



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriel Cimonetti de Almeida

**Caracterização taxonômica e potencial de produção de toxinas de
cianobactérias de crostas biológicas de solo da Caatinga pernambucana**

São José do Rio Preto

2024

Gabriel Cimonetti de Almeida

**Caracterização taxonômica e potencial de produção de toxinas de
cianobactérias de crostas biológicas de solo da Caatinga pernambucana**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco

São José do Rio Preto

2024

D279c

de Almeida, Gabriel Cimonetti

Caracterização taxonômica e potencial de produção de toxinas de cianobactérias de crostas biológicas de solo da Caatinga pernambucana / Gabriel Cimonetti de Almeida. -- São José do Rio Preto, 2024

61 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Luis Henrique Zanini Branco

1. Levantamento taxonômico. 2. Cianobactérias. 3. Cianotoxinas. 4. Crostas biológicas de solo. 5. Caatinga. I. Título.

Gabriel Cimonetti de Almeida

**Caracterização taxonômica e potencial de produção de toxinas de
cianobactérias de crostas biológicas de solo da Caatinga pernambucana**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Dra. Ana Paula Dini Andreote

CENA/USP

Dra. Monica Orlandi Paiano

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

06 de dezembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Sonia e Carlos, que, através de muito esforço, sempre me proveram com tudo o que há de melhor, me apoiaram e acreditaram nas minhas decisões e que me possibilitaram chegar até aqui. Aos meus tios Cláudio e Cidinha e minhas primas Carol e Cláudia, que sempre me incentivaram em tudo que me propus a fazer.

Aos amigos que fiz ao longo da graduação, Pedro Henrique, Paulo e Ana Clara, por sempre estarem presente para me ouvir, tantos em momentos bons quanto em momentos nem tão bons assim.

Ao meu orientador, pela paciência, amizade, suporte, empenho e conhecimentos passados ao longo destes cinco anos em que trabalhamos juntos.

Agradeço às minhas colegas de laboratório, Monica, Letícia, Marina e Nádia, pela companhia, conversas e ajuda.

Agradeço à professora Paula Rahal e ao Vivaldo por me receberem tão bem no Laboratório de Estudos Genômicos e pelo auxílio nas clonagens.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA, em especial à professora Marli Fiore, por aceitar me receber por quase um mês, e às técnicas Ana Paula e Renata, pela recepção, paciência, suporte e auxílio na resolução dos problemas que surgiram ao longo da execução do presente trabalho, sem o qual não seria possível a execução do projeto.

Agradeço à UNESP, em especial ao IBILCE, onde passei sete anos da minha vida e tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e de participar de diversas coisas diferentes e ao PPG de Microbiologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

As crostas biológicas de solo são comunidades de organismos poiquiloídricos que ocorrem em ambientes semiáridos, áridos e hiperáridos, com baixa cobertura vegetal, características presentes na Caatinga brasileira. As cianobactérias se destacam nestas comunidades como colonizadores e estruturadores iniciais das crostas, além de oferecerem importantes serviços ecológicos. Estes organismos possuem uma taxonomia complexa, devido à presença de muitos táxons crípticos e são conhecidamente produtores de substâncias tóxicas quando em condições ambientais favoráveis em ambientes aquáticos, porém pouco se sabe sobre a produção destes metabólitos em ambientes terrestres. Com isso, o presente trabalho visou a realização de um levantamento taxonômico de cianobactérias de crostas biológicas de solo da Caatinga, além da avaliação da capacidade de produção de cianotoxinas pelas mesmas. Para isso, foi realizada coleta de amostras de crostas em campo, isolamento e cultivo das cianobactérias presentes nelas, extração de material genético total, amplificação, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA e da região intergênica ITS, para posteriores análises filogenéticas, e amplificação dos genes *sxtA* e *mcyE* para avaliação de potencial tóxico. Como resultado, foram isoladas 16 linhagens diferentes, pertencentes a seis ordens, com a identificação precisa de quatro deles, evidenciando uma possível espécie nova de *Kovacikia* e *Chroakolemma*, gêneros inéditos para o Brasil. Além disso, não foram encontrados indícios concretos de produção de nenhuma das duas cianotoxinas estudadas em nenhuma das linhagens isoladas. Os resultados obtidos evidenciam a grande diversidade de cianobactérias presentes na Caatinga, bioma pouco estudado e em risco, lançando luz sobre a necessidade da realização de mais estudos neste ecossistema, assim como a continuação do presente trabalho.

Palavras-chave: Levantamento taxonômico; cianotoxinas; semiárido brasileiro.

ABSTRACT

Biological soil crusts are communities of poikilohydric organisms found in semi-arid, arid, and hyper-arid environments with low vegetation cover, characteristics present in the Brazilian Caatinga. Cyanobacteria stand out in these communities as initial colonizers and structurers, providing important ecological services. These organisms have a complex taxonomy due to the presence of many cryptic taxa and are known producers of toxic substances under favorable environmental conditions in aquatic environments. However, little is known about the production of these metabolites in terrestrial environments. Therefore, this study aimed to conduct a taxonomic survey of cyanobacteria from biological soil crusts in the Caatinga, as well as to evaluate their capacity for producing cyanotoxins. To achieve this, samples of crusts were collected in the field, and the cyanobacteria present were isolated and cultured. Total genetic material was extracted, and the 16S rRNA gene and the intergenic ITS region were amplified, cloned, and sequenced for subsequent phylogenetic analyses. The genes *sxtA* and *mcyE* were amplified to assess toxic potential. As a result, 16 different strains belonging to 6 orders were isolated, with accurate identification of four of them, highlighting a possible new species of *Kovacikia* and *Chroakolemma*, new genera previously unknown in Brazil. Additionally, no concrete evidence of the production of either of the two studied cyanotoxins was found in any of the isolated strains. The results obtained demonstrate the great diversity of cyanobacteria present in the Caatinga, a poorly studied and at-risk biome, highlighting the need for further research in this ecosystem, as well as the continuation of this work.

Key words: Taxonomic survey; cyanotoxins; Brazilian semiarid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa dos pontos de amostragem.	16
Figura 2. <i>Chroococcidiopsis</i> sp. Barras de escala: A: 20 µm; B-C: 10 µm; D-G: 5 µm.	26
Figura 3. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A) e BoxB (B) do ITS de <i>Chroakolemma</i> sp.	29
Figura 4. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), BoxB (B) e V3 (C) do ITS de <i>Kovacikia</i> sp.	31
Figura 5. Árvore consenso baseada em Máxima Verossimilhança da ordem Leptolyngbyales. Setas: linhagens isoladas. *: valores de suporte maiores que 0,7 de probabilidade posterior e 70% de bootstrap . -: valores de suporte menores que 0,7 de probabilidade posterior e 70% de bootstrap.	32
Figura 6. A. <i>Pseudanabaena</i> sp.. B-G. <i>Chroakolemma</i> sp. H-I. <i>Kovacikia</i> sp. Setas brancas: necrídios. Barras de escala: A-B: 10 µm; C: 50 µm; D-I: 10 µm.	34
Figura 7. A. <i>Microcoleus</i> aff. <i>subtorulosus</i> . B-C. <i>Microcoleus</i> aff. <i>lacustris</i> . D-E. <i>Porphyrosiphon notarisii</i> em cultivo. F-G. <i>Porphyrosiphon notarisii</i> em crosta. Barras de escala: 10 µm.	37
Figura 8. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), BoxB (B) e V3 (C) do ITS de <i>Pycnacronema conicum</i>	40
Figura 9. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), BoxB (B) e V3 (C) do ITS de <i>Gracilinea arenicola</i>	42
Figura 10. Árvore consenso baseada em Máxima Verossimilhança da ordem Coleofasciculales. Setas: linhagens isoladas. *: valores de suporte maiores que 0.7 de probabilidade posterior e 70% de bootstrap. -: valores de suporte menores que 0.7 de probabilidade posterior e 70% de bootstrap.	43
Figura 11. A-B. <i>Wilmottiaceae</i> sp. C-D. <i>Gracilinea arenicola</i> . E-F. <i>Pycnacronema conicum</i> . Barras de escala: 10 µm.	44
Figura 12. A. <i>Scytonema hyalinum</i> . B-D. <i>Nostoc</i> sp.1. E-F. <i>Nostoc</i> sp.2. Setas: heterócitos. Barras de escala: 10 µm.	47
Figura 13. A-C. <i>Nostoc</i> sp.3. D-F. <i>Nostoc</i> sp.4. Setas: heterócitos. Barras de escala: A; D: 50 µm. B; C; E; F: 10 µm.	49
Figura 14. Eletroforese do produto de PCR do gene <i>sxtA</i> de algumas das linhagens estudadas. Pyc: <i>Pycnacronema conicum</i> . Mic: <i>Microcoleus</i> aff. <i>lacustris</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas geográficas e altitude dos pontos de coleta.	17
Tabela 2. Identificação, locais de coleta e dados moleculares obtidos das linhagens estudadas. BSF: Belém do São Francisco; FLO: Floresta.	24

SUMÁRIO

1. Introdução	8
2. Revisão de literatura	9
2.1. Crostas biológicas de solo	9
2.2. Taxonomia de cianobactérias	11
2.3. Cianotoxinas.....	12
3. Objetivos.....	15
3.1. Gerais	15
3.2. Específicos.....	15
4. Materiais e métodos	15
4.1. Área de estudo e coleta das amostras	15
4.2. Isolamento e cultivo.....	17
4.3. Caracterização morfológica	18
4.4. Caracterização do gene 16S rRNA	18
4.4.1. <i>Extração e amplificação de DNA</i>	18
4.4.2. <i>Clonagem e transformação</i>	20
4.4.3. <i>Preparo das amostras para sequenciamento</i>	21
4.4.4. <i>Sequenciamento</i>	21
4.4.5. <i>Filogenia</i>	22
4.4.6. <i>Análise do ITS</i>	22
4.5. Avaliação do potencial de produção de toxinas	23
5. Resultados e discussão	23
5.1. Táxons encontrados	23
5.3. Potencial de produção de toxinas	50
6. Conclusão	51
Referências	52

1. Introdução

As crostas biológicas de solo são comunidades que se formam nas camadas superficiais do solo de ambientes áridos, semiáridos e hiperáridos, nos quais há pouca cobertura vegetal, possibilitando a chegada da luz solar na superfície (BELNAP, 2005). São formadas por organismos como cianobactérias, algas, outros procariotos, líquens, fungos e briófitas, que interagem com as partículas do solo aumentando a coesão entre elas (BELNAP, BÜDEL & LANGE, 2003).

Estas comunidades são de vital importância para os ambientes em que ocorrem, devido à alta sensibilidade dos mesmos às mudanças climáticas e às ações antrópicas, uma vez que apresentam solos pobres e pouco consolidados, estando mais suscetíveis a processos como erosão e lixiviação. Desta forma, os organismos presentes nas crostas biológicas oferecem serviços ecológicos de grande importância para o solo, como aumento da fertilidade, por meio da produção primária, fixação de nitrogênio e decomposição da matéria orgânica (BELNAP, 2005; 2006), aumento da estabilidade, pela morfologia filamentosa e produção de exopolissacarídeos por algas e cianobactérias e da emissão de estruturas de fixação por líquens e briófitas (GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006).

Dentre os ambientes em que as biocrostas ocorrem, destacam-se desertos frios e quentes, biomas alpinos, campos e savanas. No Brasil, três biomas se destacam: o Cerrado, os Pampas e a Caatinga. O último se destaca por ser considerado o ambiente mais árido do país, localizado na região Nordeste, caracterizado por apresentar vegetação xerófila, dominada, predominantemente por cactos e arbustos e com regiões em avançado processo de desertificação (DE JESUS *et al.*, 2022).

As cianobactérias são consideradas organismos-chave das crostas biológicas de solo, visto que são os responsáveis pela colonização e modificação do ambiente, uma vez que apresentam características que permitem a sobrevivência em ambientes extremos de irradiância e aridez (SCOTT, 1982). Apesar de serem organismos conhecidamente produtores de substâncias tóxicas, chamadas de cianotoxinas, a maioria dos estudos sobre este tema se concentram em populações aquáticas e pouco se sabe sobre a dinâmica dessas toxinas no solo.

Com isso, o presente trabalho se mostra relevante para agregar conhecimento à diversidade de organismos-chave do solo da Caatinga, bioma altamente degradado, assim como

a possível relevância da presença de produtos tóxicos de origem biológica no solo destes ambientes.

2. Revisão de literatura

2.1. Crostas biológicas de solo

As crostas biológicas de solo (biocrostas), também denominadas por alguns autores como microbióticas (ST. CLAIR & JOHANSEN, 1993), criptogâmicas (KELINER & HARPER, 1972), organogênicas ou microfíticas (WEST, 1990), são comunidades complexas que se estruturam a partir da interação de organismos poiquiloídricos com as partículas de regiões superficiais do solo, formando uma camada coesa. Estas comunidades cobrem cerca de 12% da superfície terrestre do planeta (RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2018) e ocorrem, majoritariamente, em biomas de regiões geográficas semiáridas, áridas e hiperáridas, as quais são caracterizadas por apresentarem vegetação de pequeno porte, geralmente arbustiva, e esparsa, possibilitando assim a chegada da luz solar na superfície do solo (BELNAP, 2005).

As biocrostas são formadas por uma ampla diversidade de organismos, tais quais cianobactérias, microalgas (principalmente verdes), fungos, líquens (ciano e clorolíquens), briófitas (musgos e hepáticas), além de representantes de outros filos de procariotos e arqueias (BELNAP, BÜDEL & LANGE, 2003). Dentre os componentes destas comunidades, as cianobactérias se destacam, uma vez que, por apresentarem características morfológicas e fisiológicas que as tornam capazes de suportar as condições extremas de irradiância e aridez, são consideradas os organismos colonizadores do ambiente e estruturadores das biocrostas (SCOTT, 1982).

Devido à grande diversidade de organismos presentes nas crostas biológicas de solo, estas comunidades são conhecidas por afetarem tanto aspectos físicos, como manutenção da estabilidade e influência na hidrologia, quanto aspectos químicos do solo, como, por exemplo, a participação em ciclos biogeoquímicos de nutrientes (principalmente carbono, nitrogênio e fósforo).

A influência das biocrostas em aspectos físicos do solo se dá, principalmente, pela presença de organismos filamentosos, como fungos, cianobactérias e microalgas, que se

entrelaçam entre as partículas de solo, mantendo-as unidas, e pela produção de exopolissacarídeos (EPS) por cianobactérias e microalgas, que também é responsável por manter as partículas de solo coesas entre si (GUNDLAPALLY & GARCIA-PICHEL, 2006). A produção de estruturas de fixação de líquens e musgos, ao mesmo tempo que aumentam a coesão entre as partículas, também criam canais para a penetração da água no solo (BÜDEL & BELNAP, 2016).

Neste sentido, Gao *et al.* (2017) observaram, *in situ*, uma redução expressiva no número e no tamanho de partículas de solo perdidas após simulações de chuva, além de um aumento de até 161% da concentração de matéria orgânica em porções de solo cobertas por crostas em relação a porções com solo descoberto. Vale também destacar os trabalhos de Kakeh *et al.* (2021) e Sun *et al.* (2021), os quais observaram que as rizinas dos líquens e os rizoides de musgos presentes em biocrostas diminuíram o número de poros grandes e aumentaram o de poros pequenos no solo, resultando em uma maior taxa de infiltração de água no solo e uma menor de escoamento.

A participação nos ciclos biogeoquímicos se dá pela presença de organismos fotossintetizantes, como cianobactérias, microalgas, líquens, briófitas e de organismos decompositores e mobilizadores de fósforo, bem como outros filos de bactérias e fungos, e de fixadores de nitrogênio, como cianolíquens. Com isso, Román *et al.* (2018), a partir de inóculos das cianobactérias heterocitadas *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault, *Scytonema hyalinum* Gardner e *Tolypothrix distorta* Kützinger ex Bornet & Flahault (comuns em biocrostas), cultivadas sozinhas e em consórcio, observaram um aumento maior do que 6 g.kg⁻¹ do total de carbono orgânico e de 0,9 g.kg⁻¹ de nitrogênio no solo de ambientes semiáridos.

Os ambientes semiáridos, áridos e hiperáridos, favoráveis para a ocorrência das crostas biológicas de solo, compreendem, juntos, mais de 40% do bioma terrestre (BELNAP *et al.* 2016) e, atualmente, contam com aproximadamente 23% de sua área total de ocorrência degradada principalmente devido à agricultura e atividades de extração mineral (REYNOLDS *et al.*, 2007; ZIKA & ERB, 2009), juntamente com o avanço das mudanças climáticas (WEBER *et al.*, 2018), uma vez que são ecossistemas sensíveis e pouco estáveis.

No Brasil, destacam-se três destes biomas: a Caatinga, o Cerrado e os Pampas. A Caatinga, alvo de estudo do presente trabalho, é um bioma semiárido (considerado o mais árido do país) que ocupa uma área de 1.037.517,8 km², o equivalente a 12% do território nacional, dividida entre os estados da região nordeste do país e o norte de Minas Gerais (NASCIMENTO,

2015). Além disso, este ecossistema caracteriza-se por apresentar solos ricos em minerais, pouco desenvolvidos, pedregosos, com pouca retenção de água, porém com boas reservas de água subterrânea (ALVES *et al.*, 2008).

Apesar de favorável para a ocorrência de biocrostras, poucos estudos envolvendo estas comunidades foram conduzidos na Caatinga e estes têm revelado uma elevada diversidade de grupos biológicos presentes, como o realizado por Szyja *et al.* (2019), que encontrou, ao menos, 50 táxons de cianobactérias, algas, fungos, líquens e briófitas presentes nas crostas biológicas. Além disso, Machado-de-Lima *et al.* (2021) encontraram grande diversidade de cianobactérias na Caatinga paraibana, com os gêneros *Scytonema* Agardh ex Bornet & Flahault, *Microcoleus* Desmazières ex Gomont e *Chroococcidiopsis* Geitler sendo os mais abundantes nos habitats amostrados.

2.2. Taxonomia de cianobactérias

As cianobactérias são procariotos considerados os primeiros organismos capazes de realizar fotossíntese oxigênica, com uma origem estimada há cerca de 3,6 bilhões de anos (GARCIA-PICHEL *et al.*, 2019). Desde então, os organismos deste filo foram adquirindo uma grande variedade de características morfológicas, contando hoje com representantes unicelulares cocoides ou multicelulares filamentosos, com células de tamanhos variados e com presença ou ausência de especialização celular, como heterócitos e acinetos, e de produção e secreção de exopolissacarídeos, além de estarem presentes na maioria dos ecossistemas terrestres (SCIUTO & MORO, 2015).

Historicamente, a taxonomia das cianobactérias se mostra uma área complexa e em constante modificação, uma vez que grande parte de sua diversidade ainda permanece desconhecida, além do filo possuir uma grande quantidade de táxons crípticos. Também são consideradas ancestrais dos cloroplastos presentes nas células de eucariotos fotossintetizantes. Em função de sua natureza procariótica, para a sistemática das cianobactérias, aceita-se a adoção tanto do código de nomenclatura Bacteriológico (CASTENHOLZ & WATERBURY, 1989) quanto o Botânico (BOURRELLY, 1970), o que pode gerar certa confusão entre os que estudam o grupo.

Os primeiros estudos dedicados à taxonomia e sistemática destes organismos, realizados no século XIX, utilizavam unicamente caracteres morfológicos e, quando possível,

reprodutivos como forma de distinção entre os grupos (THURET, 1875; BORNET & FLAHAULT, 1886; GOMONT, 1892).

Em meados do século XX, trabalhos como os de Geitler (1932), Frémy (1933) e Desikachary (1959), que, juntos, foram responsáveis pela descrição de mais de mil táxons de cianobactérias da Europa, introduziram também à taxonomia deste grupo características métricas e ecológicas dos organismos, juntamente com as já utilizadas até então.

Já no século XXI, Hoffman *et al.* (2005) começaram a considerar também características ultraestruturais e genéticas na identificação e classificação das cianobactérias, o que resultou na reavaliação de gêneros até então considerados monofiléticos, como *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Microcoleus*. Anos depois, Komárek *et al.* (2014) realizaram uma revisão taxonômica de todo o filo utilizando a chamada abordagem polifásica, que consiste na inclusão de características bioquímicas, juntamente com as utilizadas até então, e isso resultou na subdivisão do filo em oito ordens: Gloeobacterales, Pleurocapsales, Spirulinales, Chroococcales, Chroococcidiopsidales, Synechococcales, Oscillatoriales e Nostocales.

As pesquisas relacionadas à taxonomia das cianobactérias, se valendo dos mais recentes avanços e do barateamento de técnicas moleculares mais sofisticadas, vêm cada vez mais adotando o sequenciamento de genoma completo para a identificação, descrição e classificação de novos táxons (SKOUPÝ *et al.*, 2022) e trabalhos visando a revisão de todo o filo, baseado em filogenômica, também vêm sendo realizados. Com isso, mais recentemente, Strunecký, Ivanova & Mareš (2023), com a análise de sequências do gene 16S rRNA juntamente com genomas presentes em bancos de dados, reconstruíram o filo Cyanobacteria e, como resultado, houve a fragmentação das oito ordens propostas anteriormente em 19 ordens, demonstrando assim a grande complexidade taxonômica destes organismos e a necessidade de mais estudos nesta área.

2.3. Cianotoxinas

As cianobactérias, embora desempenhem importantes serviços ecológicos essenciais aos ambientes em que ocorrem, também são conhecidas pela produção de alcaloides e peptídeos cíclicos de baixo peso molecular potencialmente tóxicos para os demais organismos denominados cianotoxinas (METCALF & CODD, 2012). Estas toxinas, quando absorvidas por animais, podem exibir efeitos neurotóxico (anatoxinas e saxitoxinas), hepatotóxico

(nodularinas e microscistinas), inibidor de síntese proteica (cilindrospermopsinas), ou, quando em exposição crônica, carcinogênico (METCALF & CODD, 2012).

Dentre a ampla variedade de cianotoxinas, as microcistinas e a saxitoxinas se destacam por serem as mais comumente produzidas por diversas cepas de cianobactérias. As microcistinas são peptídeos cíclicos que representam o mais estruturalmente diverso grupo de toxinas cianobacterianas, com cerca de 90 isoformas identificadas até o momento (WELKER & VON DOHREN, 2006; METCALF & CODD, 2012) e sua síntese se dá pela expressão do *cluster* gênico *mcyS*, que possui cerca de 10 genes e um total de, aproximadamente, 55 kb (PEARSON *et al.*, 2010). Quanto ao seu mecanismo de ação, sabe-se que a exposição aguda de microcistinas pode causar falência hepática severa, uma vez que estas substâncias atuam na inibição de fosfatases em células hepáticas, resultando em uma fosforilação excessiva de estruturas filamentosas intracelulares e culminando assim na degradação do citoesqueleto e na perda da ultraestrutura dos hepatócitos (ERIKSSON *et al.*, 1990; SAHIN *et al.*, 1995).

As saxitoxinas, por sua vez, compreendem uma classe de alcaloides com cerca de 30 derivados naturais (LLEWELLYN, 2006). São consideradas poderosas neurotoxinas quando ingeridas por animais, bloqueando canais de sódio de neurônios (KAO & LEVINSON, 1986) e de cálcio de células cardíacas (SU *et al.*, 2004), resultando em falência cardíaca e parada cardiorrespiratória quando em exposição aguda. A síntese destas substâncias se dá por meio da expressão de *operons* (aproximadamente 35 kb) presentes no *cluster* gênico *sxt* (PEARSON *et al.*, 2010). Tais *operons* podem ser encontrados tanto em cianobactérias de gêneros como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis* e *Phormidium* (PODDUTURI *et al.*, 2021), com o último estando também presente tanto em crostas biológicas de solo (BAKIEVA *et al.*, 2012; HOKMOLLAHI *et al.*, 2017), quanto em dinoflagelados *Gymnodinium* (OSHIMA *et al.*, 1987) e *Pyrodinium* (HARADA, OSHIMA & YASUMOTO, 1982).

Apesar destas bactérias ocorrerem nos mais diversos tipos de ambientes, a maioria dos estudos que abordam a produção de cianotoxinas enfocam organismos de ambientes aquáticos, nos quais, quando em condições favoráveis de nutrientes, temperatura e luminosidade, ocorrem as chamadas florações de cianobactérias (MOREIRA, VASCONCELOS & ANTUNES, 2022). Com isso, embora ainda haja grandes lacunas no conhecimento dos mecanismos que desencadeiam estas florações, muito se sabe sobre este fenômeno tanto em ambientes de água doce, quanto marinhos e cepas tóxicas de diversas espécies distribuídas ao longo de todo o planeta. Espécies como *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Bornet & Flahault (PARK *et al.*, 2018), *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing (TARAFDAR *et al.*, 2023) e *Raphidiopsis*

raciborskii (Woloszynska) Aguilera *et al.* (WU *et al.*, 2022), entre outras, são amplamente conhecidas por contaminarem corpos d'água (HUO *et al.*, 2021; MOHAN *et al.*, 2024) causando, muitas vezes, a mortalidade de peixes.

Em contrapartida, o conhecimento acerca da produção destas toxinas por cianobactérias de crostas biológicas de solo ainda é escasso, com apenas alguns estudos pontuais tendo sido realizados até então. Neste sentido, Richer *et al.* (2015) identificaram a presença das toxinas ácido 2,4-diaminobutírico (DAB) e N-(2-aminoetil)glicina (AEG) e Chatziefthimiou, Banack & Cox (2021) detectaram β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), DAB e AEG ao longo de um gradiente de profundidade em locais próximos a crostas biológicas de solo de desertos. Por outro lado, Dulič *et al.* (2022) não constatarem a presença de cianotoxinas (nem de seus respectivos genes codificadores), tais como BMAA, microcistinas, cilindrospermopsinas e saxitoxinas, em cianobactérias isoladas de biocrostas.

Já em crostas biológicas do Ártico, Chrapusta *et al.* (2015) identificaram cepas de cianobactérias produtoras de microcistinas e anatoxina, sendo a última sendo reportada em solos deste tipo de ambiente pela primeira vez, evidenciando a necessidade de mais pesquisas visando a identificação e monitoramento de cepas tóxicas de cianobactérias de solo.

Apesar do solo ser considerado, em comparação com corpos d'água, um ambiente de difícil dispersão das cianotoxinas (DULIČ *et al.*, 2022), existem evidências de provável contaminação humana por estas substâncias sozinhas ou em sinergia com outros contaminantes (METCALF & CODD, 2020; MAITY *et al.*, 2021), seja pela inalação de partículas de solo contaminadas com estas substâncias (METCALF *et al.*, 2012), ou pela bioacumulação e fitotoxicidade em certas espécies de vegetais presentes em plantações. Neste sentido, Brasil e China lideram o número de pesquisas com este enfoque (ABDALLAH *et al.*, 2021), e sobre a contaminação da água matricial presente no solo (WERALUPITIYA *et al.*, 2022).

Ainda por conta da dificuldade em dispersar as cianotoxinas, a função ecológica destes compostos em solo permanece incerta. Downing, Phelan & Downing (2014) propuseram, a fim de explicar a função fisiológica da produção de cianotoxinas por cianobactérias de ambientes áridos, argumentam que toxinas como a microcistina e a BMAA são de grande importância para os indivíduos que as produzem, atuando na manutenção do metabolismo por meio da prevenção da fotoinibição causada pela produção de espécies reativas de oxigênio.

3. Objetivos

3.1. Gerais

Realizar a caracterização taxonômica (abordagem polifásica) e o avaliar potencial para produção de toxinas de cianobactérias isoladas a partir de crostas biológicas de solo encontradas em diferentes localidades da Caatinga pernambucana.

3.2. Específicos

1) Avaliar as características morfológicas e genéticas de cianobactérias que ocorrem em ambiente semiárido, com base em amostras de cultivo.

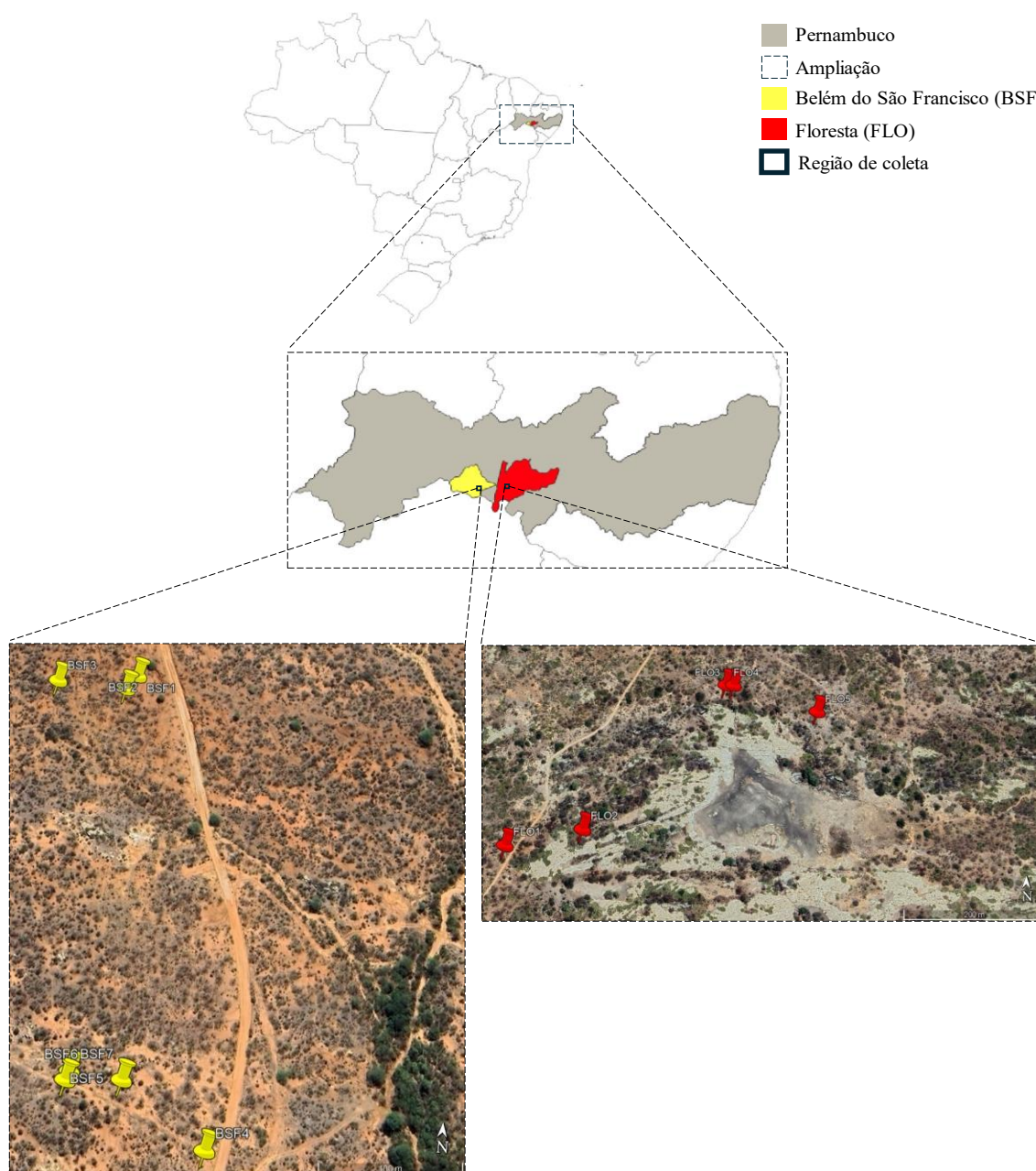
2) Avaliar a produção e/ou potencial de produção de toxinas pelas cepas de cianobactérias isoladas dos solos da Caatinga pernambucana.

4. Materiais e métodos

4.1. Área de estudo e coleta das amostras

A coleta das amostras foi feita pelo Prof. Dr. Renato José Reis Molicca (Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE) a partir de reconhecimento visual das mesmas em solos de fragmentos de Caatinga nos municípios pernambucanos de Floresta e Belém do São Francisco (Figura 1).

Figura 1. Mapa dos pontos de amostragem.



Fonte: Autor.

O recolhimento das amostras se deu em cinco pontos do primeiro município e em sete do segundo (Tabela 1), seguindo a metodologia proposta por Gundlapally & Garcia-Pichel (2006), que consiste na inserção de uma placa de Petri com 55 mm de diâmetro invertida no solo e, em seguida, na retirada de uma amostra de crosta de aproximadamente 1 cm de espessura.

Após a coleta, o material foi secado a temperatura ambiente, armazenado, rotulado e mantido refrigerado até o momento do transporte e posterior análise.

Tabela 1. Coordenadas geográficas e altitude dos pontos de coleta.

Municípios	Pontos de coleta	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Floresta (FLO)	FLO1	8°40'48,6"S	38°28'46,4"W	378
	FLO2	8°40'47,8"S	38°28'42,7"W	374
	FLO3	8°40'40,3"S	38°28'35,0"W	374
	FLO4	8°40'40,3"S	38°28'35,4"W	369
	FLO5	8°40'41,7"S	38°28'30,8"W	379
Belém do São Francisco (BSF)	BSF1	8°42'40,4"S	38°51'31,3"W	318
	BSF2	8°42'40,8"S	38°51'31,6"W	293
	BSF3	8°42'40,7"S	38°51'33,4"W	327
	BSF4	8°42'52,2"S	38°51'29,6"W	336
	BSF5	8°42'50,8"S	38°51'31,5"W	309
	BSF6	8°42'50,9"S	38°51'32,8"W	347
	BSF7	8°42'50,7"S	38°51'32,7"W	336

4.2. Isolamento e cultivo

Após a coleta e transporte do solo com o material de interesse, as amostras foram examinadas sob lupa (Olympus SZX7) para avaliação da presença de cianobactérias e, em caso positivo, para recolhimento de indivíduos. Quando encontrados, os espécimes foram montados entre lâmina e lamínula e analisados sob microscópio de luz (Olympus BX53) acoplado com câmera digital (Olympus DP51) e sistema de análise de imagens (CellSens, v1.18) para caracterização morfológica e registro fotográfico.

Os indivíduos encontrados e analisados foram inoculados em tubos de ensaio com 15 mL do meio de cultivo ASM-1, sendo mantidos sob fotoperíodo de 12 horas/claro e 12 horas/escuro (lâmpadas fluorescentes), $50 (\pm 5) \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Porções do solo coletado (cerca de 1g) também foram inoculadas nas mesmas condições de meio de cultivo e de variáveis ambientais para possibilitar o desenvolvimento de cianobactérias não observadas no exame sob lupa.

O objetivo do estabelecimento de cultivos artificiais é o isolamento das populações (linhagens uniespecíficas) e produção de biomassa para a realização de diferentes análises. Dessa forma, estes foram então monitorados e os crescimentos foram avaliados periodicamente. Quando houve necessidade, espécimes foram isolados em diferentes cultivos utilizando-se o método de “pescaria”, com utilização de pipetas tipo Pasteur para coleta de espécimes, lavagens sucessivas com água deionizada e exame sob microscópio invertido (Leica DMIL LED), como descrito em Martins *et al.* (2016).

4.3. Caracterização morfológica

Os espécimes de interesse foram analisados de acordo com suas características taxonômicas, conforme literatura específica de cada grupo, tais como forma e dimensão celular, células solitárias ou em tricomas, estrutura dos tricomas, presença de bainha, entre outras. O sistema de classificação adotado foi o proposto por Strunecký, Ivanova & Mareš (2022).

4.4. Caracterização do gene 16S rRNA

Partindo das culturas uniespecíficas não axênicas obtidas na etapa de isolamento e cultivo das cianobactérias, foi realizada a caracterização molecular dos morfotipos obtidos.

4.4.1. Extração e amplificação de DNA

A extração do DNA foi feita utilizando o DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN Group) seguindo as orientações do fabricante: inicialmente, foram colocados cerca de 0,25 g de biomassa, juntamente com 60 µL de solução C1, em um *Power Bead Tube*. Em seguida o tubo foi levado a um homogeneizador de tecidos Precellys™ 24 (Bertin Technologies, Bordeaux, França) e, em dois ciclos de 45 s a 4000 rpm com um intervalo de 20 s entre eles, as células foram lisadas. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 s e o sobrenadante foi transferido a outro tubo de 2 mL (*Collection Tube*). Adicionou-se, então, 250 µL de solução C2 e a mistura foi incubada a 4 °C por 5 minutos para, em seguida, ser centrifugada a 10.000

rpm por 1 minuto e cerca de 600 µL do sobrenadante ser transferido a um novo tubo. Com a adição de 200 µL de solução C3, o tubo foi incubado a 4 °C por 5 minutos e, passado este tempo, foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto. Transferiu-se cerca de 750 µL do sobrenadante formado a outro tubo, no qual foram adicionados 1200 µL de solução C4. Feito isso, foram transferidos 675 µL da mistura resultante a uma coluna acoplada a um novo tubo (*MBSpin Column*), o qual foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto e a fração eluída foi descartada (repetiu-se esse processo até que todo o volume passasse pela coluna). Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução C5 à coluna, que foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 s e, novamente, descartou-se o volume eluído, repetindo o processo até que a coluna estivesse completamente seca. Por fim, a coluna foi transferida a um novo tubo e, a fim de eluir o DNA, adicionou-se 100 µL de solução C6 e o mesmo foi centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto. O DNA resultante foi armazenado a -20 °C até o momento da próxima análise.

Para a amplificação do gene 16S rRNA RNAr e do espaçador intergênico 16S rRNA-23S (ITS 16S rRNA23S) foi realizada uma reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com os *primers* 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') (NEILAN *et al.*, 1997) e 23S30R (5'CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT3') (TATON *et al.*, 2003). Para cada reação, adicionou-se 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 2,5 µL de MgCl₂ a 50 mM, 5 pmol de cada iniciador, 1,5 U de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1 µL de DNA e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) esterilizada, completando um volume final de 25 µL. Os tubos contendo as reações foram levados a termocicladores (Life Technologies), nos quais foram programados o seguinte ciclo para amplificação: 5 minutos de desnaturação a 94 °C, 10 ciclos de 45 segundos a 94 °C, de 45 segundos a 57 °C, de 2 minutos a 72 °C, 25 ciclos de 45 segundos a 92 °C, 45 segundos a 54 °C, 2 minutos a 72 °C e de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos obtidos na PCR foram verificados por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1%, onde foram adicionadas alíquotas de 2 µL de DNA, 2 µL de tampão de carregamento e 1 µL de GelRed[™] 0,6X (Biotium, Hayward, EUA). A corrida no gel ocorreu com uma corrente elétrica de 100 V por 20 minutos em tampão TBE 0,5X e a documentação foi feita utilizando fotografia digital em foto documentador Mini Bis Pro e com o *software* Gel Capture[™] (Micro Photonics, Allentown, EUA). Como padrão de peso molecular, utilizou-se o marcador DNA Ladder de 1 Kb (Life Technologies). Após a confirmação da presença dos produtos de interesse amplificados pela PCR, o material foi armazenado a -20 °C até o momento da próxima análise.

4.4.2. Clonagem e transformação

Os produtos positivos para o gene 16S rRNA RNAr e os fragmentos de 16S rRNA-23S ITS foram clonados utilizando-se o *kit pGEM-T Easy Vector System I* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante: adicionou-se, a um tubo de 0,5 mL, 5 µL do tampão *2X Rapid Ligation Buffer*, 1 µL do vetor *pGEM-T Easy Vector*, 1-3 µL do produto de PCR, dependendo da concentração do DNA utilizado, e 1 µL da enzima *T4 DNA Ligase*. Por fim, o tubo foi incubado a 4 °C *overnight*.

O vetor contendo o inserto foi introduzido em células competentes de *Escherichia coli* DH5α por meio de choque térmico (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989): misturou-se os 10 µL da reação de clonagem à 50 µL de células bacterianas em um tubo de 1,5 mL, o qual foi mantido em gelo por 30 minutos e, em seguida, transferido a um banho a 42 °C por 50 segundos e imediatamente volta ao gelo por 2 minutos. Posteriormente foram adicionados 500 µL de LB líquido ao tubo e o mesmo foi incubado a 37 °C por uma hora e meia sob 180 rpm de agitação. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 6.000 rpm por 5 minutos, a fim de concentrar as células bacterianas, descartou-se então 200 µL do sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado nos 300 µL restantes no tubo.

Tais bactérias foram plaqueadas em meio de cultura LB contendo ampicilina (1 µL: 1 mL) e X-Gal (0,5 µL: 1 mL) e, após um período de crescimento de aproximadamente 18 horas em estufa, foram selecionadas as colônias brancas para a realização de mais uma reação de PCR, para confirmação da presença dos insertos. Os *primers* utilizados para esta reação, foram CYA359F, CYA781a e CYA781b, conforme o proposto por Nübel *et al.* (1997).

Confirmada a presença dos insertos de interesse, as colônias brancas selecionadas foram transferidas e cultivadas em 5 mL de meio LB líquido por cerca de 18 horas, sob temperatura de 37 °C e 180 rpm de agitação. Após o período de incubação, foi feita a extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5α, com a utilização do *kit ZR Plasmid Miniprep Classic* (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante: primeiramente centrifugou-se 1 mL de meio LB líquido contendo as bactérias a 11.000 rpm por 20 segundos e descartou-se o sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão P1 a fim de ressuspender o *pellet* formado. Após a ressuspensão, foram adicionados ao tubo 200 µL de tampão P2 até que as células bacterianas fossem completamente lisadas. Feito isso, adicionou-se 400 µL de tampão P3 ao tubo, o qual foi incubado por 2 minutos em temperatura ambiente. O tubo foi então centrifugado a 11.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante foi passado por uma coluna *Zymo-*

*Spin*TM *IIN*, sendo esta posteriormente centrifugada a 11.000 rpm por 30 segundos. Após descartar o líquido passado pela coluna, adicionou-se 200 µL do tampão *Endo-Wash Buffer* à coluna, que é novamente centrifugada a 11.000 rpm por 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 400 µL do tampão *Plasmid Wash Buffer* à coluna, a qual foi centrifugada a 11.000 rpm por 1 minuto. Por fim, transferiu-se a coluna a um outro tubo e adicionou-se à mesma 30 µL de tampão *DNA Elution Buffer* e o DNA plasmidial foi então eluído ao centrifugar a coluna a 11.000 rpm por 30 segundos. O produto resultante foi armazenado a -20 °C até o momento de próxima análise.

4.4.3. Preparo das amostras para sequenciamento

Devido à dificuldade na obtenção de clones viáveis para o sequenciamento, foram testados quatro tipos de amostras para sequenciar: I) plasmídeo contendo o inserto extraído e purificado utilizando o método descrito no item anterior; II) produto de PCR do inserto ligado ao plasmídeo, amplificado com os mesmos *primers* utilizados no item 4.4.1.; III) produto de PCR da sequência parcial do gene 16S rRNA e do ITS completo, utilizando os *primers* CYA359F e 23S30R conforme o proposto por Strunecký, Elster & Johansen (2011), porém com um gradiente de temperatura na etapa de anelamento (de 50 a 60 °C, com variações de 2 °C); IV) produto de PCR da sequência específica de cianobactérias do 16S rRNA, utilizando os mesmos *primers* descritos no item 4.4.2.

4.4.4. Sequenciamento

A reação de sequenciamento deu-se com auxílio do *kit Big Dye Terminator* versão 3.0 (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados nas reações de sequenciamento variaram de acordo com o tipo de amostra da seguinte maneira: para amostras do tipo I, os *primers* foram M13F/R, 357F/R (NÜBEL *et al.*, 1997), 704F/R (LANE, 1991) e 1114F/R; para as do tipo II, 27F, 357F, 704R, 1114F, 1494R e 23S30R; para as do tipo III, CYA359F, 704R, 1114F e 23S30R; para amostras do tipo IV, CYA359F, CYA781Ra e CYA781Rb e purificação com o *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN), seguindo as orientações do fabricante.

As reações de sequenciamento foram então devidamente precipitadas seguindo o protocolo: adição de 2,5 µL de solução EDTA(0,5 M pH 8,0)/Acetato de sódio (3M pH 9,0)

(1:1), adição de 30 µL de etanol 100% gelado (vórtex), centrifugação a 4.000 rpm por 15 mins., descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado com etanol 70% gelado, centrifugação a 4.000 rpm por 15 mins., descarte do sobrenadante e secagem no escuro por 2 horas; ressuspendidas e sequenciadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), campus Piracicaba.

4.4.5. Filogenia

As sequências do gene 16S rRNA, obtidas a partir do sequenciamento, foram alinhadas e editadas manualmente usando o programa MEGA11 (TAMURA *et al.*, 2021). Posteriormente, foram comparadas com outras depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990). As sequências mais próximas foram incluídas em uma matriz que foi utilizada nas análises seguintes.

Árvores filogenéticas foram construídas com base no modelo GTR+G+I com critérios de Máxima Verossimilhança no *software* MEGA 11, com limites de confiança dos clados calculados com valores de *bootstrap* com 1.000 réplicas de buscas heurísticas, e Inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.2. (RONQUIST *et al.* 2020), com oito milhões de gerações, amostragem a cada 1.000 e descarte das 100.000 gerações iniciais.

4.4.6. Análise do ITS

A partir dos sequenciamentos contendo o ITS, e como complemento à descrição dos táxons isolados (ITEMAN *et al.*, 2000) foram utilizadas as estruturas secundárias das regiões BoxB, D1-D1' e V3 do espaçador, utilizando a ferramenta *RNA Folding Form* da plataforma MFold Web 2.3 (ZUKER, 2003), assim como a verificação da presença e ausência dos transportadores RNAt^{Ala} e RNAt^{Ile}, com auxílio da ferramenta tRNAscan-SE 2.0 (LOWE & CHAN, 2016).

4.5. Avaliação do potencial de produção de toxinas

Partindo das cepas isoladas, os genótipos tóxicos foram identificados a partir da amplificação do gene relacionado ao domínio proteico AMT, localizado no módulo *mcyE* do complexo enzimático envolvido na produção de microcistinas, utilizando os *primers* HEP-F (5' TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC3') e HEP-R (5' AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT3') (JUNGBLUT & NEILAN, 2006), e do gene *sxtA*, envolvido na produção de saxitoxinas, com os *primers* *sxtA*-F (5' GCGTACATCCAAGCTGGACTCG3') e *sxtA*-R (5' GTAGTCCAGCTAAGGCACTTGC3') (BALLOT *et al.*, 2010).

Nas cepas em que foi confirmada a presença do gene *sxtA* com os iniciadores citados anteriormente, testes com *primers* *sxtA*-F (5' GATGACGGAGTATTTGAAGC3') e *sxtA*-R (5' CTGCATCTTCTGGACGGTAA3') (AL-TEBRINEH *et al.*, 2010), foram realizados e, de forma complementar, também foi realizada análise para a presença do gene *sxtI*, com os iniciadores OCT-F (5' TGCCGTTTTGTGCTTAGATG3') e OCT-R (5' GGACGGAAGGACTCACGATA3') (HOFF-RISSETI *et al.*, 2013), também presente no *cluster* responsável pela produção de saxitoxinas.

5. Resultados e discussão

5.1. Táxons encontrados

Foram estudadas 22 populações de cianobactérias presentes nas amostras de crostas biológicas coletadas, pertencentes a 13 gêneros de oito famílias distribuídas em seis ordens. Todas foram isoladas e cultivadas e 13 foram estudadas em nível molecular, com cinco tendo o gene 16S rRNA e o ITS completamente sequenciados, por meio dos métodos I e II e o restante com apenas a sequência específica de cianobactérias do gene 16S rRNA sequenciada (de 422 pares de base), por meio do método IV (Tabela 2).

Dentre os tipos de abordagem utilizados para sequenciamento, o único que não ofereceu nenhum resultado foi o tipo III e, embora Strunecký, Elster & Johansen (2011) tenham obtido sucesso na amplificação utilizando a temperatura de anelamento de 55 °C, o mesmo não foi possível no presente trabalho, mesmo com a reação realizada em um gradiente de temperatura, provavelmente porque os *primers* utilizados possuem temperaturas de anelamento muito

diferentes, sendo de 60°C para o CYA359F (NÜBEL *et al.*, 1997) e de 50°C para o 23S30R (TATON *et al.*, 2003).

Tabela 2. Identificação, locais de coleta e dados moleculares obtidos das linhagens estudadas. BSF: Belém do São Francisco; FLO: Floresta.

Organismo	Localidade	Dado molecular	Método de obtenção
Ordem Chroococcidiopsidales			
<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	BSF	16S rRNA parcial	IV
Ordem Leptolyngbyales			
<i>Pseudanabaena</i> sp.	BSF; FLO	16S rRNA parcial	IV
<i>Chroakolemma</i> sp.	BSF	16S rRNA + ITS	II
<i>Kovacikia</i> sp.	FLO	16S rRNA + ITS	I
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>foveolarum</i>	BSF; FLO	16S rRNA parcial	IV
Ordem Oscillatoriales			
<i>Microcoleus</i> aff. <i>subtorulosus</i>	FLO	-	-
<i>Microcoleus</i> aff. <i>lacustris</i>	BSF	-	-
<i>Porphyrosiphon notarisii</i>	BSF; FLO	16S rRNA parcial	IV
Ordem Coleofasciculales			
Wilmottiaceae sp.	FLO	-	-
<i>Pycnacronema conicum</i>	FLO	16S rRNA + ITS	I
<i>Gracilinea arenicola</i>	BSF; FLO	16S rRNA + ITS	I
Ordem Nostocales			
<i>Scytonema hyalinum</i>	BSF; FLO	16S rRNA parcial	IV
<i>Nostoc</i> sp.1	FLO	16S rRNA parcial	IV
<i>Nostoc</i> sp.2	BSF; FLO	16S rRNA parcial	IV
<i>Nostoc</i> sp.3	BSF	16S rRNA parcial	IV
<i>Nostoc</i> sp.4	BSF	16S rRNA parcial	IV

Dentre as populações estudadas, a maioria dos morfotipos pertence à ordem Oscillatoriales, com nove deles, seguida de Nostocales, com cinco, Leptolyngbyales e Coleofasciculales, com três cada e Chroococcidiopsidales e Pseudanabaenales, ambas com apenas um. Foi observado também que representantes de gêneros reconhecidamente cosmopolitas, como *Nostoc* por exemplo, ocorreram em todos os pontos amostrados, assim

como *Scytonema* e *Porphyrosiphon*, que possuem adaptações para sobreviver em ambientes com as características extremas de irradiância e aridez encontradas no bioma estudado. A produção de scytonemina (GARCIA-PICHEL & CASTENHOLZ, 1991) e carotenoides, pigmentos acessórios que filtram a radiação incidente, assim como a produção de uma bainha espessa, que propicia um microambiente mais ameno em seu interior, ajudando a evitar a dessecação do organismo, são adaptações importantes encontradas em cianobactérias de biocrostas.

Descrição dos táxons encontrados

Ordem Chroococcidiopsidales

Família Chroococcidiopsidaceae

Chroococcidiopsis sp. (Figura 2)

Colônias amorfas, gelatinosas, micro a macroscópicas, mucilagem incolor pouco evidente, células densamente agregadas; células esféricas ou discretamente ovaladas, 6,0-6,3 µm de compr. e 6,0-6,7 µm de diâm.; conteúdo celular azul-esverdeado, grânulos evidentes; divisão celular em dois planos.

Comentários: As características morfológicas da população estudadas são compatíveis com as descritas para o gênero *Chroococcidiopsis* e, embora a sequência parcial de 419 pb do gene 16S rRNA obtida demonstre alta identidade (99,75%) com espécies como *C. thermalis* Geitler e *C. cubana* Komárek & Hindák, há divergências na ecologia, uma vez que as duas espécies são encontradas em ambientes aquáticos, com a primeira isolada de fontes termais da Indonésia (GEITLER, 1933) e a segunda isolada do perifiton de corpos de água de Cuba (KOMÁREK & HINDÁK, 1975). Esta aproximação entre as sequências pode ser consequência do tamanho limitado da sequência utilizada para comparação. Desta forma, em função da grande divergência entre os ambientes de ocorrência, não foi considerada segura a atribuição de identificação específica.

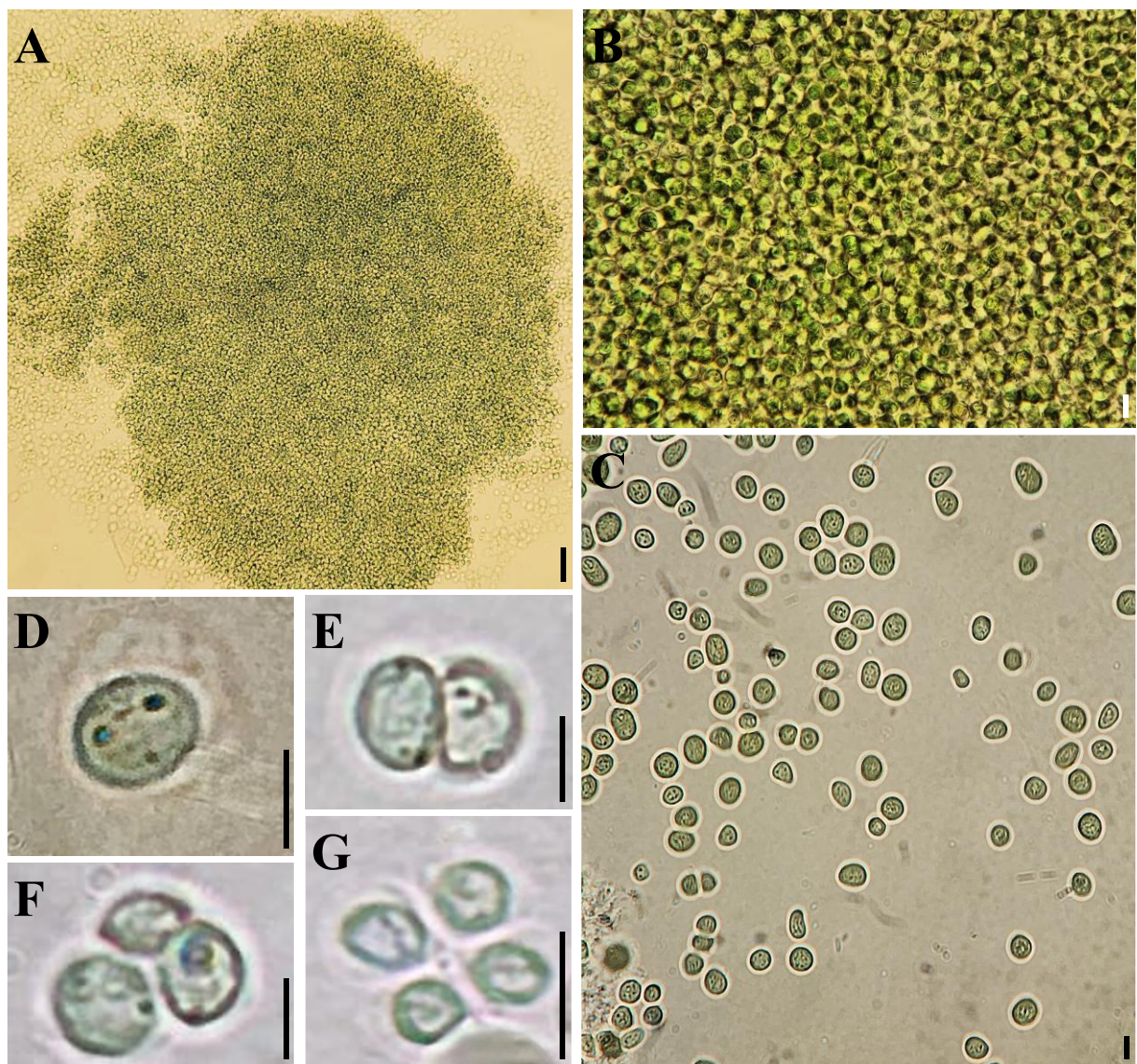
Apesar disso, *Chroococcidiopsis* corresponde a um gênero de cianobactérias unicelulares bastante comum em crostas de desertos temperados (WANG *et al.*, 2020), da Ilha

de San Nicolas, nos EUA (FLECHTNER, JOHANSEN & BELNAP, 2008), e da Índia (KUMAR & ADHIKARY, 2015), além de serem importantes componentes de comunidades hipolíticas de desertos australianos (TRACY *et al.*, 2010) e do Deserto do Atacama, no Chile (WARREN-RHODES *et al.*, 2006; AZUÁ-BASTOS *et al.*, 2011).

Observação: Presente em amostra em cultivo.

Pontos de ocorrência: BSF6.

Figura 2. *Chroococcidiopsis* sp. Barras de escala: A: 20 µm; B-C: 10 µm; D-G: 5 µm.



Fonte: Autor.

Ordem Pseudanabaenales

Família Pseudanabaenaceae

Pseudanabaena sp. (Figura 6A)

Tricomas constritos, septo hialino, longos, retos, finos, isolados ou emaranhados; e bainha ausente ou incolor, fina e aderida ao tricoma; mais longas do que largas, 4,0-6,0 μm de compr. e 2,0 μm de diâm.; célula apical cilíndrico-arredondada (4,0-6,0 μm de compr. e 2,0 μm de diâm.); conteúdo celular azul-esverdeado, homogêneo e sem grânulo evidente.

Comentários: A morfologia observada nos espécimes estudados é compatível com a descrita para a família Pseudanabaenaceae, mais especificamente com o gênero *Pseudanabaena*, principalmente pela presença de septos espessos e hialinos entre as células.

A análise da sequência parcial de 364 pb do gene 16S rRNA mostrou 94,78% de identidade com a família em questão. Embora a família Pseudanabaenaceae possua, majoritariamente, representantes aquáticos (incluindo a espécie-tipo, *Pseudanabaena catenata* Lauterborn), já foram reportadas ocorrências de espécies em crostas biológicas, como *P. minima* Anagnostidis, *P. tenuis* Koppe e *P. starmachii* Anagnostidis, presentes na África (BÜDEL *et al.*, 2009; DOJANI *et al.*, 2011) e *P. spelea* Anagnostidis, em crostas da Antártida (WEBER, BÜDEL & BELNAP, 2016). Apesar disso, apenas a observação de caracteres morfológicos, juntamente com a obtenção de um baixo número de bases no sequenciamento, inviabiliza a identificação da linhagem a nível específico.

Observações: Presente em amostra em cultivo e ambiental.

Pontos de ocorrência: FLO2; FLO5; BSF2; BSF7.

Ordem Leptolyngbyales

Família Leptolyngbyaceae

Chroakolemma sp. (Figuras 6C-G)

Filamentos solitários ou agrupados, constrictos, 2,0-6,0 µm de diâm.; bainha fina, incolor, aderida ao tricoma, espessa, enegrecida ou ausente; tricomas constrictos, longos, flexuosos, raramente pseudorramificados, finos, isolados ou emaranhados, com necrídios frequentes; células isodiamétricas ou mais longas do que largas: 1,6-4,0 µm de compr. e 1,2-4,0 µm de diâm.; célula apical cilíndrico-arredondada a cônico-arredondada com as mesmas dimensões das demais células; conteúdo celular azul-esverdeado, homogêneo e sem grânulos evidente.

Comentários: As características morfológicas e ecológicas se igualam às descritas para o gênero *Chroakolemma*, cuja espécie-tipo, *C. pellucida* Becerra-Absalón & Johansen, foi descrita ocorrendo em ambiente aerofítico em crostas biológicas de um semideserto da região central do México (BECERRA-ABSALÓN *et al.*, 2018). Com isso, a análise da sequência de 1481 pb do gene 16S rRNA obtida apresentou identidade de 95,51% com *C. pellucida*, confirmando a identidade genérica, mas não específica.

Adicionalmente, a análise da estrutura secundária do ITS (Figura 3) mostrou que há a presença dos dois transportadores e que o domínio D1-D1' (Figura 3A), o mais conservado do ITS (JOHANSEN & CASAMATTA, 2005) da linhagem em questão, conta com 65 pares de base e quatro *loops* ao longo de sua extensão e base comum ao dos demais representantes da ordem Leptolyngbyales (5'GACCU...GAGGUC3'), se assemelhando com o descrito para *C. pellucida*, exceto pelo número e tamanho dos *loops*.

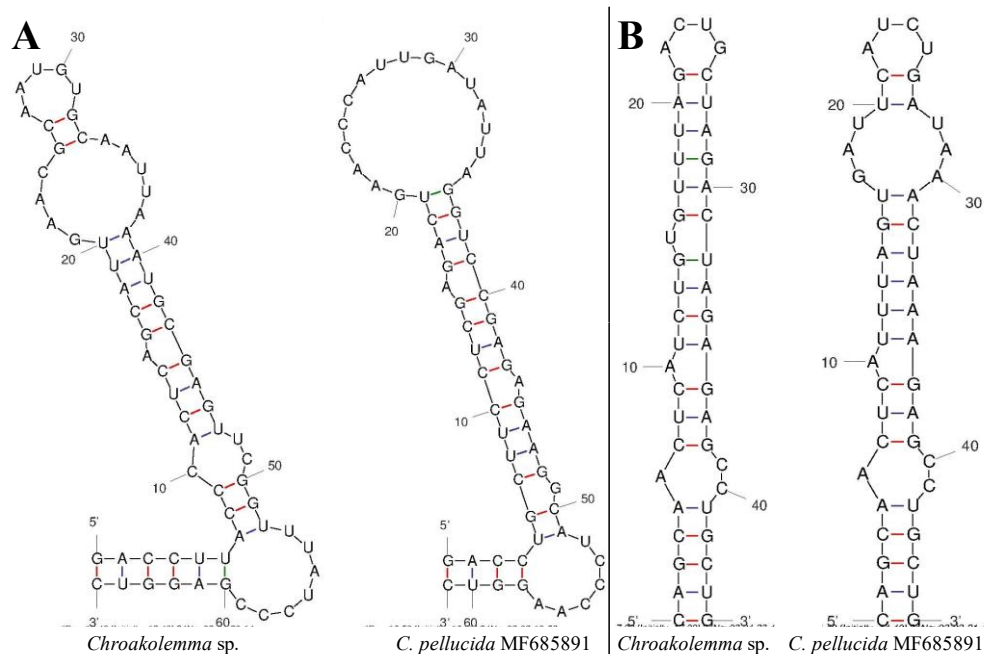
O domínio BoxB (Figura 3B), por sua vez, possui sequência da base comum para a ordem (5'CAGCA...UGCUG3'), 45 pares de base, sem *loops* em sua extensão e um pequeno *loop* terminal, características semelhantes ao observado ao descrito para a linhagem de maior identidade, com exceção da presença de um *loop* ao longo de sua extensão. Já em relação ao domínio V3, não foi possível obter a estrutura secundária em razão da baixa qualidade das bases finais do ITS.

Quanto às análises filogenéticas (Figura 5), apesar da alta identidade com *C. pellucida*, a linhagem isolada se mostrou distante do clado formado para o gênero e próxima de *Leptolyngbya* sp. MT488150, a qual provavelmente se trata de outro gênero, com um alto valor de suporte pela Inferência Bayesiana. Apesar disso, as características morfológicas, ecológicas e das estruturas secundárias do ITS aproximam a linhagem isolada do gênero *Chroakolemma* e o distanciamento observado na filogenia deve-se, provavelmente, a uma baixa qualidade de algumas bases obtidas no sequenciamento.

Observações: Presente em amostra em cultivo e ambiental.

Pontos de ocorrência: BSF5.

Figura 3. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A) e BoxB (B) do ITS de *Chroakolemma* sp.



Fonte: Autor.

Kovacikia sp. (Figuras 6H-I)

Tricomas longos, retos ou flexuosos, constrictos, isolados ou agrupados, raramente pseudorramificados; bainha fina aderida ao tricoma, transparente ou amarelada; células cúbicas isodiamétricas a cilíndricas mais longas do que largas (1,0-1,7 μm de comp. e 1,0-1,5); célula apical cilíndrico-arredondada; conteúdo celular azul-esverdeado ou verde claro.

Comentários: As características morfológicas se igualam às do gênero *Kovacikia*, porém há divergência na ecologia, uma vez que *K. muscicola* Miscoe, Pietrasiak & Johansen, espécie-tipo do gênero, foi descrita ocorrendo em cavernas havaianas (MISCOE *et al.*, 2016), ambientes de umidade relativamente alta, quando comparado à Caatinga. Mais recentemente, outras espécies descritas para o mesmo gênero foram isoladas de ambientes aquáticos, com *K. brockii* Johansen, Kastovský & Hauerová e *K. anagnostidisii* Kastovský, Johansen & Hauerová ocorrendo em fontes termais do Parque Nacional de Yellowstone, nos EUA (KASTOVSKÝ *et al.*, 2023) e *K. minuta* Shen, Li & Qiu, ocorrendo sob a sombra de macrófitas em corpos d'água rasos do Jardim Botânico de Wuhan, na China (SHEN *et al.*, 2022). Além disso, a sequência

de 1312 pb do gene 16S rRNA obtida no presente trabalho demonstrou 94,87% de identidade com *K. anagnostidisii*.

Com relação à análise da estrutura secundária do ITS (Figura 4), foram encontrados os dois transportadores estudados e uma região D1-D1' (Figura 4A) com 62 pares de base, mesma sequência de base de *Chroakolemma* sp. e um *loop* grande em sua extensão e um terminal pequeno, características também observadas no descrito para *K. anagnostidisii*, com exceção da presença de dois *loops* em sua extensão e ausência de um terminal.

Quanto ao BoxB (Figura 4B), foram observados 43 pares de base, dois *loops* pequenos em sua extensão e um *loop* terminal grande, semelhante ao de *K. anagnostidisii* exceto pela ausência de *loops* em toda a estrutura.

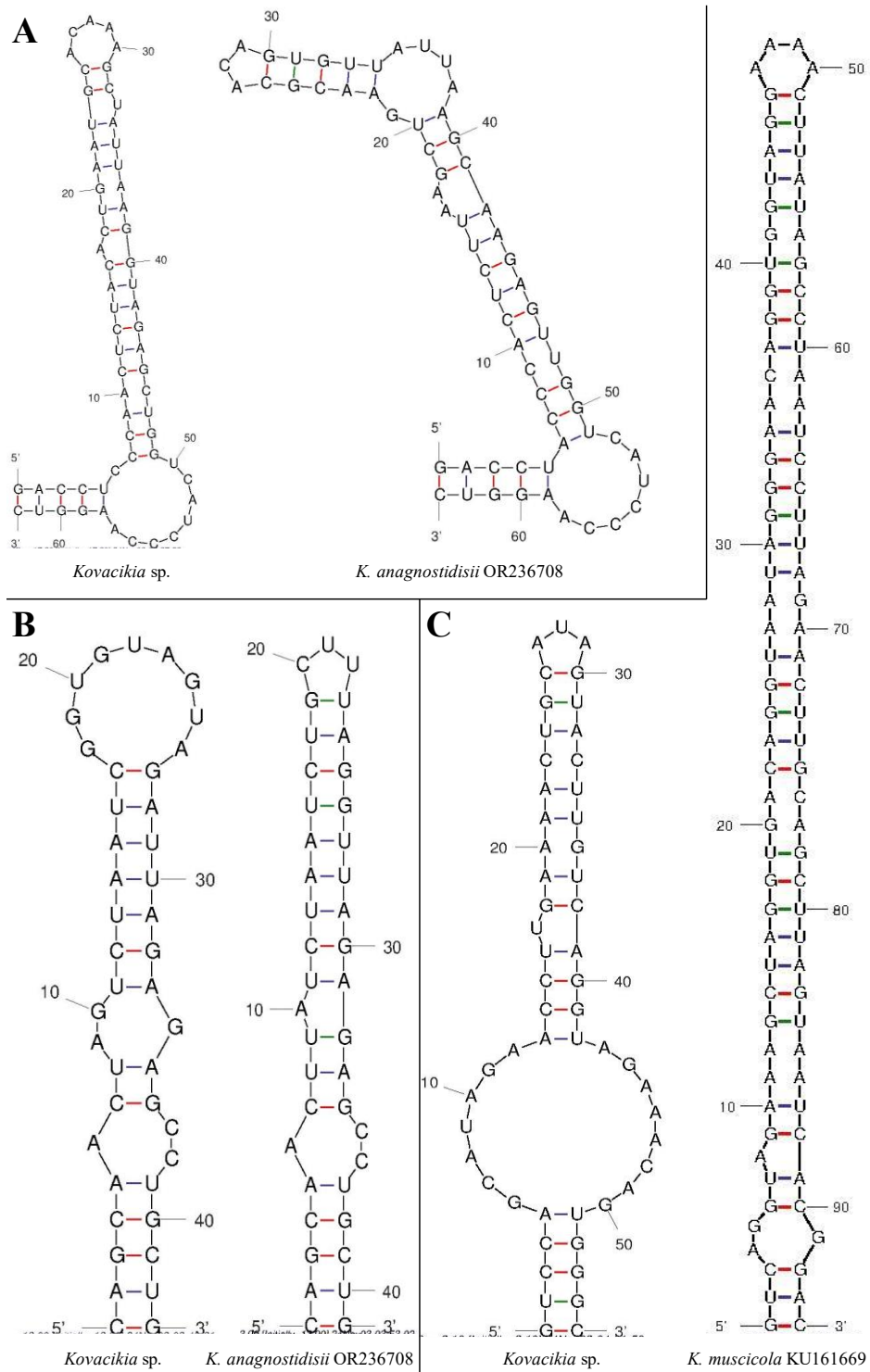
Por fim, o domínio V3 (Figura 4C), com sequência de base comum à ordem (5'GUCCA...GUGGG3'), conta com 55 pares de base, apenas um *loop* grande ao longo da cadeia e ausência do terminal. Estas características divergem do descrito para *K. muscicola*, espécie-tipo do gênero, que possui 94 pares de base, ausência de *loops*, ausência de uma citosina e substituição de uma adenina por uma guanina na sequência da base da estrutura (5'GUCAG...CAGGC3'). Tais divergências são justificadas pelas variações previstas para o domínio entre espécies de um mesmo gênero.

As análises filogenéticas (Figura 5) corroboram com a identidade demonstrada pela linhagem isolada, apesar do baixo suporte do ramo, que se trata de um representante do gênero, porém de uma provável espécie nova, uma vez que se forma um clado com as demais espécies do gênero e com *Leptothermofonsia sichuanensis* que, apesar de ser descrita em um gênero diferente, provavelmente também pertença à *Kovacikia*, uma vez que apresenta grandes similaridades morfológicas e ecológicas, além de alta identidade genética com *K. brockii* (KASTOVSKÝ *et al.*, 2023).

Observações: Presente em cultivo.

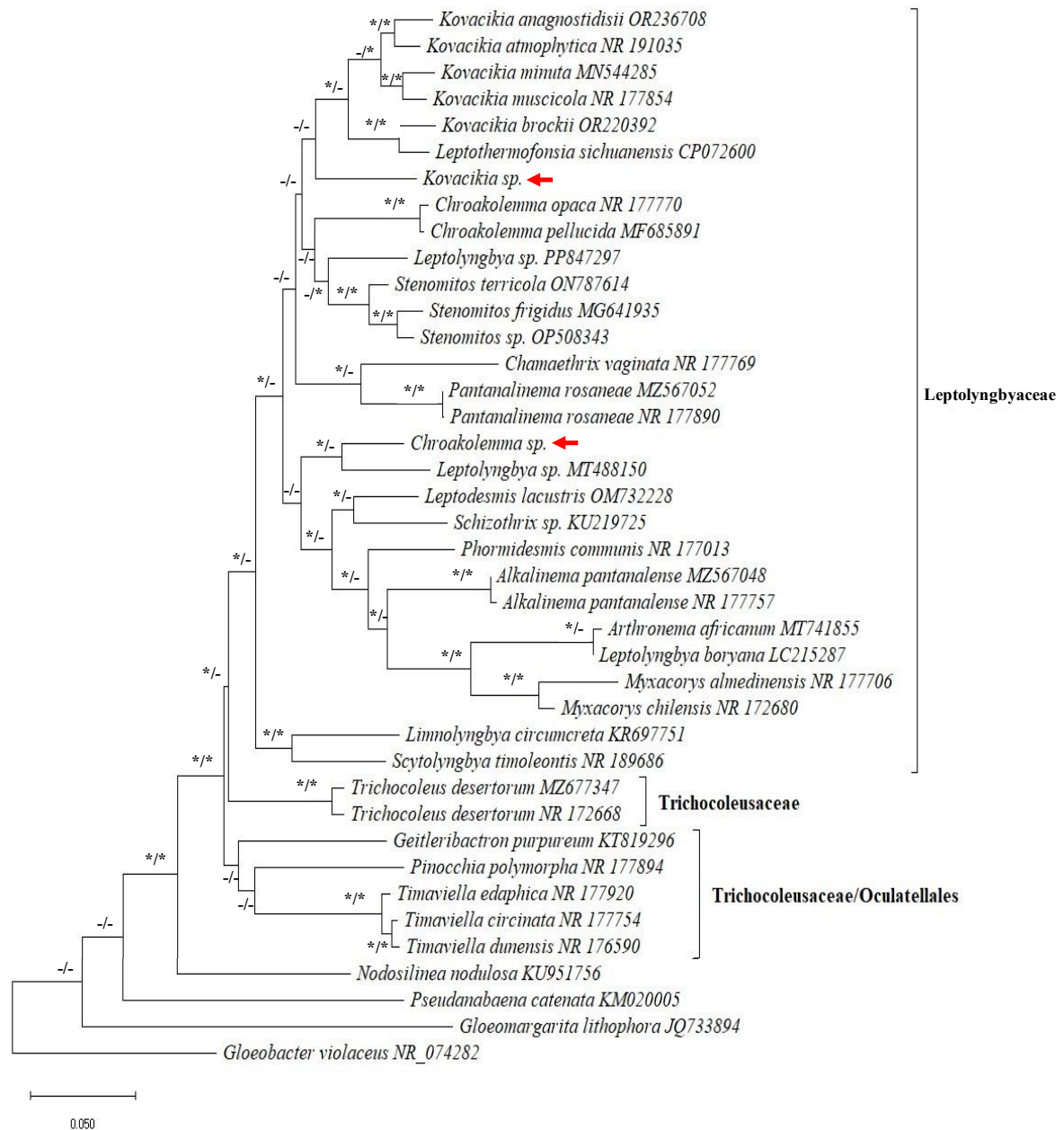
Pontos de ocorrência: FLO2.

Figura 4. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), BoxB (B) e V3 (C) do ITS de *Kovackikia* sp.



Fonte: Autor.

Figura 5. Árvore *consenso* baseada em Máxima Verossimilhança da ordem Leptolyngbyales. Setas: linhagens isoladas. *: valores de suporte maiores que 0,7 de probabilidade posterior e 70% de *bootstrap* . -: valores de suporte menores que 0,7 de probabilidade posterior e 70% de *bootstrap*.



Fonte: Autor.

Leptolyngbya cf. foveolarum (Gomont) Anagnostidis & Komárek (Figura 6B)

Tricomas longos, constrictos, retos, finos, isolados ou emaranhados e bainha ausente ou incolor, fina e aderida ao tricoma; células esféricas isodiamétricas a cilíndricas mais largas do que longas, 3,0 µm de compr. e 3,0-4,0 µm de diâm.; célula apical hemisférica (3,0 µm de

compr. e 4,0 µm de diâm.); conteúdo celular azul-esverdeado, homogêneo e sem grânulos evidentes.

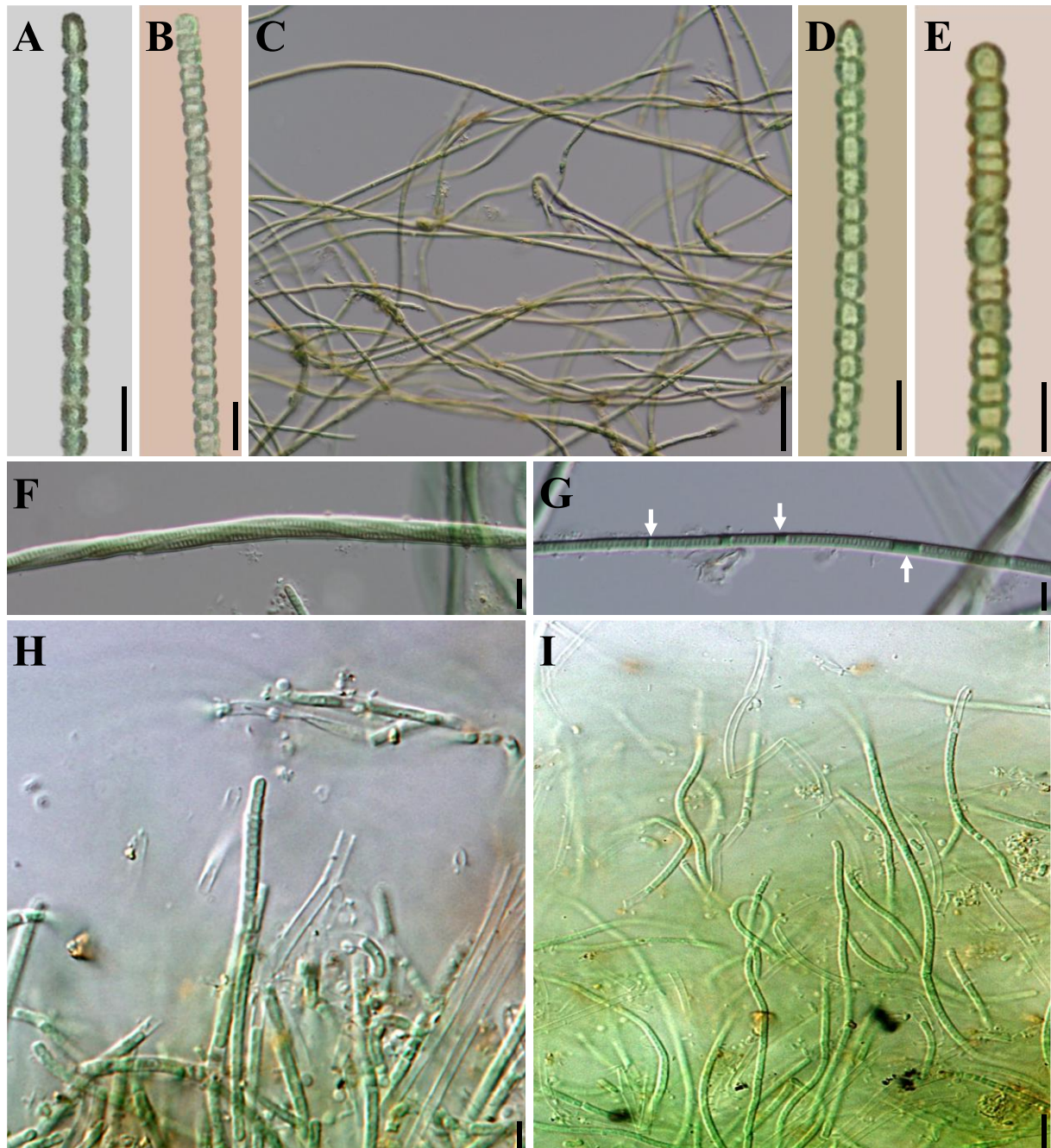
Comentários: As características gerais do tricoma, das células e a ecologia dos espécimes estudados se assemelham a *Leptolyngbya foveolarum*, divergindo um pouco nas medidas celulares. Embora a espécie tenha sido inicialmente isolada de corpos d'água doce (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1988), a ocorrência de *L. foveolarum* já foi reportada em crostas biológicas de solo de ambientes alpinos da Índia (BAKIEVA *et al.*, 2012) e da Rússia (PATOVA, NOVAKOVSKAYA & DENEVA, 2018), na Antártida (BÜDEL & COLESIE, 2014; PUSHKAREVA *et al.*, 2018), nas reservas *Succulent Karoo* e *Nama Karoo*, na África do Sul (DOJANI *et al.*, 2014) e na Ilha de San Nicolas, Estados Unidos (FLECHTNER, JOHANSEN & BELNAP, 2008).

Em contrapartida, apesar da sequência parcial de 416 pb do gene 16S rRNA obtida das populações estudadas apresentaram 94,62% de identidade genética com espécies do gênero *Leptolyngbya*, a pequena quantidade de pares de base, juntamente com a complexidade filogenética do gênero, considerado críptico, torna-se inviável a identificação exata em nível específico.

Observações: Presente em cultivo e no ambiente.

Pontos de ocorrência: FLO1; FLO2; FLO3; FLO5; BSF1; BSF2; BSF4; BSF7.

Figura 6. A. *Pseudanabaena* sp.. B-G. *Chrookolemma* sp. H-I. *Kovacikia* sp. Setas brancas: necrídios. Barras de escala: A-B: 10 µm; C: 50 µm; D-I: 10 µm.



Fonte: Autor.

Ordem Oscillatoriales

Família Microcoleaceae

Microcoleus aff. *subtorulosus* Gomont ex Gomont (Figura 7A)

Filamentos isolados, bainha fina e incolor; tricomas constritos; células em forma de barril, isodiamétricas a mais largas do que longas (9,0-11,0 µm de compr. e 9,0 µm de diâm.); célula apical hemisférica (10,0-11,0 µm de compr. e 9,0 µm de diâm.); conteúdo celular esverdeado, homogêneo, muitos grânulos evidentes.

Comentários: As características observadas nos espécimes em questão se assemelham às descritas para *Microcoleus subtorulosus*, exceto pela organização dos tricomas em feixes e pelo habitat. Porém, estudos anteriores evidenciaram a ocorrência desta espécie em crostas biológicas de solo da Índia (VINOTH *et al.*, 2019) e da América do Norte (BÜDEL, VIVAS & LANGE, 2013; WEBER, BÜDEL & BELNAP, 2016).

Observações: Presente em amostra em cultivo.

Pontos de ocorrência: FLO4.

Microcoleus aff. lacustris (Rabenhorst) Farlow ex Gomont (Figuras 7B-C)

Filamentos longos, flexuosos, bainha fina e incolor; tricomas constritos, entrelaçados em feixes com mais de cinco indivíduos; células mais longas do que largas (12,0-15,0 µm de compr. e 10,0 µm de diâm.); célula apical cilíndrico-arredondada, 15,0 µm de compr. e 10,0 µm de diâm.; conteúdo celular esverdeado, homogêneo e granuloso.

Comentários: A linhagem estudada assemelha-se com o descrito para *Microcoleus lacustris* (Rabenhorst) Farlow ex Gomont, exceto nas dimensões das células e no habitat. Embora seja descrita originalmente habitando corpos de água doce, há registros desta espécie ocorrendo em crostas biológicas de regiões da Índia (TIRKEY & ADHIKARY, 2006; VINOTH *et al.*, 2017), do Irã (HOKMOLLAHI *et al.*, 2017) e da Austrália (WILLIAMS & BÜDEL, 2012).

Observações: Presente em amostra em cultivo e ambiental.

Pontos de ocorrência: BSF1.

Porphyrosiphon notarisii Kützinger ex Gomont (Figuras 7D-G)

Filamentos 26,0-30,0 µm de diâm., bainha avermelhada, lamelada paralelamente nos espécimes da natureza e 14,0-15,0 µm de diâm., bainha incolor ou amarelada, não lamelada nos

espécimes cultivados; células mais largas do que longas, 11,0-13,0 µm de compr. e 18,0-23,0 µm de diâm.; célula apical hemisférica a cilíndrico-arredondada (16,0-18,0 µm de compr. e 16,0 µm de diâm.); conteúdo celular azul-esverdeado, homogêneo, grânulos evidentes; hormogônios morfológicamente idênticos ao tricoma de origem, bainha fina, aderida às células, incolor.

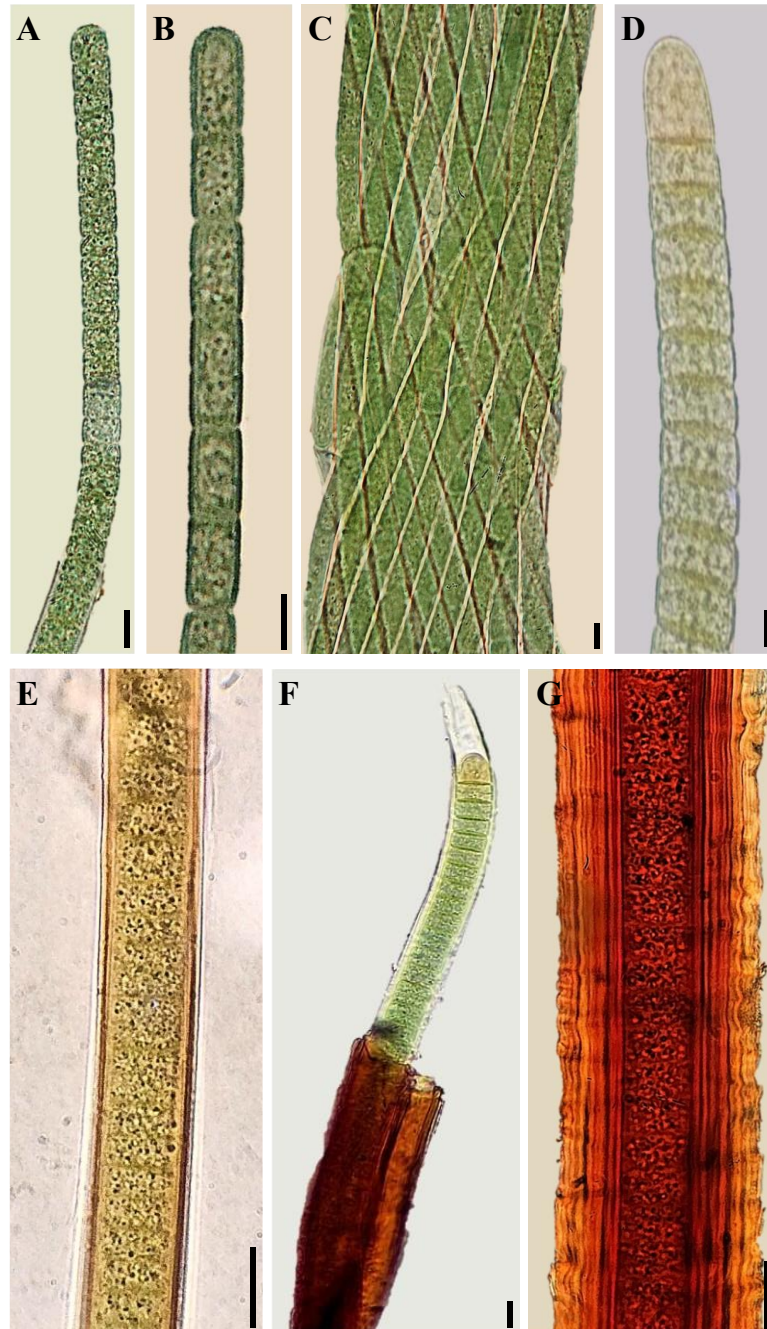
Comentários: Os dados morfológicos e ecológicos dos espécimes estudados coincidem com os de *Porphyrosiphon notarisii* Kützinger ex Gomont, que provavelmente é uma espécie cosmopolita (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005), tendo sido registrada em crostas da África (ULLMAN & BÜDEL, 2003) e da Austrália (WILLIAMS & BÜDEL, 2012). No Brasil, a ocorrência da espécie foi registrada em solos do estado de São Paulo (SANT'ANNA & AZEVEDO, 1995), no Cerrado mineiro e na Caatinga paraibana (MACHADO-DE-LIMA *et al.*, 2019; MACHADO-DE-LIMA *et al.*, 2021).

Embora a identidade genética da sequência parcial de 410 pb do gene 16S rRNA seja de 97,8% com *P. annulatus* Kim *et al.*, espécie descrita a partir de população habitante de solos úmidos da Coréia do Sul (KIM *et al.*, 2022), as características morfológicas e ecológicas são mais coincidentes com as descritas para *P. notarisii*, que exibe características altamente adaptadas a ambientes secos e de alta irradiância, como a produção de grande quantidade de pigmentos fotoprotetores e de EPS. Além disso, *P. notarisii* já foi registrada em crostas da Caatinga (MACHADO-DE-LIMA *et al.*, 2021).

Observações: Presente em amostra em cultivo e ambiental.

Pontos de ocorrência: Todos os pontos amostrados.

Figura 7. A. *Microcoleus* aff. *subtorulosus*. B-C. *Microcoleus* aff. *lacustris*. D-E. *Porphyrosiphon notarisii* em cultivo. F-G. *Porphyrosiphon notarisii* em crosta. Barras de escala: 10 µm.



Fonte: Autor.

Ordem Coleofasciculales

Família Wilmottiaceae

Wilmottiaceae sp. (Figuras 11A-B)

Filamentos longos, bainha fina e incolor; tricomas constritos dispostos paralelamente em feixes com mais de cinco indivíduos e abertos na extremidade; células isodiamétricas a mais longas do que largas (10,0-12,0 µm de compr. e 10,0 µm de diâm.); célula apical cônico-arredondada, 13,0-15,0 µm de compr. e 10,0 µm de diâm.; conteúdo celular azul-esverdeado, homogêneo, grânulos evidentes.

Comentários: A sequência parcial do gene 16S rRNA demonstrou 94,13% de identidade com cianobactérias não cultivadas de comunidades hipolíticas do nordeste da Austrália (TRACY *et al.*, 2009) e 93,89% com *Pycnacronema brasiliensis* Martins & Branco, isolada de crostas biológicas do Cerrado (MARTINS, MACHADO-DE-LIMA & BRANCO, 2019). Porém, as características morfológicas se assemelham às descritas para as famílias Microcoleaceae e Coleofasciculaceae principalmente quanto a formação de feixes de tricomas e divergindo, porém, na dimensão das células. Tais famílias são filogeneticamente próximas (STRUNECKÝ, IVANOVA & MAREŠ, 2023) e têm representantes com ocorrências registradas em crostas biológicas de solo do mundo todo (TRACY *et al.*, 2010; BAKIEVA *et al.*, 2012; PUSHKAREVA *et al.*, 2018).

Em contrapartida, a maior identidade genética obtida se dá com um representante de Wilmottiaceae e, desta forma, optou-se por identificá-la apenas em nível de família, uma vez que a sequência obtida não tem resolução suficiente para identificação em nível genérico e específico.

Pycnacronema conicum Martins & Branco (Figuras 11C-D)

Filamentos longos e isolados, bainha fina, incolor e granulosa; células isodiamétricas a mais longas do que largas (7,0-8,3 µm de compr. e 7,0 µm de diâm.); célula apical hemisférica (11,0-13,0 µm de compr. e 7,0 µm de diâm.); conteúdo celular verde-pálido, homogêneo, grânulos muito evidentes.

Comentários: A morfologia observada se assemelha à descrita para *Pycnacronema conicum* Martins & Branco, espécie isolada de amostras de casca de árvore do campus da UNESP (MARTINS, MACHADO-DE-LIMA & BRANCO, 2019), com algumas diferenças, tais como a granulação da bainha e a coloração das células. Adicionalmente, a análise da sequência de 1487 pb do gene 16S rRNA garante 99,19% de identidade com *P. conicum*, confirmando ser uma linhagem da espécie em questão.

A análise da estrutura secundária do ITS (Figura 8) revelou que a região D1-D1' (Figura 8A) possui número de pares de bases semelhantes ao descrito para a espécie, assim como a presença de um *loop* terminal (MARTINS, MACHADO-DE-LIMA & BRANCO, 2019). Entretanto, um *loop* pequeno ao longo da estrutura está ausente e uma uracila foi substituída por uma adenina na sequência da base da estrutura (5'GACCA...AGGUC3').

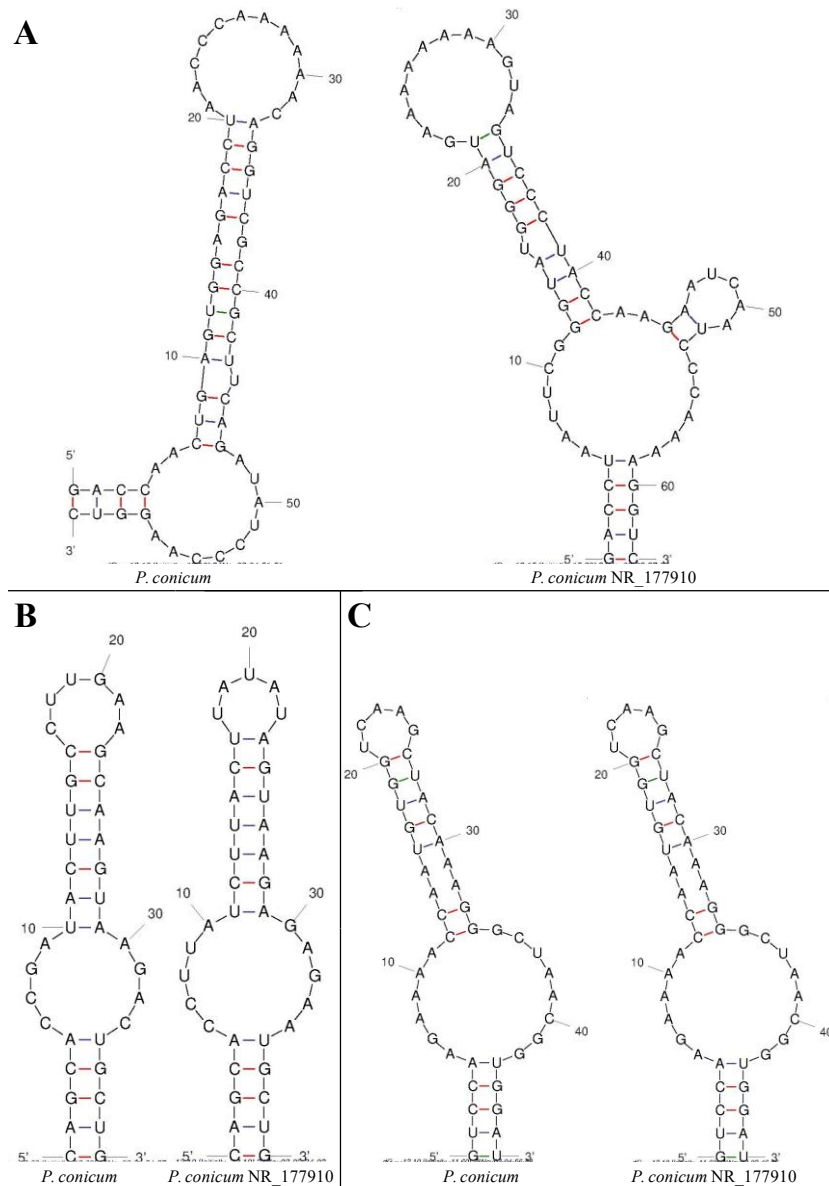
Em contrapartida, as regiões BoxB (Figura 8B) e V3 (Figura 8C) se mostraram idênticas às de *P. conicum* NR_177910, linhagem de maior similaridade com a isolada, incluindo a presença do transportador tRNA^{Ile} (MARTINS, MACHADO-DE-LIMA & BRANCO, 2019).

Adicionalmente, as análises filogenéticas comprovaram a alta identidade da linhagem isolada com a espécie em questão, agrupando-as em um mesmo clado com um alto valor de suporte de ambas as análises (Figura 10).

Observações: Presente em cultivo.

Pontos de ocorrência: FLO1.

Figura 8. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), BoxB (B) e V3 (C) do ITS de *Pycnacronema conicum*.



Fonte: Autor.

Gracilinea arenicola Machado-de-Lima & Branco (Figuras 11E-F)

Filamentos longos, flexuosos, bainha fina e incolor; tricomas deslizantes, dispostos paralelamente em feixes com mais de cinco indivíduos e abertos na extremidade; células isodiamétricas a mais longas do que largas (7,0-9,0 µm de compr. e 7,0 µm de diâm.); célula

apical cônico-arredondada, 11,0 µm de compr. e 7,0 µm de diâm.; conteúdo celular esverdeado, homogêneo, sem grânulos evidentes.

Comentários: As características morfológicas observadas se assemelham às descritas para *Gracilinea arenicola* Machado-de-Lima & Branco, espécie isolada de crostas biológica de Caatinga (MACHADO-DE-LIMA & BRANCO, 2020), mesmo bioma de estudo do presente trabalho, assim como a sequência de 1487 pb do gene 16S rRNA, que se mostrou 97,43% idêntica ao da espécie em questão.

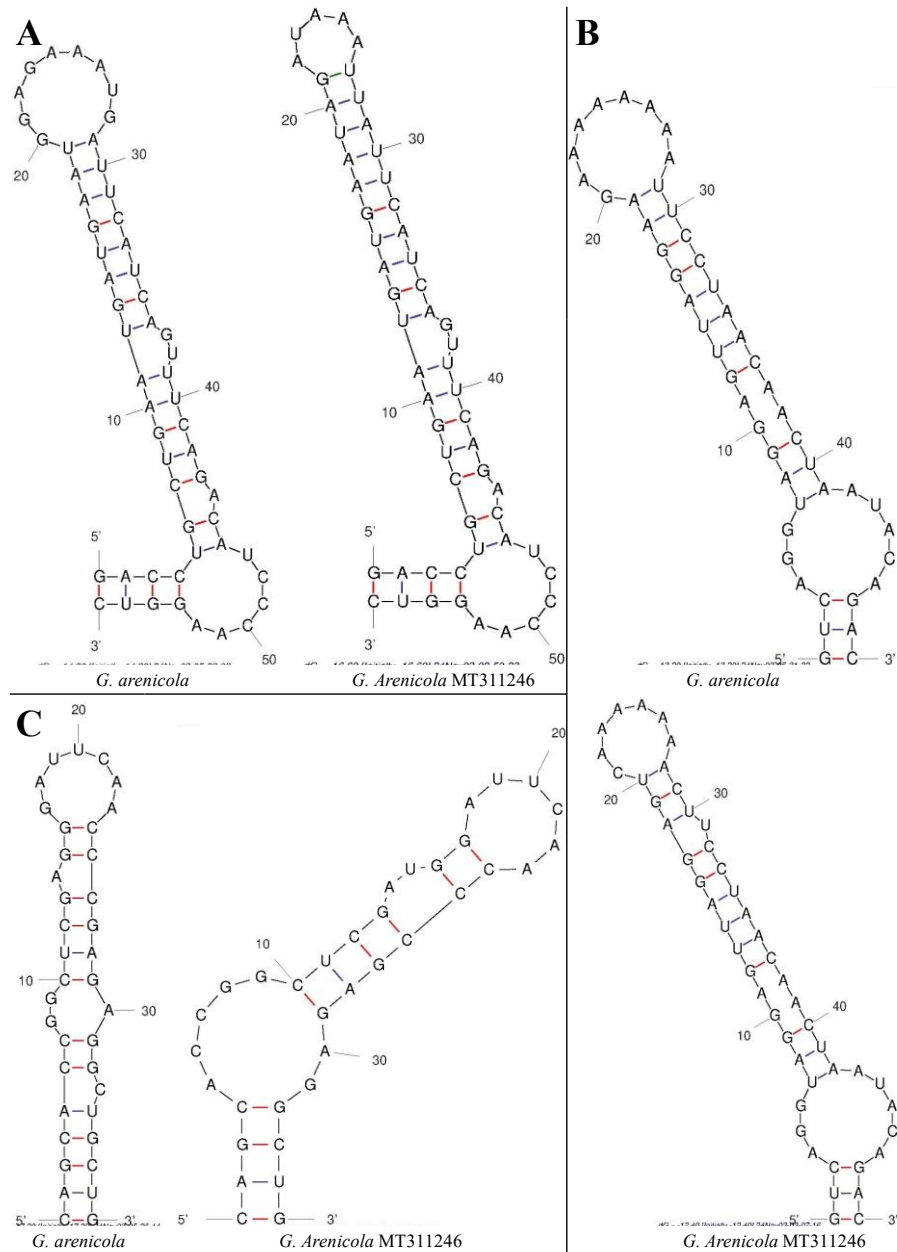
Na análise da estrutura secundária do ITS (Figura 9), o domínio D1-D1' (Figura 9A) se mostrou idêntico ao descrito para a linhagem de maior identidade, com exceção da presença de um *loop* terminal grande. O mesmo ocorreu com o domínio BoxB (Figura 9B), com exceção da ausência de um *loop* grande ao longo da estrutura, e com V3 (Figura 9C) (MACHADO-DE-LIMA & BRANCO, 2020). Com relação aos transportadores, apenas o tRNA^{Ile} foi encontrado assim como na espécie-tipo do gênero.

Além das análises morfológicas e ecológicas e das estruturas secundárias do ITS, a filogenia comprovou a identidade da linhagem isolada com *G. arenicola* MT311246, agrupando-as em um mesmo clado com alto suporte de ambas as análises feitas (Figura 10).

Observações: Presente em cultivo e no ambiente.

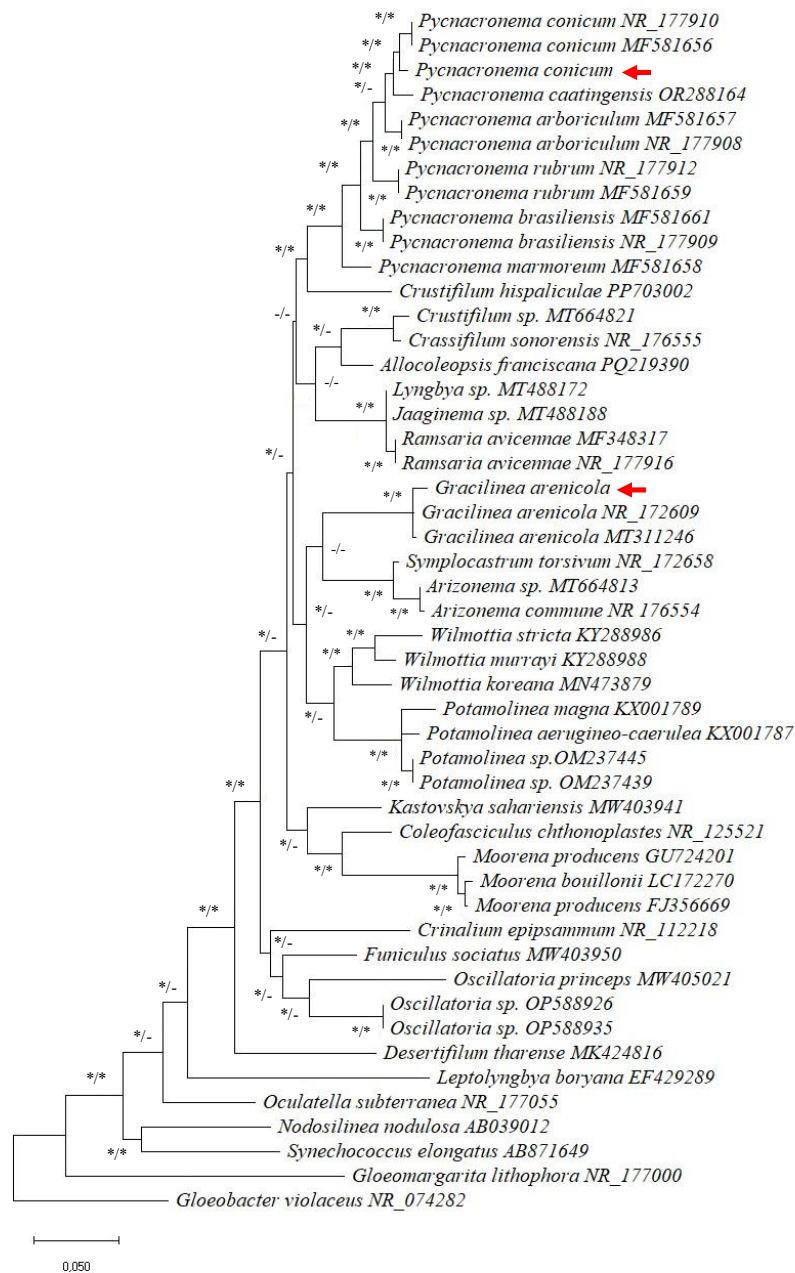
Pontos de ocorrência: FLO2; BSF3.

Figura 9. Comparação das estruturas secundárias das regiões D1-D1' (A), BoxB (B) e V3 (C) do ITS de *Gracilinea arenicola*.



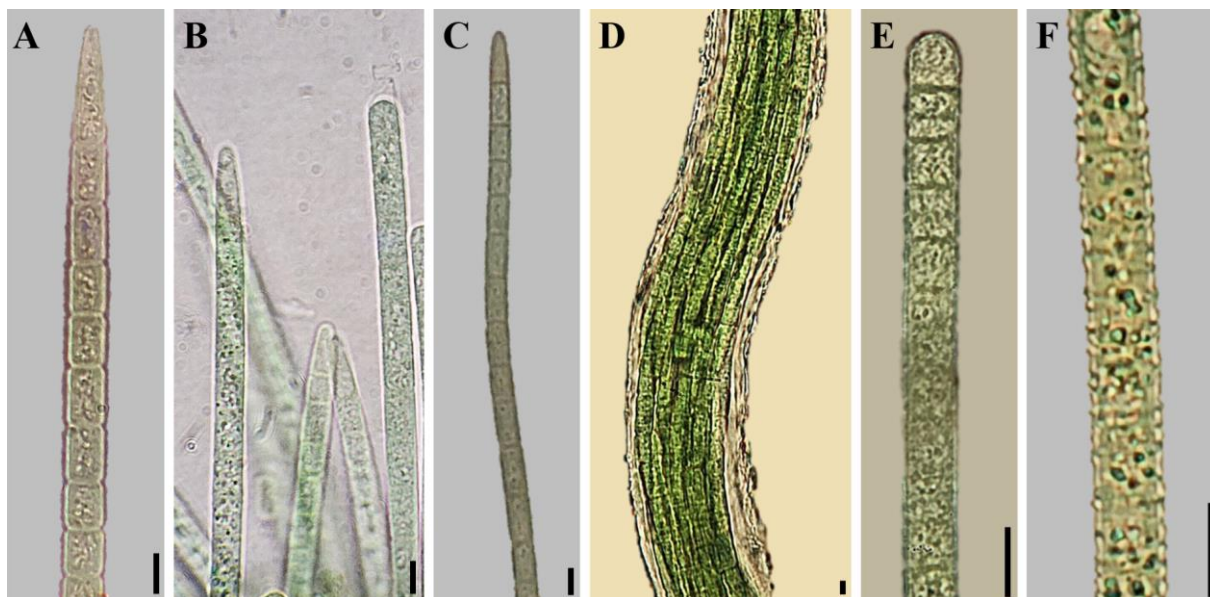
Fonte: Autor.

Figura 10. Árvore *consenso* baseada em Máxima Verossimilhança da ordem Coleofasciculales. Setas: linhagens isoladas. *: valores de suporte maiores que 0.7 de probabilidade posterior e 70% de *bootstrap*. -: valores de suporte menores que 0.7 de probabilidade posterior e 70% de *bootstrap*.



Fonte: Autor.

Figura 11. A-B. Wilmottiaceae sp. C-D. *Gracilinea arenicola*. E-F. *Pycnacronema conicum*. Barras de escala: 10 μm .



Fonte: Autor.

Ordem Nostocales

Família Scytonemataceae

Scytonema hyalinum Gardner (Figura 12A)

Filamentos espessos (13,0-15,0 μm de diâm.); bainha espessa, amarelada ou castanha; ramificações falsas morfologicamente idênticas ao tricoma principal; células mais largas do que longas, 10,0-12,0 μm de compr., 16,0 μm de diâm.; célula apical hemisférica; conteúdo celular azul-esverdeado, homogêneo, sem grânulos evidentes; heterócitos intercalares, cilíndricos ou cúbicos (14,0-15,0 μm de diâm.).

Comentários: Os espécimes estudados possuem características morfológicas e ecológicas comuns a *Scytonema hyalinum* Kützinger, assim como alta identidade genética (98,2%) da sequência parcial de 336 pb do gene 16S rRNA.

Há muitos registros de *S. hyalinum* ocorrendo em crostas biológicas de solo, sendo muitas vezes considerados componentes-chave destas comunidades, dependendo do ambiente (RIVERA-AGUILAR *et al.*, 2006), uma vez que apresentam adaptações para ambientes extremos e capacidade de fixação de nitrogênio. A ocorrência desta espécie em crostas se dá de

forma ampla, tendo sido encontrada em desertos (BHATNAGAR *et al.*, 2008) e bosques (Vinoth *et al.*, 2017; 2019) da Índia, no Cerrado e Caatinga brasileiros (MACHADO-DE-LIMA *et al.*, 2019; 2021) e em ambientes da América do Norte e da África (WEBER, BÜDEL & BELNAP, 2016).

Observações: Presente em cultivo e no ambiente.

Pontos de ocorrência: Todos os pontos amostrados.

Família Nostocaceae

Nostoc sp.1 (Figuras 12B-D)

Colônias amorfas, mucilagem hialina; células esféricas ou em forma de barril (5,0-7,0 µm de compr. e 6,0-8,0 µm de diâm.); célula apical hemisférica, 7,0 µm de compr. e 6,0 µm de diâm.; conteúdo celular verde-claro, homogêneo, grânulos ausentes; heterócitos ovais (8,0 de compr. e 8,0 de diâm.), terminais, com um poro em apenas uma das extremidades; acinetos não observados.

Comentários: A sequência parcial do gene 16S rRNA (416 pb) obtida demonstrou 99,04% de identidade com o gênero *Nostoc*, apesar de também ter mostrado alta identidade com *Dendronalium* e *Coleospermum* (98,8%).

As características morfológicas e ecológicas se assemelham mais com o descrito para *Nostoc*, uma vez que *Dendronalium* caracteriza-se por apresentar tricomas entrelaçados ou emaranhados, divergindo do observado na linhagem estudada, assim como a ecologia, já que *D. phyllosphericum* Alvarenga *et al.* foi isolada de árvores de biomas úmidos brasileiros (ALVARENGA *et al.*, 2021) e *D. spirale* Pal *et al.* isolada de solos úmidos da Índia (PAL *et al.*, 2024).

O mesmo ocorre com relação ao gênero *Coleospermum*, com o qual há divergências ecológicas, já que *C. goeppertianum* Kirchner ex Frank, única espécie descrita, foi isolada de corpos d'água doce, e morfológicas, com o gênero em questão apresentando tricomas heteropolares, com heterócitos terminais e ápice muito acuminado, característico das famílias Leptobasaceae (a qual pertence) e Rivulariaceae (STRUINECKÝ, IVANOVA & MAREŠ, 2023).

Contudo, a não observação de acinetos torna inviável a identificação precisa em nível específico.

Observação: Presente em cultivo e no ambiente.

Pontos de ocorrência: BSF1.

Nostoc sp.2 (Figuras 12E-F)

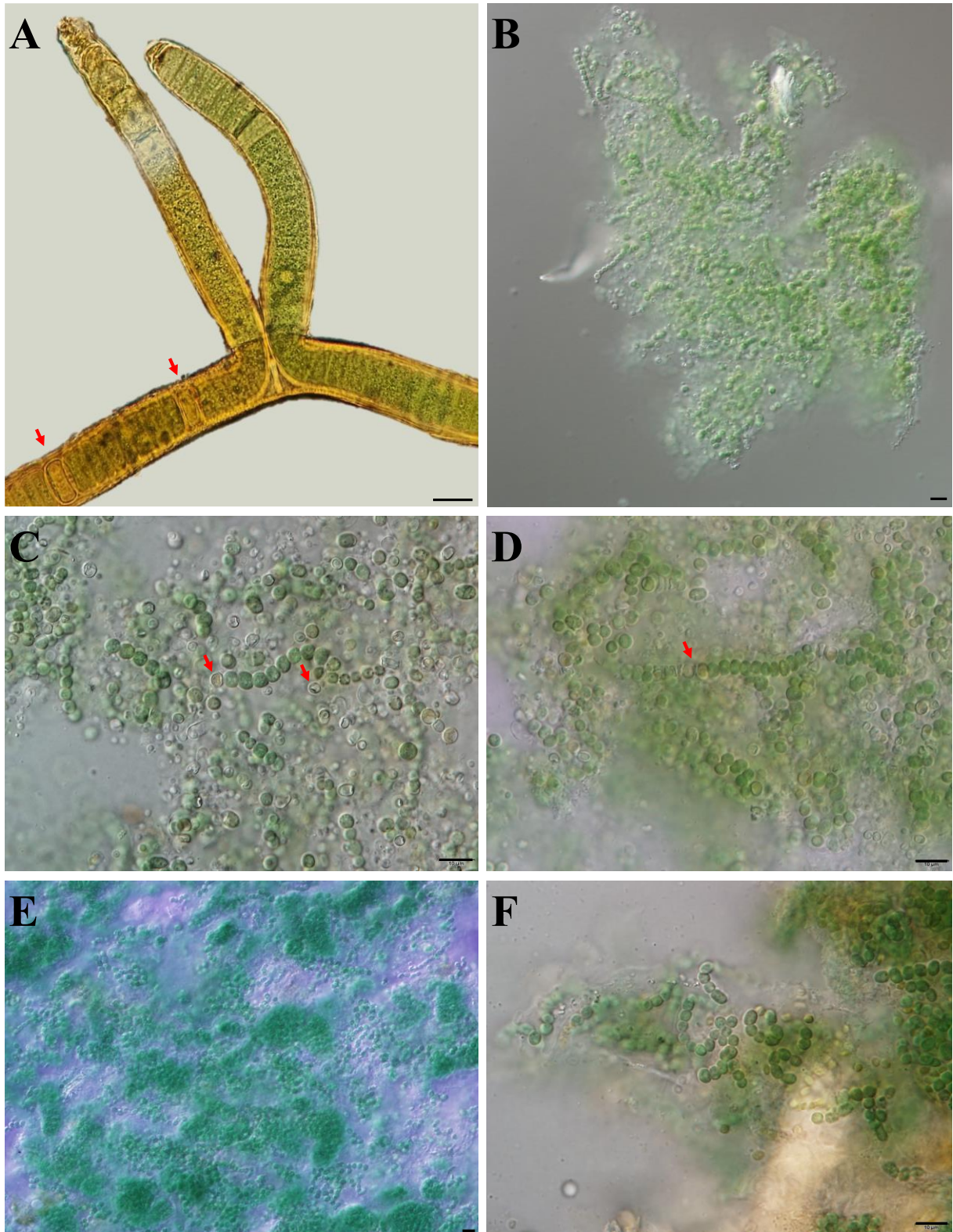
Colônias esféricas, ovais ou irregulares, mucilagem incolor ou verde-amarelada; tricomas constrictos, curtos e flexuoso; células em forma de barril, isodiamétricas a mais longas do que largas (5,0-7,0 μm de compr. e 5,0 μm de diâm.); célula apical hemisférica, 5,0 μm de diâm.; conteúdo celular com coloração esverdeada de tonalidade variável, homogêneo e grânulos evidentes; acinetos e heterócitos não observados.

Comentários: A sequência parcial de 416 pb do gene 16S rRNA obtida mostrou identidade de 99,5% com *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault, espécie tida como cosmopolita e de extrema importância para a estruturação das crostas biológicas de solo (BÜDEL *et al.*, 2016), tendo sido, inclusive, encontrada previamente no Cerrado brasileiro (MACHADO-DE-LIMA, 2016). Apesar disso, a pequena quantidade de bases sequenciadas, juntamente com a ausência de heterócitos e acinetos, tornam inviáveis a confirmação precisa da espécie a que a linhagem pertence.

Observação: Presente em cultivo e no ambiente.

Pontos de ocorrência: FLO5.

Figura 12. A. *Scytonema hyalinum*. B-D. *Nostoc* sp.1. E-F. *Nostoc* sp.2. Setas: heterócitos. Barras de escala: 10 μ m.



Fonte: Autor.

Nostoc sp.3 (Figuras 13A-C)

Colônias esféricas ou amorfas, mucilagem amarelada; tricoma constrito; células em forma de barril, isodiamétricas a mais longas do que largas (7,0-8,0 µm de compr. e 7,0 µm de diâm.); célula apical esférica 8,0 µm de compr. e 7,0 µm de diâm.; conteúdo celular verde-amarronzado, homogêneo, grânulos ausentes; heterócitos terminais esféricos isodiamétricos (8,0 de compr. e 8,0 de diâm.); acinetos não observados.

Comentários: A sequência parcial (421 pb) do gene 16S rRNA obtida mostrou identidade de 98,1% com *Nostoc* e de 97,86% com *Desikacharya* e, apesar da pouca quantidade de pares de base sequenciadas e da observação de poucos heterócitos e nenhum acineto, as demais características morfológicas da linhagem isolada reforçam a maior semelhança com o primeiro gênero, uma vez que não foi observado nenhum tricoma espiralado, característico do segundo gênero (KABIRNATAJ *et al.*, 2020).

A falta de acinetos impossibilita a identificação específica.

Observação: Presente em cultivo e no ambiente.

Pontos de ocorrência: BSF5.

Nostoc sp.4 (Figura 13D-F)

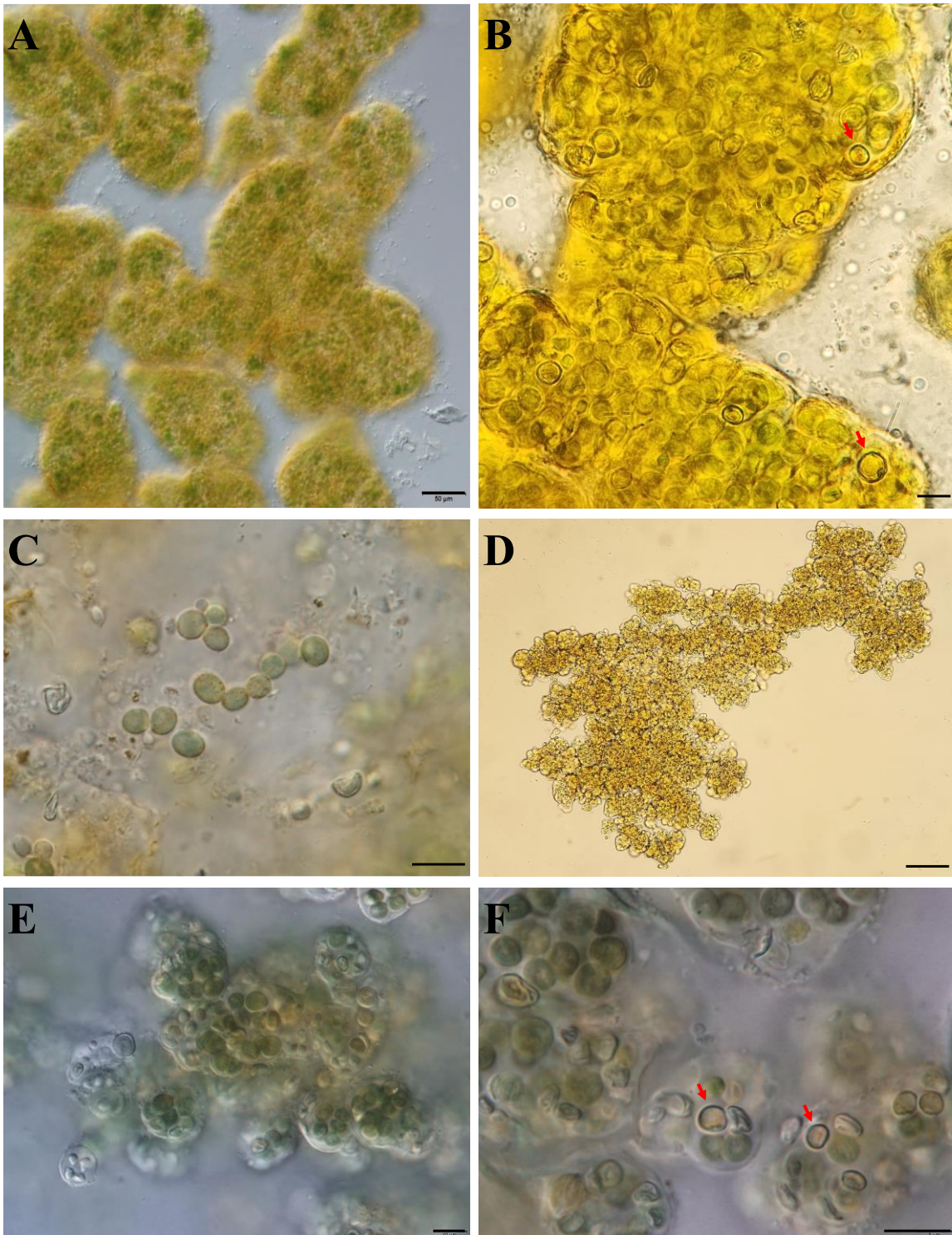
Colônias amorfas, mucilagem acastanhada; tricomas constrictos, curtos e flexuoso; células em forma de barril a esféricas (5,0-7,0 µm de compr. e 5,0-6,0 µm de diâm.); célula apical cônico-arredondada, 7,0 µm de compr. e 5,0 µm de diâm.; conteúdo celular com amarronzada de tonalidade variável, homogêneo e grânulos pouco evidentes; heterócitos intercalares ovais ou esféricos (5,0-7,0 de compr. e 6,0-7,0 de diâm.); acinetos não observados.

Comentários: A sequência parcial do 16S rRNA (395 pb) obtida para esta linhagem é 97,16% idêntica aos gêneros *Nostoc* e *Compactonostoc*, porém as características morfológicas e, principalmente, ecológicas são mais semelhantes às descritas para o primeiro táxon, uma vez que *C. shennongjianese* Cai & Li, única espécie do gênero, foi isolada de paredões rochosos úmidos de uma região temperada da China (CAI & LI, 2019), ambiente divergente ao da linhagem estudada. A falta de acinetos impossibilita a identificação específica.

Observação: Presente em cultivo e no ambiente.

Pontos de ocorrência: BSF7.

Figura 13. A-C. *Nostoc* sp.3. D-F. *Nostoc* sp.4. Setas: heterócitos. Barras de escala: A; D: 50 μ m. B; C; E; F: 10 μ m.



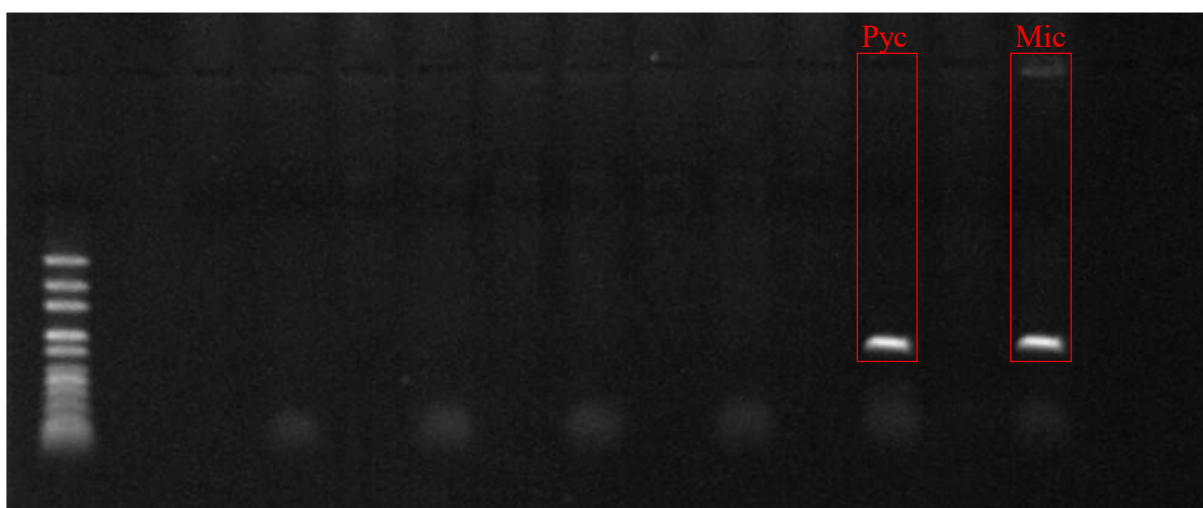
Fonte: Autor.

5.3. Potencial de produção de toxinas

Não houve a amplificação do gene *mcyE* em nenhum dos isolados, sugerindo que nenhuma das linhagens é potencialmente produtora de microcistina.

Por outro lado, na análise de presença do gene *sxtA*, comum em cianobactérias produtores de saxitoxinas, foi obtido resultado positivo para *Pycnacronema conicum* e *Microcoleus* aff. *lacustris* (Figura 14). Porém, as análises posteriores com *primers* complementares e mais específicos para detecção de *sxtA* e de *sxtI* foram negativas para ambos os genes. Devido a isso, os resultados obtidos no primeiro momento podem ser amplificações de outros genes envolvidos na expressão de outras moléculas das próprias cianobactérias estudadas ou de outras bactérias associadas a elas no cultivo.

Figura 14. Eletroforese do produto de PCR do gene *sxtA* de algumas das linhagens estudadas. Pyc: *Pycnacronema conicum*. Mic: *Microcoleus* aff. *lacustris*.



Fonte: Autor.

Desta forma, nenhuma das linhagens estudadas possui, efetivamente, nenhum dos genes propostos envolvidos na produção das toxinas estudadas. Neste contexto, a ausência de cepas potencialmente tóxicas em crostas biológicas de solo se mostra benéfica para o ambiente, já que, embora haja poucos estudos dedicados a investigar a produção de toxinas por cianobactérias de solo, sabe-se que algumas espécies terrestres, tais como *Anabaena laxa* Braun (FRANKMÖLLE *et al.*, 1992) e *Microchaete loktakensis* Brüh & Biswas (BONJOUKLIAN *et al.*, 1996), são capazes de produzir tais substâncias.

Contudo, a ausência de espécies potencialmente tóxicas vivendo no solo não exclui, de fato, a presença das toxinas no ambiente, uma vez que o contato com água contaminada também sirva de veículo para a contaminação (SAQRANE & OUDRA, 2009). Tal fato pode justificar a presença destes contaminantes, mesmo onde não há potenciais produtores (CHATZIEFTHIMIOU, BANACK & COX, 2021) e, embora haja escassez de estudos na área, Martins & Vasconcelos (2011) sugerem, como principal consequência, a biomagnificação das cianotoxinas ao longo da cadeia alimentar, na qual se inserem através da absorção pelas raízes das plantas.

Adicionalmente, os metabólitos tóxicos, quando absorvidos, também podem trazer danos aos vegetais como causar estresse oxidativo severo, afetar a captação de minerais do solo, reduzir taxa de germinação de sementes em decorrência da atividade alelopática e causar mal formações em tecidos jovens (CORBEL, MOUGIN & BOUAÏCHA, 2014; MILLER & RUSSELL, 2017; REDOUANE *et al.*, 2019).

6. Conclusão

O levantamento taxonômico realizado no presente trabalho revelou a presença táxons já conhecidos para outras áreas da Caatinga, assim como a ocorrência de gêneros e espécies potencialmente, novas. Também foi possível constatar a ocorrência de alguns táxons que já foram registrados em outros biomas semelhantes ao do estudo em outras regiões do mundo, agregando ainda mais conhecimento a respeito da distribuição ecológica das espécies e para a taxonomia das cianobactérias. Contudo, devido à complexidade das avaliações e a algumas dificuldades na obtenção dos dados, mais estudos são necessários para complementar as informações taxonômicas obtidas, a fim de conferir maior robustez aos resultados produzidos.

Quanto à produção de toxinas, estudos mais aprofundados utilizando-se um conjunto mais amplo de genes e uma variedade maior de toxinas, assim como a análise da produção efetiva e a presença destes metabólitos no solo são necessários. Isto será importante para atestar, ou excluir, a capacidade de produção desses produtos pelas cianobactérias de crostas biológicas, além de avaliar os potenciais riscos ao ambiente e aos organismos ali presentes.

Desta forma, há perspectiva de dar continuidade aos estudos aqui iniciados, visando melhorar os dados já obtidos e produzir os que ainda faltam, principalmente para a identificação das espécies. As crostas biológicas da Caatinga são ainda pouco estudadas, mas demonstram

potencial para aplicações práticas em trabalhos de proteção e restauração ambiental. Para que estas iniciativas sejam bem-sucedidas, é necessário o conhecimento adequado da composição taxonômica das crostas das diferentes regiões, principalmente quanto aos componentes cianobacterianos, seus principais integrantes. Considerando-se a grande diversidade de cianobactérias nestas comunidades e a provável presença de inúmeros táxons ainda desconhecidos, o detalhamento dos trabalhos, bem como a ampliação das áreas de estudo, são iniciativas desejáveis e recomendadas.

Referências

- ABDALLAH, M. F. *et al.* Cyanotoxins and food contamination in developing countries: review of their types, toxicity, analysis, occurrence and mitigation strategies. *Toxins*, v. 13, p. 786, 2021.
- AL-SODANY, Y. M. *et al.* Diversity of soil cyanobacteria in relation to dominant wild plants and edaphic factors at Western Saudi Arabia. *Annual Research & Review in Biology*, v. 26, p. 1-14, 2018.
- AL-TEBRINEH, J. *et al.* Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 1-8, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVARENGA, D. O. *et al.* *Amazonocrinis nigriterrae* gen. nov., sp. nov., *Atlanticothrix silvestris* gen. nov., sp. nov. and *Dendronalium phyllosphericum* gen. nov., sp. nov., nostocacean cyanobacteria from Brazilian environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 71, p. 1-12, 2021.
- ALVES, J. A. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. *Revista Caatinga*, v. 21, p. 245-254, 2008.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 80, p. 327-472, 1988.
- AZÚA-BASTOS, A. *et al.* Hypolithic cyanobacteria supported mainly by fog in the coastal range of the Atacama Desert. *Zonas Áridas*, v. 61, p. 568-581, 2011.
- BAKIEVA, G. R. *et al.* Ecological-floristic analysis of soil algae and cyanobacteria on the Tra-Tau and Yurak-Tau Mounts, Bashkiria. *Eurasian Soil Science*, v. 45, p. 873-881, 2012.
- BALLOT, A. *et al.* Paralytic Shellfish Poisoning Toxin-Producing Cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in Northeast Germany. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p. 1173-1180, 2010.
- BECERRA-ABSALÓN, I. *et al.* *Chroakolemma* gen. nov. (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria) from soil biocrusts in the semi-desert Central Region of Mexico. *Phytotaxa*, v. 367, p. 201-218, 2018.
- BELNAP, J. Crusts: Biological. In: HILLEL, D. *et al.* (Eds.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Oxford: Elsevier, p. 339-347, 2005.
- BELNAP, J. Nitrogen fixations in biological soil crusts from southeast Utah, USA. *Biological Fertilization of Soils*, v. 35, p. 128-135, 2002.
- BELNAP, J. The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological Processes*, v. 20, p. 3159-3178, 2006.
- BELNAP, J.; BÜDEL, B.; LANGE, O. L. Biological soil crusts: characteristics and distribution. In: BELNAP, J.; LANGE, O. L. (Eds.). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Berlin: Springer, p. 3-30, 2003.

- BHATNAGAR, A. *et al.* Community structure and diversity of cyanobacteria and green algae in the soils of Thar Desert (India). *Journal of Arid Environments*, v. 72, p. 73-83, 2008.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; PICCIN-SANTOS, V.; GOUVÊA-BARROS, S. Microcystin-producing genotypes from cyanobacteria in Brazilian reservoirs. *Environmental Toxicology*, v. 27, p. 461-471, 2012.
- BONJOUKLIAN, R. *et al.* A90720A, a serine protease inhibitor isolated from a terrestrial blue-green alga *Microchaete loktakensis*. *Tetrahedron*, v. 52, p. 395-404, 1996.
- BORGES, H. L. F. *et al.* Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacteria strains isolated from the northeast of Brazil. *Harmful Algae*, v. 43, p. 45-57, 2015.
- BORIE, I.; IBRAHEEM, M. Preliminary survey of microalgal soil crusts in a xeric habitat (Wadi-Araba, Eastern Desert, Egypt). *Egyptian Journal of Phycology*, v. 4, p. 19-35, 2003.
- BORNET, E.; FLAHAULT, C. Révision des Nostocacées hétérocystées, contenues dans les principaux herbiers de France. *Annales des Sciences Naturelles*, v. 1, n. 3, p. 323-381; v. 1, n. 4, p. 343-373; v. 1, n. 5, p. 51-129; v. 1, n. 7, p. 177-262, 1886.
- BOURRELLY, P. *Les algues d'eau douce: initiation à la systématique, 3: Les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines*. Paris: Editions N. Bouée & Cie, 1970.
- BÜDEL, B.; COLESIE, C. Biological soil crusts. In: COWAN, D. A. (Ed.). *Antarctic terrestrial microbiology: physical and biological properties of Antarctic soil habitats*. Heidelberg: Springer, 2014. p. 131-161.
- BÜDEL, B. *et al.* Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microbial Ecology*, v. 57, p. 289-247, 2009.
- BÜDEL, B.; VIVAS, M.; LANGE, O. L. Lichen species and the resulting photosynthetic behavior of Sonoran Desert soil crust types (Baja California, Mexico). *Ecological Processes*, v. 2, p. 1-9, 2013.
- CAI, F. F.; LI, R. H. Validation of *Compactonostoc shennongjiaense* gen. et sp. nov. (Nostocaceae, Cyanobacteria). *Notulae Algarum*, v. 121, p. 1, 2019.
- CARMICHAEL, W. W. *et al.* Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 663-668, 2001.
- CASTENHOZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Group I. Cyanobacteria. Preface. In: HOLT, J. G. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 3, p. 1710-1727. Williams & Wilkins, 1989.
- CHAMIZO, S. *et al.* Cyanobacteria inoculation as a potential tool for stabilization of burned soils. *Restoration Ecology*, v. 28, p. 1-9, 2020.
- CHATZIEFTHIMIOU, A. D. *et al.* Biocrust-produced cyanotoxins are found vertically in the desert soil profile. *Neurotoxicity Research*, v. 39, p. 42-48, 2021.
- CHORUS, I.; MARTIN, W. (Eds.). *Toxic Cyanobacteria in Water*. London: Taylor & Francis, 2021. p. 85.
- CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology Applied Pharmacology*, v. 203, p. 264-272, 2005.
- CORBEL, S.; MOUGIN, C.; BOUAÏCHA, N. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops—A review. *Chemosphere*, v. 96, p. 1-15, 2014.
- HUO, N. *et al.* Cyanobacterial blooms in China: diversity, distribution, and cyanotoxins. *Harmful Algae*, v. 109, 2021.

- DARRIBA, D. *et al.* ModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DE JESUS, J. B. *et al.* Influence of anthropization on the floristic composition and phytosociology of the Caatinga susceptible to desertification in the state of Sergipe, Brazil. *Tropical Ecology*, v. 63, p. 398–408, 2022.
- DESIKACHARY, T. V. *Cyanophyta*. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research, 1959.
- DIRBORNE, C. M.; RAMANUJAM, P. Cyanobacteria and algae in biological soil crust of East Khasi Hills, Meghalaya. *Journal of Algal Biomass Utilization*, v. 11, p. 13–24, 2020.
- DOJANI, S. *et al.* Rapid succession of biological soil crusts after experimental disturbance in the Succulent Karoo, South Africa. *Applied Soil Ecology*, v. 48, p. 263–269, 2011.
- DOJANI, S. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria in biological soil crusts of the Succulent Karoo and Nama Karoo of Southern Africa. *Microbial Ecology*, v. 67, p. 286–301, 2014.
- DOWNING, T. G.; PHELAN, R. R.; DOWNING, S. A potential physiological role for cyanotoxins in cyanobacteria of arid environments. *Journal of Arid Environments*, v. 112, p. 147–151, 2015.
- DULIČ, T. *et al.* Assessment of common cyanotoxins in cyanobacteria of biological Loess crusts. *Toxins*, v. 215, p. 1–16, 2022.
- ERIKSSON, J. E. *et al.* Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 173, p. 1347–1353, 1990.
- CHRAPUSTA, E. *et al.* Cyanotoxins uptake and accumulation in crops: Phytotoxicity and implications on human health. *Toxicon*, v. 211, p. 21–35, 2022.
- FASTNER, J.; FLIEGER, I.; NEUMANN, U. Optimized extraction of microcystins from field samples. *Water Research*, v. 32, p. 3177–3181, 1998.
- FLECHTNER, V. R.; JOHANSEN, J. R.; BELNAP, J. The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North America Naturalist*, v. 68, p. 405–436, 2008.
- FRANKMÖLLE, W. P. *et al.* Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I. Isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, v. 45, p. 1451–1457, 1992.
- FRÉMY, P. *Les Cyanophycées de Côtes d'Europe*. Cherbourg: Society of Natural Sciences and Mathematics, 1933. p. 1–234.
- GAO, L. *et al.* Biological soil crusts decrease erodibility by modifying inherent soil properties on the Loess Plateau, China. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 105, p. 49–58, 2017.
- GARCIA-PICHEL, F. *et al.* Timing the evolutionary advent of cyanobacteria and the later Great Oxidation Event using gene phylogenies of a sunscreen. *mBio*, v. 10, p. 10, 2019.
- GARCIA-PICHEL, F.; CASTENHOLZ, R. W. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, v. 27, p. 395–409, 1991.
- GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, S. (Ed.). *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Vol. 2, p. 1196. Akademische Verlagsgesellschaft, 1932.
- GEITLER, L. Diagnosen neuer Blaualgen von den Sunda-Inseln. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, v. 12, p. 622–634, 1933.
- GOMONT, M. M. Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). *Annales des Sciences Naturelles. Botanique*, 7(15), p. 263–368; 16, p. 91–264, 1892.
- GUNDLAPALLY, S. R.; GARCIA-PICHEL, F. The community and phylogenetic diversity of biological soil crusts in the Colorado Plateau studied by molecular fingerprinting and intensive cultivation. *Microbial Ecology*, v. 52, p. 345–357, 2006.

HARADA, T.; OSHIMA, Y.; YASUMOTO, T. Structure of two paralytic shellfish toxins, gonyautoxins V and VI, isolated from a tropical dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressa*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 46, p. 1861–1864, 1982.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Algological Studies (Cyanobacterial Research)*, v. 117, p. 95-115, 2005.

HOKMOLLAHI, F. *et al.* A taxonomic study on non-heterocystous filamentous cyanoprokaryotes from soil of Yazd Province, Iran. *Iranian Journal of Botany*, v. 23, p. 60-71, 2017.

HUO, D. *et al.* Cyanobacterial blooms in China: diversity, distribution, and cyanotoxins. *Harmful Algae*, v. 109, p. 102106, 2021.

ITEMAN, I. *et al.* Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, v. 146, p. 1275-1286, 2000.

JOHANSEN, J. R.; CASAMATTA, D. A. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies*, v. 117, p. 71-93, 2005.

KABIRNATAJ *et al.* Description of novel species of *Aliinostoc*, *Desikacharya* and *Desmonostoc* using a polyphasic approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, p. 3413–3426, 2020.

KAKEH, J. *et al.* Biocrust islands enhance infiltration, and reduce runoff and sediment yield on a heavily salinized dryland soil. *Geoderma*, v. 404, p. 115329, 2021.

KAO, C. Y.; LEVINSON, S. R. *Tetrodotoxin, Saxitoxin, and the Molecular Biology of the Sodium Channel*. New York: The New York Academy of Sciences, 1986. v. 479.

KAŠTOVSKÝ, J. *et al.* Hot Is Rich—An Enormous Diversity of Simple Trichal Cyanobacteria from Yellowstone Hot Springs. *Diversity*, v. 15, p. 975, 2023.

KELLMANN, R. *et al.* Biosynthetic Intermediate Analysis and Functional Homology Reveal a Saxitoxin Gene Cluster in Cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, p. 4044-4053, 2008.

KIM, D.-H. *et al.* *Porphyrosiphon annulatus* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) Isolated on Moist Soil in Suwon, Republic of Korea. *Phytotaxa*, v. 532, n. 3, p. 288-300, 2022.

KLEINER, E. F.; HARPER, K. T. Environmental and Community Organization in Grasslands of Canyonlands National Park. *Ecology*, v. 53, p. 299-309, 1972.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B. *et al.* (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, v. 19/2. Heidelberg: Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, 2005. p. 759.

KOMÁREK, J.; HINDÁK, F. Taxonomy of the New Isolated Strains of *Chroococciopsis* (Cyanophyceae). *Archiv für Hydrobiologie*, v. 13, p. 311-329, 1975.

KOMÁREK, J. *et al.* Taxonomic Classification of Cyanoprokaryotes (Cyanobacterial Genera) 2014, Using Polyphasic Approach. *Preslia*, v. 86, p. 295-335, 2014.

KUMAR, D.; ADHIKARY, S. P. Diversity, Molecular Phylogeny, and Metabolic Activity of Cyanobacteria in Biological Soil Crusts from Santiniketan (India). *Journal of Applied Phycology*, v. 27, p. 339-349, 2015.

KUMAR, D. *et al.* Diversity of Cyanobacteria in Biological Crusts on Arid Soils in the Eastern Region of India and Their Molecular Phylogeny. *Current Science Association*, v. 110, p. 1999-2004, 2016.

- LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Eds.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, Chichester, 1991. p. 115-175.
- LANGHANS, T. M. *et al.* Community Assembly of Biological Soil Crusts of Different Successional Stages in a Temperate Sand Ecosystem, as Assessed by Direct Determination and Enrichment Techniques. *Microbial Ecology*, v. 58, p. 394-407, 2009.
- LEHMAN, P. W. *et al.* Impacts of the 2014 Severe Drought on the Microcystis Bloom in San Francisco Estuary. *Harmful Algae*, v. 63, p. 94-108, 2017.
- LI, X. *et al.* Hydrological Response of Biological Soil Crusts to Global Warming: A Ten-Year Simulative Study. *Global Change Biology*, v. 24, p. 4960-4971, 2018.
- TARAFDAR, L. *et al.* Co-Occurrence Patterns and Environmental Factors Associated with Rapid Onset of *Microcystis aeruginosa* Bloom in a Tropical Coastal Lagoon. *Journal of Environmental Management*, v. 325, Part B.
- LLEWELLYN, L. E. Saxitoxin, a Toxic Marine Natural Product That Targets a Multitude of Receptors. *Natural Product Reports*, v. 23, p. 200-222, 2006.
- LOWE, T. M.; CHAN, P. P. tRNAscan-SE On-Line: Search and Contextual Analysis of Transfer RNA Genes. *Nucleic Acids Research*, v. 44, W54-57, 2016.
- ZUKER, M. Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 13, p. 3406-3415, 2003.
- MACHADO DE LIMA, N. M.; BRANCO, L. H. Z. Biological Soil Crusts: New Genera and Species of Cyanobacteria from Brazilian Semi-Arid Regions. *Phytotaxa*, v. 470, n. 4, p. 263-281, 2020.
- MACHADO-DE-LIMA, N. M. Diversidade de Cianobactérias em Crostas Biológicas e Avaliação de Perfil Celulolítico e Hemicelulolítico. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2016. p. 98.
- MACHADO-DE-LIMA, N. M. *et al.* The Compositionally Distinct Cyanobacterial Biocrusts from Brazilian Savanna and Their Environmental Drivers of Community Diversity. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1-10, 2019.
- MACHADO-DE-LIMA, N. M. *et al.* Biocrust Cyanobacterial Composition, Diversity, and Environmental Drivers in Two Contrasting Climatic Regions in Brazil. *Geoderma*, v. 386, p. 1-11, 2021.
- MAITY, S. *et al.* Co-occurrence of co-contaminants: Cyanotoxins and microplastics, in soil system and their health impacts on plant – A comprehensive review. *Science of Total Environment*, v. 794, p. 1-12, 2021.
- MARTINS, A.; VASCONCELOS, V. Use of qPCR for the Study of Hepatotoxic Cyanobacteria Population Dynamics. *Archives of Microbiology*, v. 193, p. 615-627, 2011.
- MARTINS, M. D. *et al.* Polyphasic Approach Using Multilocus Analyses Supports the Establishment of the New Aerophytic Cyanobacterial Genus *Pycnacronema* (Coleofacisculaceae, Oscillatoriales). *Journal of Phycology*, v. 55, n. 1, p. 146-159, 2018.
- MEHDA, S. *et al.* Microenvironmental Conditions Drive the Differential Cyanobacterial Community Composition of Biocrusts from the Sahara Desert. *Microorganisms*, v. 9, p. 1-27, 2021.
- METCALF, J. S.; CODD, G. A. Cyanotoxins. In: WHITTON, B. A. (Ed.). *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Dordrecht: Springer, 2012. p. 651-675.
- METCALF, J. S. *et al.* Cyanotoxins in Desert Environments May Present a Risk to Human Health. *Science of the Total Environment*, v. 422, p. 118-123, 2012.
- METCALF, J. S.; CODD, G. A. Co-Occurrence of Cyanobacteria and Cyanotoxins with Other Environmental Health Hazards: Impacts and Implications. *Toxins*, v. 12, p. 629, 2020.
- ABDALLAH, M. *et al.* Microcystins and Anatoxin-A in Arctic Biocrust Cyanobacterial Communities. *Toxicon*, v. 101, 2015.

- MILLER, A.; RUSSELL, C. Food Crops Irrigated with Cyanobacteria-Contaminated Water: An Emerging Public Health Issue in Canada. *Environmental Health Review*, v. 60, p. 58–63, 2017.
- MISCOE, L. H. *et al.* The Diatom Flora and Cyanobacteria from Caves on Kauai, Hawaii. II. Novel Cyanobacteria from Caves on Kauai, Hawaii. *Bibliotheca Phycologica*, v. 120, p. 75–152, 2016.
- MOHAN, R. *et al.* Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with Potentially Toxic Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: A Synthesis on Its Bloom Dynamics. *Folia Microbiologica*, v. 69, p. 677–691, 2024.
- MOREIRA, C.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Cyanobacterial Blooms: Current Knowledge and New Perspectives. *Earth*, v. 3, p. 127–135, 2022.
- NASCIMENTO, F. R. Os Semiáridos e a Desertificação no Brasil. *REDE*, v. 9, p. 7–26, 2015.
- NEILAN, B. A. *et al.* 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.
- NOVAKOVSKAYA, I. V. *et al.* Influence of Ecological Factors on Soil Algae in Different Types of Mountain Tundra and Sparse Forests in the Northern Urals. *Phycologia*, v. 59, p. 1–10, 2020.
- NOWZURI, B. *et al.* Plant-Cyanobacteria Interactions: Beneficial and Harmful Effects of Cyanobacterial Bioactive Compounds on Soil-Plant Systems and Subsequent Risk to Animal and Human Health. *Phytochemistry*, v. 192, p. 1–20, 2021.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 3, p. 3327–3332, 1997.
- OSHIMA, Y. *et al.* Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the Source of Paralytic Shellfish Toxins in Tasmanian Shellfish. *Toxicon*, v. 25, p. 1105–1111, 1987.
- PAL, S. *et al.* Igniting Taxonomic Curiosity: The Amazing Story of *Amazonocrinis* with the Description of a New Genus *Ahomia* gen. nov. and Novel Species of *Ahomia*, *Amazonocrinis*, and *Dendronalium* from the Biodiversity-rich Northeast Region of India. *Journal of Phycology*, v. 60, p. 387–408, 2024.
- PARK, H.-K. *et al.* Molecular Verification of Bloom-Forming *Aphanizomenon flos-aquae* and Their Secondary Metabolites in the Nakdong River. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, p. 1739, 2018.
- PATOVA, E. N. *et al.* The Influence of Edaphic and Orographic Factors on Algal Diversity in Biological Soil Crusts on Bare Spots in the Polar and Subpolar Urals. *Eurasian Soil Science*, v. 51, p. 309–320, 2018.
- PEARSON, L. *et al.* On the Chemistry, Toxicology, and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystins, Nodularin, Saxitoxin, and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1650–1680, 2010.
- PODDUTURI, R. *et al.* Monitoring of Saxitoxin Production in Lakes in Denmark by Molecular, Chromatography and Microscopic Approaches. *Harmful Algae*, v. 101, p. 101966, 2021.
- PRASATH, B. *et al.* First Report on the Intense Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* Kützinger, 1846 Bloom at Muttukkadu Backwater, Southeast Coast of India. *Indian Journal of Geo-Maritime Science*, v. 43, p. 258–262, 2014.
- PUSHKAREVA, E. *et al.* Cyanobacteria Inhabiting Biological Soil Crusts of a Polar Desert: Sør Rondane Mountains, Antarctic. *Systematics and Applied Microbiology*, v. 41, p. 363–373, 2018.
- REDOUANE, E. M. *et al.* Mode of Action and Fate of Microcystins in the Complex Soil-Plant Ecosystems. *Chemosphere*, v. 225, p. 270–281, 2019.
- REYNOLDS, J. F. *et al.* Global Desertification: Building a Science for Dryland Development. *Science*, v. 316, p. 847–851, 2007.
- RICHER, R. *et al.* The Persistence of Cyanobacterial Toxins in Desert Soils. *Journal of Arid Environments*, v. 112, p. 134–139, 2015.
- RIPPKA, R. Recognition and Identification of Cyanobacteria. In: *Methods in Enzymology*, v. 167, p. 28–76, 1988.
- RIPPKA, R. *et al.* Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, p. 1–61, 1979.

- RIVERA-AGUILAR, V. *et al.* Distribution and Composition of Cyanobacteria, Mosses and Lichens of the Biological Soil Crusts of the Tehuacán Valley, Puebla, México. *Journal of Arid Environments*, v. 65, p. 208-225, 2006.
- RODRÍGUEZ-CABALLERO, E. *et al.* Dryland Photoautotrophic Soil Surface Communities Endangered by Global Change. *Nature Geoscience*, v. 11, p. 185-189, 2018.
- ROMÁN, J. R. *et al.* Restoring Soil Functions by Means of Cyanobacteria Inoculation: Importance of Soil Conditions and Species Selection. *Land Degradation & Development*, v. 29, p. 3184-3193, 2018.
- RONQUIST, R. *et al.* *MrBayes Version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries*. 2020. Disponível em: https://github.com/NBISweden/MrBayes/blob/develop/doc/manual/Manual_MrBayes_v3.2.pdf.
- ROSSI, F.; MUGNAI, G.; DE PHILIPPIS, R. Complex Role of the Polymeric Matrix in Biological Soil Crusts. *Plant and Soil*, v. 429, p. 19-34, 2018.
- SAHIN, A. *et al.* Enzymatic Analysis of Liver Samples from Rainbow Trout for Diagnosis of Blue-Green Algae-Induced Toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 56, p. 1110-1115, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. Cold Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State. *Nova Hedwigia*, v. 60, p. 19-58, 1995.
- SAQRANE, S.; OUDRA, B. CyanoHAB Occurrence and Water Irrigation Cyanotoxin Contamination: Ecological Impacts and Potential Health Risks. *Toxins*, v. 1, p. 113-122, 2009.
- SCIUTO, K.; MORO, I. Cyanobacteria: The Bright and Dark Sides of a Charming Group. *Biodiversity and Conservation*, v. 24, p. 711-738, 2015.
- SCOTT, G. M. Desert Bryophytes. In: SMITH, A. J. E. (Ed.). *Bryophyte Ecology*. London: Chapman and Hall, 1982. p. 105-122.
- SHEN, L. Q. *et al.* *Kovacikia Minuta* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria), a New Freshwater Chlorophyll f-Producing Cyanobacterium. *Journal of Phycology*, v. 58, n. 3, p. 424-435, 2022.
- SKOUPÝ, S. *et al.* New Cyanobacterial Genus *Argonema* is Hiding in Soil Crusts Around the World. *Scientific Reports*, v. 12, p. 7203, 2022.
- SONG, G.; LI, X.; HUI, R. Effect of Biological Soil Crusts on Seed Germination and Growth of an Exotic and Two Native Plant Species in an Arid Ecosystem. *PLoS One*, v. 12, p. 1-16, 2017.
- ST. CLAIR, L. L.; JOHANSEN, J. R. Introduction to the Symposium on Soil Crust Communities. *Great Basin Naturalist*, v. 53, p. 1-4, 1993.
- STRUNECKÝ, O.; IVANOVA, A. P.; MAREŠ, J. An Update Classification in Cyanobacterial Orders and Families Based on Phylogenomic and Polyphasic Analysis. *Journal of Phycology*, v. 59, p. 12-51, 2022.
- STRUNECKÝ, O.; ELSTER, J.; KOMÁREK, J. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium "*Phormidium*" *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. *Fottea*, v. 11, p. 57-71, 2011.
- SU, Z. *et al.* Saxitoxin Blocks L-Type ICa. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 308, p. 324-329, 2004.
- SUN, F. *et al.* Towards Moss Biocrust Effects on Surface Soil Holding Capacity: Soil Water Retention Curve Analysis and Modeling. *Geoderma*, v. 399, p. 115120, 2021.
- SZYJA, M. *et al.* Neglected but Potent Dry Forest Players: Ecological Role and Ecosystem Service Provision of Biological Soil Crusts in the Human-Modified Caatinga. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 7, p. 1-18, 2019.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2020.
- TARAFDAR, L. *et al.* Co-Occurrence of Patterns and Environmental Factors Associated with Rapid Onset of *Microcystis aeruginosa* Bloom in a Tropical Coastal Lagoon. *Journal of Environmental Management*, v. 325, p. 116580, 2023.

- TATON, A. *et al.* Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): A Morphological and Molecular Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 5157-5169, 2003.
- THURET, G. Essai de classification des Nostochinées. *Annales des Sciences Naturelles*, v. 1, p. 372-382, 1875.
- TIRKEY, J.; ADHIKARY, S. P. Blue Green Algae in the Biological Soil Crusts of Different Regions of India. *Feddes Repertorium*, v. 117, p. 280-306, 2006.
- TRACY, C. R. *et al.* Microclimate and Limits to Photosynthesis in a Diverse Community of Hypolithic Cyanobacteria in Northern Australia. *Environmental Microbiology*, v. 12, p. 592-607, 2010.
- ULLMANN, I.; BÜDEL, B. Biological Soil Crusts of Africa. In: BELNAP, J.; LANGE, O. L. (Eds.). *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Berlin: Springer, 2003. p. 108-117.
- VINOTH, M. *et al.* Characterization and Estimated Diversity of Cyanobacteria in Biological Soil Crust in Sacred Grove Forest of Tamil Nadu, India. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 8, p. 849-857, 2019.
- VINOTH, M. *et al.* Distribution of Cyanobacteria in Biological Soil Crusts in Sacred Groves Forest of Ariyalur and Pudukottai Districts, Tamil Nadu, India. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemistry Sciences*, v. 3, p. 215-241, 2017.
- WANG, J. *et al.* Comparison of Cyanobacterial Communities in Temperate Deserts: A Cue for Artificial Inoculation of Biological Soil Crusts. *Science of the Total Environment*, v. 745, p. 1-9, 2020.
- WARREN-RHODES, K. A. *et al.* Hypolithic cyanobacteria, dry limit of photosynthesis, and microbial ecology in the hyperarid Atacama Desert. *Microbial Ecology*, v. 52, p. 389-398, 2006.
- WEBER, B. *et al.* Biological soil crusts of the Succulent Karoo: a review. *African Journal of Range and Forage Science*, v. 35, p. 335-350, 2018.
- WEBER, B.; BÜDEL, B.; BELNAP, J. (Eds.). *Biological Soil Crusts: An Organizing Principle on Drylands*. Springer Switzerland, 2016. 549 p.
- WELKER, M.; VON DOHREN, H. Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, p. 530-563, 2006.
- WEST, N. E. Structure and function of microphytic soil crusts in wildland ecosystems of arid to semi-arid regions. *Advances in Ecological Research*, v. 20, p. 179-223, 1990.
- WILLIAMS, W. J.; BÜDEL, B. Species diversity, biomass and long-term patterns of biological soil crusts with special focus on cyanobacteria of the Acacia aneura Mulga Lands of Queensland, Australia. *Algological Studies*, v. 140, p. 23-50, 2012.
- WU, Z.; YANG, S.; SHI, J. Overview of the distribution and adaptation of a bloom-forming cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*: integrating genomics, toxicity, and ecophysiology. *Journal of Oceanology and Limnology*, v. 40, p. 1774-1791, 2022.
- ZHANG, B. *et al.* Microalgal species variation at different successional stages in biological soil crusts of the Gurbantunggut Desert, Northwestern China. *Biology and Fertility of Soils*, v. 45, p. 539-547, 2009.
- ZIKA, M.; ERB, K. H. The global loss of net primary production resulting from human-induced soil degradation in drylands. *Ecological Economics*, v. 69, p. 310-318, 2009.