

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE
MESTRADO INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE E AMBIENTE

RAISSA DA COSTA SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES DA CHAPADA DAS MESAS**

São Luís
2019

RAISSA DA COSTA SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES DA CHAPADA DAS MESAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall’Agnol

São Luís
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

DA COSTA SOUSA, RAISSA.
CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES DA CHAPADA DAS MESAS / RAISSA DA COSTA
SOUSA. - 2019.
66 p.

Orientador(a): LEONARDO TEIXEIRA DALL'AGNOL.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
SÃO LUÍS, 2019.

1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. 2. NOSTOC. 3.
PANTANALINEMA. I. TEIXEIRA DALL'AGNOL, LEONARDO. II.
Título.

RAISSA DA COSTA SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES DA CHAPADA DAS MESAS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Ambiente.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol (Orientador)
Doutor em Química Sustentável
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Andrea Christina Gomes de Azevedo Cutrim
Doutora em Oceanografia
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Juliano dos Santos
Doutor em Agronomia/Fitopatologia
Universidade Federal do Maranhão

À minha mãe, Eraneide Vieira e minhas
irmãs, Karlla Thayse e Rayane Costa,
ofereço.

Ao meu afilhado e sobrinho
Pedro Henrik, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela graça da vida e pelo constante cuidado.

À Nossa Senhora, dona de minha mais profunda devoção e confiança.

Ao prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol pela orientação neste trabalho.

A Capes e FAPEMA pelo suporte financeiro de bolsas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente pela oportunidade e apoio concedidos.

À prof^a Dr^a Hivana Dall'Agnol e prof. Dr. Pablo Gonçalves.

Ao Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, pelo apoio neste trabalho;

À Dr^a Kaarina Sivonen e Dr. David Fewer pelo suporte e apoio, ao Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na University of Helsinki (Finlândia), em especial pela amizade e ajuda de Maria Christodolou, Danilo Alvarenga e Rafael Popin.

Ao prof. Dr. Marco Valério e Laboratório de Ficologia, pelo auxílio nas identificações morfológicas dos isolados.

À prof^a Dr^a Denise Fernandes Coutinho e Laboratório de Farmacognosia II, pela concessão do laboratório para as primeiras etapas.

À prof^a Dr^a Luciana Magalhães Rebêlo Alencar e departamento de física, pelas imagens em AFM.

Ao prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior e departamento de parasitologia, pelo auxílio nos testes carrapaticidas.

Aos amigos sempre presentes: Ana Carolina Butarelli, Amanda Monteiro, Igor Santana, Karla Pierote, Lucas Salomão, Malena Costa e Pedro Felipe. Em especial à Mariene Oliveira que compartilhou comigo cada segundo do início ao fim desta jornada.

Ao meu melhor amigo e namorado Alberto Lima, obrigada pelo carinho e fé em mim.

Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!

Papa Francisco

RESUMO

A grande diversidade de cianobactérias não inclui apenas a variabilidade morfológica e preferências de habitat, mas também os metabólitos bioativos produzidos por esses microrganismos. O Parque Nacional da Chapada das Mesas abriga uma diversidade de microrganismos fotossintetizantes ainda pouco explorada e com potencial biotecnológico e consequências diretas para o turismo da região. O objetivo deste trabalho foi caracterizar, através de uma abordagem polifásica, microrganismos fotossintetizantes isolados da Chapada das Mesas – Maranhão. A obtenção de isolados foi realizada através de coleta de amostras de sedimento e água em corpos d'água dentro e fora da área do parque. A caracterização morfológica foi realizada através de observações em microscópio óptico e análises de ultraestrutura utilizando microscopia de força atômica. Os isolados também foram identificados utilizando marcadores gênicos filogenéticos e funcionais (16S rRNA e os genes da saxotoxina e microcistina). Adicionalmente, foram realizadas análises de espectrometria de massas e testes de bioatividade contra bactérias, fungos e carrapatos. A caracterização morfológica identificou as amostras GBBB01 e GBBB02 como pertencentes ao gênero *Nostoc/Desmonostoc* e a GBBB05 como *Pantanalinema*, descrição esta que foi confirmada pelo sequenciamento que teve resultados comparativos acima de 94% de similaridade para GBBB02 e 05. Nas análises de ultraestrutura em AFM a cepa GBBB01 (*Nostoc sp.*) mostrou células dispostas isoladamente, não formando tricomas. Para a GBBB05 observou-se a disposição das células nos filamentos unidas ao longo dos tricomas, sendo possível observar células diferenciadas e célula apical cilíndrica corroborando com a descrição por morfologia. Não foi possível detectar a presença de genes de vias metabólicas de cianotoxinas via reação em cadeia da polimerase. Na caracterização química obtida através de espectrometria de massa dos extratos das amostras GBBB01, 02 e 05 não foi possível identificar espectros característicos de compostos bioativos conhecidos como cianotoxinas ou cianobactinas. Os testes de bioatividade também não apresentaram nenhum resultado positivo, dentro das concentrações usadas, para nenhuma das cepas testadas. Os resultados, apontam que as cianobactérias presentes nos corpos d'água da Chapada das Mesas não são tóxicos, e não há risco iminente para os residentes locais e turistas. Porém análises adicionais são necessárias para descartar totalmente a produção de metabólitos secundários bioativos nos isolados obtidos.

Palavras-chave: cianobactérias. metabólitos secundários. *Nostoc*. *Pantanalinema*.

ABSTRACT

The great diversity of cyanobacteria does not only include the morphological variability and habitat preferences, but also the bioactive metabolites produced by these microorganisms. The National Park of Chapada das Mesas is home to a diversity of photosynthetic microorganisms still underutilized and with biotechnological potential and direct consequences for tourism in the region. The objective of this work was to characterize, through a polyphase approach, photosynthetic microorganisms isolated from Chapada das Mesas - Maranhão. Isolation was obtained by collecting sediment and water samples in water bodies inside and outside the park area. The morphological characterization was performed through optical microscope observations and ultrastructural analysis using atomic force microscopy. Isolates were also identified using phylogenetic and functional gene markers (16S rRNA and the saxotoxin and microcystin genes). In addition, analyzes of mass spectrometry and bioactivity tests against bacteria, fungi and ticks were carried out. Morphological characterization identified samples GBBB01 and GBBB02 as belonging to the genus *Nostoc/Desmonostoc* and GBBB05 as *Pantanalinema*, a description which was confirmed by the sequencing which had comparative results above 94% similarity for GBBB02 and 05. In the analyzes of ultrastructure in AFM strain GBBB01 (*Nostoc* sp.) showed cells arranged alone, not forming trichomes. For GBBB05 the cells were arranged in the joined filaments along the trichomes, being possible to observe differentiated cells and cylindrical apical cell corroborating with the description by morphology. The presence of cyanotoxin metabolic pathway genes could not be detected via polymerase chain reaction. It was not possible to identify characteristic spectra of bioactive compounds known as cyanotoxins or cyanobacins in mass spectrometry of extracts from GBBB01, 02 and 05 samples. The bioactivity tests also showed no positive results, within the concentrations used, against any of the strains tested. The results indicate that the cyanobacteria present in the water bodies of the Chapada das Mesas are not toxic, and there is no imminent risk for local residents and tourists. However additional analyzes are required to completely rule out the production of bioactive secondary metabolites in the isolates obtained.

Keywords: cyanobacteria. *Nostoc*. *Pantanalinema*. secondary metabolites.

LISTA DE SIGLAS

AFM – Microscopia de Força Atômica

BLASTn – Basic Local Alignment and Search Tool for nucleotide

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

ITS – Internal transcribed spacer region

GNPS - Global Natural Product Social

MC-LR – Microcistina - LR

MSC – Metabólitos secundários de cianobactérias

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NRPS - Peptídeo sintetase não-ribossômico

PARNACM – Parque Nacional da Chapada das Mesas

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PKS - Policetídeo sintase

rbcL – Subunidade maior da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

RuBisCO – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

SISBio – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

S.O.C. – Super Optimal Broth

UV – Ultravioleta

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografias da diversidade de cianobactérias	16
Figura 2: Cianobactéria do gênero <i>Nostoc</i>	18
Figura 3: Cianobactéria do gênero <i>Pantanalinema</i>	19
Figura 4: Parque Nacional da Chapada das Mesas, Maranhão, Brasil	25
Figura 5: Locais de coleta no PARNACM.....	27
Figura 6: Fotomicrografia de GBBB01 (<i>Nostoc</i> sp.).....	39
Figura 7: Fotomicrografia de GBBB02 (<i>Nostoc</i> sp.)	40
Figura 8: Fotomicrografia de GBBB05 (<i>Pantanalinema</i> sp.)	42
Figura 9 Imagem ultraestrutural de GBBB01 (<i>Nostoc</i> sp.).	44
Figura 10: Imagem ultraestrutural de GBBB01 (<i>Nostoc</i> sp.), medida de altura de célula	45
Figura 11: Imagens ultraestruturais de GBBB05 (<i>Pantanalinema</i> sp.).....	46
Figura 12: Imagem ultraestrutural de GBBB05 (<i>Pantanalinema</i> sp.), medida de altura de célula.	47
Figura 13: Produtos de amplificação (PCR) do gene rRNA 16S	48
Figura 14: Produtos de amplificação (PCR) dos clones.....	48
Figura 15: Árvore de diversidade dos isolados GBBB02 e GBBB05.	50
Figura 16: Teste de bioatividade antibacteriana e antifúngica em placas.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Visão esquemática de ordens e famílias de cianobactérias	17
Tabela 2: Compostos antimicrobianos derivados de cianobactérias	24
Tabela 3: Localização de pontos de coleta no PARNACM com latitude, longitude e altitude	28
Tabela 4: Solução de preparo para meio de cultivo Z8	29
Tabela 5: Solução de preparo para meio de cultivo BG-11.....	29
Tabela 6: Reagentes da solução SBS	30
Tabela 7: Marcadores e condições de amplificação dos genes para PCR.....	31
Tabela 8: Controles negativos para teste carrapaticida	35
Tabela 9: Parâmetros físico-químicos medidos com sonda multiparamétrica nos locais de coleta do PARNACM	36
Tabela 10: Parâmetros ambientais de nutrientes mensurados nos locais de coleta do PARNACM	38
Tabela 11: Resultado do sequenciamento submetido ao BLASTn	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Cianobactérias	15
2.2	Os gêneros <i>Nostoc</i> e <i>Pantanalinema</i>	18
2.3	Identificação e caracterização de microrganismos fotossintetizantes.....	20
2.3.1	Marcadores moleculares	20
2.3.2	Marcadores morfológicos	20
2.3.3	Microscopia de Força Atômica (AFM)	21
2.4	Metabólitos secundários de cianobactérias	21
2.5	Bioatividade e potencial biotecnológico	23
2.6	Parque Nacional da Chapada das Mesas.....	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Geral.....	26
3.2	Específicos	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Coleta e cultivo de linhagens de cianobactéria	27
4.2	Análise morfológica	29
4.3	Análise de ultraestrutura em AFM.....	30
4.3.1	Preparo das amostras em etanol/ácido acético	30
4.4	Análise molecular	30
4.4.1	Extração de DNA genômico	30
4.4.2	Amplificação por PCR de marcadores filogenéticos e de cianotoxinas	31
4.4.3	Clonagem e PCR de colônia	32
4.4.4	Análise das sequências.....	33
4.5	Extrato de cianobactérias	33
4.6	Teste de bioatividade antimicrobiana	34
4.7	Teste de bioatividade carrapaticida.....	34
4.8	Caracterização química	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Fatores físico-químicos	36
5.2	Caracterização morfológica	38
5.3	Caracterização ultraestrutural em AFM.....	43
5.4	Análise molecular	48
5.5	Análise genética	49
5.6	Caracterização química dos extratos.....	50
5.7	Análise da bioatividade.....	51
5.7.1	Testes antimicrobiano.....	51
5.7.2	Testes carrapaticida.....	52
6	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias são um grupo de organismos procariontes morfológicamente diverso, essas bactérias fotossintetizantes, estão classificadas dentro do Reino Monera, divisão Eubacteria, classe Cianobactéria. No entanto, ainda há um debate significativo sobre a classificação em níveis taxonômicos mais elevados em relação à composição de ordens, famílias, gêneros e espécies (Komárek e Anagnostidis, 1988; Castenholz e Waterbury, 1989; Percival et al., 2014).

A evolução de mais de 3,5 bilhões de anos, permitiu o surgimento de numerosas adaptações morfofisiológicas, permitindo a estes microrganismos que se desenvolvessem nas mais variadas condições ambientais (Padisák, 1997). É de ressaltar a capacidade fotossintética e a adaptabilidade metabólica desse grupo como características chaves que permitiram a distribuição quase que ubíqua desse grupo no planeta, limitada, obviamente, pela presença de luz (Steinhauser et al., 2012).

Considerando a longa e complexa história evolutiva de cianobactérias e sua diversidade morfofisiológica é difícil de realizar a caracterização/identificação utilizando apenas dados morfológicos desses organismos, conforme utilizado nas abordagens clássicas dos sistemas de classificação na botânica e na microbiologia (Rippka et al., 1979; Neilan et al., 1997; Komárek e Anagnostidis, 2005). O número de caracteres morfológicos utilizados para definir táxons (formas, filamentos, tipos de ramificação, dimensões, presença de acinetos, etc.) mudaram várias vezes ao longo dos últimos anos de estudo dessas espécies de cianobactérias e a classificação a nível de gênero ou espécie é muitas vezes imprecisa (Komárek, 2013).

O gene 16S rRNA é o marcador mais utilizado nos estudos moleculares de microrganismos procariontes, o que inclui cianobactérias. Portanto pode ser uma importante ferramenta para confirmar/rejeitar táxons baseados na morfologia e detectar novos clados (Eckert et al., 2015). O sistema taxonômico de cianobactérias foi radicalmente alterado, particularmente com a introdução da microscopia eletrônica e de métodos moleculares e genéticos para caracterização dos táxons (Komárek et al., 2013).

Idealmente a identificação taxonômica deveria ser realizada pela caracterização polifásica incluindo: morfologia, bioquímica e biologia molecular (Brito et al., 2012). Sabe-se que fatores distintos, como intensidade de luz, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, podem afetar o crescimento desses microrganismos e que especificamente, as concentrações de

nitrogênio e fósforo dentro do sistema de cultivo são consideradas determinantes do crescimento da biomassa (Markou et al. 2014).

Além disso, estes microrganismos vêm ganhando crescente atenção por sua capacidade de produzir uma grande variedade de produtos naturais bioativos, também conhecidos como metabólitos secundários de cianobactérias, cuja maioria apresenta enorme potencial para o desenvolvimento de novas drogas (Abed et al., 2009). Yu e Keller (2005) destacam que os metabólitos secundários são de grande interesse para a humanidade, devido as suas propriedades farmacêuticas (antibióticos) e/ou tóxicas (toxinas).

Esses microrganismos constituem uma fonte rica de novos compostos bioativos com propriedades anticâncer, antiviral, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, atividades citotóxicas e anti-HIV, além de serem uma excelente fonte de peptídeos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, carotenos, clorofila, ficocianina e minerais (Mimouni et al., 2012; Tarman et al., 2013; Gupta et al., 2013).

Estas substâncias sintetizadas principalmente por enzimas multifuncionais, chamadas de peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS), policetídeo sintase (PKS) ou por um misto dos dois sistemas enzimáticos, podem ser explorados como base para geração de novos fármacos (Wase e Wright, 2008).

Os metabólitos secundários têm um impacto significativo na saúde humana, tanto diretamente através da contaminação dos reservatórios de água potável por espécies tóxicas, como indiretamente através do seu potencial farmacêutico, por exemplo (Dittmann et al., 2013).

Tornou-se claro que as cianobactérias produzem uma gama de produtos naturais para além de toxinas, muitas das quais têm atividades biológicas interessantes, mostrando que uma gama de substâncias tóxicas ou produtos bioativos podem ser empregados ecologicamente como aleloquímicos, ou substâncias que podem inibir competidores dentre espécies simpátricas de microrganismos, algas e macrófitas, bem como para o desenvolvimento comercial e aplicação destes compostos como algicidas, herbicidas e inseticidas (Berry et al., 2008; Sivonen et al., 2010).

Portanto, devido a alta importância nas possíveis aplicações de cianobactérias como recurso biológico, é importante que, além do isolamento das cepas, sejam realizadas a identificação taxonômica e a caracterização dos isolados (Galhano et al. 2011).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Cianobactérias

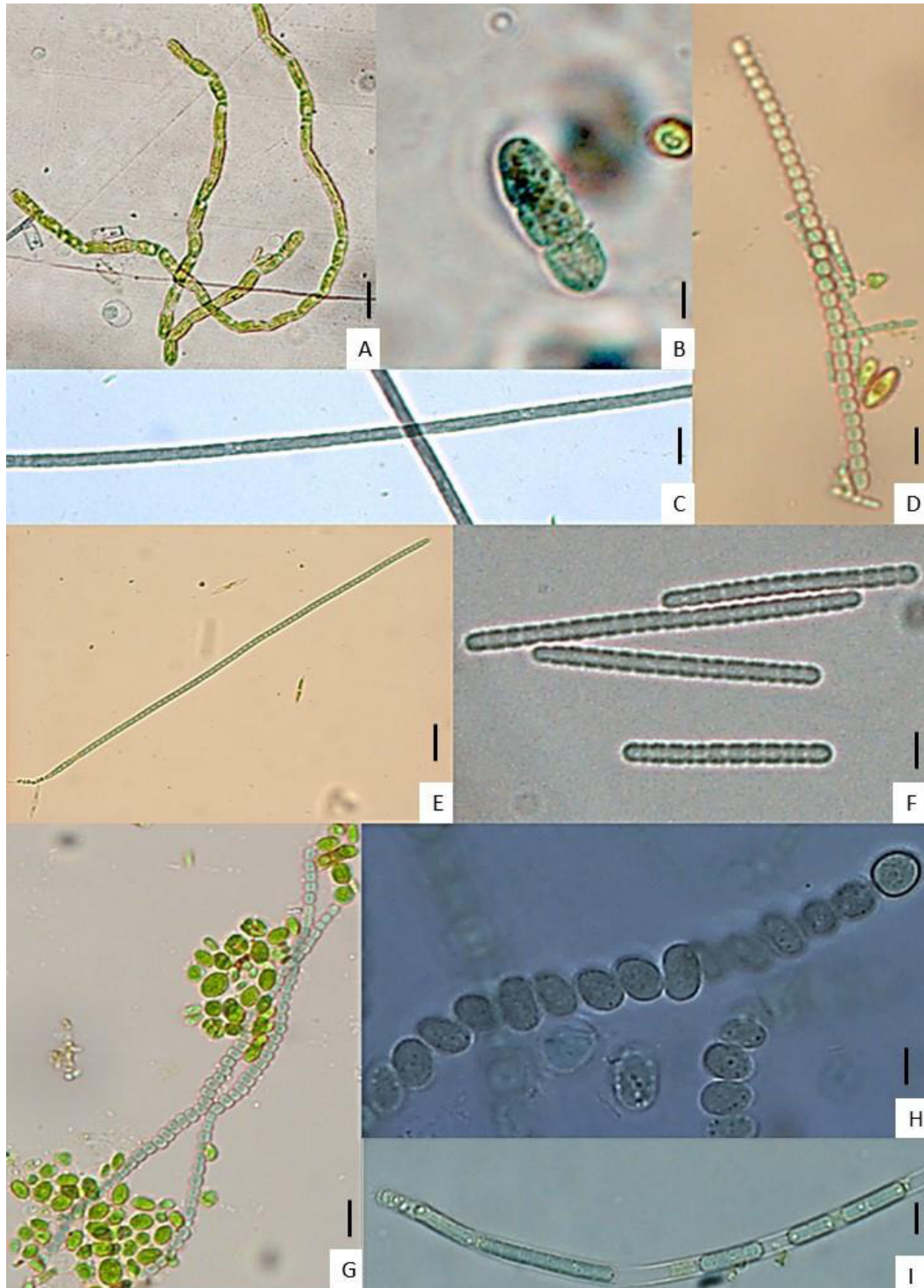
Além de serem comuns em ambientes aquáticos (Hamilton et al., 2014), cianobactérias também podem ser encontradas nos mais inusitados locais e superfícies como em solos desérticos, em simbiose com fungos, na superfície foliar de plantas, no sedimento, etc (Richter et al., 2015).

O Brasil possui uma diversidade de microrganismos fotossintetizantes significativa, porém os estudos geralmente focam em mananciais para uso de abastecimento ou outras aplicações comerciais (Silva-Stenico et al., 2011). As florações de cianobactérias representam um risco à saúde humana e animal e ao ambiente em geral tendo em vista a capacidade de produção de metabólitos secundários, muitos deles tóxicos (Svirčev et al., 2014).

As cianobactérias possuem formato das células variando de dimensões mínimas como os gêneros *Synechococcus* e *Prochloococcus*, formadores do picoplâncton – organismos planctônicos fotossintéticos de tamanhos entre 0,2 e 2 μm – até espécies filamentosas como do gênero *Nostoc* com dezenas de micrômetros de comprimento (cilíndrico, barril, globular, irregular), nas colônias o arranjo das células ou filamentos pode ser irregular, radial ou em planos ordenados, algumas são formadoras de heterócitos, células que contribuem para a fixação de quase metade da quantidade total de nitrogênio biologicamente fixo em todo o mundo (Figura 1)(Fogg, 1986; Dufresne et al., 2003; Elbert et al., 2012; Komárek, 2013).

Ainda que a morfologia seja complexa quando comparada com a maioria dos microrganismos procaríotas, a taxonomia baseada apenas nessas características pode não resultar numa classificação filogeneticamente confiável, devido ao fato de muitas espécies próximas possuírem características muito similares e também haja vista que existe uma grande variação de acordo com as diferentes condições nutricionais e de crescimento em que se encontram. Não é surpreendente, portanto que a taxonomia das cianobactérias ainda seja muito controversa, podendo encontrá-la ainda descrita em dois grandes sistemas: botânico e bacteriológico (Brito et al., 2012).

Figura 1: Fotomicrografias da diversidade de cianobactérias. A - Células com formato retangular. B- Células com formato oblongo, tricoma reduzido. C, D, F, G - Filamentos com células constrictas. E- célula apical diferenciada. H - Filamentos com células oval-esféricas, bainha evidente e presença de acinetos. I - presença de necródios. Barras: 10µm. Fotos: SOUSA, R. C.



O sistema taxonômico de cianobactérias foi radicalmente mudado particularmente com a introdução da microscopia eletrônica e de métodos moleculares e genéticos para caracterização de táxons, a nova cassificação de cianonbactérias distribui estes microrganismos

em 8 ordens (Nostocales, Chroococciopsidales, Spirulinales, Pleurocapsales, Chroococcales, Oscillatoriales, Synechococcales e Gloeobacterales) reorganizando assim trabalhos de taxonomia e filogenia de anos anteriores (Tabela 1) (Komárek et al.; 2014).

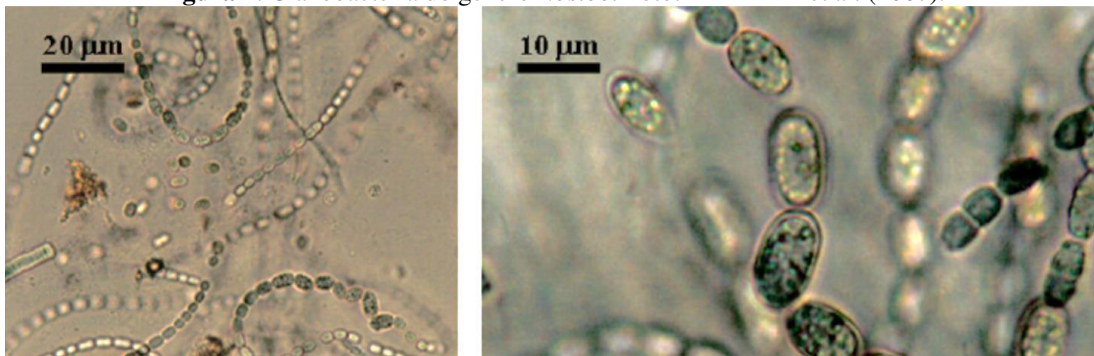
Tabela 1: Visão esquemática de ordens e famílias de cianobactérias segundo Komárek et al. (2014), e os importantes caracteres taxonômicos utilizados para distingui-los (Adaptação).

Ordem	Família	Características
Nostocales	Scytonemataceae	Organismos filamentosos, produção facultativa de acinetos, possuem heterócitos, ramificação ausente ou falsa.
	Symphyonemataceae	
	Rivulariaceae	
	Tolypothrichaceae	
	Godleyaceae	
	Chlorogloeopsidaceae	
	Hapalosiphonaceae	
	Capsosiraceae	
	Stigonemataceae	
	Gloeotrichiaceae	
	Aphanizomenonaceae	
Nostocaceae		
Chroococciopsidales	Chroococciopsidaceae	Células com divisão em três planos.
Spirulinales	Spirulinaceae	Tricomas parafusiformes sem bainha.
Pleurocapsales	Hydrococcaceae	Células com divisão irregular ou em múltiplos planos, polár e com pseudo-filamentos.
	Dermocarpellaceae	
	Xenococcaceae	
	Hyellaceae	
Chroococcales	Microcystaceae	Organismos unicelulares, coloniais ou pseudofilamentosos.
	Aphanothecaceae	
	Cyanobacteriaceae	
	Cyanothrichaceae	
	Stichosiphonaceae	
	Chroococcaceae	
	Gomphosphaeriaceae	
	Entophysalidaceae	
Oscillatoriales	Cyanothecaceae	Tricomas relativamente estreitos, homocitados.
	Borziaceae	
	Coleofasciculaceae	
	Microcoleaceae	
	Homoeotrichaceae	
	Oscillatoriaceae	
	Gomontiellaceae	
Synechococcales	Synechococcaceae	Células polarizadas, tricomas com ou sem bainha, agrupados ou solitários.
	Merismopediaceae	
	Prochloraceae	
	Coelosphaeriaceae	
	Acaryochloridaceae	
	Chamaesiphonaceae	
	Romeriaceae	
	Pseudanabaenaceae	
	Leptolyngbyaceae	
	Schizotrichaceae	
	Heteroleibleiniaceae	
Gloeobacterales	Gloeobactereaceae	Tipos unicelulares (maioria coloniais) e filamentosos.

2.2. Os gêneros *Nostoc* e *Pantanalinema*

Rippka et al. (1979), classificaram o gênero *Nostoc* como sendo cianobactérias filamentosas capazes de diferenciar células especializadas fixadoras de N₂ (heterócitos), e que se caracterizam, além disso, pela divisão em apenas um plano (Figura 2). É de grande importância ecológica e econômica, com vários estudos publicados, sendo que recentemente, após revisões taxonômicas, algumas espécies foram reclassificadas em dois novos gêneros: *Mojavia* e *Desmonostoc* (Komárek et al., 2014).

Figura 2: Cianobactéria do gênero *Nostoc*. Foto: Sant'Anna et al. (2007).



As espécies de *Nostoc* são cosmopolitas, comumente encontradas no solo e em associações simbióticas com plantas e fungos, e alguns isolados e cepas foram caracterizados como prolíficos produtores de metabólitos secundários, incluindo peptídeos, policetídeos e alcalóides (Dittmann et al., 2015). A distribuição geográfica varia de regiões polares a tropicais, podendo colonizar desertos, semi-desertos, pastagens secas e superfícies rochosas (Aboal et al., 2010).

Jokela et al. (2017), constataram que o cultivo de cepas em baixa salinidade e luz, mas em altas concentrações de fósforo, potencializa um bom crescimento e expressão peptídica, além de apresentar um perfil de crescimento bentônico em contato com substratos. Sabe-se ainda que a produção de clorofila e carotenoides de cianobactérias do gênero *Nostoc* pouco é influenciada pela concentração de nitrogênio fornecida, numa variação de 0 a 17mM NaNO₃, equivalente a 0, 25, 50 e 100% da concentração de nitrato presente no meio de cultura BG-11 (Loaiza et al., 2016), neste mesmo estudo ainda se indica que a produção de proteínas, carboidratos e pigmentos lipossolúveis aumenta sob condições diazotróficas.

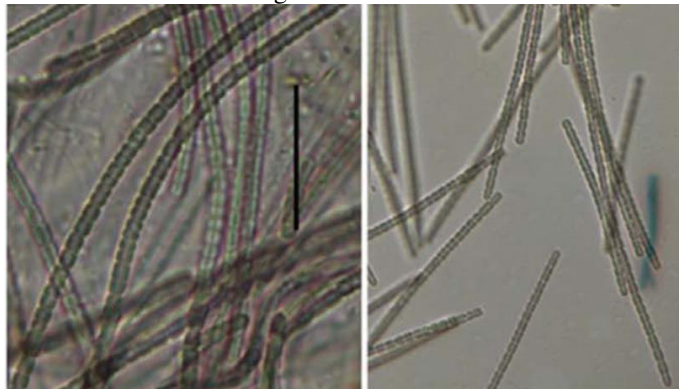
Liao et al. (2015), descreveram em seus experimentos que cepas de *Nostoc* possuem uma considerável quantidade de polissacarídeos heteroglicanos em sua composição de membrana, esse biopolímero pode ser responsável pela capacidade de tolerância à dessecação,

além desse papel fisiológico, polissacarídeos como este também podem ser responsáveis pela atividade imunomodulatória.

El-Sheekh et al. (2006), constataram que a atividade antibacteriana e antifúngica de espécies desse gênero apresentam grande inibição em testes contra *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. Outros estudos ainda indicam diversas atividades de cepas *Nostoc* com potencial anticancerígeno, antiviral, nutracêutico e de biorremediação (Kanekiyo et al., 2005; Sangeetha et al., 2014; Martins et al., 2017; Galetovic et al., 2017).

O gênero *Leptolyngbya* foi descrito por Anagnostidis & Komárek (1988), anteriormente este gênero era incluído em um conjunto de cepas identificadas como "LPP-grupo B" por Rippka et al. (1979), dentro deste mesmo grupo encontravam-se cepas de *Lyngbya*, *Phormidium* e *Plectonema* que apresentavam em sua morfologia caracteres semelhantes. *Pantanalinema* é um gênero descrito em 2015 retirado do grupo de *Leptolyngbya* e reclassificado através de uma abordagem polifásica, que considera as características morfológicas, a filogenia do gene 16S rRNA, estruturas secundárias do 16S-23S rRNA (ITS) e características fisiológicas como respostas de crescimento ao pH da cultura (Figura 3) (Vaz et al., 2015).

Figura 3: Cianobactéria do novo gênero *Pantanalinema*. Foto: Vaz et al. (2015).



Cianobactérias desse novo gênero foram primeiramente encontradas em lagos e se caracterizaram pela resistência e capacidade de sobreviver e produzir biomassa numa grande variação de pH. Os primeiros isolados foram testados numa escala de pH de 4 a 11, tendo sido registrada também a capacidade de modificar o pH do meio de cultura durante o crescimento, especialmente nos níveis de pH de 6,0 e 7,4. Devido a essas características, propõe-se que esse gênero pode ocupar uma gama de nichos ecológicos como rios, lagos, ambientes alcalinos ou levemente ácidos, fornecendo algumas informações sobre sua biogeografia (Genuário et al., 2017).

2.3. Identificação e caracterização de microrganismos fotossintetizantes

2.3.1. Marcadores moleculares

Tradicionalmente, a identificação de cianobactérias em geral é realizada através da morfologia, porém, essas identificações podem ser imprecisas devida à alta variedade fenotípica que estes microrganismos apresentam (Lee et al., 2014). A classificação exata da taxonomia exige sempre uma integração de diversos fatores que incluem características ecológicas, morfológicas e fisiológicas (Schlick-Steiner et al., 2010). Por essa razão, técnicas moleculares para identificação taxonômica foram implementadas (Lee et al., 2014).

É possível a identificação molecular de cepas de cianobactérias isoladas de ambientes tropicais por uma sequência parcial do 16S, ou utilizando marcadores funcionais como a L-Asparaginase, por exemplo, a fim de estudar os genes responsáveis pelas propriedades de interesse biotecnológico (Morales et al., 2017). Segundo Vandamme et al. (1996), a região do rRNA 16S pode ser usada para a maioria dos estudos de inferências filogenéticas, podendo indicar conforme o percentual de similaridade as espécies estudadas. Para cianobactérias em geral, têm-se utilizado par análises filogenéticas regiões gênicas como ITS e *rbcL*, além do 16S rRNA.

2.3.2. Marcadores morfológicos

Vários autores utilizam a microscopia ótica tradicional como base para a identificação de suas cepas (Mariné, Clavero e Roldán, 2004; Kurobe et al., 2013). A maioria das cianobactérias pode ser prontamente distinguida de outros microrganismos fotossintetizantes e entre si, pelo menos a nível de famílias, utilizando-se o método tradicional de identificação morfológica. É até mesmo possível identificar algumas propriedades fisiológicas, haja vista algumas diferenciações celulares serem muito distintas, como por exemplo, a presença de heterócitos (relacionados à fixação de nitrogênio), acinetos (células de resistência), presença de bainha mucilaginosa, produção (e intensidade) de mucilagem, entre outras (Seiderer et al., 2017). Entretanto a identificação mesmo a nível de espécie não permite afirmar a produção ou não de cianotoxinas e metabólitos secundários bioativos, haja vista que mesmo espécies reconhecidamente produtoras, podem apresentar isolados com alterações genéticas que comprometam a via biossintética relacionada, e portanto, testes moleculares, bioquímicos e de bioatividade se fazem necessários (WHO, 1999).

2.3.3. *Microscopia de Força Atômica (AFM)*

A técnica de AFM baseia-se em uma varredura pela superfície da amostra com ponta afiada (sonda) montada em um cantilever flexível cuja deflexão causada pela interação com a superfície é detectada por um método óptico de alta precisão (Binnig, Quate e Gerber, 1986).

Foi estabelecida como uma técnica vantajosa para visualizar as superfícies de células microbianas (Dufrière, 2004). Esse método permite a observação direta em nanoescala da morfologia superficial de uma amostra bacteriana (Neu et al., 2010), podendo ser observados parâmetros estruturais e físicos de células bacterianas como viscosidade e elasticidade de componentes celulares, além de explorar forças de interação (Chen et al. 2009; Dufrière e Garcia-Parajo, 2012).

Casella et al. (2017), caracterizaram a distribuição espacial e mobilidade de complexos fotossintéticos no interior da membrana de tilacóide de cianobactérias usando uma combinação de AFM e de outras técnicas. A técnica de AFM ainda permite reconhecer com alta resolução a dinâmica de proteínas de membrana, reconhecimento de proteínas de membrana e detalhes de superfícies celulares (Yamashita et al., 2012).

2.4 **Metabólitos secundários de cianobactérias**

Os produtos naturais permanecem como uma fonte importante de estruturas que contribuem para drogas semissintéticas ou sintéticas para diversas doenças (Hoelder, Clarke e Workman, 2012). Recentemente, os pesquisadores estão focando principalmente no desenvolvimento de novas drogas a partir de cianobactérias marinhas (Paul et al., 2010).

Esses microrganismos são capazes de produzir uma gama de produtos naturais que são potencialmente capazes de desempenhar papel importante em funções ecológicas ou biológicas (Méjean e Ploux, 2013). Apresentam uma grande capacidade de aplicação na agricultura, fármacos, nutracêuticos e biocombustíveis, além de exibir ampla diversidade em sua morfologia e distribuição ecológica (Gupta et al., 2013).

Vários metabólitos secundários podem atuar como antibióticos, enzimas, anticancerígenos e anti-inflamatórios. Metabólitos secundários não tóxicos incluem fitohormônios, sideróforos e vários compostos de proteção UV, como os aminoácidos mycosporina e scytonemina, algumas cianobactérias inclusive são utilizadas como possíveis fontes de alimentação para consumo animal e humano (Mata et al., 2010; Rajneesh et al., 2017;

Haque et al., 2017). Cianobactérias do gênero *Lyngbya* produzem metabólitos como saponinas, flavonóides e antraquinonas (Axpucac-Aspuac et al., 2017).

Cianobactérias também são produtoras de toxinas, hepatotoxinas como microcistinas que afetam o fígado, neurotoxinas como anatoxina-a e saxitoxina que alteram as reações neuromusculares, e dermatotoxinas, toxinas que causam irritação da pele (Wiegand e Pflugmacher, 2005; Kleinteich et al., 2013).

Cilindropermopsinas pertencem a uma classe de alcalóides com efeitos citotóxicos hepatotóxicos, nefrotóxicos e gerais (Pearson, 2016), também é conhecida a sua capacidade de inibir a síntese de proteínas e glutatona, além da alteração de diferentes biomarcadores de estresse oxidativo em mamíferos e vertebrados (Guzmán-Guillén et al., 2015).

A anatoxina-a, é um éster fosfato, com propriedades farmacológicas e químicas diferentes, atuando como inibidor da acetilcolinesterase. na via biossintética para a anatoxina-a, descrita recentemente com base na sequência do genoma de *Oscillatoria* PCC 6506 (Méjean et al., 2009).

Saxitoxinas pertencem a uma classe de alcalóides neurotóxicos potentes, 57 análogos de saxitoxina já foram identificados em vários organismos (Wiese et al., 2010), desde sua descoberta em 1957 (Schantz et al., 1957). Kellmann et al. (2008) identificaram o gene cluster putativo responsável pela biossíntese de saxitoxina em *Cylindropermopsis raciborskii*. Supõe-se que a toxicidade pode fornecer na vantagem ecológica para o organismo produtor em comparação com estirpes não-tóxicas (Holland e Kinnear, 2013).

Algumas cepas podem produzir toxinas altamente potentes tais como a MC-LR, que podem levar à mortandade de animais, inclusive de seres humanos (Sanchez et al., 2012). Essa toxina foi isolada pela primeira vez de *Microcystis aeruginosa* (Carmichael et al., 1990). Apesar da contabilização de uma pequena proporção de biomassa de algas, a presença de cianobactérias tóxicas nos rios pode ter implicações importantes para a saúde humana e aquática (Bukaveckas et al.; 2017).

O monitoramento de florações ganhou importância nos últimos anos devido à sua crescente ocorrência e a descoberta de novas cianotoxinas (Agha et al., 2012). Segundo Beaver et al. (2018) a provável ocorrência de táxons potencialmente produtores de cianotoxinas em lagos e reservatórios é previsível numa base biogeográfica, dependendo das características morfológicas e da qualidade da água.

A forma mais fácil para minimizar o aparecimento desses microrganismos pode ser a prevenção, ou seja, a diminuição da oferta de fosfato na água proveniente de esgotos sanitários e resíduos industriais a fim de amenizar os impactos de toxicidade, mas também deve ser evitado o uso de algicidas, como sulfato de cobre, que podem causar a morte celular e facilitar a liberação de toxinas na água (Sanches et al., 2012; Uriza, Martínez e Sanjurjo, 2017).

Capelo Neto e Neycombe (2017) reforçam que quanto aos metabólitos, as toxinas mais comumente encontradas em sistemas de tratamento de água (microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsina) são facilmente removidas com oxidantes disponíveis nos sistemas de tratamento (cloro, por exemplo), desde que respeitados os tempos de contato, residuais e pHs apropriados.

A Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil (Portaria MS Nº 2914), com base em estudos sobre a toxicidade oral de cianotoxinas, adotaram como um limite máximo aceitável de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas em água para consumo humano (WHO, 1993). O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) na resolução 357/2005 cita cianobactérias como microorganismos procarióticos autotróficos que entram com parâmetro para classificação de qualidade da água, pois podem produzir toxinas com efeitos adversos a saúde.

2.5 Bioatividade e potencial biotecnológico

Esses organismos fotossintetizantes apresentam também uma grande potência na produção de bioenergia e biocombustíveis. Como uma potencial fonte de bicomcombustível as cianobactérias apresentam um papel promissor e se justificam pela facilidade de cultivo, por serem consideradas produtoras de recursos renováveis, pela grande produção de biomassa e seus derivados, além disso, a plasticidade do seu metabolismo permite que a biossíntese de lipídios seja guiada por condições controladas. Ainda, várias cepas podem ser manipuladas geneticamente facilmente (Vasudevan e Briggs, 2008; Sarsekeyeva et al., 2015).

Contribuem para múltiplas funções do ecossistema, incluindo o aprimoramento da estrutura do solo, a estabilidade, a fertilidade, a hidrologia de superfície e participam até mesmo do ciclo do nitrogênio e carbono (Chamizo et al., 2012; Zhao et al.; 2014). A inoculação de cianobactérias pode modificar rapidamente propriedades de substratos de solo, sustentando o potencial dos organismos como ferramentas para iniciar a recuperação das funções do solo inférteis (Muñoz-Rojas et al., 2018). Para o uso como recurso biológico em práticas como a

agricultura, é preciso a identificação e caracterização de taxa capazes de se adaptarem às condições ambientais (Morales et al., 2017).

Dentre as atividades biológicas de cianobactérias, a atividade antimicrobiana é de grande importância, Kellam et al. (1988), observaram o potencial antimicrobiano de extrato de cianobactérias em bioensaios utilizando microrganismos selecionados como organismos de teste. Os bioensaios bacterianos compreendem testes com diferentes como: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* são bactérias frequentemente usadas (McGill e Hardy, 1992).

Em seu estudo, Swain et al. (2017) revisaram 121 compostos de cianobactéria pertencentes a diversas classes químicas, estes poderiam ser usados no desenvolvimento de antimicrobianos, contra cepas resistentes de bactéria, fungos e micobactérias, como moléculas de base (Ver tabela 2).

Tabela 2: Compostos antimicrobianos de cianobactérias (Swain et al., 2017).

Compostos antimicrobianos derivados de cianobactérias		
Cianobactéria	Composto	Referência
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Kawaguchipectin B	Ishida et al. (1997)
<i>Nostoc commune</i>	Diterpenoid	Jaki, Heilmann e Sticher (2000)
<i>Fischerella ambigua</i>	Parsiguine	Ghasemi et al. (2004)
<i>Anabaena cylindrica</i>	Anachelin H	Gademann et al. (2007)
<i>Lyngbya sp.</i>	Lyngbyazothrins A – D	Zainuddin et al. (2009)
<i>Leptolyngbya crosbyana</i>	Crossbyanol A	Choi et al. (2010)
<i>Lyngbya majuscula</i>	Pitiprolamine	Montaser et al. (2011)
<i>Tychonema sp.</i>	Brunsvicamides B	Chlipala, Mo e Orjala (2011)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Aeruginazoles A	Adiv, Ahronov-Nadborny e Carmeli (2012)
<i>Fischerella ambigua</i>	Ambiguine	Micallef et al. (2015)
<i>Fischerella sp.</i>	Hapalindole	Micallef et al. (2015)
<i>Lyngbya majuscula</i>	Tiahuramides A – C	Levert et al. (2018)

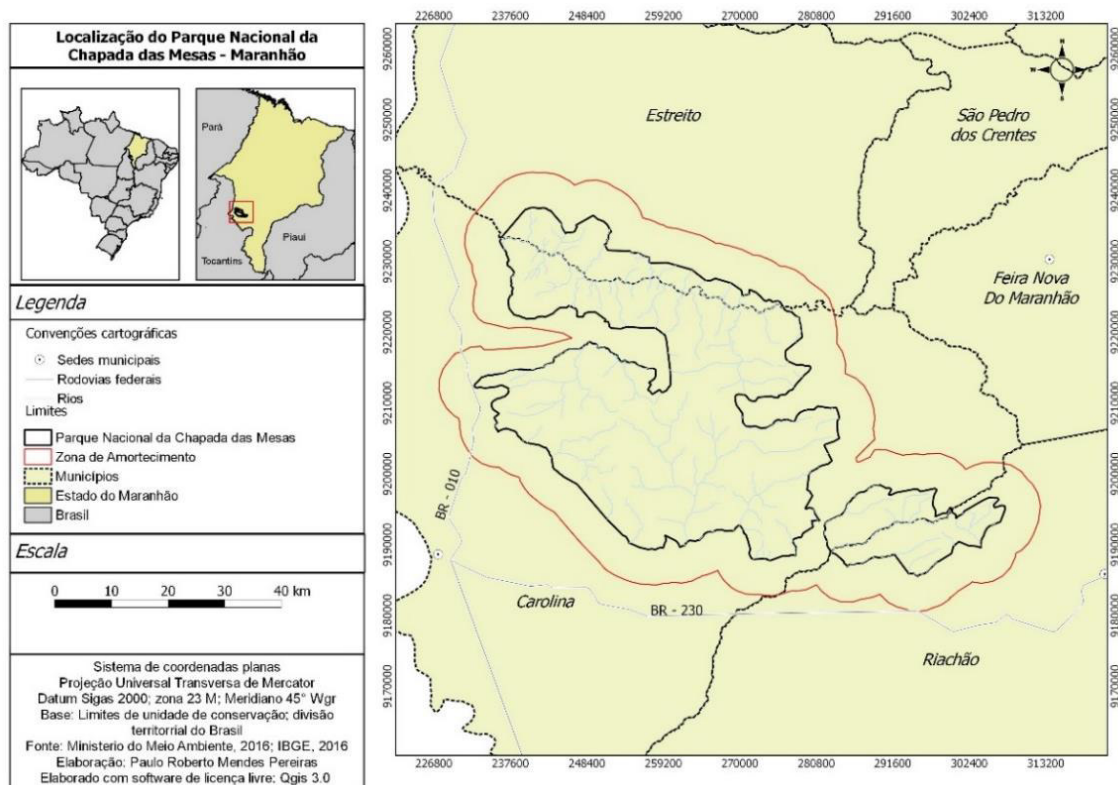
Niveshika et al. (2016) estudaram um composto bioativo isolado do gênero *Nostoc* que teve atividade antibacteriana contra cepas como *E. Coli*, *P. vulgaris*, e *P. aeruginosa*.

2.6 Parque Nacional da Chapada das Mesas (PARNACM)

Localizada na divisa entre as regiões Norte e Nordeste do Brasil, nos estados do Maranhão e Tocantins, a Chapada das Mesas constitui uma típica paisagem de chapada, além de possuir um importante papel ambiental e ecológico (Salgado et al., 2015).

O PARNACM abrange os municípios de Estreito, Carolina e Riachão (Figura 4), se caracteriza por uma grande biodiversidade, está localizado no sul do Estado do Maranhão na bacia do rio Tocantins, além de possuir um grande potencial para abrigar altos níveis de riqueza e abundância de espécies da flora e fauna, o Parque possui uma grande importância hidrológica pois abrange as nascentes de cursos d'água, que abastecem três bacias hidrográficas, a do Parnaíba, Araguaia/Tocantins e do São Francisco (Marques, 2012).

Figura 4: Parque Nacional da Chapada das Mesas, Maranhão, Brasil. Fonte: MMA, 2016. Organização: PEREIRA, P. R. M.



Inserido no bioma cerrado, há uma maior predominância deste bioma no PARNACM, com presença de mata galeria, ocorrem também grandes manchas de cerrado, denominadas de cerradão, que em conjunto com os outros tipos de cerrado se tornam extremamente importante para a manutenção da biodiversidade local e regional (Marques, 2012). Se encontra em uma área considerada Amazônia Legal, sendo que as áreas de conservação do cerrado equivalem a aproximadamente 2% da região Amazônica (IBAMA, 2006). Martins et al. (2017) ainda destaca que a região da Chapada das Mesas constitui uma paisagem com uma morfogênese muito mais complexa do que o previsto para paisagens do tipo Chapada.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar através de uma abordagem polifásica microrganismos fotossintetizantes isolados da Chapada das Mesas, MA.

3.2 Específicos

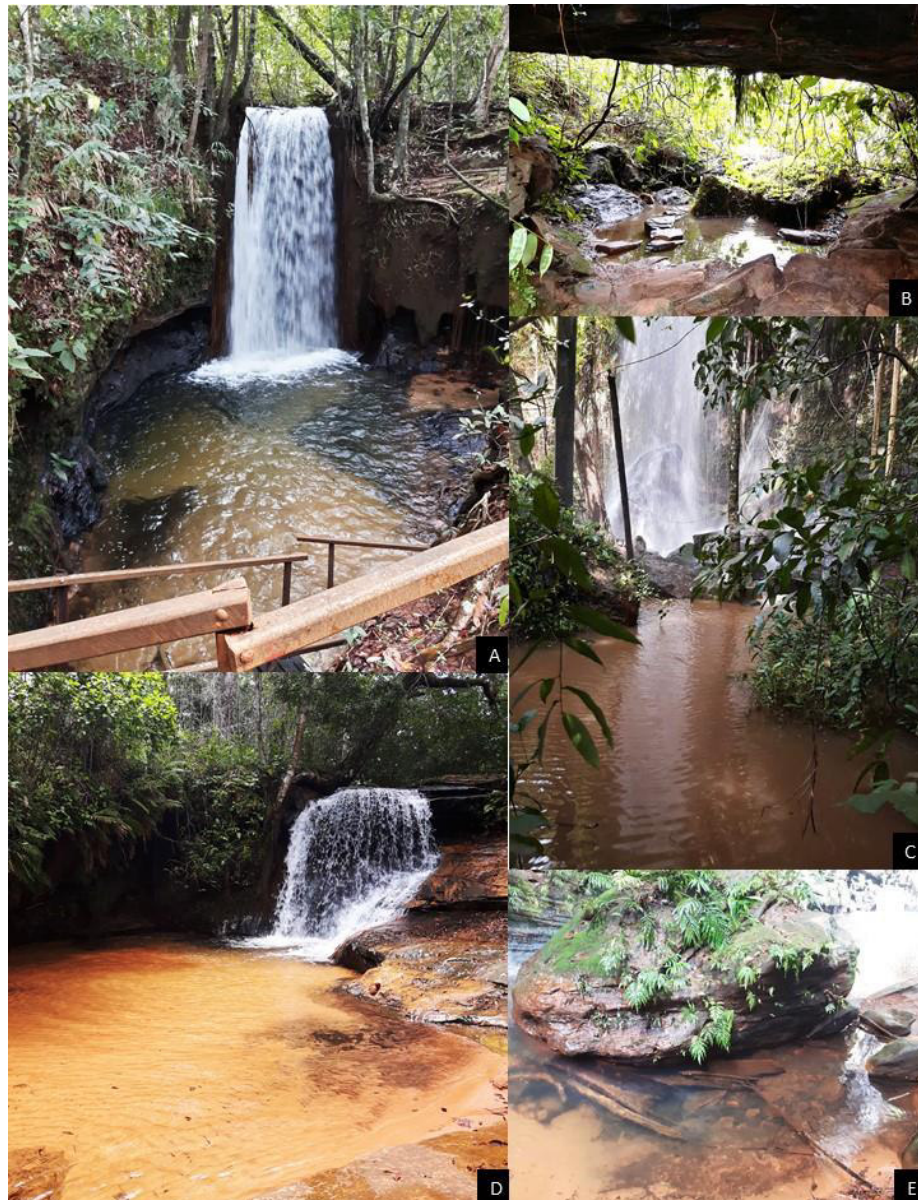
- 3.2.1. Obter culturas unialgais de microrganismos fotossintetizantes;
- 3.2.2. Proceder a caracterização morfológica e molecular dos isolados;
- 3.2.3. Detectar a presença de genes codificantes de cianotoxinas;
- 3.2.4. Testar a bioatividade dos extratos produzidos;
- 3.2.5. Caracterizar quimicamente os extratos obtidos.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta e cultivo de linhagens de cianobactéria

Para obtenção de linhagens foram obtidas amostras de sedimento e água em corpos d'água dentro da área do Parque Nacional da Chapada das Mesas e nas áreas adjacentes do mesmo (Figura 5 e Tabela 3), no mês de março de 2017, amostragem única em período chuvoso. A coleta foi realizada com autorização do Sisbio/ICMBio para atividades com finalidade científica, na Instrução Normativa nº 03/2014, através do código de autenticação 42362534, dentro do projeto BioCyaM - Bioprospecção de metabólitos secundários de cianobactérias do Parque Nacional da Chapada das Mesas, MA.

Figura 5: Locais de coleta no PARNACM. A – Cachoeira Porteira. B – Cachoeira da Prata. C – Cachoeira São Romão. D – Cachoeira Garrote. E – Cachoeira Santuário. Fotos: SOUSA, R. C.



Nos pontos de coleta foram analisados *in situ* vários parâmetros físico-químicos, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e condutividade através do uso de sonda específica multiparamétrica. Foram coletadas 30 mL de amostras de água em tubos plásticos estéreis de 50 mL e mantidas no gelo durante o transporte.

Tabela 3: Localização de pontos de coleta no PARNACM com latitude, longitude e altitude.

	Pontos de coleta	Lat	Lon	Alt
1	Cachoeira Porteira (jusante)	07°02'73S	047°30'46''W	178m
2	Cachoeira Porteira (montante)	07°02'65S	047°30'45''W	163m
3	Cachoeira Garrote 1	07°01'04S	047°28'63''W	162m
4	Cachoeira Garrote 2	07°01'02S	047°28'64''W	195m
5	Cachoeira Santuário 1	06°58'62S	047°26'59''W	231m
6	Cachoeira Santuário 2	06°58'62S	047°26'61''W	220m
7	Cachoeira da Prata 1	06°59'68S	047°09'91''W	212m
8	Cachoeira da Prata 2	06°59'62S	047°09'95''W	178m
9	Cachoeira de São Romão (beira montante)	07°01'21S	047°02'39''W	236m
10	Cachoeira de São Romão (desvio montante)	07°01'21S	047°02'41''W	239m
11	Cachoeira de São Romão (jusante mata fechada)	07°01'21S	047°02'43''W	243m
12	Cachoeira de São Romão (jusante beira da praia)	07°01'22S	047°01'22''W	247m

A obtenção de culturas de cianobactérias unialgais foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia). As culturas foram analisadas na Universidade de Helsinki durante a realização de estágio internacional realizado pela autora da dissertação no período de agosto a novembro de 2018.

As amostras foram inoculadas em meio Z8 com ou sem nitrogênio (Tabela 4) e em meio BG-11 com nitrogênio (Tabela 5), incubação sob iluminação de 3-15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 3 a 4 semanas e temperatura de 17°C-25°C até a obtenção de grande biomassa bacteriana. Para a obtenção de culturas puras foi utilizado método de isolamento em placas, diluições ou “pescaria” sob visualização em microscópio óptico. A coleção de cianobactérias foi mantida e nomeada de GBBB (em referência ao Grupo de Pesquisa em Biodiversidade, Bioprospecção e Biotecnologia) para cada amostra axênica ou unialgal.

As três amostras mais isoladas foram utilizadas neste trabalho, sendo elas: GBBB01 (*Nostoc* sp.) coletada na Cachoeira de São Romão amostra de sedimento, GBBB02 (*Nostoc* sp.) coletada na Cachoeira de São Romão amostra de água e GBBB05 (*Pantanalinema* sp.) coletada na Cachoeira de São Romão amostra de sedimento.

Tabela 4: Solução de preparo para meio de cultivo Z8 com nitrogênio.

Componentes	Volume Final (ml/l)
Z8 I	10
Z8 II	10
Z8 III	10
Micronutrientes	1

Tabela 5: Solução de preparo para meio de cultivo BG-11 (Watanabe e Tanabe, 2013).

Componentes	Concentração Final (g/l)
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄	0,04
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato de amônio férrico	0,006
Na ₂ EDTA	0,001
Micronutrientes	-
Carbonato de sódio	0,02

4.2. Análise morfológica

A análise das linhagens foi realizada em microscópio óptico equipado com o sistema digital de imagem AxioVisionLE 4.6 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Foram analisados caracteres como: diâmetro e comprimento de células vegetativas, além da presença ou ausência de acinetos e heterócitos. As identificações das espécies foram realizadas usando como base a chave de identificação de Bicudo e Menezes (2006) e Komárek e Agnostidis (2005). Análises realizadas no Laboratório de Ficologia da UFMA e no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

4.3. Análise de ultraestrutura em AFM

As amostras foram fixadas utilizando protocolo de fixação em solução de etanol/ácido acético na proporção 3:1, conforme descrito por Chao e Zhang (2011). Inicialmente foi preparada solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Tabela 6), a solução de etanol/ácido acético foi preparada na proporção 3:1 e mantida em temperatura ambiente.

Tabela 6: Reagentes da solução STS em 1L de H₂O deionizada.

Componentes	Concentração Final (g/l)
NaCl	8,475
Na ₂ -HPO ₄	1,093
NaH ₂ -PO ₄	0,276

4.3.1. Preparo das amostras em etanol/ácido acético

Adicionou-se 1 mL das amostras a tubos de 1,5 mL, o material foi centrifugado para concentrar as células no fundo, em seguida as amostras foram lavadas com 1mL da solução tampão salina, agitou-se levemente e então foi novamente centrifugada por 3 minutos a 10.000 xg, o sobrenadante foi descartado e logo após foi adicionado 1 mL da solução fixadora de glutaraldeído 2,5%, agitou-se levemente e manteve-se a amostra na solução por 10 minutos, após esse período a solução foi centrifugada por 3 minutos a 10.000 xg e o sobrenadante foi retirado, as amostras foram lavadas novamente com a solução de PBS por 2 vezes e ressuspensas em 1 mL de água ultrapura. Colocou-se 50 µl do preparado em lamínulas e secas à temperatura ambiente, e depois de secas as mesmas foram armazenadas em geladeira por 24 horas antes de serem levadas para o equipamento.

As amostras fixadas em etanol/ácido acético foram observadas em microscópio óptico antes de serem analisadas por AFM, para verificação da presença de células isoladas e em boas condições de preservação. Foi utilizado para análise das amostras microscópio de força atômica na Central Analítica de Materiais da UFMA.

4.4. Caracterização molecular

4.4.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA foi feita com o KIT ÔMEGA E.Z.N.A. SP Plant DNA KIT e seguiu-se o protocolo do fabricante para 50mL de cultura fresca. A integridade do DNA extraído foi conferida através de leitura em NanoDrop e em gel de Agarose.

Foi realizada leitura em NanoDrop 1000 Espectrofotômetro controlado por um software (ThermoScientific) para quantificação do DNA. A absorbância foi mensurada em 230nm, 260nm e 280nm, como A260/A280 e A260/230, as reações foram calculadas automaticamente em NanoDrop One/One^c Microvolume UV-Vis Espectrofotômetro (ThermoScientific).

O gel de Agarose foi preparado a 2% e 1 gota de brometo etílico. O gel correu nas condições de 100 V por 1h. O comprimento do gel foi de 10 cm. Para a preparação de cada amostra usou-se 2 µL de água Milli-Q, 1 µL de 6X DNA Loading Dye (ThermoScientific) e 2 µL de DNA. Como controle negativo usou-se 4 µL de água Milli-Q e 1 µL de 6X DNA Loading Dye. No gel foi usado para controle positivo 2 tipos de Ladders: M1 e M2. Ladder M1: λDNA/EcoRI + Hind III Marker 3 (ThermoScientific) e Ladder M2: GeneRuler 1 kb Plus DNA Lader (ThermoScientific).

Análises realizadas no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

4.4.2. Amplificação por PCR de marcadores filogenéticos e de cianotoxinas

O gene 16S rRNA foi selecionado para ser amplificado como marcador filogenético, seguindo as referências de Taton et al. (2006). A amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) do gene 16S rRNA foi feita para um volume final de 25 µL, contendo, 2,5 µL DreamTaq buffer com MgCl₂ 20 mM 10 X, 0,5 µL MgCl₂, 0,625 µL dNTP's 10 mM (em cada), 1,25 µL do primer inicial 10 mM, 1,25 µL do primer reverso 10 mM, 0,625 µL DreamTaq polymerase 5 u/λ, 16,25 µL de ddH₂O e 2 µL de DNA. A reação foi realizada no BioRader Cycler, nas condições descritas na tabela 7.

Para a detecção de cianotoxinas foram utilizados iniciadores específicos conforme descrito na tabela 7 nas seguintes condições de PCR: volume final de 25 µL, contendo, 2,5 µL DreamTaq buffer com MgCl₂ 20 mM 10X, 0,5 µL MgCl₂, 0,625 µL dNTP's 10 mM (em cada), 2,5 µL do mix de primers 10 mM, 0,1 µL DreamTaq polymerase 5u/λ, 16,775 µL de ddH₂O e 2 µL de DNA.

Tabela 7: Marcadores e condições de amplificação dos genes para PCR

Gene	Iniciador	Sequência (5'-3')	Condições da PCR
16S rRNA	16S27F ^{*1}	AGAGTTTGATCCTGG CTCAG	95°C/3min; 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s; anelamento a 56°C por 30s; extensão a 72°C por 2min e extensão final a 72°C por 7min.
	16S1494R ^{*2}	GTACGGCTACCTTGT TACGAC	

Saxitoxina	sxtF ^{*3}	GGAGTGGATTTCAA CACCAGAA	Pré-desnaturação a 95°C por 3min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 61°C por 30seg, extensão a 72°C por 25seg e extensão final a 72°C por 5min
	sxtR ^{*3}	GTTTCCCAGACTCGT TTCAGG	
Microcistina	mcyF ^{*3}	AATAAATCATAATTT AGAACSGGVGATTT AGG	
	mcyR ^{*3}	AATAAATCATAACG RBTVADTTGRTATTC AATTCT	

*Obtidos de 1: WILMOTTE, A.; VAN DER AUWERA, G.; DE WACHTER, R. 1993.

2: WILMOTTE, A.; DEMONCEAU, C.; GOFFART, A.; HECQ, J. H.; DEMOULIN, V.; CROSSLEY, A. C. 2002.

3: AL-TEBRINEH, J.; PEARSON, L. A.; YASAR, S. A.; NEILAN, B. A. 2012.

Análises realizadas no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

4.4.3. Clonagem e PCR de colônia

Após a amplificação por PCR das sequências de DNA, foi realizada a clonagem dos amplicons, para isso foi utilizado o kit de clonagem TOPO® TA (Thermo Fisher Scientific) e seguiu-se as instruções indicadas pelo fabricante. A transformação foi realizada através de choque térmico. As células transformadas foram inoculadas em placas de cultivo com meio LB ágar (nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40, 60 µL de inóculo) e incubadas por 12h a 37°C. Após isso, os clones foram selecionados a partir de colônias de coloração branca.

As colônias de interesse foram retiradas das placas e a presença dos insertos foi confirmada por meio de PCR utilizando os iniciadores M13F (5'-CTGGCCGTCGTTTTAC-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). A amplificação foi feita para um volume final de 25 µL, contendo, 2,5 µL DreamTaq buffer com MgCl₂ 20 mM 10X, 0,5 µL MgCl₂, 0,625 µL dNTP's 10mM (em cada), 1,25 µL do primer inicial 10 mM, 1,25 µL do primer reverso 10 mM, 0,625 µL DreamTaq polymerase 5 u/λ, 16,25 µL de ddH₂O e 2 µL de DNA.

As condições da termociclagem foram: pré-desnaturação a 95°C por 3 min, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 50°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. O produto da PCR foi verificado através de gel de Agarose a 0,7%. Os clones que apareceram com resultados positivos no gel de Agarose passaram então por uma PCR com primers específicos para DNA de cianobactérias, utilizando os iniciadores 359F e 1350R. A amplificação foi feita para um volume final de 20 µL, contendo, 2 µL DreamTaq buffer com MgCl₂ 20 mM 10X, 0,4 µL MgCl₂, 0,5 µL dNTP's 10 mM (em cada), 1 µL do primer inicial 10 mM, 1 µL do primer reverso 10 mM, 0,5 µL DreamTaq polymerase 5

u/λ, 12,6 μL de ddH₂O e 2 μL de DNA. As condições da termociclagem foram: pré-desnaturação a 95°C por 3min, 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg, anelamento a 56°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR e clonagem foram enviados para um serviço terceirizado e foram sequenciados de acordo com o protocolo do mesmo.

Análises realizadas no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

4.4.4 Análise das sequências

As sequências obtidas foram verificadas quanto a qualidade e alinhadas pela ferramenta ClustalW e editadas manualmente no programa BioEdit (Hall, 2011). A ferramenta BLASTn do banco de dados Genbank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi utilizada para comparações de homologias e obtenção de sequências similares para a construção das árvores de diversidade e filogenia.

As análises de diversidade foram realizadas utilizando-se o método de Neighbor Joining (Saitou e Nei, 1987), no software Mega X (Kumar et al., 2018).

4.5. Extrato de cianobactérias

Para a obtenção de extrato de cianobactérias seguiu-se a metodologia indicada por Shishido et al. (2015), as células foram extraídas por centrifugação de 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, depois foram armazenadas a -80°C antes da liofilização. O material ficou 71 horas no liofilizador para a secagem total das células. Em um tubo de 2 mL foi transferido 200 μL de beads de vidro, 100 mg de células liofilizadas e 1mL de MeOH 100%. Homogeneizou-se as amostras usando FastPrep-24 disruptor celular, duas vezes por 20 segundos a uma velocidade de 6,5 m/s⁻¹. Em temperatura ambiente as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g em eppendorff, depois disso o sobrenadante foi coletado em um tubo de vidro e passou pelo processo de evaporação do solvente (com Nitrogênio), acrescentou-se mais 1 mL de MeOH, concentração de 100 mg/mL. A amostra então foi sonicada por 2 minutos e mantida a -20°C para análises posteriores.

Análises realizadas no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

4.6. Teste de bioatividade antimicrobiana

Extratos metanólicos (300 µL) de todas as cepas estudadas foram aplicados a um disco de papel e mantidos overnight para a absorção do extrato pelos discos. Foram utilizadas cepas bacterianas e fúngicas do Microbial Domain Biological Resource Centre (HAMBI). *Candida albicans* HAMBI484 e *Aspergillus flavus* HAMBI829 foram cultivados em meio Ágar dextrose batata (PDA), *Micrococcus luteus* HAMBI2688 e *Escherichia coli* HAMBI1723 foram cultivadas em meio Ágar nutriente (NA), *Staphylococcus aureus* HAMBI66 foi cultivado em meio Ágar brain heart infusion (BHI), enquanto *Acinetobacter baumannii* HAMBI1760 foi cultivado em Ágar triptona glicose (TGY). Após o inóculo de bactérias e fungos nas placas com meio sólido, os discos foram aplicados, depois de um período de incubação de 24 horas - 72 horas em temperaturas de 28°C-37°C, as placas foram analisadas com mensuramento das zonas de inibição, que foram medidas incluindo o diâmetro do disco de papel. Para controle positivo foi utilizado Kanamycin 1000 µg por disco para bactérias e Nistatina 300 µg por disco para fungos e para controle negativo foi utilizado 300 µL de MeOH 100% por disco (Vestola et al. 2014).

Análises realizadas no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

4.7. Teste de atividade carrapaticida

Os testes de atividade acaricida foram realizados no Laboratório de Helminologia na UFMA com duas cepas do carrapato *Rhipicephalus microplus*, sendo uma resistente e outra considerada sensível aos carrapaticidas químicos sintéticos: JAGUAR e POA, respectivamente. Foi realizado um teste piloto com extrato na concentração padrão (100 mg/mL), para verificar o melhor diluente e a necessidade de diluições da amostra. Os extratos foram obtidos a partir de dois solventes diferentes, um utilizando metanol 100% e outro etanol 70%. O extrato metanólico foi liofilizado e suspenso em dois diferentes diluentes, água deionizada e solução de ET-Triton 0,02%. Ao final foram obtidos 3 produtos a serem testados: extrato metanólico suspenso em água deionizada, extrato metanólico suspenso em solução de ET-Triton 0,02%, e extrato etanólico. Como controle negativo foram utilizadas soluções diferentes conforme descritos na Tabela 08. Foram adicionados 1000 µL do extrato, em Eppendorff de 1,5 mL e aproximadamente, 500 larvas foram adicionadas. Imediatamente após a adição de larvas, o tubo foi fechado e agitado vigorosamente por alguns segundos e, em seguida, suavemente por 10 min. Os tubos foram então abertos e as larvas transferidas para um filtro de papel. Após

secagem, cerca de 100 larvas foram transferidas para filtro de papel quadriculado (850 mm/750 mm) dobrados e fechados com cliques em um “pacote”. Os pacotes foram incubados a 27-28 °C e 80-90% de umidade relativa por 24 horas, em seguida, a mortalidade foi determinada. Apenas larvas capazes de locomoção foram consideradas vivas. Estes passos foram repetidos para cada um dos extratos obtidos e para cada cepa de organismo testada (Klafke et al., 2006).

Tabela 8 - Controles negativos usados no teste carrapaticida.

Material (Extrato)	Solução controle
Extrato etanoico	Etanol 70%
Extrato metanoico suspenso em dH ₂ O*	dH ₂ O
Extrato metanoico suspenso em solução de ET-Triton 0,02%	Solução de ET-Triton 0,02%

*dH₂O: água deionizada

Para o teste de atividade carrapaticida utilizou-se as cepas GBBB01 e GBBB02, a GBBB05 não apresentou crescimento de biomassa o suficiente para o teste de bioatividade. Lürling et al. (2013) citam que a taxa de crescimento lento de muitas cepas atingindo aproximadamente 0,2 duplicações por dia, é uma desvantagem nas pesquisas onde se utiliza grande biomassa destes microrganismos.

4.8. Caracterização química

A análise de metabólitos secundários no extrato de cianobactéria foi realizada em um sistema Shimadzu Prominence LC acoplado a um Quadrupole time-of-flight (MicroTOF-QII; Bruker Daltonics) e equipado com uma interface de ionização por electrospray. A separação foi obtida em uma coluna RP (Phenomenex, Luna) a 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ usando uma eluição de gradiente linear (5–90% B em 50 min). O equipamento Q/TOF foi operado no modo *scan* e AutoMS/MS, realizando experimentos de MS/MS sobre os três íons mais intensos a partir de cada pesquisa por MS. As análises por UPLC-QTOF foram realizadas com o sistema Acquity I-Class UPLC – Synapt G2-Si HDMS (Waters Corp.). A calibração do QTOF foi feita com formato de sódio. Os dados precisos de massa foram processados pelo programa Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics) o qual forneceu uma classificação de possíveis fórmulas elementares usando o SmartFormulaEditorTM (Jokela et al. 2012)

Análises realizadas no Departamento de Ciências da Alimentação e do Meio Ambiente, Divisão de Microbiologia e Biotecnologia, na Universidade de Helsinki (Finlândia).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fatores físico-químicos e nutrientes

A temperatura da água mostrou uma variação de $\pm 3^{\circ}\text{C}$ nos pontos de coleta, com mínima de 25°C e máxima de $28,2^{\circ}\text{C}$, encontrando-se numa variação ótima para crescimento de organismos fotossintetizantes segundo Ferreira (2008). O valor mínimo e máximo de pH apresentou uma variação de 0,5. Dos parâmetros medidos a turbidez apresentou o maior nível de variação, oscilando de 3,97 a 22,3. O oxigênio dissolvido na água apresentou valor mínimo de 2,75 e máximo de 7,77. Pouca variação de salinidade (Ver tabela 9).

Tabela 9: Parâmetros físico-químicos medidos com sonda multiparamétrica nos locais de coleta do PARNACM.

	Pontos de coleta	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Turbidez (NTU)	OD (mg/L)	Sal.
1	Cachoeira Porteira (jusante)	27.5	7,1	4,39	6.20	0,001
2	Cachoeira Porteira (montante)	27.2	7,3	4,82	7.66	0,001
3	Cachoeira Garrote 1	27.8	7,3	3,97	5.63	0
4	Cachoeira Garrote 2	28.2	7,2	4,57	5.65	0,001
5	Cachoeira Santuário 1	27.5	7,3	7,44	4.35	0
6	Cachoeira Santuário 2	27.4	6,9	5,93	2.75	0
7	Cachoeira da Prata 1	26.2	6,9	14,3	5.98	0,02
8	Cachoeira da Prata 2	25.0	6,9	11,7	3.48	0,001
9	Cachoeira de São Romão (beira montante)	26.4	7	12,9	7.51	0,002
10	Cachoeira de São Romão (desvio montante)	26.5	7,3	22,3	7.12	0,002
11	Cachoeira de São Romão (jusante mata fechada)	26.2	7,4	16	3.55	0,002
12	Cachoeira de São Romão (jusante beira da praia)	26.5	7,4	20,6	7.77	0,002

Legenda: Temp.: Temperatura; OD: Oxigênio Dissolvido/ Sal.: Salinidade;

Machado et al. (2016), em estudo realizado no reservatório de Guarapiranga, concluíram que as características físico-químicas e biológicas do reservatório têm variação espacial e temporal e, conseqüentemente, a ocorrência das cianobactérias varia em função destas características determinando a alternância de táxons entre o período chuvoso e seco. Esta mudança foi comprovada pela dinâmica entre a elevada biomassa constatada para estes

organismos e altos teores de nutrientes, principalmente de amônio, pH neutro-alcalino e baixa zona eufótica.

A coleta foi realizada em período chuvoso e Dos Santos et al. (2017) afirmam que a presença de cianobactérias é maior em períodos chuvosos quando em seu trabalho compararam estação chuvosa e seca, porém também há uma ampla distribuição na estação seca e pode estar correlacionado com fatores como salinidade, turbidez da água e os nutrientes presentes.

Houve pouca variação de salinidade nos locais de coleta, segundo Carstensen et al. (2015) florações de cianobactérias são mais restritas a habitats de baixa salinidade, esse fator pode estar ligado a importantes implicações ecológicas e bioquímicas, além de haver uma rotação de nutrientes. Ambientes que produzem variações na salinidade, dependendo das quantidades de água fresca disponível, dão a elas uma vantagem sobre outros concorrentes (Domingues et al., 2005).

A variação da presença de oxigênio dissolvido teve mínima de 2,75 mg/L na Cachoeira do Santuário (ponto 6), Jardim et al. (2014) afirma que quanto maior a concentração de oxigênio dissolvido no local maior a ocorrência de florações de cianobactérias, além da concentração de OD estar diretamente ligada ao aumento da presença de nitrato na água, apresentando uma correlação positiva para a densidade de cianobactérias.

Os organismos fotossintéticos dependem de uma fonte de nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento, a fonte de mais fácil obtenção para esses organismos como cianobactérias, é o N_2 na forma de íon amônio NH_4^+ , NO_2^- ou NO_3^- (Paschkewitz, 2012). Cianobactérias em ambientes eutrofizados conseguem otimizar o aproveitamento da luz e assimilar nutrientes, além de sua capacidade de fixação de nitrogênio em colunas d'água com elevada incidência solar e formação de acinetos em águas com alto índice de turbidez (Paerl e Paul, 2012) (Ver tabela 10).

Dentro dos valores de referência dos parâmetros qualidade da água para corpos de água classe 2 conforme a Resolução CONAMA 357/05 o máximo de nitrato deve ser igual a $10mg.L^{-1}$. Ferraz (2012) mostra que valores elevados de nitrato geralmente são acompanhados pelo aumento das cianobactérias, além disso, os valores de nitrato podem cair logo após episódios de densidade celular alta, isso se dá devido o consumo deste nutriente pelas cianobactérias em seu metabolismo, utilizando-o para seu crescimento. O ponto 6 (Cachoeira de São Romão – beira montante) de onde foram obtidas as cepas deste estudo apresenta quantidade baixa de nitrato e nele foram encontradas espécies fixadoras de nitrogênio.

Tabela 10: Parâmetros ambientais de nutrientes mensurados nos locais de coleta do PARNACM.

	Pontos de coleta	NH₃ μmol.L⁻¹	NO₂ μmol.L⁻²	NO₃ μmol.L⁻³	PO₃⁻⁴ μmol.L⁻⁴	SiO₂ μmol.L⁻⁵
1	Cachoeira Porteira (jusante)	112,56	0,02	4,03	0,02	1,73
2	Cachoeira Porteira (montante)	18,59	0,03	2,63	0,26	2,64
3	Cachoeira Garrote 1	17,2	0,04	4,63	1,21	1,2
4	Cachoeira Garrote 2	12,33	0,05	4,17	0,07	2
5	Cachoeira Santuário 1	10,93	0,04	3,88	0,02	0,57
6	Cachoeira Santuário 2	6,76	0,06	3,6	0,11	0,62
7	Cachoeira da Prata 1	7,45	0,11	2,2	0,38	0,81
8	Cachoeira da Prata 2	26,25	0,24	7,57	0,53	2,52
9	Cachoeira de São Romão (beira montante)	8,85	0,14	5,46	0,26	3,78
10	Cachoeira de São Romão (desvio montante)	10,24	0,08	5,71	0,6	4,26
11	Cachoeira de São Romão (jusante mata fechada)	8,85	0,1	6,74	0,55	3,93
12	Cachoeira de São Romão (jusante beira da praia)	6,76	0,16	58,07	0,4	4,3

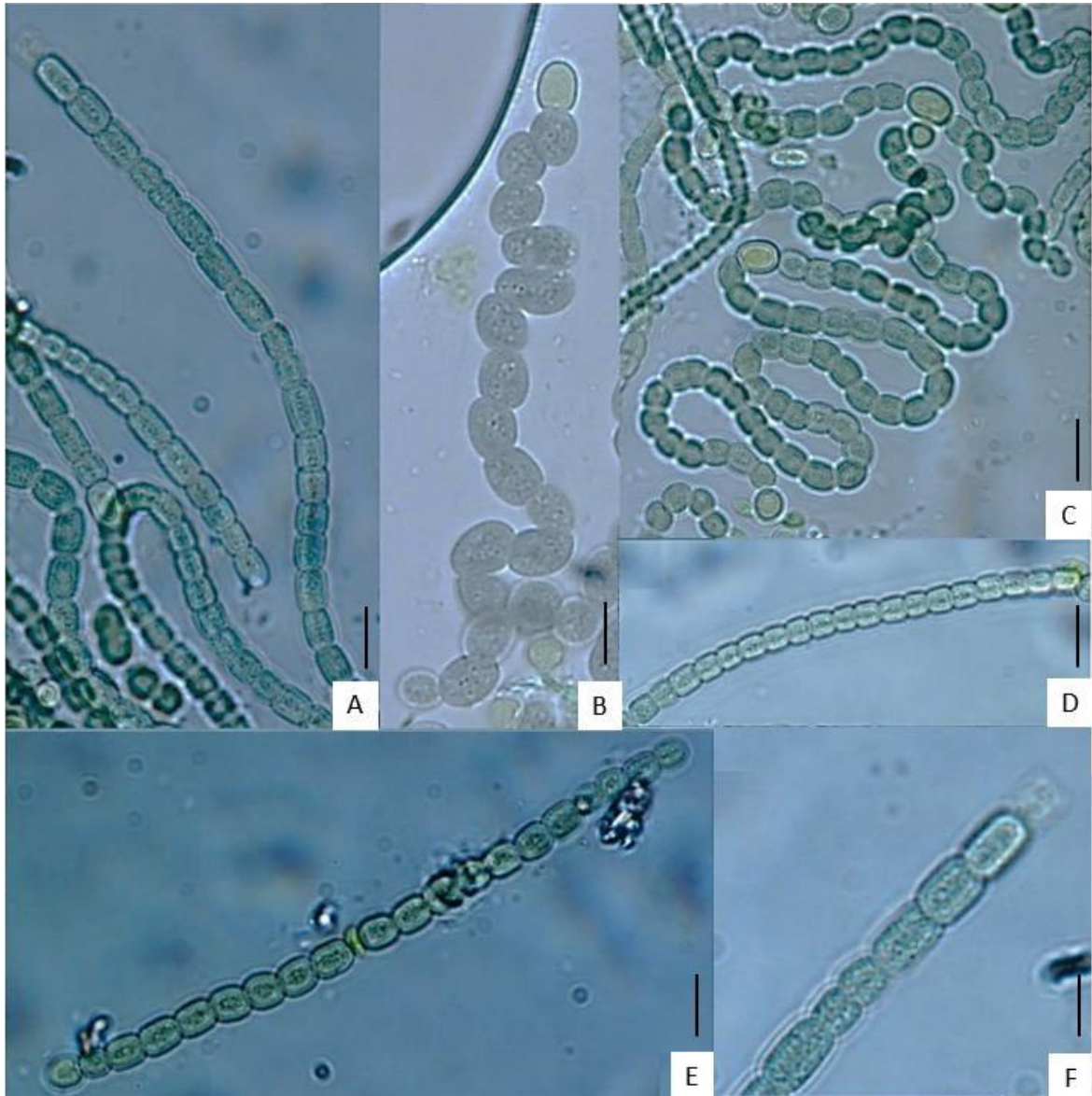
A alta carga de nutrientes pode ter influência direta de efluentes domésticos e industriais, quando esse efluentes são lançados nos corpos d'água levam ao aumento da concentração de nutrientes nos corpos d'água, principalmente fósforo e nitrogênio, acarretando um aumento de eventos de eutrofização nestes ambientes, afetando diretamente a comunidade aquática ali presente, favorecendo alguns organismos em detrimento dos demais, como é o caso das cianobactérias (Ferraz, 2012).

5.2. Caracterização morfológica

As células vegetativas da GBBB01 (*Nostoc* sp.) em meio líquido apresentam-se em colônias são de cor verde-escuro, formando uma mucilagem gelatinosa. Observados no microscópio os tricomas são de cor verde-claro, móveis, agregados, isopolares, longos, flexíveis, sem ramificações, células constrictas e conteúdo celular com grânulos (Figura 6).

Células vegetativas cilíndricas arredondadas, 5-6 μ m altura x 3-4 μ m largura. Células apicais com formas variadas: arredondada ou cônica-arredondada. Células mais longas que largas, filamentos finos, alguns curtos, porém a maioria longos. Presença de acinetos formados em cadeia, 6-7 μ m altura x 4-5 μ m largura. Bainha incolor. Hormogônios pouco observados.

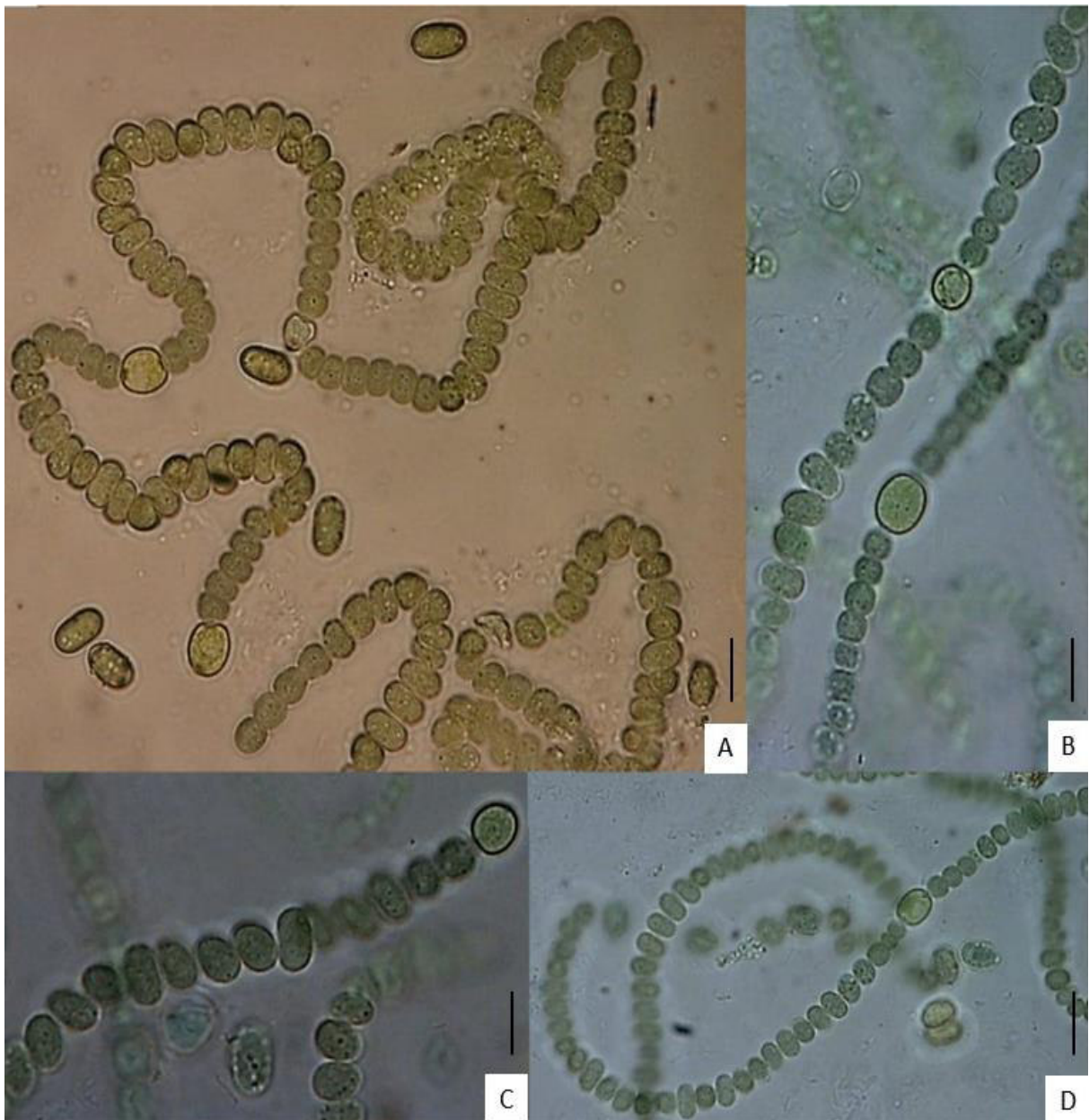
Figura 6: Fotomicrografia de GBBB01 (*Nostoc* sp.) A- F – filamento de cianobactéria. B, C – presença de acinetos. E – célula terminal. Barras: 10 μ m. Fotos: SOUSA, R. C.



Furtado et al. (2009) descreve o gênero como células formando tricomas mucilaginosos de cor amarronzada, as células podem ser esféricas ou em forma de barril com conteúdo granular, há também a presença de heterócitos que podem ser terminais ou intercalares em formato de barril, os acinetos encontrados com formato cilíndrico ou ligeiramente arqueado.

GBBB02 (*Nostoc* sp.) em meio sólido as colônias são esféricas, mucilaginosas e de cor marrom-esverdeada. Em meio líquido os filamentos de cor verde-escuro formam aglomerados ligados ao fundo do frasco, os tricomas são móveis, longos, flexíveis, em linha reta ou ondulados, incolor ou quase invisível envelopamento, 3-4 μ m largura (Figura 7).

Figura 7: Fotomicrografia de GBBB02 (*Nostoc* sp.) A-D – filamento de cianobactéria *Nostoc* sp. com presença de heterócitos. B, C – presença de acinetos. Barras: 10 μ m. Fotos: SOUSA, R. C.



Tricomas são unisseriados e isopolar, sem falsas ramificações e constrictos. Células vegetativas são cilíndricas, 3-5 μ m altura x 3-4 μ m largura, contém grânulos que são observados em muitas células e possui cor verde claro para marrom-esverdeado. Heterócitos intercalares ou terminais. Heterócitos intercalares são ovais quase esféricos d=5-6 μ m ou ovais 7 μ m altura x 6 μ m largura, enquanto os heterócitos terminais são esféricos d=3-4 μ m ou oblongos 5 μ m altura x 4 μ m largura, cor amarelo-esverdeado.

Acinetos claramente distinguíveis de células vegetativas, formato oval com 9 μ m altura x 5 μ m largura (algumas outras formas foram observadas, mas em menor quantidade), possuem parede celular espessa, contém grânulos e cor esverdeada, se desenvolvem paraheterociticamente e às vezes todas as células em tricomas são convertidos para acinetos. Hormogônia em direção aos heterócitos terminais também foram observadas.

Komárek et al. (2014), em seu sistema de classificação de cianobactérias descrevem morfologicamente *Nostoc* como espécies de cianobactérias não ramificadas, com filamentos isopolar ou heteropolar, produzindo acinetos, frequentemente em série.

GBBB05 (*Pantanalinema* sp.) possui talos com coloração de verde escuro ao verde-oliva (Figura 8). Os filamentos são longos 3 μ m de largura, emaranhados e flexíveis. Bainha é fina, firme e incolor, sempre ligado a tricomas. Os tricomas são cilíndricos, não constrictos ou ligeiramente constringidos nas paredes transversais, unisseriados, não atenuados em direção às extremidades, sem células necrídicas. Os tricomas têm 2 μ m de largura, cor verde pálido e possuem motilidade (deslizamento). As células são isodiamétricas 2-3 μ m de comprimento x 2 μ m de largura com conteúdo granular. A célula apical é arredondada para arredondada-cônica sem caliptra. Não foi observada ramificação falsa.

Quanto à sua morfologia, Vaz et al., (2015) descrevem as cepas de *Pantanalinema* com tricomas microscópicos, os filamentos são emaranhados e flexíveis. Os tricomas móveis são caracterizados por uma leve motilidade de deslizamento. A célula apical é cilíndrica com um ápice arredondado a ligeiramente cônico, o conteúdo celular é homogêneo podendo ser verde acastanhado ou verde oliva.

Figura 8: Fotomicrografia de GBBB05 (*Pantanalinema* sp.) A- E – filamento de cianobactéria *Pantanalinema* sp. A – célula apical arredondada-cônica. E – presença de necrídeos. F – filamento com conteúdo granular. Barras: 10µm. Fotos: SOUSA, R. C.



Em todas as cepas a identificação morfológica corrobora com os resultados obtidos no microbioma realizado para as amostras.

5.3. Caracterização ultra estrutural

O protocolo de etanol/ácido acético foi primeiramente utilizado para a caracterização ultraestrutural, pois segundo Chao e Zang (2011) esta solução promove uma melhor preservação da morfologia celular. Os testes para a amostra GBBB02 ainda não foram concluídos pela Central Analítica de Materiais da UFMA.

Nas imagens 3D obtidas por microscopia de força atômica para cepa GBBB01 (*Nostoc* sp.) nota-se os detalhes topográficos das células, estas são encontradas dispostas isoladamente, não formando tricomas na maioria das vezes, o que pode ser ocasionado pelo rompimento de estruturas na realização do processo, isso ocorre, pois, a secagem do filamento pode provocar alterações na estrutura total. Ainda assim, é possível observar na figura 9 poucas células unidas formando uma parte do filamento.

Read, Connell e Adams (2007), em seu trabalho de visualização em nanoescala de parede celular de cianobactérias filamentosas, conseguiram visualizar através de imagens AFM uma natureza paralela da matriz de cepas de *Nostoc*, porém, assim como neste trabalho houveram alguns rompimentos da regularidade da disposição das células, com filamentos que aparecem ser quebrados ou encontrando-se nos sentidos diferentes do sentido da maioria da disposição.

É possível obter varreduras de AFM de alta resolução de cianobactérias filamentosas preparadas em protocolo sem secagem e fixação, ou seja, totalmente hidratadas. Read, Connell e Adams (2007), realizaram a primeira varredura para cianobactérias hidratadas em cepas filamentosas e concluíram que apesar de ser possível estudar a topologia e as propriedades físico-químicas da superfície bacteriana nestas circunstâncias as análises são dificultadas pela não imobilização completa da amostra.

Na figura 9 apresentada para a GBBB01 observa-se que as células são unidas constritamente, além disso há cadeias ligantes entre elas, é possível também analisar o grau de rugosidade e o perfil de altura dessas células que chega a 1.8 μ m (Figura 10). A medida de Rugosidade média (Ra) para a GBBB01 foi mensurada em 47.1nm, isso representa rugosidade da superfície da membrana em análise tridimensional.

Figura 9: Imagem ultraestrutural de GBBB01 (*Nostoc* sp.), A, B – pequenos tricomas. C, D – presença de cadeias ligantes entre células. E, F – tricomas maiores com presença de acinetos.

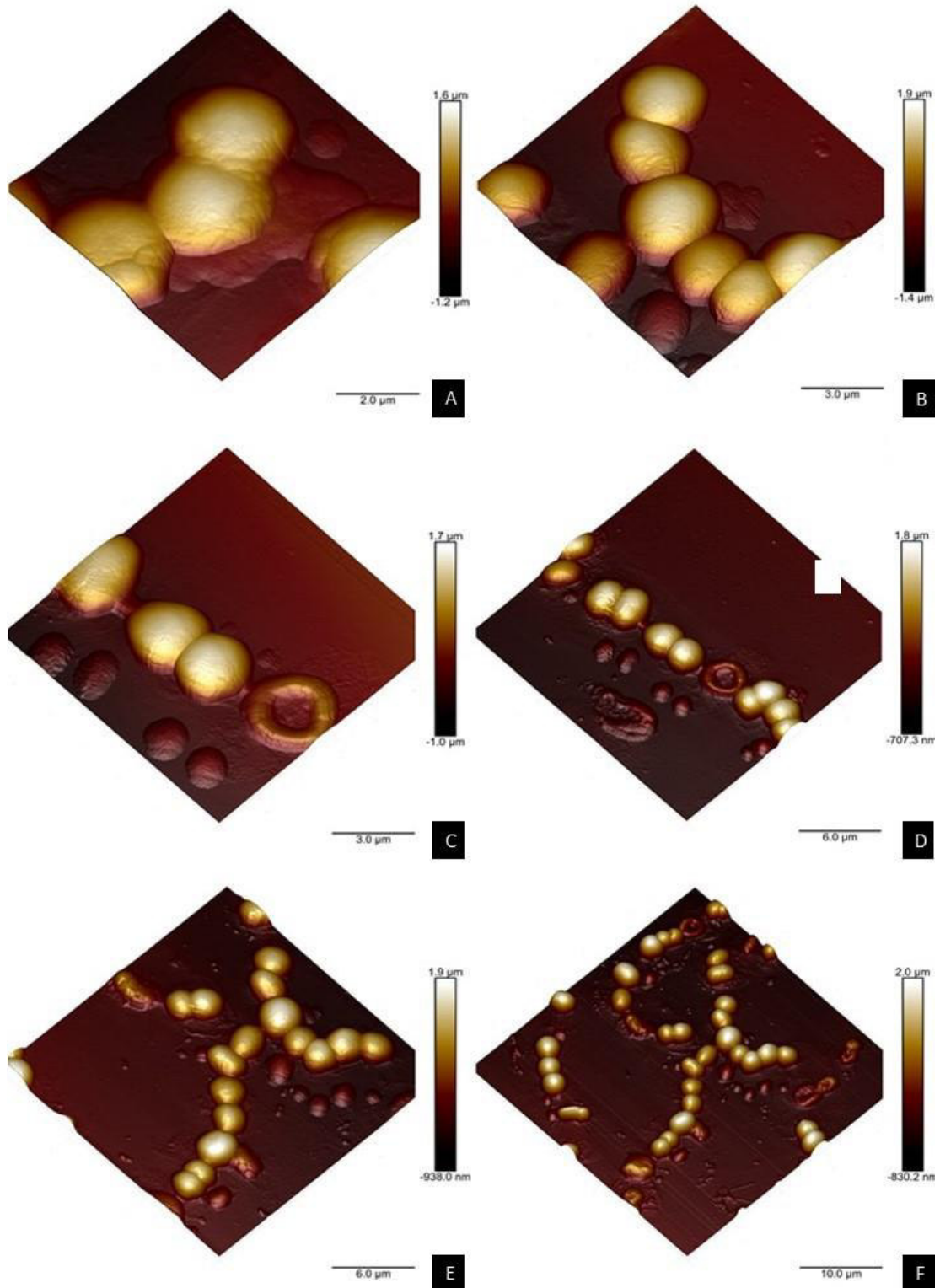
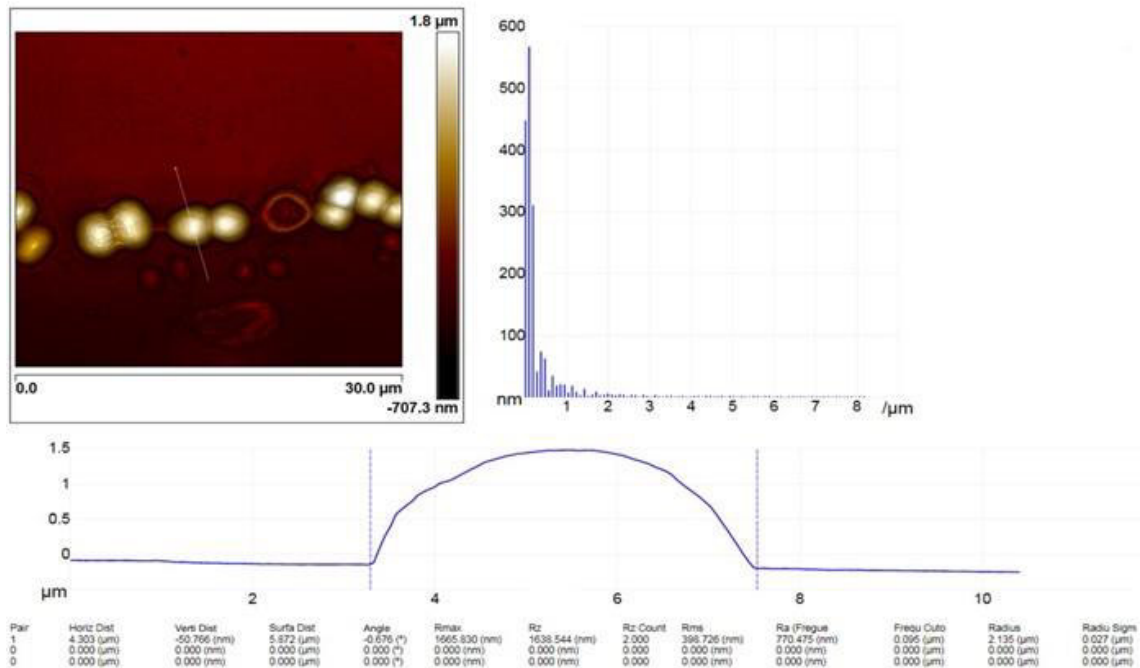


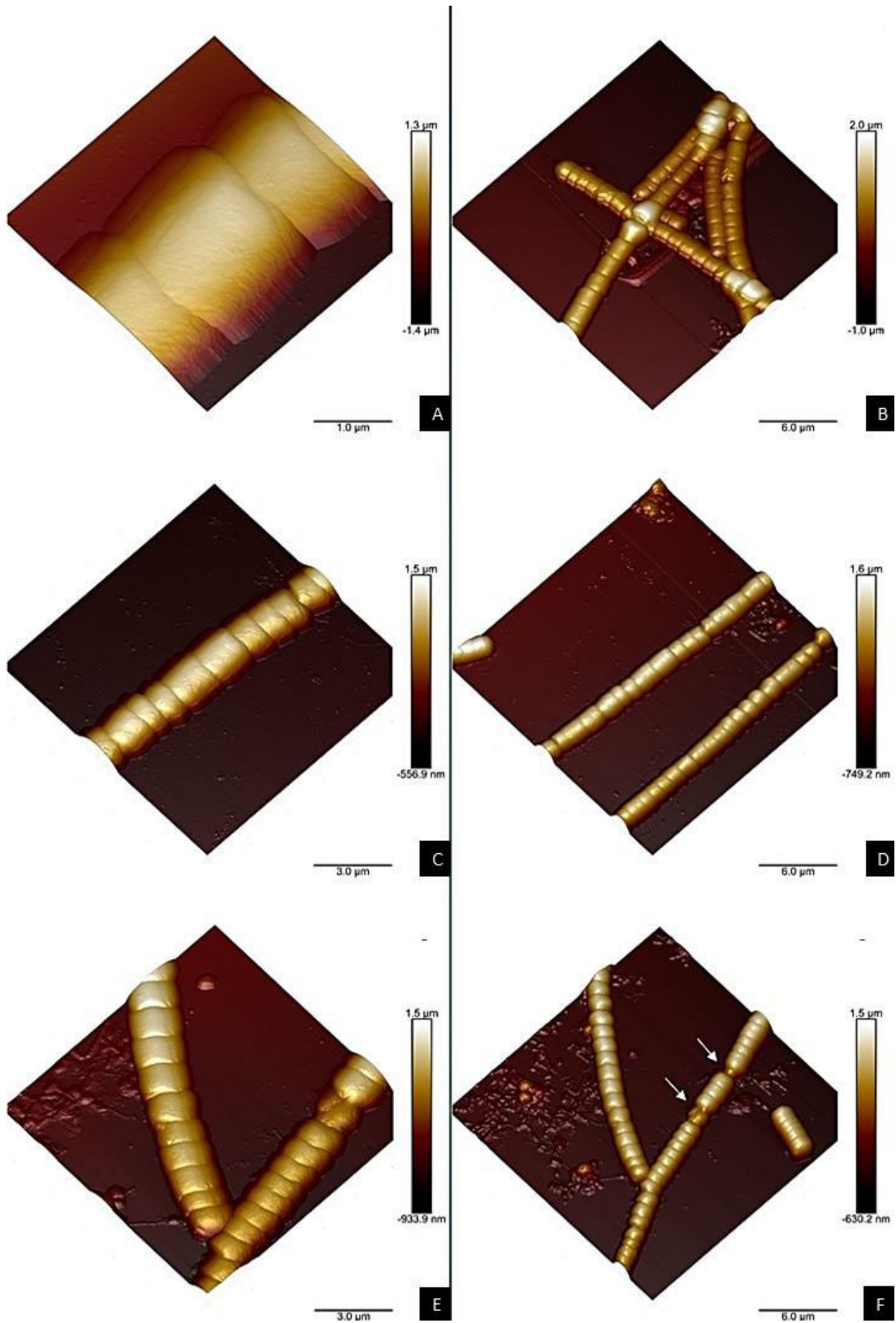
Figura 10: Imagem ultraestrutural de GBBB01 (*Nostoc* sp.), medida de altura de célula.



Por se tratar de um gênero recentemente descrito, ainda não é encontrado nenhum trabalho que mencione a análise de ultraestrutura com AFM para cepas do gênero *Pantanalinema*. Por meio das imagens obtidas é possível observar a disposição das células nos filamentos desta cianobactéria (Figura 11).

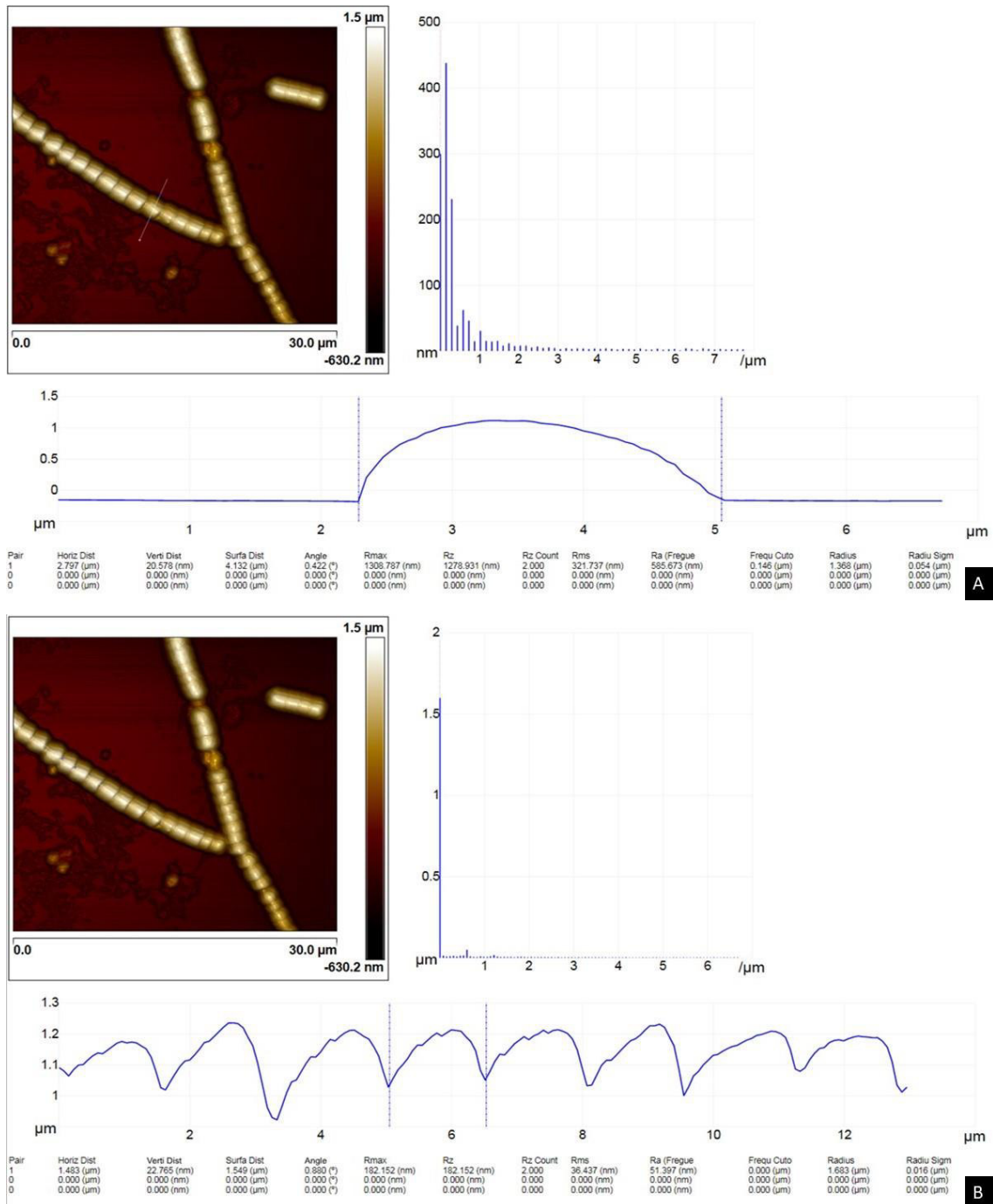
As células da GBBB05 encontram-se firmemente unidas ao longo dos tricomas, na figura 11B ainda é possível observar células diferenciadas que fazem ligação com o restante do filamento e célula apical cilíndrica corroborando com a descrição por morfologia anteriormente citada. O perfil de Ra encontrado para a GBBB05 é de 32,7nm, apresentando então uma superfície de membrana mais lisa.

Figura 11: Imagens ultraestruturais de GBBB05 (*Pantalaninema* sp.) A – ligação de células constrictas. B, C, D – filamento isopolar . E, F – Tricomas com presença de células diferenciadas.



Nas imagens abaixo (Figura 12) são analisados respectivamente os padrões de diâmetro das células medidas isoladamente e o padrão medido célula-a-célula para a formação do filamento completo, onde observa-se o perfil de altura dessas células que chega a 1.5µm.

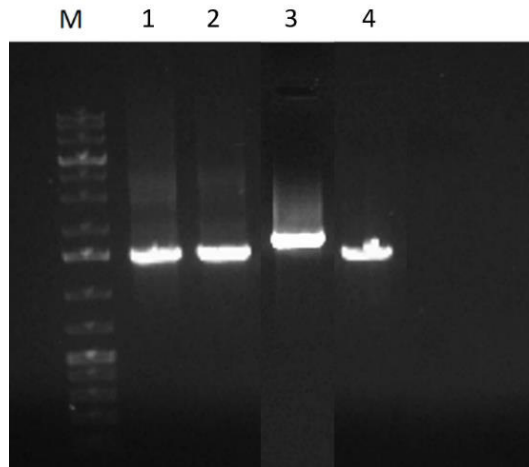
Figura 12: Imagem ultraestrutural de GBBB05 (*Pantanalinema* sp.). A – medida de altura de célula isolada. B – medida de altura de célula-a-célula em filamento.



5.4. Análise molecular

Das cepas de cianobactérias testadas, todas resultaram em amostras com DNA em quantidade satisfatória e boa qualidade constatada comprovada pela eletroforese em gel de Agarose e posteriormente comprovada pela amplificação (Figura 13).

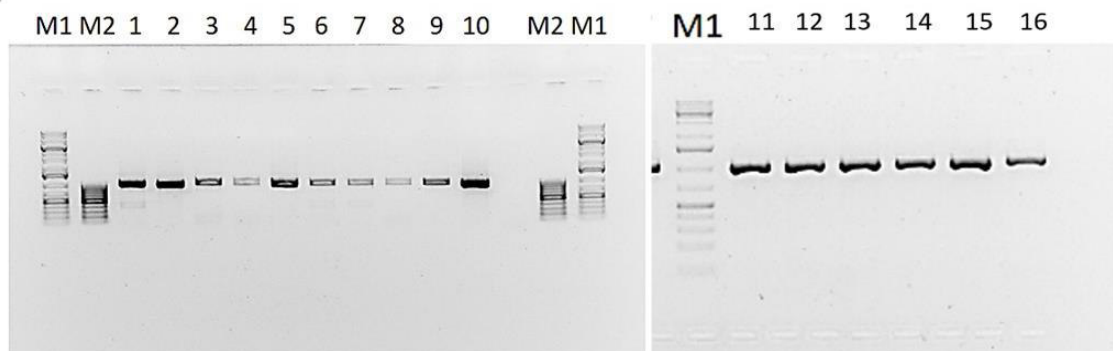
Figura 13: Produtos de amplificação (PCR) do gene rRNA 16S. M – marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; 1 – GBBB01; 2 – GBBB02; 3 – GBBB05, 4 – Controle positivo.



As mesmas amostras foram testadas com iniciadores específicos para as cianotoxinas saxitoxina e microcistina, não apresentando resultado positivo para essas toxinas.

A partir dos produtos de PCR do rRNA16S, foram realizadas clonagens com as cepas GBBB01, GBBB02 e GBBB05. Os resultados das clonagens foram checados após um dia, observou-se a presença de colônias brancas e dessas colônias então realizada uma nova PCR com a utilização do primer universal M13F e M13R para avaliar a ligação com o vetor. Logo após outra PCR com os iniciadores específicos 359F e 1350R foi realizada, neste caso, somente para os clones que apresentaram resultado positivo (Figura 14).

Figura 14: Produtos de amplificação (PCR) dos clones. M1 – marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; M2 – marcador de peso molecular 100mb DNA Ladder; 1-8 – Clones GBBB01; 9-10 – Clones GBBB02; 11-16 – Clones GBBB05.



5.5. Análise genética

Após a obtenção dos resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA através de um serviço terceirizado, as sequências consenso foram alinhadas e montadas usando o software Bioedit. Após a edição das sequências para eliminar regiões de baixa qualidade, as mesmas foram submetidas ao BLASTn. Os resultados podem ser observados na tabela 11 abaixo. Em geral a identificação molecular corroborou a morfologia.

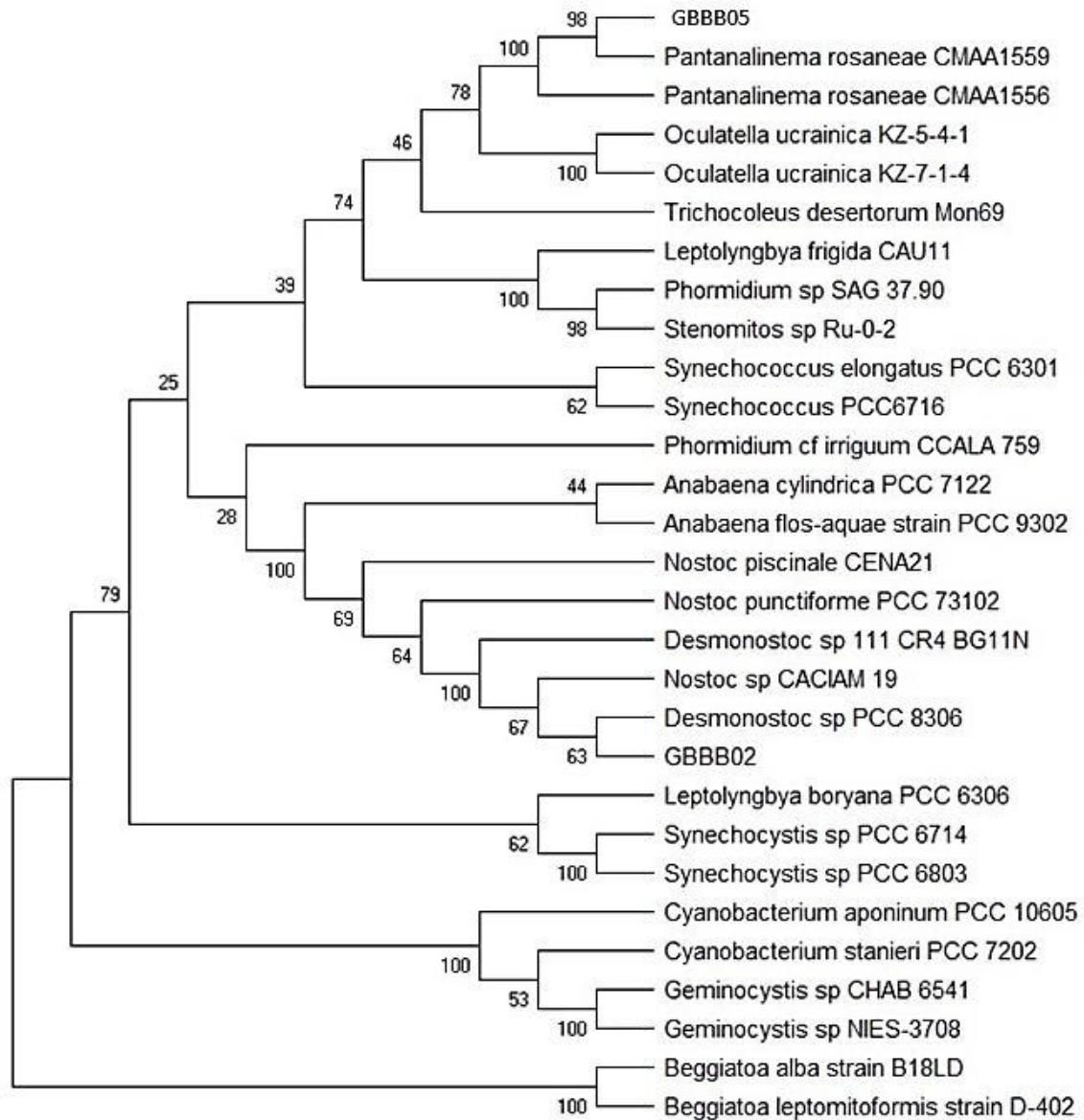
Em relação a amostra GBBB01 só foi possível obter sequências de clones referentes a bactérias heterotróficas associadas, isso pode ter ocorrido devido à cultura não estar axênica no período que foi realizada a clonagem, ainda há a possibilidade de se otimizar outros marcadores gênicos específicos de cianobactérias para lograr sequenciar o organismo fotossintetizante da amostra.

Tabela 11: Resultado do sequenciamento submetido ao BLASTn.

Amostra (GBBB)	Descrição	Pontuação total	Cobertura	E-value	Identidade	Nº de acesso
01	<i>Leptospira sp.</i> MS161 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2665	93%	0.0	99.66%	AB758716.1
02	<i>Desmonostoc sp.</i> PCC 8306 partial 16S rRNA gene, strain PCC 8306	1672	99%	0.0	99.67%	HG004584.1
05	<i>Pantanalinema rosanae</i> CMAA1559 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	2673	94%	0.0	99.79%	KY873318.1

A árvore filogenética gerada refletiu os resultados de identificação obtidos através do BLASTn (Figura 15). A relação filogenética foi inferida usando o método de agrupamento de vizinhos. A amostra GBBB02 teve resultados idênticos para os gêneros *Desmonostoc* e *Nostoc* no BLASTn, porém em na árvore filogenética ficou mais próxima do gênero *Desmonostoc*, indicando que esta amostra pode estar mais proximamente relacionada a este táxon.

Figura 15: Árvore de diversidade dos isolados GBBB02 e GBBB05. A relação filogenética foi inferida usando o método de agrupamento de vizinhos. A árvore consenso de Bootstrap foi inferida usando 10.000 replicatas. A distância evolucionária foi computada utilizando o método de Kimura-2-parâmetros. Esta análise envolveu 29 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada sequência de par (pairwise deletion option). Havia um total de 1477 posições no conjunto de dados final. As análises evolucionárias foram conduzidas no software MEGA X.



5.6. Caracterização química dos extratos

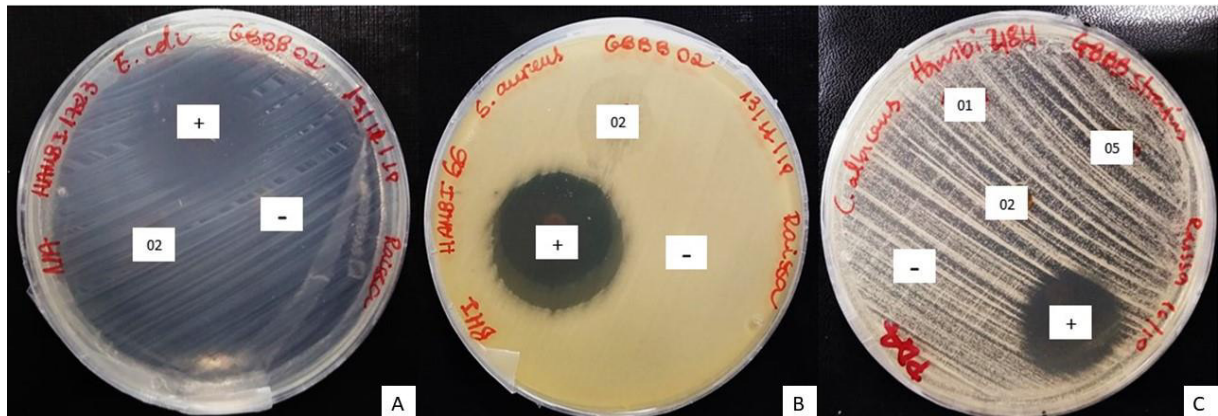
Após avaliação preliminar manual dos resultados obtidos na análise de espectrometria de massa dos extratos das amostras (GBBB01, GBBB02 e GBBB05), não foi possível identificar espectros característicos de compostos bioativos conhecidos como cianotoxinas ou cianobactinas, por exemplo. Wang et al. (2016) sugere o servidor Global Natural Products Social Network (GNPS) para se realizar análises mais detalhadas e identificação de compostos crípticos.

5.7. Análise da bioatividade

5.7.1. Teste antimicrobiano

Os testes de bioatividade foram realizados com bactérias gram-positivas e gram-negativas e fungos, não apresentando resultados positivos para nenhuma cepa testada, apesar de já haver descrito na literatura inibição positiva em testes de bioatividade com cianobactérias do gênero *Nostoc* (Senhorinho et al., 2015; Niveshika et al., 2016; Barboza et al., 2017; Xue et al., 2018), todas os extratos foram testados na concentração de 100 mg de biomassa liofilizada (Figura 16).

Figura 16: Teste de bioatividade antibacteriana e antifúngica em placas. A - Teste com amostra GBBB02 com *Escherichia coli*. B - Teste com amostra GBBB02 com *Staphylococcus aureus*. C - Teste com amostras GBBB 01, 02 e 05 com *Candida albicans*. Fotos: SOUSA, R. C.



De acordo com a literatura, cepas de *Nostoc* em extrato de metanol mostraram uma forte atividade contra bactérias gram-negativas (*S. flexneri* e *S. typhi*) e bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*), com zonas de inibição que variaram de 12,8 a 23,3mm de diâmetro (Pham, et al., 2017).

Pode-se levantar três hipóteses para explicar a falta de atividade microbiana em nosso estudo:

1. Os isolados testados não produzem metabólitos secundários;
2. As condições de cultivo não foram adequadas para a produção de compostos com bioatividade;
3. A quantidade de biomassa utilizada na produção dos extratos (100 mg) não foi suficiente para os compostos bioativos apresentarem sua ação antimicrobiana.

É sugerido na literatura que os microrganismos tendem a ativar a expressão de suas vias metabólicas secundárias, as quais estão ligadas à compostos bioativos, em situações de estresse, como limitação de nutrientes, estresse de temperatura (Waditee-Sirisattha et al., 2014).

5.7.2. *Teste carrapaticida*

Os testes carrapaticidas não apresentaram nenhuma inibição com os organismos alvo testados: cepa resistente em extrato metanólico, cepa sensível em extrato metanólico e cepa resistente em extrato etanólico.

Becher e Jüttner (2005) em seu trabalho encontraram cepas de cianobactéria com atividade inseticida contra *Chironomus sp.*, cianobactérias do gênero *Fischerella* obtiveram bom desempenho com mortalidade de 100% do organismo de teste em 36h. Berry et al. (2008) testaram cepas dos gêneros *Lyngbya*, *Pseudanabaena* e *Synechococcus* em larvas onde foi possível obter de mortalidade significativa de 90 a 100% dos microrganismos testados, reafirmando os peptídeos citotóxicos de cianobactérias do gênero *Lyngbya*, nomeados de pahayokolides.

Vale ressaltar que apesar de não terem apresentado positividade para nenhum teste de bioatividade realizado, o gênero *Nostoc* já é comumente utilizado como referência de cianobactéria produtora de metabólitos secundários de interesse biológico e o gênero *Pantanalinema* recentemente descrito ainda precisa ser mais estudado (Micallef et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

Com base no que foi apresentado é possível concluir que o Parque Nacional da Chapada das Mesas além de possuir condições favoráveis para o crescimento de uma diversidade de microrganismos fotossintetizantes abriga cianobactérias de grande importância biológica.

A análise ultraestrutural em AFM forneceu características importantes para a identificação e caracterização morfológica dos isolados, além de ter sido a primeira utilização desta técnica para o gênero *Pantanalinema*. A utilização de técnicas complementares como espectrometria Raman e de Massas poderá auxiliar na otimização de métodos mais precisos de identificação e classificação de microrganismos em geral e especialmente do grupo das cianobactérias.

Portanto, as amostras GBBB01, 02 e 05 ainda passarão por uma padronização e otimização dos testes já realizados, além disso a não ocorrência de bioatividade ou positividade para genes de cianotoxinas podem indicar que os microrganismos fotossintetizantes presentes nos corpos d'água do PARNACM não são tóxicos, e conseqüentemente, não apresentariam risco para os residentes locais e turistas que procuram a região.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **J Appl Microbiol.** v. 106, 1-12. 2009.
- ABOAL, M.; CRISTOBAL, C. J.; MARIN-MURCIA, J. P. About the presence of *N. commune* var *flagelliforme* (Nostocaceae, Cyanophyceae) on clay soils from arid regions of south east Spain. **Acta Bot. Malacit.** v. 35, 156–161. 2010.
- ADIV, S.; AHRONOV-NADBORNY, R.; CARMELI, S. New aeruginazoles, a group of thiazole-containing cyclic peptides from *Microcystis aeruginosa* blooms. **Tetrahedron** v. 68, 1376-1383. 2012.
- AGHA, R.; CIRÉS, S.; WÖRMER, L.; DOMÍNGUEZ, J. A.; QUESADA, A. Multi-scale strategies for the monitoring of freshwater cyanobacteria: Reducing the sources of uncertainty. **Water Research** v. 46, 3043-3053. 2012.
- AL-TEBRINEH, J.; PEARSON, L. A.; YASAR, S. A.; NEILAN, B. A. A multiplex qPCR targeting hepato-and neurotoxic cyanobacteria of global significance. **Harmful Algae** v. 15, 19–25. 2012.
- ANAGNOSTIDIS K.; KOMÁREK J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 – Oscillatoriales, Arch. Hydrobiol. Suppl., 80, Algol. Stud., 327–472. 1988.
- AXPUACA-ASPUAC, E.; ESTRADA-PALENCIA, E.; VALLADARES-JOVEL, B.; OLIVA-HERNÁNDEZ, B.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PÉREZ-SABINO, F. Metabolitos secundarios y cianotoxinas producidos por cianobacterias del lago de Atitlán. **Revista Científica** v. 27, 9-20. 2017.
- BARBOZA, G. F. O.; GORLACH-LIRA, K.; SASSI, C. F. C.; SASSI, R. Microcystins production and antibacterial activity of cyanobacterial strains of *Synechocystis*, *Synechococcus* and *Romeria* from water and coral reef organisms (Brazil). **Revista de Biologia Tropical** v. 65, 890-899. 2017.
- BECHER, P. G.; JÜTTNER, F. Insecticidal compounds of the biofilm-forming cyanobacterium *Fischerella* sp.(ATCC43239). **Environmental Toxicology** v. 20, p. 363–372. 2005.
- BEAVER, J. R.; TAUSZ, C. E.; SCOTSE, K. C.; POLLARD, A. L.; MITCHELL, R. M. Environmental factors influencing the quantitative distribution of microcystin and common potentially toxic cyanobacteria in U.S. lakes and reservoirs. **Harmful Algae** v. 78, 118-128. 2018.
- BERRY, J. P.; GANTAR, M.; PEREZ, M. H.; BERRY, G.; NORIEGA, F. G. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. **Marine drugs** v. 6, 117-146. 2008.
- BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil - Chave para Identificação e Descrições.** Rima. 2006.
- BINNIG, G.; QUATE, C.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Phys Rev Lett** v. 56, 30-33. 1986.

- BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano. Brasília: SVS, 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resoluções do CONAMA – Qualidade da Água. 1ª edição. Brasília: 255 - 285.
- BRITO, A.; RAMOS, V.; SEABRA, R.; SANTOS, A.; SANTOS, C. L.; LOPO, M.; FERREIRA, S.; MARTINS, A.; MOTA, R.; FRAZÃO, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V.; TAMAGNINI, P. Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: A polyphasic study. **Systematic and Applied Microbiology** v. 35, 110-119. 2012.
- BUKAVECKAS, P. A.; LESUTIENE, J.; GASIUNAITE, Z. R.; LOZYS, L.; OLENINA, I.; PILKAITYTE, R.; PUTYS, Z.; TASSONE, S.; WOOD, J. Microcystin in aquatic food webs of the Baltic and Chesapeake Bay regions. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** v. 191, 50-59. 2017.
- CAPELO NETO, J.; NEYCOMBE, G. Oxidação de cianobactérias e seus metabólitos em sistemas de tratamento de água: o estado da arte. **Eng. Sanit. Ambient.** v. 22, 829-840. 2017.
- CARMICHAEL, W. W.; MAHMOOD, N. A.; HYDE, E. G. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae). In: Hall S, Strichartz G (eds) Marine toxins: origins, structure and molecular pharmacology. American Chemical Society, Washington, cap. 6, p 87–106. 1990.
- CARSTENSEN, J.; KLAIS R.; CLOERN, J. E. Phytoplankton blooms in estuarine and coastal waters: Seasonal patterns and key species. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** v. 162, 98-109. 2015.
- CASELLA, S.; HUANG, F.; MASON, D.; ZHAO, G.; JOHNSON, G. N.; MULLINEAUX, C. W.; LIU, L. Dissecting the native architecture and dynamics of cyanobacterial photosynthetic machinery. **Molecular Plant** v. 10, 1434-1448. 2017.
- CASTENHOLZ, R. W.; J. B. WATERBURY. Oxygenic photosynthetic bacteria sect 19., Group I. Cyanobacteria. In Staley, J. T., M. P. Bryant, N. Pfennig & J. G. Holt (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Williams and Wilkins Co, Baltimore: 1710–1728. 1989.
- CELIE, J. W. A. M.; BEELEN, R. H. J.; VAN DEN BORN, J. Effect of fixation protocols on in situ detection of L-selectin ligands. **Journal of Immunological Methods** v. 298, 155–159, 2005.
- CHAO, Y.; ZHANG, T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 92, 381–392, 2011.
- CHAMIZO, S.; CANTÓN, Y.; MIRALLES, I.; DOMINGO, F. Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry** v. 49, 96-105. 2012.
- CHEN, G.; ZHOU, J.; PARK, B.; XU, B. Single ricin detection by atomic force microscopy chemomechanical mapping. **Applied Physics Letters** v. 95, 1-3. 2009.

- CHIPALA, G. E.; MO, S.; ORJALA, J. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria – a source for drug Discovery. **Curr. Drug Targets** v. 12, 1654-1673. 2011.
- CHOI, H.; ENGENE, N.; SMITH, J. E.; PRESKITT, L. B.; GERWICK, W. H. Crossbyanols A–D, Toxic Brominated Polyphenyl Ethers from the Hawai’ian Bloom-Forming Cyanobacterium *Leptolyngbya crossbyana*. **Journal of Natural Products** v. 74, 517-522. 2010.
- DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and revolutionary roots. **FEMS Microbio.** v. 37, 23-43. 2013.
- DITTMANN, E.; GUGGER, M.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. **Trends in Microbiology** v. 23, 642-652. 2015.
- DOMINGUES, R. B.; BARBOSA, A.; GALVÃO, H. Nutrients, light and phytoplankton succession in a temperate estuary (the Guadiana, south-western Iberia). **Estuar Coast Shelf Sci.** v. 64, 249-260. 2005.
- DOS SANTOS, A. K. D.; OLIVEIRA, A. L. L.; FURTADO, J. A.; FERREIRA, F. S.; ARAÚJO, B. O.; CORRÊA, J. J. M.; CAVALCANTI, L. F.; CUTRIM, A. C. G. A.; CUTRIM, M. V. J. Spatial and seasonal variation of microphytoplankton community and the correlation with environmental parameters in a hypereutrophic tropical estuary - Maranhão – Brazil. **Brazilian Journal Of Oceanography** v. 65, 356-372. 2017.
- DUFRENE, Y. F. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2, 451-460. 2004.
- DUFRENE, Y. F.; GARCIA-MARAJÓ, M. F. Recent progress in cell surface nanoscopy: light and force in the near-field. **Nano Today** v. 7, 390-403. 2012.
- DUFRESNE, A.; SALANOUBAT, M.; PARTENSKY, F.; ARTIGUENAVE, F.; AXMANN, I. M.; BARBE, V.; DUPRAS, S.; GALPERIN, M. Y.; KOONIN, E. V.; LE GALL, F.; MAKAROVA, K. S.; OSTROWSKI, M.; OZTAS, S.; ROBERT, C.; ROGOZIN, I. B.; SCANLAN, D. J.; DE MARSAC, N. T.; WEISSENBACH, J.; WINCKER, P.; WOLF, Y. I.; HESS, W. R. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototropic genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 100, 10020–10025. 2003.
- ECKERT, E. M.; FONTANETO, D.; COCI, M.; CALLIERI, C. Does a barcoding gap exist in prokaryotes? Evidences from species delimitation in cyanobacteria. **Life** v. 5, 50-64. 2015.
- ELBERT, W.; WEBER, B.; BURROWS, S.; STEINKAMP, J.; BÜDEL, B.; ANDREAE, M. O.; PÖSCHL, U. Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. **Nat. Geosci.** v. 5, 459-462. 2012.
- EL-SHEEKH, M. M.; OSMAN, M. E. H.; DYAB, M. A.; AMER, M. S. Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v. 21, 42-50. 2006.

FERRAZ, H. D. A. **Associação da ocorrência de cianobactérias às variações de parâmetros de qualidade da água em quatro bacias hidrográficas de Minas Gerais.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

FOGG, G. E. Picoplankton. **Proceedings of the Royal Society of London** v. 228, p. 1-30. 1986.

FURTADO, A. L. F. F.; CALIJURI, M. DO C.; LORENZI, A. S.; HONDA, R. Y.; GENUÁRIO, D. B.; FIORE, M. F. Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. **Hydrobiologia** v. 627, 195-209. 2009.

GADEMANN, K.; BETHUEL, Y.; LOCHER, H. H.; HUBSCHWERLEN, C. Biomimetic total synthesis and antimicrobial evaluation of anachelin H. **Journal of Organic Chemistry** v. 72, 8361-8370. 2007.

GALETOVIC, A.; ARAYA, J. E.; GÓMEZ-SILVA, B. Biochemical composition and toxicity of edible colonies of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Llayta. **Revista chilena de nutrición** v. 44, 360-370. 2017.

GALHANO, V.; DE FIGUEIREDO, D. R.; ALVES, A.; CORREIA, A.; PEREIRA, M. J.; GOMES-LARANJO, J.; PEIXOTO, F. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, *Nostocales*) isolated from Portuguese freshwater habitats. **Hydrobiologia** v. 663 p. 187-203. 2011.

GENUÁRIO, D. B.; DE SOUZA, W. R.; MONTEIRO, R. T. R.; SANT'ANNA, C. L.; MELO, I. S. *Amazoninema* gen. nov., (Synechococcales, Pseudanabaenaceae) a novel cyanobacteria genus from Brazilian Amazonian rivers. **Int J Syst Evol Microbiol** v. 68, 2249-2257. 2018.

GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; DE MELO, I. S. Phylogenetic insights into the diversity of homocytous cyanobacteria from Amazonian rivers. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 116, 120-135. 2017.

GHASEMI, Y.; YAZDI, M. T.; SHAFIEE, A.; AMINI, A.; SHOKRAVI, S.; ZARRINI, G. Parsiguine, a novel antimicrobial substance from *Fischerella ambigua*. **Pharmaceutical Biology** v. 42, 318-322. 2004.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae) —Prospects and challenges. **Algal Research** v. 2, 79-97. 2013.

GUZMÁN-GUILLÉN, R.; MANZANO, I. L.; MORENO, I. M.; ORTEGA, A. I. P.; MOYANO, R.; BLANCO, A.; CAMEÁNA, A. M. Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. **Aquatic Toxicology** v. 161, 17-24. 2015.

HALL, T. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull. Biosci.** v. 2,60-61. 2011.

- HAMILTON, ET AL.; HAMILTON, D. P.; WOOD, S. A.; DIETRICH, D. R.; PUDDICK, J. Chapter 15: costs of harmful blooms of freshwater cyanobacteria N.K. Sharma, A.K. Rai, L.J. Stal (Eds.), *Cyanobacteria: an Economic Perspective*, John Wiley & Sons, 245-256. 2014.
- HAQUE, F.; BANAYAN, S.; YEE, J.; YI, W. C. Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. **Chemosphere** v. 183, 164-175. 2017.
- HOELDER, S.; CLARKE, P. A.; WORKMAN, P. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. **Mol Oncol.** v. 6, 155-176. 2012.
- HOLLAND, A.; KINNEAR, S. Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: Compounds for competitive advantage and/or physiological aide? **Mar. Drugs** v. 11, 2239-2258. 2013.
- ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, K. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Natural Products** v. 60, 724-726. 1997.
- JAKI, B.; HEILMANN, J.; STICHER, O. New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). **Journal of Natural Products** v. 63, 1283-1285. 2000.
- JARDIM, F. A.; VON SPERLING, E.; JARDIM, B. F. M.; ALMEIDA, K. C. B. Fatores determinantes das florações de cianobactérias na água do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Eng. Sanit. Ambiente** v. 19, 207-218. 2014.
- JOKELA, J.; HEINILÄ, L. M. P.; SHISHIDO, T. K.; WAHLSTEN, M.; FEWER, D. P.; FIORE, M. F.; WANG, H.; HAAPANIEMI, E.; PERMI, P.; SIVONEN, K. Production of high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitors pseudospumigins by the brazilian benthic *Nostoc sp.* CENA 543. **Frontiers in Microbiology** v. 8, 1-14. 2017.
- JOKELA, J.; OFTEDAL, L.; HERFINDAL, L.; PERMI, P.; WAHLSTEN, M.; DOSKELAND, S. O.; SIVONEN, K. Anabaenolysins, Novel Cytolytic Lipopeptides from Benthic Anabaena Cyanobacteria. **PLoS ONE** v. 12, 1-9. 2012.
- JONES, A. C.; MONROE, E. A.; EISMAN, E. B.; GERWICK, L.; SHERMAN, D. H.; GERWICK, W. H. The unique mechanistic transformations involved in the biosynthesis of modular natural products from marine cyanobacteria. **Natural product reports** v. 27, 1048-1065. 2010.
- KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; DE ALBUQUERQUE, T. A.; et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, 386–390, 2006.
- KANEKIYO, K.; LEE, J.; HAYASHI, K.; TAKENAKA, H.; HAYAKAWA, Y.; ENDO, S.; HAYASHI, T. Isolation of an Antiviral Polysaccharide, Nostoflan, from a Terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. **J. Nat. Prod.** v. 68, 1037-1041. 2005.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. 2005. Cyanoprokaryota. 2. Teil Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl (eds.). *Sübwasserflora von Mitteleuropa*. Elsevier: Spektrum Akademischer Verlag, Munique, 759.

- KELLAM, S. J.; CANNELL, R. J. P.; OWSIANKA, A. M.; WALKER, J. M. Results of a large scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture. **J. Br. Phycol.** v. 23, 45-47. 1988.
- KELLMANN, R.; MICHALI, T. K.; NEILAN, B. A. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. **Journal of Molecular Evolution** v. 67, 526-538. 2008.
- KLEINTEICH, J.; WOOD, S. A.; PUDDICK, J.; SCHLEHECK, D.; KÜPPER, F. C.; DIETRICH, D. Potent toxins in Arctic environments – Presence of saxitoxins and an unusual microcystin variant in Arctic freshwater ecosystems. **Chemico-Biological Interactions** v. 206, 423-431. 2013.
- KOMÁREK, J. (2013): Cyanoprokaryota. 3. Heterocytous genera. – In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L. & Schagerl M. (eds), Süswasserflora von Mitteleuropa/Freshwater flora of Central Europe, p. 1130, Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
- KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J.; MARES, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. **Preslia** v. 86, 295-335. 2014.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. **Arch. Hydrobiol** v. 50, p. 327-472. 1988.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGAX: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol Biol Evol.** v. 35, 1547–1549. 2018.
- KUROBE, T.; BAXA, D. V.; MIONI, C. E.; KUDELA, R. M.; SMYTHE, T. R.; WALLER, S.; CHAPMAN, A. D.; TEH, S. J. Identification of harmful cyanobacteria in the Sacramento-San Joaquin Delta and Clear Lake, California by DNA barcoding. **Springerplus** v. 2, 491. 2013.
- LEE, S. Y.; PRIMAVERA, J. H.; DAHDOUH-GUEBAS, F.; et al. Ecological role and services of tropical mangrove ecosystems: A reassessment. **Global Ecol. Biogeogr.** v. 23, n. 7. 2014.
- LEVERT, A.; ALVARIÑO, R.; BORNANCIN, L.; ABOU MANSOUR, E.; BURJA, A. M.; GENEVIÈRE, A. M.; BONNARD, I.; ALONSO, E.; BOTANA, L.; BANAIGS, B. Structures and Activities of Tiahuramides A-C, Cyclic Depsipeptides from a Tahitian Collection of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products** v. 81, 1301-1310. 2018.
- LIAO, H. F.; WU, T. J.; TAI, J. L.; CHI, M. C.; LIN, L. L. Immunomodulatory potential of the polysaccharide-rich extract from edible cyanobacterium *Nostoc commune*. **Medical Sciences** v. 3, 112-123. 2015.
- LOAIZA, N. R.; VERA, P.; AIELLO-MAZZARRI, C.; MORALES E. Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrate. **Acta biol. Colomb.** v. 2, 347-354. 2016.

- LÜRLING, M.; ESHETU, F.; FAASSEN, E. J.; KOSTEN, S.; HUSZAR, V. L. M. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. **Freshw. Biol.** v. 58,552–559. 2013.
- MACHADO, L. S.; SANTOS, L. G.; DOVAL, J. C. L.; POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V. Fatores ambientais relacionados à ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas no reservatório de Guarapiranga, SP, Brasil. **Rev. Ambient. Água** v. 11, 810-818. 2016.
- MARINÉ, M. H.; CLAVERO, E.; ROLDÁN, M. Microscopy methods applied to research on cyanobacteria. **Limnetica**. v. 23, 179-186. 2004.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research** v. 65, 186-202. 2014.
- MARQUES, A. R. **Saberes geográficos integrados aos estudos territoriais sob a ótica da implantação do Parque Nacional da Chapada das Mesas, Sertão de Carolina/MA.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente. 2012.
- MARTINS, F. P.; SALGADO, A. A. R.; BARRETO, H. N. Morfogênese da Chapada das Mesas (Maranhã-Tocantins): paisagem cárstica e poligenética. **Rev. Bras. Geomorfol.** v.18, 623-63. 2017.
- MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. New technologies from the bioworld: selection of biopolymer-producing microalgae. **Polímeros** v. 27, 285-289. 2017.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 14, 217-232. 2010.
- MCGILL, A.S.; AND R. HARDY, 1992. Review of the Methods Used in the Determination of Antibiotics and their Metabolites in Farmed Fish. In: Chemoherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. C. Michel and D.J. Alderman, (Eds.). Office International Des Espizooties, Paris, pp: 343-380.
- MÉJEAN, A.; MANN, S.; MALDINEY, T.; VASSILIADIS, G.; LEQUIN, O.; PLOUX, O. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. **Journal of the American Chemical Society** v. 131, 7512-7513. 2009.
- MÉJEAN, A.; PLOUX, O. A genomic view of secondary metabolite production in cyanobacteria. **Adv. Bot. Res.** v. 65, 189-234. 2013.
- MICALLEF, M. L.; D'AGOSTINO, P. M.; AL-SINAWI, B.; NEILAN, B. A.; MOFFITT, M. C. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. **Marine Genomics** v. 21, 1-12. 2015.
- MICALLEF, M. L.; D'AGOSTINO, P. M.; SHARMA, D.; VISWANATHAN, R.; MOFFITT, M. C. Genome mining for natural product biosynthetic gene clusters in the Subsection V cyanobacteria. **BMC Genomics** v. 16, 1-20. 2015.

- MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; PASQUET, V.; MATHIEU, M.; PICOT, L.; BOUGARAN, G.; CADORET, J. P.; MORANT-MANCEAU, A.; SCHOEFS, B. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. **Curr. Pharm. Biotechnol.** v. 13, 2733-2750. 2012.
- MONTASER, R.; ABBOUD, K. A.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Pitiprolamide, a proline-rich dolastatin 16 analogue from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* from Guam. **Journal of Natural Products** v. 74, 109-112. 2011.
- MORALES, M. C.; VILLALOBOS, K.; RODRÍGUEZ, A. R.; SIMÓN, N. M.; UMANÃ-CASTRO, R. Identificación y caracterización molecular de cianobacterias tropicales de los géneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonema* (Nostocales: Nostocaceae), con posible potencial biotecnológico. **UNED Research Journal** v. 9, 280-288. 2017.
- MUÑOZ-ROJAS, M.; ROMÁN, J. R.; RONCERO-RAMOS, B.; ERICKSON, T. E.; MERRITT, D. J.; AGUILA-CARRICONDO, P.; CANTÓN, Y. Cyanobacteria inoculation enhances carbon sequestration in soil substrates used in dryland restoration. **Science of the Total Environment** v. 636, 1149-1154. 2018.
- NEILAN, B. A.; JACOBS, J.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L. L.; HAWKINS, P. R.; COX, P. T.; GOODMAN, A. E. rDNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 47, 693-697. 1997.
- NEU, T. R.; MANZ, B.; VOLKE, F.; DYNES, J. J.; HITCHCOCK, A. P.; LAWRENCE, J. R. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. **FEMS Microbiology Ecology** v. 72, 1-21. 2010.
- NIVESHKA, E.; VERMA, A. K.; MISHRA, A. K.; SINGH, V. K. Structural Elucidation and Molecular Docking of a Novel Antibiotic Compound from Cyanobacterium *Nostoc sp.* MGL001. **Front. Microbiol.** v. 7, 1-15. 2016.
- PADISÁK, J. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. **Arch Hydrobiol. Suppl.** v. 107, 563-593. 1997.
- PASCHKEWITZ, T. M. Ammonia production at ambient temperature and pressure: an electrochemical and biological approach. PhD (Doctor of Philosophy) thesis. University of Iowa, 2012.
- PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research** v. 46, 1349-1363. 2012.
- PAUL, S. M.; MYTELKA, D. S.; DUNWIDDIE, C. T. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nat Rev Drug Discov.** v. 9, 203-214. 2010.
- PEARSON, L. A.; DITTMANN, E.; MAZMOUZ, R.; ONGLEY, S. E.; D'AGOSTINO, P. M.; NEILAN, B. A. The genetics biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. **Harmful Algae** v. 54, 98-111. 2016.
- PERCIVAL, S. L.; YATES, M. V.; WILLIAMS, D. W.; CHALMERS, R.; GRAY, N. F. Microbiology of waterborne diseases: Microbiological aspects and risks. 2014.

- PHAM, H. T. L.; NGUYEN, L. T. T.; DUONG, T. A.; BUI, D. T. T.; DOAN, Q. T.; NGUYEN, H. T. T.; MUNDT, S. Diversity and bioactivities of nostocacean cyanobacteria isolated from paddy soil in Vietnam. **Systematic and Applied Microbiology** v. 40, 470-481. 2017.
- RAJNEESH; SINGH, S. P.; PATHAK, J.; SINHA, R. P. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 69, 578-595. 2017.
- READ, N.; CONNELL, S. D.; ADAMS, D. G. Nanoscale visualization of a fibrillar array in the cell wall of filamentous cyanobacteria and its implications for gliding motility. **Journal of Bacteriology** 189, 7361-7366. 2007.
- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; GLÖCKNER, F. O.; PEPLIES, J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics** v. 32, 681-931. 2015.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.** v. 111, 1-61. 1979.
- SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4: 406–25
- SALGADO, A. A. R.; BUENO, G. T.; DINIZ, A. D.; MARENT, B. R. Long-Term Geomorphological Evolution of the Brazilian Territory. In: VIEIRA B.C.; SALGADO A.A.R.; SANTOS. L.J.C. **Landscapes and Landforms of Brazil**, London: Springer, 2015, p. 19-31.
- SANCHES, S. M.; DO PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 33, 181-187. 2012.
- SANGEETHA, M.; MENAKHA, M.; VIJAYAKUMAR, S. *In silico* prediction of anticancer cyanobacterial drug from *Nostoc*. **Biomedicine & Preventive Nutrition** v. 4, 71-73. 2014.
- SARSEKEYEVA, F.; ZAYADAN, B. K.; USSERBAEVA, A.; BEDBENOV, V. S.; SINETOVA, M. A.; LOS, D. A. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. **Photosynth Res.** v. 125, 329-340. 2015.
- SCHANTZ, E. J.; MOLD, J.; STANGER, D.; SHAVEL, J.; RIEL, F.; BOWDEN, J.; LYNCH, J.; WYLER, R.; RIEGEL, B.; SOMMER, H. Paralytic shellfish poison VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. **J. Am. Chem. Soc.** v. 79, 5230-5235. 1957.
- SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R. H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annu Rev Entomol.** v. 55, 421-38. 2010.
- SEIDERER, T.; VENTER, A.; VAN WYK, F.; LEVANETS, A.; JORDAAN, A. Growth of soil algae and cyanobacteria on gold mine tailings material. **South African Journal of Science** v. 113, 1-6. 2017.

- SENHORINHO, G. N. A.; ROSS, G. M.; SCOTT, J. A. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. **Phycologia** v. 54, 271-282. 2015.
- SHISHIDO, T. K., HUMISTO, A.; JOKELA, J.; LIU, L.; WAHLSTEN, M.; TAMRAKAR, A.; FEWER, D. P.; PERMI, P.; ANDREOTE, A. P. D.; FIORE, M. F.; SIVONEN, K. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. **Marine Drugs** v. 13, p. 2124-2140. 2015.
- SILVA-STENICO, M. E.; SILVA, C. S. P.; LORENZI, A. S.; SHISHIDO, T. K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S. P.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research** v. 166, 161-175. 2011.
- SIVONEN, K.; LEIKOSKI, N.; FEWER, D.; JOKELA, J. Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 86, 1213-1225. 2010.
- STEINHAUSER, D.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L. Unusual cyanobacterial TCA cycles: Not broken just different. **Trends Plant Sci.** v. 17, 503-509. 2012.
- SVIRČEV, Z. B.; TOKODI, N.; DROBAC, D.; CODD, G. A. Cyanobacteria in aquatic ecosystems in Serbia: effects on water quality, human health and biodiversity. **Syst. Biodivers.** v. 12, 261-270. 2014.
- SWAIN, S. S.; PAIDSETTY, S. K.; PADHY, R. N. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 90, 760-776. 2017.
- TARMAN, K.; LINDEQUIST, U.; MUNDT, S. Metabolites of marine microorganisms and their pharmacological activities. Kim SK, editor. *Marine Microbiology: bioactive compounds and biotechnological applications*. Weinheim: Wiley-VCH;; 393-416, 2013.
- Taton, A., Grubisic, S., Balthasart, P., Hodgson, D. A., Laybourn-Parry, J. & Wilmotte, A. 2006a. Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57:272–89.
- URIZA, E. A. C.; MARTINEZ, A. D. A.; SANJURJO, M. A. Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. **Hidrobiológica** v. 27, 241-251. 2017.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K., AND J SWINGS. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **American Society for Microbiology Journals**. June 1, 1996.
- VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel Production—Current State of the Art and Challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 35, 421-430. 2008.
- VAZ, M. G. M. V.; GENUÁRIO, D. B.; ANDREOTE, A. P. D.; MALONE, C. F. S.; SANT'ANNA, C. L.; BARBIERO, L.; FIORE, M. F. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v. 65, 298–308. 2015.
- VESTOLA, J.; SHISHIDO, T.K.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; AITIO, O.; PERMI, P.; WAHLSTEN, M.; WANG, H.; ROUHAINEN, L.; SIVONEN, K. Hassallidins, antifungal

glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 111, p. 1909-1917. 2014.

WADITEE-SIRISATTHA, R.; KAGEYAMA, H.; SOPUN, W.; TANAKA, Y.; TAKABE, T. Identification and upregulation of biosynthetic genes required for accumulation of mycosporine-2-glycine under salt stress conditions in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2014, 80, 1763–1769.

WANG, Y.; WU, X.; CHEN, J.; AMIN, R.; LU, M.; BHAYANA, B.; ZHAO, J.; MURRAY, C.; HAMBLIN, M.; HOOPER, D.; DAI, T. Antimicrobial Blue Light Inactivation of Gram-Negative Pathogens in Biofilms: In Vitro and in Vivo Studies. **Journal of Infectious Diseases** v. 213, 1380-1387. 2016.

WASE, N. V.; WRIGHT, P. C. Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery. **Expert Opin Drug Discov** v. 3, 903-929. 2008.

WHO - World Health Organization. (1993) Guidelines for drinking-water quality.

WHO – World Health Organization. (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. **Toxicology and applied pharmacology** v. 203, 201-218. 2005.

WIESE, M.; D'AGOSTINO, P. M.; MIHALI, T. K.; MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. **Mar. Drugs** v. 8, 2185-2211. 2010.

WILMOTTE, A.; VANDER AUWERA, G; DE WACHTER, R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis. **FEMS Lett.** v. 317, 96-100. 1993.

WILMOTTE, A.; DEMONCEAU, C.; GOFFART, A.; HECQ, J. H.; DEMOULIN, V.; CROSSLEY, A. C. Molecular and pigment studies of the picophytoplankton in a region of Southern Ocean (42-54°S, 141-144°E) in March 1998. **Deep-Sea Res. II** v. 49, 3351-3363. 2002.

XUE, Y.; ZHAO, P.; QUAN, C.; ZHAO, Z.; GAO, W.; LI, J.; ZU, X.; FU, D.; FENG, S.; BAI, X.; ZUO, Y.; LI, P. Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. **Peptides** v. 107, 17-24. 2018.

YAMASHITA, H.; TAOKA, A.; UCHIHASHI, T.; ASANO, T.; ANDO, T.; FUKUMORI, Y. Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM. **J. Mol. Biol.** v. 422, 300-309. 2012.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annu Rev Phytopathol** v. 43, 437-458. 2005.

ZAINUDDIN, E. N.; JANSEN, R.; NIMTZ, M.; WRAY, V.; PREISITSCH, M.; LALK, M.; MUNDT, S. Lyngbyazothrins A-D, antimicrobial cyclic undecapeptides from the cultured cyanobacterium *Lyngbya* sp. **Journal of Natural Products** v. 72, 1373-1378. 2009.

ZHAO, Y. M.; ZHU, Q. K.; LI, P.; ZHAO, L. L.; WANG, L. L.; ZHENG, X. L.; MA, H.
Effects of artificially cultivated biological soil crusts on soil nutrients and biological activities
in the Loess Plateau. **Journal of Arid Land** v. 6, 742–752. 2014.