo e concentrações de nitrogênio, 1991. In: **CETESB** Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. **Relatório teórico**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 6-6, 1992.

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

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

ANDERSEN, R.A. **Algae culturing techniques**. Elsevier, 578 p., 2005.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 157-164, 2003.

BOKESCH, H.R.; O´KEEFE, B.R.; McKEE, T.C.; PANNELL, L.K.; PATTERSON, G.M.L.; GARDELA, R.S.; SOWDER, R.C.; TURPIN, J.; WATSON, K.; BUCKHEIT JR., R.W.; BOYD, M.R. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**, Maryland, v. 42, p. 2578-2584, 2003.

BRANCO, L.H.Z.; NECCHI JÚNIOR O.; BRANCO, C.C.Z. Ecological distribution of Cyanophyceae in lotic ecosystems of São Paulo State. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.1, p. 99-108, 2001.

CASAMATA, D.A.; VIS, M.L.; SHESTH, R.G. Cryptic species in cyanobacterial systematics: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAP molecular markers and 16S rDNA sequence data. **Aquatic Botany**, v. 77, p. 295-309, 2003.

CASTENHOLZ, R.W. Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (Blue-green algae), **Journal of Phycology**, v. 28, p. 737-745, 1992.

CASTIGLIONI, B.; RIZZI, E.; FROSINI, A.; SIVONEN, K.; RAJANIEMI, P.; RANTALA, A.; MUGNAI, M.A.; VENTURA, S.; WILMOTTE, A.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, P.; CONSOLANDI, C.; BORDONI, R.; MEZZELANI, A.; BATTAGLIA, C.; De BELLIS, G. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7161-7172, 2004.

DOKULIL, M.T.; TEUBNER, K. Cyanobacterial dominance in lakes. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 438, p. 1-12, 2000.

DUARTE FILHO, P.; SILVA, P.; COSTA, J.A.V. Estudo do crescimento de duas cepas de *Spirulina platensis* em diferentes meios de cultivo e níveis de agitação. **Proceedings of the XVIII CBCTA**, Porto Alegre, Brazil, 2002.

FÁBREGAS, J.; PATIÑO, M.; MORALES, E.D.; DOMINGUEZ, A.; OTERO, A. Distintive control of metabolic pathways by *Chlorella autotrophica* in semicontinuous culture, **Canadian Journal of Microbiology**, Santiago, v. 42, p. 1087-1090, 1996.

FERRIS, M.J.; HIRSCH, C.F. Method for Isolation and Purification of Cyanobacteria, **Applied and Environmental Microbiology**, New Jersey, v. 57, n. 5, p. 1448-1452, 1991.

FLETCHER, J.E.; MARTIN, W.P. Some effects of algae and molds in the rain-crust of desert soils. **Ecology**, Washington, v. 29, p. 95-100, 1948.

GALLON, J.R. N₂ fixation in phototrophs: adaptation to a specialized way of life. **Plant and Soil**, v. 230, p. 39-48, 2001.

GAO, K.; YE, C. Culture of the terrestrial cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* (Cyanophyceae), under aquatic conditions. **Journal Phycology**, Guangdong, v. 39, p. 617-623, 2003.

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

GUPTA, N.; BHASKAR, A.S.B.; RAO, P.V.L. Growth characteristics and toxin production in batch cultures of *Anabaena flosaquae*: effects of culture media and duration. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Gwalior, v. 18, p. 29-35, 2002.

HOFFMANN, L.; DEMOULIN, V. Morphological variability of some species of Scytonemataceae (Cyanophyceae) under different culture conditions, **Bull. Soc. Roy. Bot. Belg**, Tallahassee, v. 118, p. 189-197, 1985.

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

HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C.P.; VISSER, P.M.; BALKE, H.; SIGON, C.A.M.; PASSARGE, J.; WEISSING, F.J.; MUR, L.R. Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, p. 117-133, 2002.

JAKI, B.; ORJALA, J.; STICHER, O. A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 502-503, 1999.

JHA, M.N.; MISHRA, S.K. Biological responses of cyanobacteria to insecticides and their insecticide degrading potential, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, Samastipur, v. 75, p. 374-381, 2005.

JUNGBLUT, A.D.; NEILAN, B.A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of Cyanobacteria, **Arch. Microbiol.**, Sydney, v. 185, p. 107-114, 2006.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria, **Archiv für Hydrobiologie Supplementband/Algological Studies**, v. 109, p. 305-325, 2003.

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

KUMAR, A.; SINGH, D.P.; TYAGI, M.B.; KUMAR, A.; PRASUNA, E.G.; THAKUR, J.K. Production of hepatotoxin by the cyanobacterium *Scytonema* sp. strain BT 23. **Journal Application Microbiology Biotechnology**, Varanasi, v. 10, p. 375-380, 2000.

KURANO, N.; MIYACHI, S. Selection of microalgae growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Iwate, v. 100, n. 04, p. 403-408, 2005.

LAKATOS, M.; BILGER, W.; BÜDEL, B. Carotenoid composition of terrestrial cyanobacteria: response to natural light conditions in open rock habitats in Venezuela, **Europe Journal Phycology**, Kaiserslautern, v. 36, p. 367-375, 2001.

LIU, X-J.; JIANG, Y.; CHEN, F. Fatty acids profile of the edible filamentous cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* at different temperatures and developmental stages in liquid suspension culture. **Process Biochemistry**, Hong Kong, v. 40, p. 371-377, 2005

MARTIN, T.C.; WYATT, J.T. Comparative physiology and morphology of six strains of stigonemacean blue-green algae. **Journal Phycology**, Johnson, v. 10, p. 57-65, 1974.

MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, G.; RODRIGUEZ, M. H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; IBARRA, J.E. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*, **Journal Microbiological Methods**, México, v. 57, p. 115-121, 2004.

McCORMICK, P.V.; RAWLIK, P.S.; LURDING, K.; SMITH, P.; KAR, F.H. Periphyton-water quality relationships along nutrient gradient in the northern Florida Everglades. **Journal of North American Benthological Society**, v. 15, p. 433-449, 1996.

McCORMICK, P.V.; SHUFORD, R.B.E.; BCUS, J.G.; KENEDY, W.C. Spatial and seasonal patterns of periphyton biomass and productivity in the northern Everglades, Florida, USA. **Hydrobiologia**, v. 362, p. 185-208, 1998.

METTING, B. The Systematics and Ecology of soil algae. **The Botanical Review**, New York, v. 47, p. 195-312, 1981.

MORI, S.; CASTORENO, A.; MULLIGAN, M.E.; LAMMERS, P.J. Nitrogen status modulates the expression of RNA-binding proteins in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Houston, v. 227, p. 203-210, 2003.

NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rRNA Sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Sydney, v.47, n. 03, p. 693-697, 1997.

NICHOLS, H.W. Growth media freshwater. In: _____. Handbook of phycolgical methods: culture methods and growth measurements. **Cambridge University Press**, Cambridge, p. 7-24, 1973.

PAERL, H.W.; PRUFERT-BEBOUT, L.E.; GUO, C. Iron-stimulated N₂ fixation and growth in natural and cultured populations of the planktonic marine cyanobacteria *Trichodesmium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 1044-1047, 1994.

PAERL, H.W.; FITZPATRICK, M.; BEBOUT, B.M. Seasonal Nitrogen Fixation Dynamics in a Marine Microbial Mat: Potential Roles of Cyanobacteria and Microheterotrophs. **Limnology and Oceanography**, v. 41, n. 3, p. 419-427, 1996.

PATTERSON, G.M.L.; BOLIS, C.M. Fungal cell-wall polysaccharides elicit an antifungal secondary metabolite (phytoalexin) in the cyanobacterium *Scytonema ocellatum*. **Journal Phycology**, Lawrence, v. 33, p. 54-60, 1997.

PERONA, E.; BONILLA, I.; MATEO, P. Epilithic cyanobacterial communities and water quality; an alternative tool for monitoring eutrophication in the Alberhe River (Spain). **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 183-191, 1998.

REICHERT, C.C.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor, Brazilian **Journal of Chemical Engineering**, Rio Grande, v. 23, n.01, p. 23-28, 2006.

REJMÁNKOVÁ E.; KOMÁRKVÁ J. Function of cyanobacterial mats in phosphorus-limited tropical wetlands. **Hydrobiologia**, v. 431, p. 135-153, 2000.

REJMÁNKOVÁ, E.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Cyanobacteria - a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 189-199, 2004.

RESHEF, V.; CARMELI, S. Schizopeptin 791, a new anabeanopeptin-like cyclic peptide from the cyanobacterium *Schizothrix* sp. **Journal of Natural Products**, Tel Aviv, v. 65, p. 1187-1189. 2002.

SALOMON, P.S.; JANSON, S.; GRANLI, E. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. **Harmful Algae**, Kalmar, v. 2, p. 261-272, 2003.

SCHWABE, G.E. Blue-green algae as pioneers on post-volcanic substrate (Surtsey/Iceland). p. 332-352. In: DESIKACHARY, T.V. (ed.) **Taxonomy and Biology in blue-green algae**. Bangalore: Bangalore Press. 1972.

SMITKA, T.A.; BONJOUKLIAN, R.; DOOLIN, L.; JONES, N.D.; DEETER, J.B.; YOSHIDA, W.Y.; PRINSEP, M.R.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L. Ambiguine isonitriles, fungicidal hapalindole-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the Stigonemataceae. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 57, n. 3, p. 857-861, 1992.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; DE WIT, R.; WILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach, **Applied and Environmental Microbiology**, Deutsche, v. 69, p. 5157-5169, 2003

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D. A.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains, **Journal Phycology**, Liège, p. 14, 2006

VENKATARAMAN, G.S. The role of blue-green algae in tropical rice cultivation. In: STEWART, W.D.P (ed.). Nitrogen fixation by free-living microorganisms. **Cambridge University Press**, Cambridge , 1975.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylgenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITTON, B.A. Diversity, Ecology, and Taxonomy of the Cyanobacteria. In: Photosynthetic Prokariotes (MANN, N.H.; CARR, N.G. eds.) p. 1-15, **Plenum Press**, New York, 1992.

WHITTON, B.A. Soils and rice fields. p. 233-255. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (eds) The Ecology of Cyanobacteria. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 2000.

YAMAMOTO, Y.; NAKAHARA, H. Competitive dominance of cianobacterium *Microcystis aeruginosa* in nutrient-rich cultura conditions with special reference to dissolved inorganic carbon uptake. **Phycological Research**, Kyoto, v. 53, p. 201-208, 2005.

YUSOFF, F.M.; MATIAS, H.B.; KHALID, Z.A.; PHANG, S-M. Culture of microalgae using interstitial water extracted from shrimp pond bottom sediments, **Aquaculture**, Selangor, v. 201, p. 263-270, 2001.

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

VIII - ANEXO

Meio BG-11 (ALLEN, 1968)

Composto por solução de EDTA, Citrato férrico amoniacal, Metais traços, NaNO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4+3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 e Ácido cítrico, todos a 1%, com exceção dos metais traços a 0,1%, o pH da solução acertado em 7,4. A água bideionizada utilizada no preparo foi destilada no momento da preparação, pra não perder sua validade isenta de sais.

Meio ASM-1 (AGUIAR & AZEVEDO, 1992)

É composto por quatro soluções:

- 1) Solução A: NaNO_3 , $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$;
- 2) Solução B: KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4+12\text{H}_2\text{O}$;
- 3) Solução C: H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2+4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2+6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$;
- 4) Solução D: EDTA titriplex.

Nas seguintes proporções:

Solução A - 2%

Solução B - 0,2%

Solução C - 0,01%

Solução D - 0,04%

CAPÍTULO III

Caracterização molecular de populações de Nostocales com ramificações verdadeiras com base no rRNA 16S

Caracterização molecular de populações de Nostocales com ramificações verdadeiras da mata atlântica paulista com base no rRNA 16S

RESUMO: As Cyanobacteria têm papel importante na história da Terra como produtores primários e fonte de oxigênio atmosférico. Até hoje, entretanto, como e quando o grupo se diversificou permanece obscuro. Durante as últimas décadas, biólogos têm empregado uma variedade de técnicas moleculares para responder questões de filogenia, evolução e diversidade de populações. A comparação de seqüências de rRNA é uma poderosa ferramenta para deduzir as relações filogenéticas e evolucionárias. Para estudos filogenéticos, dados desta seqüência são comumente empregados e sua utilização é adequada para distinguir grupos de altos níveis taxonômicos (ordens) bem como de espécies. Os genes do rRNA 16S têm sido o critério para determinação de relações filogenéticas ou da diversidade no ambiente e a detecção e quantificação de populações específicas. Das onze espécies coletadas na região da mata atlântica nove tiveram seus DNAs amplificados por PCR usando iniciadores para seqüências do gene do rRNA 16S, porém, somente *Stigonema ocellatum* e *Hapalosiphon* sp. foram clonadas e seqüenciadas com sucesso. Após análise BLAST, verificou-se 98% de identidade destas cianobactérias com *S. ocellatum* SAG 48.90 e três diferentes espécies de *Hapalosiphon* disponíveis no GenBank. Devido à escassez de dados obtidos neste estudo e dos armazenados no Genbank para estes táxons em particular pode-se dizer que a proximidade taxonômica entre estas populações ainda é incerta. As análises filogenéticas, por sua vez, corroboraram a origem monofilética das cianobactérias heterocitadas.

I - INTRODUÇÃO

Muitos microfósseis do Pré-Cambriano podem se relacionar com as cianobactérias modernas a partir de um estudo comparativo entre fósseis (KNOLL & GOLÚBIC, 1992). Entretanto, registros geológicos são sempre acompanhados da preservação incompleta da história evolutiva, portanto tal percurso das cianobactérias tem ainda permanecido obscuro (TOMITANI, 2004). Durante a última década, biólogos têm empregado uma variedade de técnicas moleculares para responder questões de filogenia, evolução e diversidade de populações cianobacterianas (BOYER *et al.*, 2001; TOMITANI, 2004) e, para esse fim, a maioria baseia-se na seqüência do rRNA 16S (subunidade pequena ribossomal) (GIOVANNI *et al.*, 1988; TURNER *et al.*, 1999; WILMOTTE & HERDMAN, 2001; GUGGER & HOFFMANN, 2004).

O advento da sistemática molecular permite comparar seqüências de DNA de cianobactérias com outros procariotos e eucariotos inferindo uma filogenia. Análises baseadas em uma ordem de extensão de seqüências gênicas revelam claramente que estes organismos constituem um dos onze maiores clados do domínio *Bacteria*. Esta filogenia explica a disposição de muitas similaridades em estruturas celulares e fisiológicas que cianobactérias compartilham com outros procariotos (GRAHAM & WILCOX, 2000).

A comparação de seqüências de rRNA é uma poderosa ferramenta para deduzir as relações filogenéticas e evolutivas entre *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (WEISBURG *et al.*, 1991). CASAMATTA *et al.* (2003) relatam que, em uma classificação, muitas vezes a variação morfológica pode não corresponder a diferenças genéticas em cianobactérias, e que métodos moleculares são essenciais na detecção do curso biogeográfico de espécies potencialmente críticas.

Em geral, seqüências macromoleculares têm sido utilizadas porque permitem uma inferência quantitativa de parentescos, além de serem cumulativas. O uso de macromoléculas em análises filogenéticas, como os RNAs ribossomais, particularmente o rRNA 16S tem providenciado o estabelecimento de relacionamentos por conter muitas informações, como a conservação e distribuição natural das espécies (LANE *et al.*, 1985) o que reflete a riqueza das formas microbianas no ambiente (STACKEBRANDT & RAINEY, 1995). Segundo YAMAMOTO & HARAYAMA (1998), a taxa de evolução do rRNA 16S é de 1% a cada 50 milhões de anos e a de sítios sinônimos de proteínas é de 0,7 a 0,8% por milhões de anos.

Análises do rRNA 16S e, mais recentemente, dos Espaçadores Transcritos Internos (ITS) entre os genes de rRNA 16S-23S têm ampliado os estudos, propiciando alusões do parentesco filogenético de gêneros de cianobactérias das ordens propostas por ANAGNOSTIDIS E KOMÁREK (1990) (BOYER *et al.*, 2001).

Segundo NÜBEL *et al.* (1997), a análise comparativa deste gene proporciona uma nova significância para a investigação da discrepância entre linhagens de coleções e comunidades naturais. Segundo estes mesmos autores, o gene rRNA 16S é independente de cultivo ou de condições de crescimento, pois podem ser recuperados por amplificação do DNA. Porém, relatam ainda, que há várias armadilhas potenciais nesta técnica, como a formação de quimeras ou a amplificação de moléculas-molde com diferentes eficiências.

Embora as seqüências do rRNA 16S sejam rotineira e amplamente utilizadas para distinguir e estabelecer relações entre gêneros com espécies bem resolvidas, há cientistas que refutam o uso desta seqüência. Segundo FOX *et al.* (1992), quando o nível de identidade do rRNA 16S é de 99%, a hibridização DNA-DNA pode ou não documentar a existência de uma identidade de espécies. O que se observa, então, é que a identidade das seqüências de rRNA 16S pode não garantir a identidade das espécies, porém pode determinar relacionamentos inter e intragenéricos, e que, segundo este raciocínio portanto, os dados do rRNA 16S não são apropriados. Os autores relatam ainda que as linhagens são denominadas como espécies com base em outros critérios e atribuem as diferenças à possível diversidade de interespecies antes de criar uma nova espécie.

Em alguns estudos, entretanto, são utilizadas seqüências de rRNA 16S para distinguir grupos taxonômicos superiores (como as ordens) bem como espécies individuais (CASAMATTA *et al.*, 2005). Segundo GARCIA-PICHEL *et al.* (1998), a porcentagem de similaridade usualmente utilizada nas seqüências de rRNA 16S para distinguir espécies é maior que 97,5% o que corresponde a, pelo menos, 70% de hibridização DNA-DNA.

Árvores filogenéticas podem ser construídas a partir de outras seqüências genéticas além do rRNA 16S, como *gyrB* (DNA girase topoisomerase tipo II), *hetR* (formação do heterócito), *nifD*, *nifH*, *nifK* (nitrogenase), *rpoB*, *rpoC1*, *rpoD1* (RNA polimerase) e *rbcLX* (Rubisco) (SEO & YOKOTA, 2003; HENSON *et al.*, 2004a,b; RAJANIEMI *et al.*, 2005; TOMITANI, 2004). A comparação dos resultados das análises filogenéticas destes diferentes genes geralmente são confrontadas com os de rRNA 16S. SEO & YOKOTA (2003) relatam que a árvore baseada nos genes *rpoC1* e *rpoD1* corroboram resultados obtidos por análises segundo o rRNA 16S, que indicam que *Nostocales* e *Stigonematales* são grupos monofiléticos, enquanto TOMITANI (2004) afirma que árvores com base em *hetR* suportam a topologia do rRNA 16S.

Entretanto, todos os métodos moleculares para avaliação das relações filogenéticas (por ex. hibridização DNA-DNA, DNA-RNA, rRNA 5S, seqüenciamento de proteínas, oligonucleotídeos, rRNA 16S e padrão enzimológico, entre outros) têm suas vantagens e limitações (LANE *et al.*, 1985). A exata relação filogenética das cianobactérias é ainda, portanto

controversa (GIOVANNONI *et al.*, 1988; TURNER *et al.*, 1999; DOUGLAS & TURNER, 1991; WILMOTTE *et al.*, 1992; ISHIDA *et al.*, 2001; ROBERTSON *et al.*, 2001).

As árvores filogenéticas do rRNA 16S mais comumente utilizadas baseiam-se nos métodos de *neighbor-joining* (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) como verificado, por exemplo, nos trabalhos de PALINSKA *et al.* (2006), WILLAME *et al.* (2006), FIORE *et al.* (2007) e SARUHASHI *et al.* (2007).

A classificação taxonômica tem como função registrar a biodiversidade da Terra baseada nas relações evolutivas (genéticas) e ecológicas, bem como as variações fenotípicas e pode gerar uma certa confusão devido à sua amplitude de variantes (morfologia, ecologia, ultraestrutura e molecular) (MARQUARDT & PALINSKA, 2007). O uso de nomes para a designação de vários passos evolutivos (unidades taxonômicas) é constantemente a única via para a organização clara do sistema. Nenhum outro método é, até agora, mais prático para determinação e comparação de táxons em ambas as pesquisas de campo ou experimental. Entretanto, isto é necessário para usar e para integrar todos os dados avaliados para o sistema para que a classificação possa ser continuamente alterada, corrigida e reavaliada (HOFFMANN *et al.*, 2005). Entretanto, os estudos moleculares com cianobactérias cultivadas ou ambientais apresentam dois imponentes obstáculos que são a eliminação de contaminantes da bainha e da mucilagem. O primeiro interfere no resultado das análises, pois pode ter seu DNA amplificado e seqüenciado, resultando em perda de tempo e de recursos, além de interferir nas conclusões obtidas. A bainha, por sua vez, é rica em polissacarídeos, polifenóis e outras substâncias que dificultam a remoção do DNA e impedem a ação de substâncias como o fenol e a lisozima que são amplamente utilizados na lise celular (WU *et al.*, 2000; SRIVASTAVA *et al.*, 2007).

Contudo, são escassos os estudos com gêneros das Nostocales com ramificação verdadeira, sendo que os existentes abordam poucos gêneros como *Capsosira*, *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Hapalosiphon*, *Nostochopsis*, *Stigonema* e *Westiellopsis*, com reduzido número de espécies. De fato, isto é muito pouco para se estabelecer e resolver a história evolutiva das cianobactérias filamentosas heterocitadas com ramificações verdadeiras (TOMITANI, 2004).

Atualmente, sabe-se que táxons heterocitados são monofiléticos, enquanto as formas unicelulares e filamentosas sem heterócito e/ou acinetos são heterogêneos, com linhas evolutivas distintas. A monofilia das cianobactérias heterocitadas é comprovada por análises filogenéticas baseadas em diferentes genes, observação que é corroborada pelo arranjo similar dos tilacóides em todas as cianobactérias heterocitadas.

Independentemente de limitações das seqüências do rRNA 16S, que representam apenas uma pequena fração do genoma total, e o número limitante de gêneros e espécies que possuem

seqüências avaliadas, vários discernimentos emergiram pela combinação de dados moleculares e morfológicos, que não devem ser ignorados na classificação cianobacterial.

Investigações mais detalhadas sobre as cianobactérias, principalmente as de ambientes aerofíticos, têm revelado um número consideravelmente elevado de táxons ainda desconhecidos. Estes podem ainda guardar uma série de informações importantes para o entendimento das relações de parentesco entre as diferentes espécies e esclarecer a estabilidade dos diferentes caracteres utilizados na sistemática do grupo. Deste modo, a caracterização molecular de populações (ou espécies) de ambientes tropicais e de habitats especiais, como os aerofíticos, assume grande importância nos estudos realizados nesta linha de pesquisa.

II - OBJETIVOS

- Caracterizar populações de cianobactérias com ramificações verdadeiras encontradas na mata atlântica paulista do ponto de vista molecular.
- Comparar as seqüências obtidas com outras de mesmas espécies com a finalidade de avaliar as possíveis variações produzidas pela distribuição geográfica.
- Avaliar a proximidade molecular com espécies ou gêneros próximos, procurando por relacionamentos de parentesco entre os organismos do grupo.

III - MATERIAL E MÉTODOS

A - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS USANDO O RRNA 16S

Foram utilizadas amostras de cianobactérias provenientes de campo (da natureza), devido a impossibilidade de seu crescimento e manutenção em meios de cultivo.

A metodologia utilizada no estudo molecular das espécies de cianobactérias foi baseada nos trabalhos de NEILAN *et al.* (1997) e LANE (1991).

1 - Extração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada com as nove espécies de cianobactérias coletadas ao longo do litoral norte paulista em mata atlântica. São elas: *Hapalosiphon aureus*, *Hapalosiphon* sp., *Nostochopsis lobatus*, *Spelaeopogon sommierii*, *Stigonema hormoides*, *S. minutum*, *S. ocellatum*, *S. robustum* e *S. turfaceum*.

A quebra celular foi realizada primeiramente por maceração mecânica, utilizando-se nitrogênio líquido para facilitar o procedimento. Depois do congelamento, a amostra de

cianobactéria foi então esmagada com auxílio de pistilo de plástico autoclavado. A quantidade de biomassa a ser utilizada correspondeu a aproximadamente ao fundo do *ependorf*.

Para a extração foi utilizado rotineiramente o kit Ultra Clean Microbial DNA Isolation (MoBio Laboratories), segundo as especificações do fabricante. Em uma única situação (*Spelaeopogon sommierii*) foi necessário o emprego do kit Gnome (QBIOgene), seguindo o procedimento indicado pelo fabricante, pois o procedimento com o kit de rotina não produziu resultados satisfatórios.

Ao DNA extraído (aproximadamente 5 µL por amostra) foram acrescidos 2 µL de tampão de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%) e a integridade do produto foi verificada em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio (0,3 µg/mL de gel), em corrida eletroforética usando o tampão TBE 1,5 X (TBE 1 X: Tris-borato 44 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita utilizando fotografia digital do gel em transluminador. Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen). As amostras foram estocadas à temperatura de -20°C até a próxima etapa.

2 - Amplificação do gene rRNA 16S

Para a amplificação das seqüências do gene do rRNA 16S (Figura 1) a partir do DNA extraído, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'), segundo NEILAN *et al.* (1997). A amplificação do rRNA 16S foi realizada utilizando-se o kit "Pure Taq Ready To-Go PCR Beads" (GE Life Science), seguindo-se as recomendações do fabricante.

A termociclagem foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. A concentração dos produtos amplificados foi avaliada em gel de agarose 1% e purificado com Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). A verificação do tamanho dos *amplicons* resultantes será realizada através do padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e a quantificação, através do aparelho Qubit Fluorometer (Invitrogen) a partir de 1 µL da amostra do produto de PCR.

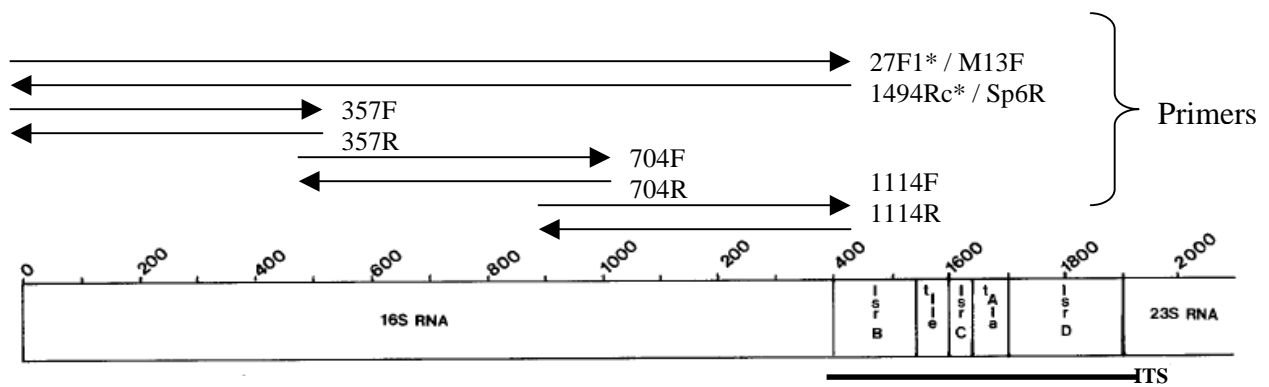


Figura 1 - Mapa do *operon* do gene rRNA 16S-23S demonstrando o gene rRNA 16S, a região dos ITS (Espaçadores Transcritos Internos) contendo os genes ISR-B, ISR-C e ISR-D intercalados pelos genes de tRNA isoleucina (tIle) e alanina (tAla) e o gene rRNA 23S, respectivamente (adaptado de BOYER *et al.*, 2001). Acima, os primers utilizados na PCR (*) e no sequenciamento demonstrando suas regiões de anelamento e extensão (sem escala).

3 - Clonagem de produtos de PCR

Após a amplificação por PCR das seqüências de DNA, foi realizada a clonagem dos amplicons, utilizando-se o kit de clonagem “pGEM[®]-T Easy Vector Systems”, fabricado pela Promega, seguindo as instruções do fabricante.

3.1 - Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foi feita por meio de choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989). Alíquotas de 5 μ L do produto de ligação e 50 μ L de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 α foram misturadas em um microtubo esterilizado e incubadas em gelo por 30 minutos. Posteriormente, o microtubo foi colocado em banho-maria a 41°C por 1 minuto e em seguida novamente incubado em gelo por 2 minutos. Um volume de 250 μ L de meio SOC sob temperatura ambiente (SAMBROOK *et al.*, 1989) foi adicionado ao microtubo. A mistura foi, então, incubada a 37°C por 1 hora sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), nas respectivas concentrações finais de 100 μ g/mL e 100 μ g/mL de meio, por 14-16 horas a temperatura de 37°C.

3.2 - PCR de colônia

Após o plaqueamento, foram escolhidas as colônias brancas para uma nova reação de PCR e confirmação da presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células transformadas de cada clone foi adicionada a 25 μ L de reação de PCR utilizando-se os *primers*: 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (NEILAN *et al.*, 1997). A amplificação foi feita em solução contendo tampão para a reação PCR 1 X (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2

mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 10 ng de DNA, 5 pmol de cada *primer*, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) esterilizada, para um volume final de 25 µL. As condições da termociclagem foram: desnaturação a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto. A verificação do tamanho e quantificação dos *amplicons* resultantes foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.3 - Extração do DNA plasmidial

A extração dos plasmídios das células de *Escherichia coli* DH5α contendo os insertos foi feita pelo método de preparação em pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina, de acordo com BIRNBOIM & DOLY (1979). As colônias brancas que fizeram parte da seleção foram transferidas para 3,5 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 14 a 16 horas a 37°C e sob agitação de 200 rpm. Em microtubos de 1,5 mL foram colocadas as células produzidas e em seguida centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. O precipitado formado foi ressuspenso em 100 µL de solução gelada (Tris-HCl 1 M, pH 8,0, EDTA 0,5 M, 0,9 de glucose e água para um volume final de 100 mL). Em seguida, 200 µL de uma solução 1:1 (NaOH 0,4 N e SDS 2%) foram adicionados e misturados gentilmente. Após incubação no gelo por 10 minutos, foram adicionados aos microtubos 150 µL de outra solução também gelada (acetato de potássio 5m, 11,5 mL de ácido acético glacial e água, para um volume final de 100 mL). Posteriormente foram centrifugados a 13.000 rpm durante 20 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo, o qual foi tratado com RNase A (10mg/mL) por 30 min a 37 °C. Foi adicionado 1 mL de etanol 100% gelado e centrifugado em seguida (13.000 rpm por 15 min). O sobrenadante foi eliminado e o precipitado lavado com 750 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min. Para eliminação total do etanol, o precipitado foi colocado em bloco aquecedor a 40°C até total evaporação. Posteriormente foi ressuspenso em 30 µL de água ultrapura (Milli-Q) e incubado a 37°C por 10 min. Os plasmídios extraídos foram verificados em gel de agarose 1% conforme descrito anteriormente e armazenados a -20°C até a próxima etapa.

4 - Sequenciamento do rRNA 16S

Os *amplicons* clonados foram reamplificados por PCR usando o “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para a reação foram utilizados 200 ng de cada plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol.µL⁻¹ do iniciador M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA-3') e do SP6 (5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'). Os oligonucleotídeos 357F (CCTACGGGAGGCAGCAG), 357R (CTGCTGCCTCCCGTA

GG), 704F (GTAGSGGTGAAATSCGTAGA), 704R (TCTACGSATTCACCSCTAC), 1114F (GCAACGAGCGCAACCC) e 1114R (GGGTTGCGCTCGTTGC) descritos por LANE (1991) foram usados em reações adicionais, buscando-se o seqüenciamento do fragmento total com aproximadamente 1500 pb.

A reação de termociclagem para seqüenciamento foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto em 25 ciclos. Após a amplificação dos fragmentos parciais de interesse, procedeu-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit. Foi utilizado o seqüenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), os dados foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing - Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

Com a finalidade de se obter uma seqüência gênica de maior confiabilidade, o *amplicon* foi seqüenciado em triplicata com os *primers* externos (M13F e Sp6R) e internos (357F, 357R, 704F, 704R, 1114F e 1114R).

B - Processamento e análise filogenética das seqüências

As seqüências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20). Os fragmentos parciais seqüenciados foram alinhados e editados por correção manual usando-se o programa BioEdit v 7.0.5 (HALL, 1999), em sistema operacional Windows XP. As seqüências foram comparadas com outras 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).

As seqüências obtidas, somadas as outras selecionadas foram novamente alinhadas, editadas e utilizadas para a análise filogenética. Com base em táxons próximos apontados por análises preliminares, onde se buscou uma comparação mais abrangente com outros membros do grupo, foram utilizados os seguintes: *Cyanobium* sp. JJ27STR, *Prochlorococcus marinus*, *Phormidium* sp. UTCC487, *Leptolyngbya boryana* UTEX B485, *Nostoc commune* EV1-KK1, *Brasilonema terrestre* CENA116, *Scytonema hofmanni* PCC7110, *Fischerella mucicola* PCC7414, *Fischerella* sp. CENA19, *Nostochopsis* sp., *Chlorogloeopsis* sp. Greenland_5, *Hapalosiphon welwitschii*, *Hapalosiphon delicatulus*, *Symphyonemopsis* sp. VAPOR1, *Stigonema ocellatum* SAG48.90 e *Westiellopsis prolifica* SAG16.93. Seus códigos de acesso e quantidade de pares de bases estão descritos no Anexo 2.

As matrizes de dados foram exportadas no formato NEXUS (MADDISON *et al.*, 1997), arquivo de entrada para o software PAUP (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods”) (SWOFFORD, 2003).

As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de distância *neighbor-joining*, máxima parcimônia e máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) (SCHNEIDER, 2003). Os limites de confiança dos grupos (clados) das árvores filogenéticas foram calculados com os valores de suporte de *bootstrap* com 1.000 réplicas de buscas heurísticas, o que gerou árvores de consenso com o critério maior que 50% de semelhança nos ramos das árvores.

A edição das árvores foi realizada utilizando-se o programa TreeView v.1.6.1 (PAGE, 1996).

IV - RESULTADOS

Das nove espécies de cianobactérias testadas, oito resultaram em amostras positivas quanto à extração de DNA, apresentando, entretanto, baixa quantidade de DNA extraído e purificado quando comparada à quantidade de material bruto utilizado na extração (0,1 a 0,25g). Porém, o DNA extraído apresentou, na maioria dos casos, boa qualidade constatada pela amplificação e posteriormente comprovada pela eletroforese em gel de agarose (Figura 2).

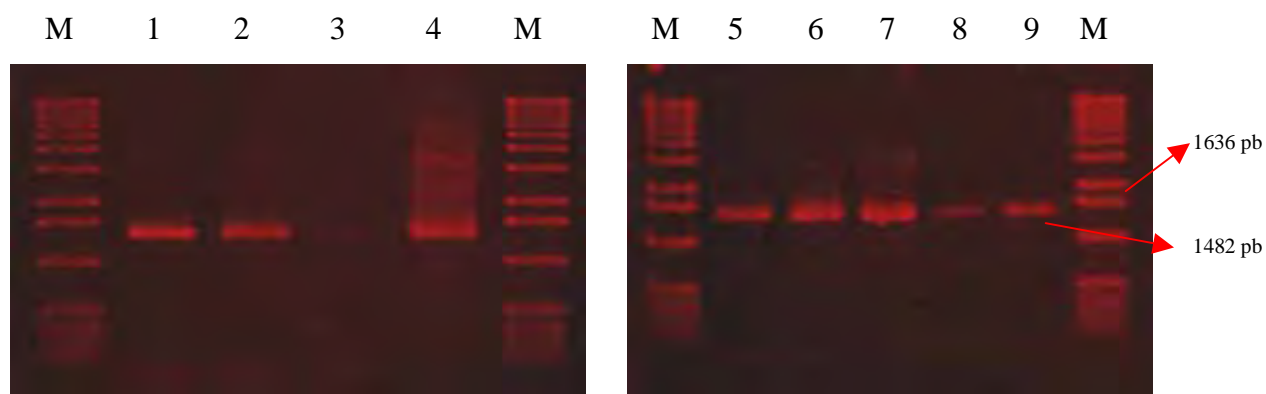


Figura 2 - Géis representativos dos produtos de amplificação (PCR) do gene rRNA 16S. M - marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). 1 - *Hapalosiphon aureus*; 2 - *Hapalosiphon* sp.; 3 - *Nostochopsis lobatus* (negativo); 4 - *Spelaopogon sommierii*; 5 - *Stigonema hormoides*; 6 - *S. minutum*; 7 - *S. ocellatum*; 8 - *S. robustum*; 9 - *S. turfaceum*.

A partir dos produtos de PCR conseguidos, foram realizadas clonagens com as espécies *Hapalosiphon* sp., *Stigonema hormoides*, *S. ocellatum*, *S. turfaceum*, *S. robustum* e *Spelaopogon sommierii*. Os resultados de ligação com o vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy, etapa inicial no procedimento de clonagem das amostras estão demonstrados abaixo (Tabela 1). Considerou-se satisfatório quando houve ligação com o vetor e obtenção de clone com o inserto

de interesse, insatisfatório quando a ligação com o vetor foi bem sucedida, mas não se conseguiu nenhum clone com o inserto de interesse e nulo quando não houve sequer a ligação com o vetor. As razões para o alto índice de resultados práticos negativos ainda não são nítidas.

Tabela 1 - Resultados do procedimento de ligação ao vetor de clonagem ρ GEM[®]-T Easy.

Espécie	Ligação com o vetor de clonagem ρGEM[®]-T Easy
<i>Hapalosiphon</i> sp.	Satisfatório
<i>Stigonema ocellatum</i>	Satisfatório
<i>Stigonema hormoides</i>	Insatisfatório
<i>Stigonema turfaceum</i>	Insatisfatório
<i>Stigonema robustum</i>	Insatisfatório
<i>Spelaeopogon sommierii</i>	Nulo

As clonagens de *Hapalosiphon* sp. e *S. ocellatum* resultaram em 14 e 22 clones, respectivamente. Dos 22 clones de *S. ocellatum* três foram eliminados após o PCR de colônia por não conterem inserto. Os clones contendo o inserto de interesse de ambas as espécies foram para a etapa de seqüenciamento com a utilização do *primer* universal M13F, sendo que destes, dez foram positivos para o inserto do rRNA 16S de cianobactérias e os outros 23, insertos de diversos gêneros de bactérias.

Por meio da análise BLAST, as seqüências resultantes para o *primer* M13F foram comparadas às do banco de dados GenBank e um clone de *S. ocellatum* e três de *Hapalosiphon* sp. encontraram correspondência com as seqüências quase completas do rRNA 16S, respectivamente, de *S. ocellatum* (SAG 48.90 - AJ544082 - 96%) e *H. welwitschii* (AY034793 - 98%). Posteriormente, foi possível o alinhamento de todas as seqüências provenientes dos *primers* internos em ambas as espécies e o estabelecimento de uma seqüência com 1352 e 1390 nucleotídeos de *S. ocellatum* e *Hapalosiphon* sp., respectivamente, consistindo, portanto, em duas novas seqüências quase completas do gene rRNA 16S provenientes, agora, de hábitat tropical. A análise BLAST destas seqüências resultou em identidade de *Hapalosiphon* sp. com *H. welwitschii* e de *S. ocellatum* com *S. ocellatum* SAG 48.90 do GenBank, ambas no nível de 98% (Anexo).

As análises filogenéticas geraram a formação de três clados que merecem destaque. O clado 1 reúne as formas heterocitadas, o clado 2 as populações de *Stigonema ocellatum* e o clado 3 sustenta todas as populações do gênero *Hapalosiphon* (Figura 3).

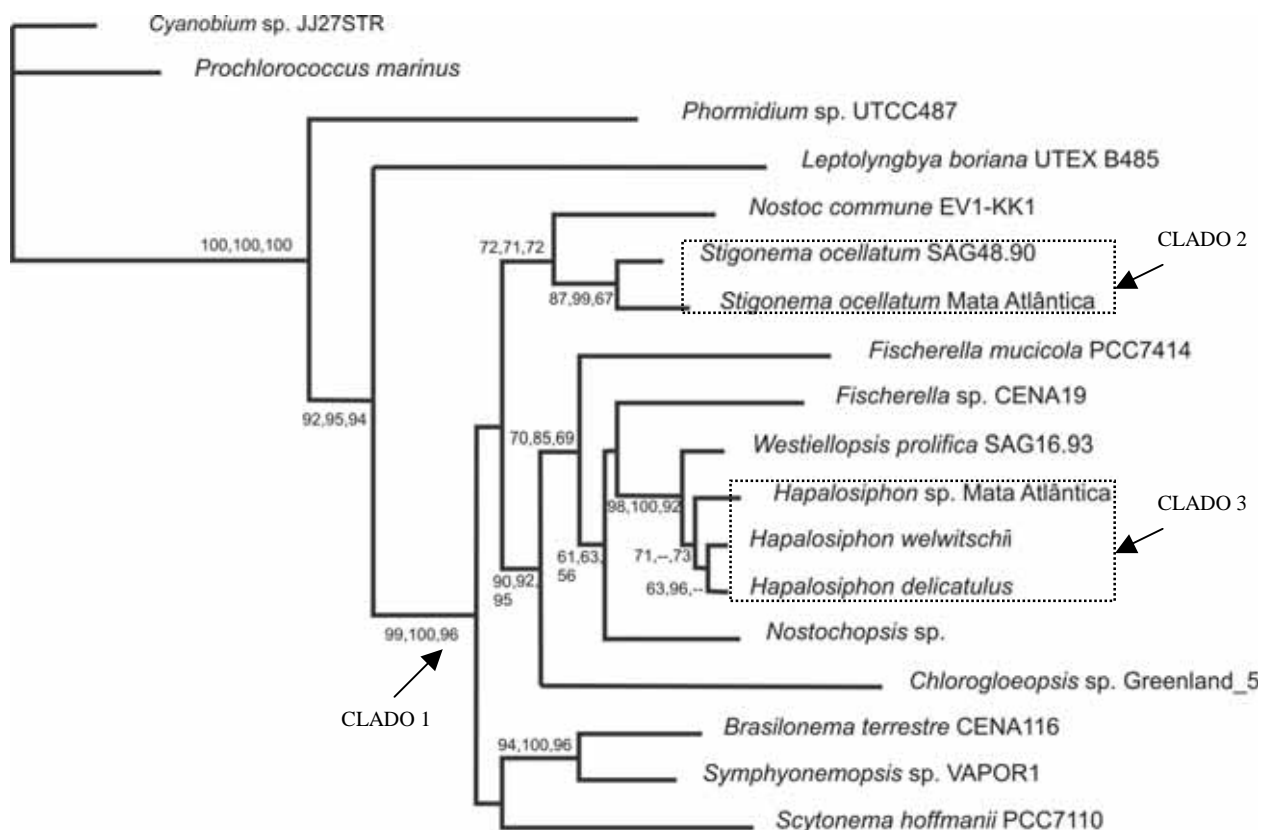


Figura 3 - Árvore filogenética resultante das análises de *neighbor-joining*, máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Valores de *bootstrap* utilizando os métodos citados estão respectivamente indicados nos nós, quando superiores a 50%. Os números de acesso no GenBank dos táxons utilizados para a construção desta árvore estão no Anexo 2.

V - DISCUSSÃO

A extração de DNA é o passo inicial para análise molecular bem sucedida. Uma das etapas deste processo é a quebra celular, considerada crítica para a extração em cianobactérias (WU *et al.*, 2000), principalmente quando o material de interesse procede diretamente de amostras de campo. Vários estudos têm proposto diferentes técnicas para o processo de extração (TSAI & OLSON, 1991; MILLER *et al.*, 1999; NEILAN, 1995; TILLET & NEILAN, 2000), mas todos apresentam limitações que vão desde a toxicidade até a complexidade excessiva dos protocolos empregados, passando, inclusive, por métodos de custo elevado (SARUHASHI *et al.*, 2007). Um dos principais complicadores no processo de quebra celular e extração do DNA em cianobactérias é a presença de exopolissacarídeos mucilaginosos produzidos pelos organismos e frequentemente depositados na forma de uma bainha ou de uma mucilagem amorfa. Muitos processos utilizam fenol e lisozimas para promover a quebra celular, mas a presença da mucilagem dificulta o acesso das substâncias à célula (DE PHILIPPIS & VINCENZINI, 1998) e, assim, os protocolos não resultam em uma extração eficiente. Os resultados conseguidos revelaram que o processo de extração adotado foi relativamente eficiente, gerando um produto

de boa qualidade, mas, contudo, de baixa eficiência quantitativa. Como sugerido em diversos trabalhos, ponderamos que a pouca quantidade de DNA resultante da extração pode ser devida à presença de exomucopolissacarídeos, muitas vezes abundantes nos organismos estudados, dificultando, portanto uma extração quantitativamente mais produtiva.

As amostras originárias diretamente da natureza carregam um grande número de contaminantes procariotos (outras bactérias), mesmo com os cuidados de limpeza iniciais podem ter seus DNAs extraídos junto ao das cianobactérias de interesse. Este fato pode ter sido intensificado pela existência de bainha de mucilagem nas cianobactérias, que impõe as dificuldades acima comentadas.

STACKEBRANDT & GOEBEL (1994), utilizando linhagens de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, correlacionaram resultados de hibridização DNA-DNA com a similaridade das seqüências gênicas do rRNA 16S e concluíram que as linhagens com valores acima de 70% de hibridização, consideradas pertencentes a mesmas espécies, também possuíam acima de 97,5% de similaridade entre suas seqüências do rRNA 16S. Deste modo, em estudos bacteriológicos (que incluem as cianobactérias), este valor de similaridade passou a ser amplamente utilizado como um delimitador entre genótipos que potencialmente definiriam espécies ou relacionamentos filogenéticos mais distantes (GARCIA-PICHEL *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; GKELIS *et al.*, 2003; CASAMATTA *et al.*, 2006; TATON *et al.*, 2006; MARQUARDT & PALINSKA, 2007).

As similaridades observadas (98%) entre as populações de *Hapalosiphon* sp. e *Stigonema ocellatum* da mata atlântica brasileira e as populações de *H. welwitschii* e de *S. ocellatum* presentes no Genbank (americana e européia, respectivamente) indicam que estas pertencem à mesma espécie, pois o valor de porcentagem foi superior ao limite comumente utilizado para a definição de táxons específicos comparados pelo rRNA 16S. Porém, não foram encontradas as características morfométricas de *H. welwitschii* americana (dados não publicados pelos autores) para que se pudesse confrontar os dados morfológicos com os moleculares e, portanto, afirmar que se trata de uma mesma espécie. Um fator complicador é que a população de *Hapalosiphon* sp. estudada apresenta divergências métricas em relação à *H. welwitschii* descrita na literatura especializada.

Discrepâncias em termos de similaridade entre seqüências podem ser geradas por erros de identificação em alguma das populações, levando, portanto, a uma consideração equivocada sobre a variação genotípica da espécie. Registros de equívocos como este são relativamente comuns na literatura (p.ex. GUGGER & HOFFMANN, 2004; CASAMATTA *et al.*, 2006; PALINSKA *et al.*, 2006; WILLAME *et al.*, 2006). As populações brasileiras estudadas estão de

acordo com os dados morfológicos e métricos constantes na literatura e, em especial, na descrição original da espécie no caso de *S. ocellatum* (BORNET & FLAHAULT, 1886-1888). A população européia identificada como *S. ocellatum*, cuja seqüência foi depositada no GenBank (AJ504082), tem suas características morfológicas principais fornecidas no trabalho de GUGGER & HOFFMANN (2004) e, até onde se pode julgar, parece também corresponder à espécie, mesmo com a falta de dados específicos sobre as características métricas.

A alta similaridade das seqüências de rDNA 16S entre as linhagens de *Fischerella*, *Hapalosiphon* e *Westiellopsis* obtida em nosso estudo corrobora a apresentada por GUGGER & HOFFMANN (2004). Estes autores relatam que estas linhagens são co-específicas, e que a alta variabilidade nos caracteres morfológicos já foi verificada em *Westiellopsis* (STRACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; JEEJI-BAI, 1972). Confirmam, então, a necessidade de uma revisão destes três gêneros, já que o critério estabelecido para definição de gênero é de 95% de similaridade.

Alguns estudos sugerem a existência de variações genótípicas para mesmos morfotipos (ou morfoespécies ou UTOs - unidades taxonômicas operacionais). TATON *et al.* (2006) encontraram, em seus estudos sobre linhagens de cianobactérias da Antártica, um conjunto de 21 diferentes genótipos enquanto a diversidade fenotípica, que se esperava correspondente, revelou a existência de apenas 12 morfoespécies. Ou seja, existem diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie definida segundo caracteres morfológicos e métricos. Segundo os autores, apoiados em FUHRMAN & CAMPBELL (1998), variações entre 97,5 e 99,9% dentro da mesma UTO podem representar remanescentes da microdiversidade do rRNA 16S, o que pode ser explicado, por exemplo, pela ocorrência de diferentes ecotipos. Espécies com ampla distribuição geográfica e variação de habitats (não ubíquas - KOMÁREK, 1994) devem apresentar variações genótípicas em diferentes graus, como verificado no presente estudo.

Um dos problemas para uma proposta mais robusta com relação a este tema é a falta de dados moleculares para espécies dos gêneros. Com o progresso dos estudos e conseqüente resultados de seqüenciamentos de outras espécies do grupo, acredita-se que o cenário poderá ser interpretado com maior clareza, o que levará a conclusões mais bem alicerçadas.

Do ponto de vista filogenético dos níveis taxonômicos mais elevados (Figura 3), mesmo que a árvore construída seja ainda limitada, pode-se destacar a formação de três cladogramas significativos. O clado 1 reúne as formas heterocitadas e o 2 agrupa as duas populações de *Stigonema ocellatum* e o 3 as populações do gênero *Hapalosiphon*.

O clado 1 reforça a já constatada origem monofilética das cianobactérias heterocitadas, demonstrada por autores como GUGGER & HOFFMANN (2004), HOFFMANN *et al.* (2005) e

TOMITANI *et al.* (2006). Embora todas as cianobactérias dotadas de heterócitos tenham uma origem comum, fica obscuro se a distribuição atual reflete uma descendência vertical ou perda secundária por transferência horizontal de genes dentro das cianobactérias (TOMITANI *et al.*, 2006).

A população de *Stigonema ocellatum* proveniente da mata atlântica posicionou-se próxima à população européia, o mesmo foi observado com a população de *Hapalosiphon* sp. com as populações de *H. delicatulus* e *H. welwitschii* formando dois clados distintos (clado 2 e clado 3, respectivamente, Figura 3) com grande suporte nas análises filogenéticas, pois os valores de *neighbor-joining*, máxima parcimônia e máxima verossimilhança obtidos foram acima de 67%.

A ausência de clados distintos que separem as Nostocales com ramificações verdadeiras das de ramificações falsas confirmam que esta característica morfológica não é um critério adequado para se identificar linhagens. Isto foi observado neste estudo pelas posições ocupadas na árvore filogenética por *Nostoc commune* (próxima as *Stigonema ocellatum*) e *Symphyonemopsis* sp. VAPOR1 (próxima a *Brasilonema terrestre* e *Scytonema hoffmanni*). GUGGER E HOFFMANN (2004) relatam que são necessários novos estudos sobre uma possível evolução das cianobactérias heterocitadas com ramificações verdadeiras em Y das com ramificações falsas.

Seqüências de rDNA têm um papel central no estudo de evolução e ecologia microbiana e, particularmente os genes do rRNA 16S, têm sido o critério para determinação de relações filogenéticas ou determinação da diversidade no ambiente e a detecção e quantificação de populações específicas. (ACINAS *et al.*, 2004).

As coincidências e correlações entre citomorfologia, fisiologia e características bioquímicas representam o critério evolucionário mais importante da diversidade cianobacteriana. Especialmente as definições ecológica e bioquímica são limitadas por um único passo de diversificação cianobacteriana e a procura de limites entre estes é evidentemente importante para o futuro da pesquisa destes organismos (KOMÁREK, 1994).

Análises moleculares são especialmente importantes, pois podem assegurar (ou reduzir) a confiabilidade de determinados critérios morfológicos e/ou métricos e refletir a filogenia destas mesmas características. Entretanto, em alguns casos, esta interpretação não é um processo simples, como ressaltado por TATON *et al.* (2006).

A taxonomia moderna é, hoje, uma ciência sintética que procura utilizar todas as informações acessíveis do material biológico em questão. A progressão de estudos como o presente, abordando grupos de regiões ainda pouco exploradas como as tropicais, é de extrema

importância para o entendimento das relações evolutivas e produção de um sistema de classificação mais natural para este importante grupo de organismos.

VI - CONCLUSÃO

Duas espécies oriundas de amostras de campo, *Stigonema ocellatum* e *Hapalosiphon* sp., tiveram seus DNAs amplificados, clonados e seqüenciados com sucesso por meio de iniciadores para seqüências do gene do rRNA 16S. Foi verificada identidade de 98% destas cianobactérias com *S. ocellatum* SAG 48.90 e três diferentes espécies de *Hapalosiphon* disponíveis no GenBank. Devido à escassez de dados obtidos neste estudo e dos armazenados no Genbank para estes táxons em particular pode-se dizer que a proximidade taxonômica entre estas populações ainda é incerta. As análises filogenéticas, por sua vez, corroboraram a origem monofilética das cianobactérias heterocitadas.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACINAS, S.G.; MARCELINO, L.A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M.F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.

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

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

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid**, v. 7, p. 1513-23, 1979.

BORNET, E.; FLAHAULT, C. Révision des Nostocacées hétérocystées, contenues dans les principaux herbiers de France. **Annales des Sciences Natureles: Botanique**, ser. 7, Paris, v. 3, 4, 5, 7, p. 323-380, 343-373, 51-129, 171-262, 1886-1888.

BOYER, S.L.; FLETCHTER, V.R.; JOHANSEN, J.R. Is the 16S and 23S rRNA Internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case Study in Cyanobacteria. **Molecular Biology Evolutionary**, v. 18, n. 6, p. 1057-106 2001.

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

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

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

De PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 151-175, 1998.

DOUGLAS, S.E.; TURNER, S. Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. **Journal Molecular Evolutionary**, v. 33, p. 267-273, 1991.

FIORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J.; LORENZI, A.S. The cyanobacterial genus *Brasilonema* gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. **Journal of Phycology**, v. 43, p. 789-798, 2007.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK Jr., . How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 166-170, 1992.

GARCIA-PICHEL, F.; NÜBEL, U.; MUYZER, G. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 169, p. 469-482, 1998.

GIOVANNI, S.J.; TURNER, S.; OLSEN, G.J.; BARNS, S.; LANE, D.J.; PACE, N.R. Evolutionary relationships among Cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 384-3592, 1988.

GKELIS, S.; RAJANIEMI, P.; VARDAKA, E.; MOUSTAKA-GOUNI, M.; LANARAS, T.; SIVONEN, K. *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. **Microbial Ecology**, v. 49, p. 176-182, 2005.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. Algae, ed. **Prentice Hall**, p. 97-131, 2000.

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

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HENSON, B.J.; HESSELBROCK, S.M.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on *nifD*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 493-497, 2004.

HENSON, B.J.; WATSON, L.E.; BARNUM, S.R. The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *nifD*. **Journal of Molecular Evolutionary**, v. 58, p. 390-399, 2004.

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

ISHIDA, T.; WATANABE, M.M.; SUGIYAMA, J.; YOKOTA, A. Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of *Oscillatoriales* and *Pleurocapsales* as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 20, p. 79-82, 2001.

JEEJI-BAI, N. The genus *Westiellopsis* Janet. In *Taxonomy and Biology of Blue-Green Algae*. Edited by T. V. Desikachary. Madras: University of Madras, p. 62-74, 1972.

KNOLL, A.H.; GOLUBIC, S. **Living and Proterozoic cyanobacteria**. In: *Early Organic Evolution: Implication for mineral and energy resources*, Ed., Schidlowski, M. *et al.*, p. 450-462, Springer-Verlag, Berlin, 1992.

KOMÁREK, J. Current trends and species delimitation in the cyanoprokaryote taxonomy. **Archiv für Hydrobiologie Supplementaband/Algological Studies**, Stuttgart, v. 75, p.11-29, 1994.

LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L. PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LANE, D.J. **16S/23S sequencing**. In: STACKEBRANDT, E. & GOODFELLOW, M. (eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: Wiley and Sons, 1991.

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

MADDISON, D.R.; SWOFFORD, D.L.; MADDISON, W.P. Nexus - an extensible file format for systematic information. **Systematic Biology**, v. 46, p. 590-621, 1997.

MARQUARDT, J.; PALINSKA, K.A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. **Archives of Microbiology**, v. 187, p. 187-397, 2007.

MILLER, D.N.; BRYANT, J.E.; MADSEN, E.L.; GHIORSE, W.C. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4715-4724, 1999.

NEILAN, B.A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2286-2291, 1995.

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*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 693-697, 1997.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F. MUYZER, G. PCR Primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3327-332, 1997.

PAGE, R.D.M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer. **Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PALINSKA, K.A.; THOMASIU, C.F.; MARQUARDT, J.; GOLUBIC, S. Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccata. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2253-2263, 2006.

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

ROBERTSON, B.R.; TEZUKA, N.; WATANABE, M.M. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 51, p. 861-871, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 2^a ed. Cold Spring Harbor, 1989.

SARUHASHI, S.; HAMADA, K.; HORIIKE, T.; SHINOZAWA, T. Determination of whole prokaryotic phylogeny by the development of a random extraction method. **Gene**, v. 392, p. 157-163, 2007.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética: um guia prático**. Ribeirão Preto, Holos Edit. 114 p., 2003.

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

SRIVASTAVA, A.K.; ARA, A.; BHARGAVA, P.; MISHA, Y.; RAI, L.C. A rapid and cost-effective method of genomic DNA isolation from cyanobacterial culture, mat and soil suitable for genomic fingerprinting and community analysis. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 373-382, 2007.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. A place for DNA-Dna reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. In AKKERMANS, A.DL.; Van ELSAS, J.D.; BRUIJN, F.J. (ed), **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands), p. 3.1.1/1-17, 1995.

SWOFFORD, D.L. **PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods)**. Version 4. Sunderland, Sinauer Associates, 2003.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, DOI:10.1111/j.1529-8817.2006.00278x, 2006.

TILLET, D., NEILAN, B.A. Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 36, p. 251-258, 2000.

TOMITANI, A. Evolution of branching filamentous cyanobacteria: molecular-phylogenetic analyses of stigonematalean species. Frontier Research on Earth Evolution - **Paleoenvironment**, v.2, p. 1-5, 2004.

TOMITANI, A. KNOLL, A.H.; CAVANAUGH, C.M.; OHNO, T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. PNAS published online DOI 10.1073/pnas0600999103, v. 103, n. 14, p. 5442-5447, 2006.

TSAI, Y.L.; OLSON, B.H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. **Applied and environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1070-1074, 1991.

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

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WILLAME, R.; BOUTTE, C.; GRUBSIC, S.; WILMOTTE, A.; KOMÁREK, J.; HOFFMANN, L. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 1312-1332, 2006.

WILMOTTE, A.; TURNER, S.; Van de PEER, Y.; PACE, N.R. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (cyanobacteria) with narrow trichomes. II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. **Journal of Phycology**, v. 28, p. 828-838, 1992.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. **Phylogenetic relationships among the cyanobacteria base don 16S rRN sequences**. In Garrity GM (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 487-493, 2001.

WU, X.; ZARKA, A.; BOUSSIBA, S. A simplified protocol for preparing dna from filamentous cyanobacteria. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 385-392, 2000.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p. 813-819, 1998.

VI - ANEXOS

ANEXO 1. *Primers* utilizados na amplificação e seqüenciamento do gene 16S rRNA das cianobactérias.

Primers	Seqüência 5' → 3'	Referências
27F1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	NEILAN et al., 1997
1494Rc	TAC GGC EAC CTT GTT ACG AC	NEILAN et al., 1997
M13F*	GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A	LANE, 1991
Sp6R*	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA	LANE, 1991
357F*	CCT ACG GGA GGC AGC AG	LANE, 1991
357R*	CTG CTG CCT CCC GTA GG	LANE, 1991
704F*	GTA GSG GTG AAA TSC GTA GA	LANE, 1991
704R*	TCT ACG SAT TTC ACC SCT AC	LANE, 1991
1114F*	GCA ACG AGC GCA ACC C	LANE, 1991
1114R*	GGG TTG CGC TCG TTG C	LANE, 1991

* *Primers* de seqüenciamento.

ANEXO 2. Códigos de acesso e quantidade de pares de bases dos táxons retirados do Genbank utilizados na montagem da árvore filogenética.

Táxon	Código de acesso	Nº pares de bases
<i>Brasilonema terrestre</i> CENA116	EF490447	1415
<i>Chlorogloeopsis</i> sp. Greenland_5	DQ431000	1437
<i>Cyanobium</i> sp. JJ27STR	AM710383	1458
<i>Fischerella mucicola</i> PCC7414	AB075986	1147
<i>Fischerella</i> sp. CENA19	AY039703	1412
<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	AB093484	1440
<i>Hapalosiphon welwitschii</i>	AY034793	1480
<i>Leptolyngbya boriana</i> UTEX B485	AF132793	1410
<i>Nostoc commune</i> EV1-KK1	AY577536	1112
<i>Nostochopsis</i> sp.	AJ544081	1361
<i>Phormidium</i> sp. UTCC487	AF218376	1396
<i>Prochlorococcus marinus</i>	X63140	1147
<i>Scytonema hoffmanni</i> PCC7110	AF132781	1412
<i>Stigonema ocellatum</i> SAG48.90	AJ544082	1352
<i>Symphyonemopsis</i> sp. VAPOR1	AJ544085	1360
<i>Westiellopsis prolifica</i> SAG16.93	AJ544086	1347

ANEXO 3. Sequência parcial do rRNA 16S composta pelos quatro nucleotídeos Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T), identificando os nucleotídeos que diferem entre a amostra sequenciada no presente trabalho (*Stigonema ocellatum* mata atlântica) e a retirada do GenBank SAG 48.90 - AJ544082.

			10	20	30	40	50	60	
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TTAGAGTTTGATTCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCG						
<i>S. ocellatum</i>	MA							
				70	80	90	100	110	120
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	AACGGACTCTTCGGAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGAATCTGCCTTTAGG						
<i>S. ocellatum</i>	MA	G.....						
				130	140	150	160	170	180
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TCTGGGACAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGGATATGCTTAACGGTGAAAGATTAA						
<i>S. ocellatum</i>	MA	A.....						
				190	200	210	220	230	240
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TTGCCTAAAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGC						
<i>S. ocellatum</i>	MA	G.....G.....						
				250	260	270	280	290	300
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	GACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAG						
<i>S. ocellatum</i>	MA							
				310	320	330	340	350	360
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAA						
<i>S. ocellatum</i>	MA							
				370	380	390	400	410	420
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAACCTCTTTTCTCAGGGAAGAATAATG						
<i>S. ocellatum</i>	MA	GTT..						
				430	440	450	460	470	480
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	ACGGTACCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGG						
<i>S. ocellatum</i>	MA	C.....						
				490	500	510	520	530	540
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	ATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGCAGTGTAAGTCTG						
<i>S. ocellatum</i>	MA							
				550	560	570	580	590	600
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	CTGTTAAAGAGTCTGGCTCAACCAGATAAGGGCAGTGGAACTACACAGCTAGAGTACGT						
<i>S. ocellatum</i>	MA	G..G						
				610	620	630	640	650	660
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCG						
<i>S. ocellatum</i>	MA		.A.....						
				670	680	690	700	710	720
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	GTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGTAAC TGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGA						
<i>S. ocellatum</i>	MA							
				730	740	750	760	770	780
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	ATGGGATTAGATAACCCAGTAGTCTAGCCGTAACGATGGATACTAGGTGTTGCTTGTA						
<i>S. ocellatum</i>	MA							

				790	800	810	820	830	840
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TCGACCCGAGCAGTACCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCA					
<i>S. ocellatum</i>	MA	G.....					
				850	860	870	880	890	900
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	AGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAT					
<i>S. ocellatum</i>	MA	C.....					
				910	920	930	940	950	960
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTGCGGAATCTCAGGGAACTTG					
<i>S. ocellatum</i>	MA	C..A.....					
				970	980	990	1000	1010	1020
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	AGAGTGCCTTCGGGAGCGCAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA					
<i>S. ocellatum</i>	MA						
				1030	1040	1050	1060	1070	1080
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	GATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTCGTTCTTAGTTGCCATCATTAAGTT					
<i>S. ocellatum</i>	MA						
				1090	1100	1110	1120	1130	1140
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	GGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA					
<i>S. ocellatum</i>	MA						
				1150	1160	1170	1180	1190	1200
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	GCATGCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAGAGGGCAGCGA					
<i>S. ocellatum</i>	MA	C.....					
				1210	1220	1230	1240	1250	1260
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	GCTAGCGATGGCAAGCTAATCCCGTAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACT					
<i>S. ocellatum</i>	MA	A.AT.....A.....A.....G.....					
				1270	1280	1290	1300	1310	1320
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	CGCCTGCGTGAAGGTGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTT					
<i>S. ocellatum</i>	MA	T.....G.....					
				1330	1340	1350			
<i>S. ocellatum</i>	SAG	48.90	CCCGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCA-----					
<i>S. ocellatum</i>	MA	-----					

ANEXO 4. Sequência parcial do rRNA 16S composta pelos quatro nucleotídeos Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T), identificando os nucleotídeos que diferem entre a amostra sequenciada no presente trabalho (*Hapalosiphon* sp. mata atlântica) e a retirada do GenBank de *H. welwitschii* - AY034793.

	10	20	30	40	50	60
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	-----AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTATGCTTAAC					
	70	80	90	100	110	120
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	ACATGCAAGTCGAACGGTCTCTTCGGAGATAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGAGAA					
	130	140	150	160	170	180
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	TCTGGCTCTAGGTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCTATGG					
	190	200	210	220	230	240
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GTGAAAGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAGA					
	250	260	270	280	290	300
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA					
	310	320	330	340	350	360
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGC					
	370	380	390	400	410	420
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CTGACGGAGCAATACCGCTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTGTGTAACCTCTTTTCTCAA					
	430	440	450	460	470	480
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GGAAGAATGATGACGGTACTTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG					
	490	500	510	520	530	540
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GTAATACGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGC					
	550	560	570	580	590	600
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	TGTGTGTGTCTATTGTAAAGAGTTTGGCTCAACCAAATAAGGGCGGTAGAAACTACACA					
	610	620	630	640	650	660
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCA					
	670	680	690	700	710	720
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAG					
	730	740	750	760	770	780
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAG					

	790	800	810	820	830	840
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GCGTTGAGAGTATCGACCCTCTCAGTGCCGTAGCTAACCGGTTAAGTATCCCGCCTGGGG					
	850	860	870	880	890	900
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	AGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGT					
	910	920	930	940	950	960
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	ATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCT					
	970	980	990	1000	1010	1020
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CTGGGAACTAGAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAG					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGC					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CAGCATTTAGGATGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	TGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGA					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAAATCTCAGAAACCGTGGCTCAGTTCAGATC					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GCAGGCTGCAACTCGCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCAGGTCAGCATACTG					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CAGTGAATTCGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGAAGCTGGTCAGC					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	CCCGAAGTCGTTACCCTAACTGTTTCGCAGAGGGGATGCCGAAGGTAGGACTGGTACTG					
	1450	1460	1470	1480	1490	
<i>H.welwitschii</i>					
<i>Hapalosiphon</i> sp.	GGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT					