



GIUSEPPE FERNANDES DE OLIVEIRA BARBOZA



**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
CIANOBACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES MARINHOS DOS ESTADOS DO
RIO GRANDE DO NORTE, PARAÍBA E SANTA CATARINA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

João Pessoa
2015

GIUSEPPE FERNANDES DE OLIVEIRA BARBOZA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
CIANOBACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES MARINHOS DOS ESTADOS DO
RIO GRANDE DO NORTE, PARAÍBA E SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular.**

Orientador: Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira

Co-orientador: Prof. Dr Roberto Sassi

João Pessoa
2015

B239c Barboza, Giuseppe Fernandes de Oliveira.
Caracterização morfológica e molecular de
cianobactérias isoladas de ambientes marinhos dos estados
do Rio Grande do Norte, Paraíba e Santa Catarina /
Giuseppe Fernandes de Oliveira Barboza. – João Pessoa,
2015.
77f.: il.
Orientadora: Krystyna Gorchach Lira.
Coorientador: Roberto Sassi.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN.
1. Biologia celular e molecular. 2. Cianobactérias. 3. Perfil
de ácidos graxos. 4. Taxonomia. 5. Atividade antibacteriana.

UFPB/BC

CDU: 576+577:2(043)

GIUSEPPE FERNANDES DE OLIVEIRA BARBOZA

Dissertação de Mestrado avaliada em ___/ ___/ ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Krystyna Gorlach Lira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora

Prof. Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Prof^a Dr^a Patricia Mirella da Silva Scardua
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Aos meus pais, Pedro (*in memoriam*) e
Gilvanete e aos meus irmãos por todo o
amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade que me concedeu em conhecer as pessoas certas para a realização deste trabalho.

À minha mãe e aos meus irmãos, por todo apoio e amor!

À minha avó Beatriz, por todo o carinho e interesse sobre os avanços científicos dos seus netos.

Aos professores Krystyna Gorlach Lira (minha orientadora) e Roberto Sassi, por toda a paciência dos dois (que não foi pouca!) e toda a sabedoria que incita o crescimento profissional de cada um, revelando o carinho e a dedicação empregada ao campo científico.

Ao pessoal do LARBIM, professora Cristiane, Jordana, Aline, Patrícia, Viviane, Katharina, Clediana, Evandro, Renata, Gabriel, Gabriela, Nyelson e ao pessoal do Biomicro, Gláucia, Daiane, Vanessa, Valberta, Yasmin, Bruno, Yago, Dona Alda e aos meus colegas de pós, Giuseppe Gianini (meu xará), Adriano, e em especial a Roberta por todos os momentos alegres, tristes, momentos de risadas ou muitas vezes tensos que passamos juntos com a rotina de laboratório e fora dele e por isso tudo, eu tive muita sorte em fazer parte de dois laboratórios com pessoas excepcionais.

À estrutura do LARBIM e aos técnicos: André, Dora, Neide Margarida pelo trabalho de manutenção do banco e apoio técnico que ajuda bastante!

À Ludmilla por ser sempre muito prestativa, paciente e atenciosa com todos os alunos da pós.

À minha turma de mestrado, mesmo que por muitas vezes não tivéssemos nem tempo de nos cumprimentarmos com a correria nos corredores do DBM.

Ao apoio financeiro da CAPES.

À Universidade federal da Paraíba e ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o fim deste trabalho durante esse período.

RESUMO

Cianobactérias são organismos procariontes fotoautotróficos com ampla distribuição em diversos ambientes aquáticos que durante as últimas décadas vêm sendo reconhecidas como uma poderosa fonte de lipídeos e compostos bioativos. Apresentam grande variabilidade morfológica que reflete as dificuldades nos estudos taxonômicos. O objetivo deste trabalho foi identificar 22 isolados de cianobactérias provenientes de água do mar e invertebrados marinhos do litoral brasileiro. A metodologia utilizada neste estudo foi através de classificação taxonômica tradicional e uma abordagem molecular, além de caracterização com relação à produção de microcistinas, atividade antibacteriana e o perfil de ácidos graxos, verificando sua viabilidade para a produção de biomassa e uso biotecnológico. As análises indicaram que a morfologia das células dos isolados de cianobactérias pertenceu aos gêneros *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Romeria* e *Planctolyngbya* da ordem Synechococcales e aos gêneros *Cyanothece* e *Phormidium* da ordem Oscillatoriales. Somente 6 isolados analisados por sequências parciais do gene RNAr 16S que indicaram similaridade entre 98% e 100% com o gênero *Synechococcus*, entretanto apenas 3 isolados analisados foram classificados neste gênero na base das características morfológicas. A produção de microcistinas, avaliada pela técnica de ELISA, foi observada em 5 isolados, pertencentes ao gênero *Synechocystis*, enquanto o gene *mcyB* foi detectado em 12 isolados (*Romeria*, *Synechocystis*, *Synechococcus*). Os extratos metanólicos e etanólicos de quatro isolados de cianobactérias demonstraram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*. O perfil de ácidos graxos foi determinado em 8 isolados, dos quais a maioria apresentou os seguintes ácidos com o teor mais elevado: palmítico, linoléico e oléico. O perfil de ácidos graxos de um isolado de *Romeria gracilis* apresentou o teor mais alto de ácido palmítico (47,3%), enquanto dois isolados de *Synechococcus nidulans* apresentaram os ácidos oleico e linoleico. Dentre as cianobactérias analisadas, um isolado de *Synechocystis aquatilis* apresentou a maior biomassa (1,646g/L) e alto teor de ácidos linoléico e palmítico, além de conter o ácido linolênico. Este isolado não apresentou produção de microcistina e gene *mcyB*, mostrando assim um potencial para ser explorado em biotecnologia.

Palavras Chave: Cianobactérias. Perfil de ácidos graxos. Taxonomia. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Cyanobacteria are photoautotrophic prokaryotic organisms widely distributed in various aquatic environments that over the past decades have been recognized as a powerful source of lipids and bioactive compounds. They have great morphological variability reflecting the difficulties in taxonomic studies. The aim of this study was to identify 22 strains of cyanobacteria isolated from seawater and marine invertebrates of the Brazilian coast, using traditional taxonomic classification and a molecular approach. This work aimed also to characterize the isolates with relation to the microcystin production, antibacterial activity and fatty acid profile, verifying this way their feasibility for the production of biomass and biotechnological use. According to the classification made on the basis of cell morphology, the cyanobacteria strains belonged to the *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Romeria* and *Planctolyngbya* genera of Synechococcales order, and *Cyanothece* and *Phormidium* genera of Oscillatoriales order. The results of the phylogenetic analysis of partial 16S rRNA gene sequences of 6 strains indicated their similarity between 98% and 100% with the genus *Synechococcus*, however, only 3 strains were identified as *Synechococcus* spp. on the base of cell morphology. The production of microcystins, assessed by ELISA, was observed in 5 strains belonging to the genus *Synechocystis*, whereas *mcyB* gene was detected in 12 strains (*Romeria*, *Synechocystis*, *Synechococcus*). The methanolic and ethanolic extracts from four strains of cyanobacteria have demonstrated growth inhibition of *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. The fatty acid profile was determined in 8 strains and most of them showed higher content of the following acids: palmitic, oleic and linoleic. The fatty acid profile of a *Romeria gracilis* strain showed the highest content of palmitic acid (47.3%), while two *Synechococcus nidulans* strains showed oleic and linoleic acids. Among the analyzed cyanobacteria, a *Synechocystis aquatilis* strain showed the highest biomass (1,646g/L) and high content of linoleic and palmitic acids as well as linolenic acid. This strain did not show production of microcystin and nor *mcyB* gene, thus showing a potential to be exploited in biotechnology.

Keywords: Cyanobacteria. Fatty acid profile. Taxonomy. Antibacterial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

RNAr 16S –	Ácido ribonucléico da subunidade ribossomal menor
Adda -	3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4,6-ácido dienoico
ALA -	Ácido alfa-linolênico
atm –	Atmosfera
AVC -	Acidente Vascular Cerebral
BBD -	Black-Band Disease
BG11 –	Blue Green Medium
BHI -	Brain Heart Infusion
BLAST -	Basic Local Alignment Search Tool
CD4 -	Grupamento de diferenciação 4
CLO -	Cloranfenicol
CTAB -	Brometo de cetil-trimetilamônio
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DNAr -	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTP–	desoxirribonucleotideos trifosfatados
EDTA –	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA -	Enzime-Linked Immunoabsorbant Assay
ES -	Estreptomicina
FWR –	Foundation Water Research
GC-MS -	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
GLA -	Ácido gama-linolênico
<i>gyrB</i> –	subunit B protein of DNA gyrase
HIV –	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
IGS -	Intergenic Spacer Region
LAMES -	Laboratório de Métodos de Extração e Separação

LARBIM –	Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas
LEA –	Laboratório de Estudos Ambientais
LPS –	Lipopolissacarídeo
NAL -	Ácido nalidíxico
NCBI -	National Center for Biotechnology Information
NCCLS -	National Committee for Clinical Laboratory Standards
DO –	Densidade óptica
OMS –	Organização Mundial da Saúde
ORF -	Open Reading Frame
pb –	pares de base
PC -	Ficocianina
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
pH –	Potencial hidrogeniônico
PKC -	Proteína Quinase-C
RNAr -	Ácido Ribonucleico ribossomal
rpm –	rotação por minuto
<i>rpoC1</i> -	RNA polymerase C1
<i>rbcLX</i> -	Rubisco
VAN –	Vancomicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de diversidade morfológica das cianobactérias. a <i>Synechocystis</i> sp., b <i>Merismopedia</i> sp., c <i>Oscillatoria</i> sp., d <i>Anabaena</i> sp.	16
Figura 2. Representação esquemática do cluster de genes <i>mcy</i> responsável pela produção de microcistina.	23
Figura 3. Visão geral do banco de culturas de microalgas (LARBIM/LEA/UFPB)	32
Figura 4. Suspensão de células de cianobactérias imobilizadas em ágar	33
Figura 5. Cultura de cianobactérias provenientes de blocos de ágar imersos em meio líquido Conway com água do mar	33
Figura 6. Isolado M20C - <i>Synechocystis aquatilis</i>	42
Figura 7. Isolado M94C - <i>Synechococcus</i> sp.	43
Figura 8. Isolados M6C (a) e M304C (b) - gênero <i>Romeria</i>	43
Figura 9. Isolado M333C – <i>Planktolyngbya</i> sp.	44
Figura 10. Isolado M181C - <i>Cyanothece</i> sp.	45
Figura 11. Isolado M216C - <i>Phormidium</i> sp.	45
Figura 12. Produtos da amplificação do gene RNAr 16S de alguns isolados de cianobactérias	46
Figura 13 - Produtos de amplificação do gene <i>mcyB</i> dos isolados de cianobactérias marinhas	49
Figura 14. Teste de sensibilidade de <i>P. aeruginosa</i> aos extratos metanólicos no ágar Muller-Hinton. Extrato do isolado M6C (seta) apresenta halo de inibição da cepa padrão	53
Figura 15. Teste de sensibilidade de <i>S. aureus</i> (A) e <i>P. aeruginosa</i> (B) aos antibióticos (controle): ácido nalidíxico (NAL), estreptomicina (ES), cloranfenicol (CLO) e vancomicina (VAN)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio de cultura Conway	29
Tabela 2. Composição do meio de cultura BG11	30
Tabela 3. Distribuição de isolados de cianobactérias nos respectivos gêneros segundo sistema de Komárek	40
Tabela 4 – Relação de cianobactérias isoladas de ambientes e organismos marinhos do litoral dos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Santa Catarina	41
Tabela 5. Resultados da análise das sequencias parciais do gene RNAr 16S dos isolados de cianobactérias marinhas pela ferramenta BLAST Microbial Genomes (Megablast)	47
Tabela 6. Produção de microcistinas e a presença do gene <i>mcyB</i> nos isolados de cianobactérias marinhas	50
Tabela 7. Atividade antibacteriana de extratos metanólicos e etanólicos dos isolados de cianobactérias marinhas	52
Tabela 8. Produção de biomassa dos isolados de cianobactérias marinhas	55
Tabela 9. Composição de ácidos graxos (percentual do total de ácidos graxos) dos isolados de cianobactérias marinhas	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Características gerais de cianobactérias	14
1.2. Classificação das cianobactérias	17
1.3. Produção de metabólitos antimicrobianos por cianobactérias	19
1.4. Cianotoxinas	20
1.4.1 Neurotoxinas	21
1.4.2 Dermatotoxinas	21
1.4.3 Hepatotoxinas	22
1.5 Características de microcistinas e sua biossíntese	22
1.6 Potencial biotecnológico de cianobactérias marinhas	24
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Coleta de amostras.....	28
3.2 Meios de cultura.....	29
3.3. Isolamento de cianobactérias e obtenção de biomassa.....	31
3.4. Manutenção de isolados de cianobactérias em meio sólido.....	32
3.5 Identificação de cianobactérias.....	34
3.6 Cultivo para obtenção de biomassa dos isolados de cianobactérias.....	34
3.7 Caracterização molecular dos isolados de cianobactérias.....	35
3.7.1 Extração de DNA genômico.....	35
3.7.2 Amplificação do gene RNAr 16S e purificação dos produtos de PCR.....	36
3.7.3 Sequenciamento e análise filogenética do gene RNAr 16S dos isolados de Cianobactérias.....	36
3.8 Produção de microcistina por isolados de cianobactérias.....	37
3.8.1 Detecção de microcistinas pela técnica de ELISA.....	37
3.8.2 Detecção do gene <i>mcyB</i> envolvido na síntese de microcistina.....	37
3.9 Atividade antibacteriana dos extratos de isolados de cianobactérias marinhas.....	38

3.10 Análise de perfil de ácidos graxos dos isolados de cianobactérias.....	39
---	----

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
---------------------------------------	-----------

4.1 Identificação dos isolados de cianobactérias marinhas	40
---	----

4.2 Análise moleculares de isolados de cianobactérias	46
---	----

4.2.1 Análise filogenética de isolados de cianobactérias marinhas	46
---	----

4.2.2 Produção de microcistinas e presença do gene <i>mcyB</i> em isolados de cianobactérias.....	49
---	----

4.3 Atividade antibacteriana de extratos dos isolados de cianobactérias marinhas	51
--	----

4.4 Biomassa dos isolados de cianobactérias marinhas	54
--	----

4.5. Perfil de ácidos graxos dos isolados de cianobactérias marinhas	55
--	----

5. CONCLUSÕES.....	59
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS

ANEXOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de cianobactérias

Pertencentes ao grupo dos procariontes fotossintetizantes, as cianobactérias ou cianofíceas datam de 3,5 bilhões de anos atrás, contribuindo largamente com o enriquecimento do oxigênio atmosférico do planeta durante o período Pré-cambriano e estão amplamente distribuídas em quase todos os habitats, desde ambientes aquáticos marinhos ou dulcícolas a ambientes terrestres, além de estarem associadas a outros organismos (PAERL e PAUL, 2011).

A ampla distribuição desse grupo com cerca de 150 gêneros e entre 2000 e 8000 espécies se deve às suas características morfológicas e fisiológicas, possuindo uma impressionante capacidade adaptativa. Sua flexibilidade genômica é outra característica que as permite colonizar habitats bastante inóspitos com condições extremas de temperatura, pH e salinidade (KOMÁREK, 2006; FRANCESCHINI et al., 2010; NABOUT et al., 2013).

Algumas espécies possuem afinidade a determinados habitats ou substratos como relatado por Crispino (2007), que demonstrou que ordens como Chroococcales e Oscillatoriales comportando-se como epífitas, além de outras espécies de cianobactérias se apresentando como psâmicas, localizadas nos grãos de areia do litoral do Estado de São Paulo.

O'Neil et al. (2011) destacaram a diversidade de ambientes que habitam e o gênero *Synechococcus*, uma cianobactéria cosmopolita que também ocorrem em mar aberto, responsável pela formação de florações nocivas em muitos ecossistemas marinhos.

No Nordeste do Brasil, ainda há poucos estudos relacionados à diversidade marinha das cianobactérias. A maioria dos trabalhos envolvendo cianobactérias refere-se a ambientes dulcícolas, devido à ocorrência de florações de cianobactérias em todo o país, que motivaram o interesse pela identificação das espécies tóxicas por abordagem molecular nas últimas décadas (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003; SOARES et al., 2013; BORGES et al., 2015).

Caires (2013) relata que apesar da grande extensão do litoral do Brasil, este é um ambiente ainda pobremente estudado, sendo necessária a expansão das pesquisas sobre biodiversidade de cianobactérias nos ambientes costeiros.

Com relação à estrutura das cianobactérias, elas assemelham-se a de uma bactéria, exibindo parede celular com camada mucilagínosa (bainha) externa, composta principalmente

de polissacarídeos fibrilares, sendo a maior quantidade de peptideoglicano (mureína), caracterizando-as como bactérias Gram negativas. Apresenta cápsula ou envoltório mucilaginoso, citoplasma, nucleóide, tilacóides, ribossomos, inclusões de fosfato, proteínas e lipídeos, grânulos de cianoficina, nas quais são encontrados os pigmentos fotossintetizantes Van Den Hoek; Mann; Jahns, 1995 (apud CRISPINO, 2007).

Cianobactérias possuem pigmentos carotenóides, clorofila *a* e ficobiliproteínas como ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina, organizados em complexos de pigmentos absorvedores de energia conhecidos como ficobilissomas, localizados nas membranas dos tilacóides e a cor verde-azulada característica desse grupo é devido à presença do pigmento ficocianina *c* (PARMAR et al., 2011).

Apesar da organização procariótica, as cianobactérias possuem um elaborado sistema de membranas internas responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons e fotossíntese. Possuem únicas substâncias de reserva, amido cianobacteriano e cianoficina (SINGH et al., 2011). Realizam fotólise da água utilizando fotossistemas I e II, porém, sob condições anaeróbias, são capazes de utilizar apenas o fotossistema I como as bactérias púrpuras (SINGH et al., 2011). Embora sejam fotoautotróficas, algumas espécies comportam-se como heterotróficas no escuro, consumindo glicose como fonte de carbono (SINGH et al., 2011).

As cianobactérias podem ser organismos unicelulares, coloniais ou filamentosos (Franceschini et al., 2010). As cianobactérias unicelulares possuem formas que variam desde arredondadas, elípticas até cilíndrico-alongadas, fusiformes e piriformes (Figura 1).

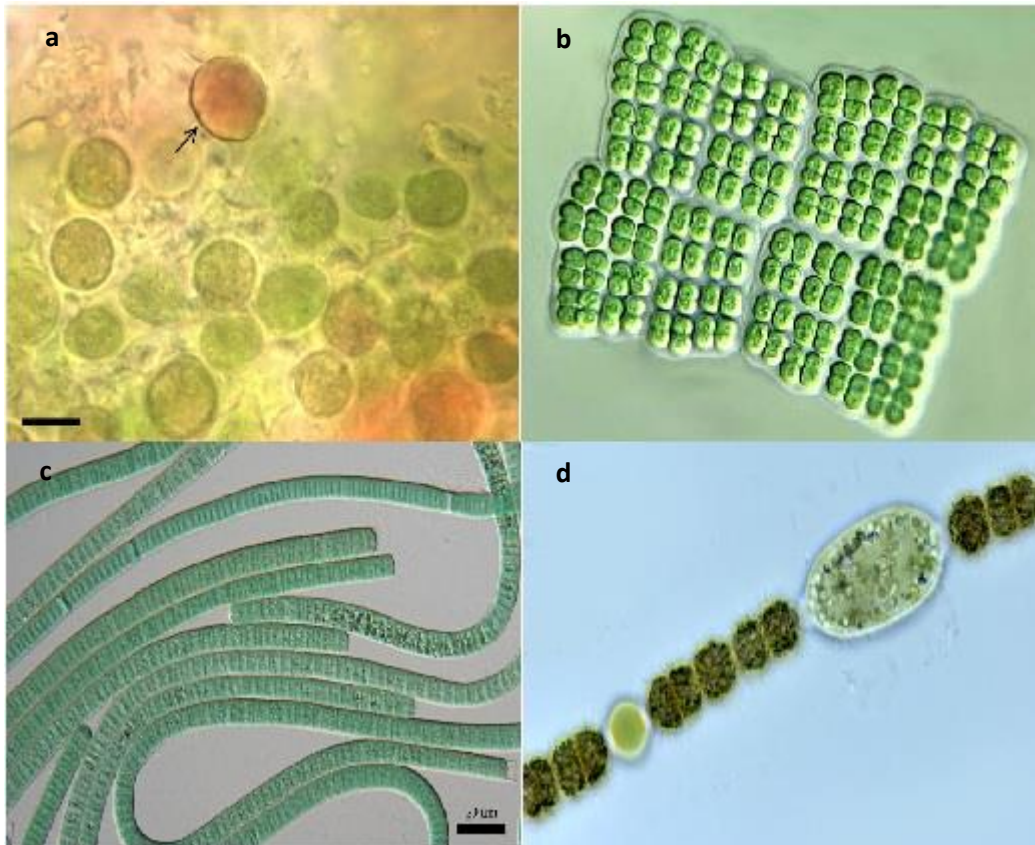
Formas coloniais são constituídas de poucas ou centenas de células de formas arredondadas, alongadas, tabulares, cúbicas ou irregulares, revestidas com mucilagem homogênea ou estratificada; opaca ou hialina; incolor ou amarelada, castanha ou avermelhada (Figura 1) (FRANCESCHINI et al., 2010).

As cianobactérias filamentosas apresentam-se como uni ou multisseriadas com presença ou não de bainha mucilaginosa e com ou sem ramificações formadas a partir de divisão celular perpendicular ou paralela ao eixo maior do tricoma (termo utilizado para o conjunto de células dispostas linearmente) e nunca são flageladas (SANT'ANNA et al., 2006; FRANCESCHINI et al., 2010).

Ainda sob o ponto de vista morfológico, formas filamentosas podem ser homocitadas, quando há apenas ocorrência de células vegetativas, e heterocitadas, quando há a ocorrência de células vegetativas e especializadas, como acinetos e heterocistos, cujo desenvolvimento serve para a adaptação estrutural e enzimática das células (Figura 1) (FRANCESCHINI et al., 2010; KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010). Os heterocistos são células

especializadas, desenvolvidas em linhagens filamentosas para proteger a enzima nitrogenase. Essa enzima, cuja função é converter o gás nitrogênio da atmosfera em amônia, seria rapidamente e irreversivelmente destruída na presença de oxigênio. Assim, com o auxílio dessas células, é proporcionado à enzima um ambiente anaeróbico para a fixação de nitrogênio, o qual é transferido para as células vegetativas (ADAMS, 2000). Acinetos, por sua vez, são células diferenciadas em tamanho, constituindo uma estrutura com paredes espessas, acumulando substâncias de reserva e promovendo resistência às cianobactérias quanto ao ressecamento e à dessecação (BRANDÃO; DOMINGOS, 2006).

Figura 1. Ilustração de diversidade morfológica das cianobactérias. **a** *Synechocystis* sp., **b** *Merismopedia* sp. **c** *Oscillatoria* sp., **d** *Anabaena* sp.



Fontes: <https://www.cs.us.es/~fran/students/julian/organisms/organisms.html>.

<http://ccala.butbn.cas.cz/en/oscillatoria-limosa-c-agardh-0>

http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano_colonies/MERISMOPEDIA/Merismopedia_Image_page.html#pic04.

http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano_filaments/cyano_unbranched_filamentapered_filaments/heterocysts/no_visible_sheath/ANABAENA/Anabaena_Image_page.html#pic08. Acesso em 20 de outubro de 2015.

A reprodução de cianobactérias se dá de forma assexuada e qualquer célula colonial pode dividir-se, e as novas células, quando afastadas, formam novas colônias. Formas coloniais e filamentosas apresentam vários tipos de fragmentação em seu talo. Grupos mais complexos como cianobactérias cocóides podem ainda se dividir por fissão binária assimétrica e fissão múltipla (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005; JUNIOR, 2012).

1.2. Classificação das cianobactérias

Há dois códigos empregados para a classificação do grupo das cianobactérias: o botânico e o bacteriológico, e a coexistência de dois códigos para um mesmo grupo de organismos causa problemas (PALINSKA; SUROSZ, 2014).

Em 1978, quando o Subcomitê de Taxonomia de Bactérias Fototróficas submeteu ao Comitê Internacional de Sistemática Bacteriológica (CISB) uma proposta sobre a regência de normas de nomenclatura cianobacteriana pelo Código Internacional para Nomenclatura de Bactérias, um conflito em potencial foi causado com a nomenclatura botânica, já que cianobactérias (cianófitas, algas verde-azuladas) estão também denominadas sob o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (OREN, 2004).

Assim, em 1985 o Subcomitê de Taxonomia de Bactérias Fototróficas realizou um seminário em Paris, objetivando trabalhar soluções que tratassem de procedimentos e problemas técnicos envolvidos na adesão de cianobactérias sob o código botânico, discutindo prováveis problemas de nomenclatura que seriam levantados e como eles deveriam lidar com a situação elaborando possíveis procedimentos para a validação de novos nomes, respeitando ambos os códigos, mas apesar disso, quaisquer esforços não tinham sido ainda oficialmente criados (OREN, 2004).

As regras dos códigos botânico e bacteriológico diferem bastante entre si (PALINSKA; SUROSZ, 2014). Os botânicos consideram a presença de clorofila e a liberação de O₂ fotossintético como elementos que caracterizam fisiologicamente as cianobactérias como fotoautotróficas aeróbias, constituindo argumentos bastante significativos para a inclusão das mesmas no grupo das algas eucarióticas (GENUÁRIO, 2010).

Já os microbiologistas incluem a organização da estrutura celular, baseada em microscopia eletrônica e as análises bioquímicas da composição da parede celular e estrutura dos ribossomos que revelam a natureza procariótica de suas células, justificando o posicionamento desse grupo junto às bactérias Gram negativas (STANIER, 1977; HOICZYK; HANSEL, 2000; GENUÁRIO, 2010).

Apesar dessas divergências, ambas as abordagens vêm sendo empregadas na sistemática de cianobactérias, de fato, sempre com necessidade de uma revisão contínua de identificação das linhagens e prática nomenclatural adequada associada tanto com os códigos bacteriológicos e botânicos (KOMÁREK, 2006).

Na classificação taxonômica moderna, os gêneros de cianobactérias são considerados um grupo monofilético abrangendo desde uma até muitas espécies, ou seja, um grupo que inclui um ancestral comum (KOMÁREK et al., 2014; FRANCESCHINI, 2010). Por isso, um alto nível de caracterização taxonômica utilizando uma abordagem polifásica é fundamental para a definição dos gêneros monofiléticos e também em nível de espécie, incorporando propriedades genotípicas e fenotípicas (KOMÁREK et al., 2014; PALINSKA; SUROSZ, 2014).

Segundo Dvorák et al. (2015), a sistemática e taxonomia de cianobactérias têm sofrido bastantes mudanças nas últimas décadas referentes ao número de ordens e os estudos de maior compreensão sobre classificação de cianobactérias na era moderna tem sido realizados pelos autores Anagnostidis e Komárek (1985, 1988, 1990; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1986, 1989), que empregam as abordagens bacteriológica e botânica baseando-se na integração de morfologia, fisiologia e ecologia de cianobactérias.

Porém esse sistema de classificação ainda vem sendo reavaliado e alterado radicalmente em relação aos gêneros de cianobactérias, necessitando de mais investigação incluindo descrição morfológica baseada em microscopia de luz e eletrônica, análises moleculares do gene RNAr 16S e outros marcadores como a região ITS (Intergenic Transcribed Spacer), além de dados bioquímicos e composição de ácidos graxos da parede celular (KOMÁREK et al., 2014; DVORÁK et al., 2015).

Segundo Janda e Abbot (2007), o uso de sequências gênicas referentes à região RNAr 16S para estudar a filogenia e taxonomia bacteriana se deve a alguns fatores como: a sua presença, geralmente como múltiplos genes ou operons, em quase todas as bactérias, alta conservação do gene de RNAr 16S, e por último, o fato do gene de RNAr 16S (1500pb) ser suficientemente grande para fins de informação.

A região RNAr ITS 16S-23S (Internal Transcribed Spacer) é utilizada por muitos estudos investigando o potencial desta sequência de RNA nos estudos filogenéticos de cianobactérias (BOYER, FLETCHNER; JONHANSEN, 2000; ITEMAN et al., 2000; CASTIGLIONI et al., 2004; RAJANIEMI et al., 2005; CHEN et al., 2006; PICCIN-SANTOS; BRANDÃO; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2014).

Moreira et al. (2013) em sua revisão sobre filogenia e biogeografia de cianobactérias tóxicas indica que a posição taxonômica atual de alguns gêneros deve ser revista e que os estudos filogenéticos de cianobactérias são pouco desenvolvidos. Estes autores afirmam que é necessária uma revisão taxonômica de cianobactérias planctônicas de água doce e do gênero *Nostoc* com base na análise filogenética das sequências de genes RNAr 16S. Zapomělová et al. 2012 (apud MOREIRA et al., 2013) observaram que os métodos moleculares podem influenciar a formação de novos táxons através de sequenciamento do gene RNAr 16S e análise filogenética dos táxons existentes. Por exemplo, estes autores propuseram reclassificação das espécies *Anabaena bergii*, *Aphanizomenon ovalisporum* e *Anabaena tenericaulis* para as espécies *Chrysochloris bergii*, *Chrysochloris ovalisporum* e *Dolichospermum tenericaule*, respectivamente.

Segundo Robertson, Tezuka e Watanabe (2001), outras sequências têm sido utilizadas alternativamente como marcadores moleculares em cianobactérias e, em particular, a região *cpcBA-IGS* do operon da ficocianina (PC) para identificar cianobactérias em estudos filogenéticos.

Mazard et al. (2004) desenvolveram um primer oligonucleotídeo para amplificação do gene de DNAr 16S que reconhece especificamente as cianobactérias marinhas unicelulares diazotróficas, o qual foi utilizado para avaliar a sua distribuição no Mar da Arábia. Além deste, alguns trabalhos utilizaram outras sequências de genes codificadores de proteínas auxiliando as análises filogenéticas baseadas no gene RNAr 16S (EHRENREICH, WATERBURY; WEBB, 2005; STEINDLER et al., 2005; GENUÁRIO et al., 2009; HASLER et al., 2012).

1.3. Produção de metabólitos antimicrobianos por cianobactérias

Nas últimas décadas, cianobactérias vêm recebendo atenção em áreas como ecologia, bioquímica, fisiologia e também biologia molecular quanto à produção de compostos bioativos. Por estarem amplamente distribuídas em todos os ecossistemas do planeta e por possuírem um enorme potencial para produção de antibióticos e compostos farmacologicamente ativos entre eles antibióticos (BOROWITZKA, 1995; CARDOZO et al., 2007; AL-WATHNANI et al., 2012).

As cianobactérias são, globalmente, importantes produtoras primárias que podem alterar componentes de seus habitats através dos produtos sintetizados, alterando as densidades de competidores ou predadores ou a disponibilidade de nutrientes essenciais, tais

como metais traço. Caracterizar a capacidade biosintética de diversas cianobactérias é crucial para entender os impactos ecológicos desses organismos. Além disso, a prospecção do subprodutos do metabolismo de cianobactérias pode resultar na descoberta de compostos com aplicações industriais e biotecnológicas (EHRENREICH, WATERBURY; WEBB, 2005).

Estudos relatam uma alta diversidade de compostos bioativos que apresentam atividade antiprotozoária, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, citotóxica, inibitória de proteases e de canais de íon de cálcio, como lipopeptídeos, aminoácidos, ácidos graxos, macrolídeos, entres outros (SINGH et al., 2011; COSTA et al., 2012; VAZ, 2014).

Dentre esses estudos, Chu (2012) ressalta potenciais aplicações na medicina de diversos peptídeos lineares ou cíclicos e depsipeptídeos, que funcionam como inibidores de proteases no tratamento de doenças como AVC (Acidente vascular Cerebral), obstrução da artéria coronária e enfisema pulmonar. Ainda, o autor relata um novo componente, cyanovirin-N, como um potente agente virucida contra HIV. Gunasekera et al. (2008) relataram que cianobactérias do gênero *Lyngbya* produzem lipopeptídeos com atividade citotóxica e antimetabólica.

Vários metabólitos secundários de cianobactérias possuem propriedades antimicrobianas. Em geral, os gêneros filamentosos de cianobactérias possuem maior potencial antimicrobiano do que os gêneros unicelulares (MADHUMATHI et al., 2011; REEHANA; AHAMED; THAJUDDIN, 2012).

Silambarasan e Abraham (2011) relataram atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidrofóbicos de cianobactérias filamentosas dos gêneros *Oscillatoria*, *Lyngbya* e *Phormidium*. Volk e Furkert (2006) descreveram atividades antibacteriana e antifúngica de exometabólitos excretados por duas espécies de cianobactérias (*Nodularia harveyana* e *Nostoc insulare*).

Esses e outros trabalhos descreveram atividades antimicrobianas de cianobactérias contra bactérias patogênicas e fungos resistentes a drogas sintéticas e antibióticos indicando sua aplicação na indústria farmacêutica, produção de pesticidas e biofertilizantes (BIONDI et al., 2008; KIM, 2006).

1.4. Cianotoxinas

Toxinas produzidas por cianobactérias são chamadas de cianotoxinas e podem prejudicar a saúde tanto de humanos como de animais domésticos e selvagens, sejam de origem aquática ou terrestre, através do consumo ou contato com água contaminada. Seus

efeitos toxicológicos abrangem neurotoxicidade, dermatotoxicidade, citotoxicidade e hepatotoxicidade. Alguns desses efeitos são conhecidos há várias décadas, variando desde intoxicações até a morte (METTING; PYNE, 1986). A classificação das cianotoxinas baseia-se nesses efeitos e dividem-se de acordo com o seu alvo em mamíferos: hepatotóxicas (lesões hepáticas), neurotóxicas (danos nervosos) citotóxicas (lesões celulares) e toxinas responsáveis por reações alérgicas (dermatotoxinas) distribuídas entre vários gêneros como *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Aphanocapsa* (CALIJURI, ALVES; SANTOS, 2006).

Vários estudos relataram a ocorrência e ecotoxicologia de cianobactérias em ambientes de água doce ao redor do mundo (FRAZÃO; MARTINS E VASCONCELOS, 2010). Em contrapartida, os estudos relativos a ambientes marinhos não são realizados com a mesma dimensão. Frazão; Martins e Vasconcelos (2010) observaram a produção de toxinas por alguns isolados de cianobactérias marinhas isoladas do litoral de Portugal as quais foram tóxicas para camarões marinhos. Mazur-Marzec et al. (2013) relataram a contaminação de moluscos e peixes no Mar Báltico por cianobactérias produtoras de cianotoxinas.

1.4.1 Neurotoxinas

As neurotoxinas são um grupo diverso de metabólitos bioativos que variam em estrutura química e mecanismos de ação, produzindo efeitos biológicos distintos. Em geral, estas toxinas demonstraram bloquear o influxo de sódio por meio de membranas nervosas excitáveis, impedindo assim a formação de potenciais de ação (HEJAZI; WIJFFELS, 2004). Há duas classes de neurotoxinas: A saxitoxina é responsável por efeito paralisante, bloqueando canais de sódio nas células nervosas impedindo a progressão do potencial de ação para o funcionamento normal da célula, podendo causar fraqueza muscular e dificuldade acentuada na respiração (OLIVEIRA et al., 2010; MOREIRA et al., 2013). A anatoxina-a é um alcalóide relacionado com o tropano e age como bloqueador neuromuscular despolarizante (BLÁHA; BABICA; MARŠÁLEK, 2009). Entre os gêneros de cianobactérias conhecidos pela produção dessas classes de cianotoxinas estão: *Anabaena*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Phormidium* e *Oscillatoria* (FWR, 2014).

1.4.2 Dermatotoxinas

Dermatotoxinas são conhecidas como lyngbyatoxina-a e aplisiatoxina que agem como potentes promotores tumorais, atuando através de potencialização da proteína quinase C (PKC) (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Outro tipo de dermatotoxina é o

lipopolissacarídeo (LPS) que consiste de um polissacarídeo principal e outros secundários, entre eles cadeias longas de ácidos graxos e também ácidos graxos sem fosfato (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Entre os gêneros de cianobactérias responsáveis pela produção de dermatotoxinas estão *Lyngbya*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* e *Schizothrix* (BLÁHA; BABICA; MARŠÁLEK, 2009; ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

1.4.3 Hepatotoxinas

As toxinas deste grupo são conhecidas como microcistinas, nodularinas e cilindropermopsinas. Seus órgãos-alvo primários são o fígado, rins, pulmões e coração e são produzidas pelos gêneros *Cylindropermopsis*, *Umezakia*, *Aphanizomenon*, *Raphidiopsis*, *Anabaena* e *Lyngbya* (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013; FWR, 2014).

As microcistinas, mais comumente encontradas em florações de água doce são moléculas de heptapeptídeos cíclicos os quais podem levar à morte em algumas horas devido à hemorragia no fígado (CARNEIRO; LEITE, 2008).

A cilindropermopsina é um alcalóide guanidínico cíclico, cujo mecanismo de ação está relacionado à inibição de glutatona e síntese proteica, e inibição do citocromo P450 (FWR, 2014). A nodularina possui mecanismos de ação idênticos ao da microcistina e apenas dois gêneros foram identificados pela sua produção: *Nodularia* e *Nostoc*, (CHURRO; DIAS; VALÉRIO, 2012; FWR, 2014).

1.5 Características de microcistinas e sua biossíntese

Microcistina é a hepatotoxina mais comumente estudada e encontrada em florações de todo o mundo, produzida por vários gêneros de cianobactérias.

As espécies já identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas em diversos gêneros como *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindropermopsis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Anabaenopsis*, *Synechocystis* e *Lyngbya*, entre outros (SILVANIA, 2012; BORTOLI; PINTO, 2015).

No Brasil, a ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas tem sido relacionada principalmente às espécies dos gêneros *Microcystis*, *Radiocystis*, *Cylindropermopsis* e *Anabaena* (JARDIM, 2008).

O principal mecanismo de toxicidade da microcistina ocorre em nível molecular, ela inibe irreversivelmente as proteínas fosfatases 1 e 2A, que são enzimas reguladoras-chave na catalisação da desfosforilação de serina/treonina em várias fosfoproteínas. Essa inibição causa

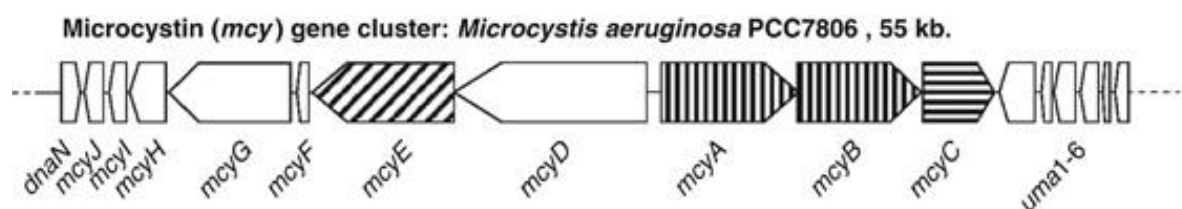
perda da integridade do citoesqueleto e subsequente citólise ou apoptose, principalmente dos hepatócitos. Após exposição aguda, observam-se os sintomas: lesão hepática grave, seguido por choque hemodinâmico, taquicardia, colapso, exagerada respiração abdominal, cianose, convulsões e por fim, óbito (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005).

A hepatotóxina microcistina é composta por sete aminoácidos que formam uma estrutura cíclica [Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-] dos quais Z e X são L-aminoácidos, D-MeAsp é D-eritro- β -ácido metilaspártico, Mdha é *N*-metildehidroalanina e Adda é 3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienóico (ROUHIAINEN et al., 2004; CRESPIM, 2013). Há mais de 200 variantes estruturais, devido a pequenas modificações no anel peptídico, a partir das quais a nomenclatura de cada variante é realizada através da identificação dos aminoácidos substituídos nas posições 2 e 4 do anel peptídico cíclico e a variante mais comum, microcistina-LR, possui L-leucina (L) e L-arginina (R) nessas respectivas posições (FWR, 2014).

Estirpes tóxicas podem ser identificadas pela presença de genes *mcy* (Figura 2), que codificam as sintases de policetídeo e sintetases de peptídeos envolvidos na biossíntese de microcistina (DYBLE et al., 2008). Os genes *mcy* possuem peso molecular igual a 55 kb de DNA e codifica seis grandes quadros de leitura aberta, *mcyA-E* e G, juntamente com outras quatro pequenas ORFs (*mcyF* e H-J) localizadas no cromossomo (BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2003).

O gene *mcyB* é um dos genes correlacionados com essa biossíntese e foi utilizado por Ross, Santiago-Vázquez e Paul (2006) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para analisar a presença de microcistinas pela espécie *Microcystis aeruginosa* em resposta a estresse oxidativo de um estuário localizado no estado da Flórida nos Estados unidos. Kaebernick et al. (2000) estudaram o transcrito dos genes *mcyB* e *mcyD* sob efeito de várias intensidades luminosas e outros fatores de estresse, analisando a liberação de microcistinas da espécie *Microcystis aeruginosa*.

Figura 2. Representação esquemática do cluster de genes *mcy* responsável pela produção de microcistina.



Fonte: modificado de Gehring et al. (2012).

A expressão desses genes em cianobactérias pode estar ligada direta ou indiretamente a fatores ambientais como a temperatura e mudanças provocadas pelo clima e podem afetar o crescimento e a produção de hepatotoxinas (EL-SHEHAWY et al., 2012).

A produção de microcistinas pode ser prejudicial ao homem com relação à balneabilidade. Segundo Carvalho et al. (2013), o manual da OMS (Organização Mundial da Saúde) de 2011 abrange três vias principais de exposição às cianotoxinas em águas recreacionais, seja através de contato direto com o corpo ou a ingestão acidental e inalação de água contendo células de cianobactérias potencialmente produtoras, limitando uma dose diária tolerável provisória das microcistinas em 0,04 µg/kg de peso corporal e o limite recomendado de 1 µg L⁻¹ para abastecimento referente à água potável (DYBLE et al., 2008; CARVALHO et al., 2013).

A identificação de isolados cianobacterianos potencialmente prejudiciais à saúde humana é necessária, tanto quanto o desenvolvimento de estratégias de gerenciamento de riscos, monitoramento da qualidade hídrica e prevenção das florações de cianobactérias (GIDDINGS et al., 2012).

Essa identificação também é importante pela aplicabilidade de cianobactérias na indústria alimentícia com alto valor nutricional e produção de produtos farmacológicos e biocombustíveis que impulsionam as cianobactérias em direção a um futuro comercial promissor (SIQUEIRA; OLIVEIRA-FILHO, 2005; OLIVEIRA et al., 2011).

1.6 Potencial biotecnológico de cianobactérias marinhas

Nos últimos anos as cianobactérias têm atraído atenções de âmbito mundial para uso biotecnológico devido às suas vantagens relacionadas à rápida produção de biomassa em alta quantidade, cultivada para os experimentos em grande escala a fim de analisar compostos bioativos direcionados à indústria farmacêutica e alimentícia (McPHAIL et al., 2007; ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013; MUNDT et al., 2014).

Vários gêneros como *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Synechocystis* e *Lyngbya* entre outros são utilizados a partir da extração de diversas classes de metabólitos para a produção de fármacos (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

A descoberta desse potencial iniciou-se a partir da imensa quantidade de metabólitos relatados a partir de uma variedade de organismos marinhos desde a década de 60,

evidenciando o ambiente marinho como uma excelente fonte de novas substâncias químicas não encontradas em ambientes terrestres (ZANCHETT; OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Nagarajan; Maruthanayagam e Sundararaman (2012) relataram que cianobactérias marinhas possuem uma enorme diversidade de metabólitos com atividades biológicas importantes de elevado potencial como atividade anticâncer, antitumoral e antimicrobiana, incluindo propriedades biotóxicas.

O potencial lipídico do conteúdo oleico de células cianobacterianas é outro importante parâmetro que define diversas aplicações biotecnológicas para a produção de uma série de produtos industriais e farmacológicos com atividade anti-inflamatória e produtos alimentícios de alto valor agregado devido aos componentes em seu conteúdo lipídico de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) presentes nas células, como o ácido eicosapentaenoico (ácido graxo dos ômega-3), ácido linoléico, ácido alfa-linolênico (ALA) e ácido gama-linolênico (GLA) (NUNNERY; MEVERS; GERWICK, 2010; SUBRAMANIAN et al., 2014; OJIT et al., 2015). Essa alta produtividade e teor de lipídeos são devido ao armazenamento do material alimentar de reserva utilizado como fonte de pigmentos, lipídios, vitaminas, proteínas e certos metabólitos secundários (RAJESHWARI; RAJASHEKHAR, 2011).

Há muitos séculos as cianobactérias vêm sendo utilizadas como uma rica fonte de nutrientes, sendo, atualmente, vendida como um alimento saudável em diversos lugares do mundo, mas essa produção é realizada a partir de um limitado número de espécies (OLAIZOLA, 2003; SKJÅNES, REBOURS; LINDBLAD, 2013).

Fontes alternativas de combustíveis tem sido foco de atenção mundial para a economia e o meio ambiente e pesquisas referentes à produção de biocombustíveis vêm crescendo qualitativamente. Assim, o alto teor de lipídios de cianobactérias com um vasto perfil de ácidos graxos vem sendo considerado como matéria-prima renovável para a produção de biodiesel a partir da extração do conteúdo lipídico das células de cianobactérias que oferecem um grande potencial para tal (SINGH; MALLICK, 2014; STEINHOFF et al., 2014).

Ultimamente, a produção de biodiesel está voltada prioritariamente para a viabilidade e qualidade envolvidas em larga escala (PARMAR et al., 2011).

A preocupação com emissões de CO₂ na atmosfera a partir de combustível fóssil leva ao desenvolvimento de propostas de conversão biológica do CO₂ com energia solar em biocombustíveis através de microrganismos fotossintetizantes como microalgas e cianobactérias, onde há vantagens competitivas frente à biomassa de plantas oleaginosas como alta taxa de crescimento e sistema de produção em terras não aráveis, além disso, cianobactérias são microrganismos fotossintéticos que não precisam de um alto custo de

amido ou açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, diferentemente de microrganismos heterotróficos como *Escherichia coli* e leveduras (LIU et al., 2011; MACHADO; ATSUMI, 2012).

Aikawa et al. (2014), relataram que o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis resultam em uma promoção de pesquisas sobre biocombustíveis mais benignos ao meio ambiente e em seus estudos descobriram uma alta produtividade de glicogênio a partir de um isolado do gênero *Synechococcus* de região costeira, revelando-se como uma promissora fonte de carboidratos para a produção de biodiesel.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar isolados de cianobactérias provenientes de água do mar e invertebrados bênticos recifais dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados de cianobactérias provenientes de amostras de água do mar e dos organismos marinhos;
- Analisar a produção de microcistinas por isolados de cianobactérias pela técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay);
- Verificar a presença do gene *mcyB*, envolvido na biossíntese de microcistina, utilizando a técnica de PCR;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos isolados de cianobactérias;
- Caracterizar o perfil de ácidos graxos dos isolados de cianobactérias.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta de amostras

Foram utilizados 22 isolados da Coleção de Microalgas da UFPB (CMUFPB) do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/LEA/UFPB) obtidos no período de jul./2010 a fev./2014 dos seguintes ambientes: água do mar dos recifes costeiros do Cabo Branco, João Pessoa, PB, desembocadura dos estuários dos rios Mamanguape e Paraíba e da laguna costeira de Jacarapé, João Pessoa, PB; do estuário do rio Pirangi, RN e da praia da Armação, SC. Também foram isolados a partir do tecido dos invertebrados bênticos recifais: zoantídeo *Protopalythoa variabilis* esponja *Cynachrella* sp., corais *Siderastrea* sp. e *Siderastrea stellata*, e esponjas do gênero *Haliclona* sp. e Ascídia (classe mais diversa do subfilo Tunicata, filo Urochordata) coletadas nas praias do Cabo Branco e praia do Seixas em João Pessoa e praia de Carapibus no município do Conde - PB .

As amostras de água do mar foram coletadas em garrafas plásticas de 500 ml e as amostras de organismos bênticos foram colocadas em recipientes com água do mar filtrada estéril, em seguida as amostras foram transportadas em recipiente hermético no gelo para o laboratório.

3.2. Meios de cultura

Para o cultivo de cianobactérias foram utilizados dois meios de cultura: meio Conway (WALNE, 1970) e meio BG11 (STANIER, 1971) preparados com água do mar (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Composição do meio de cultura Conway.

Soluções	Reagentes	Solução estoque (mg 1.000 mL ⁻¹)	Meio de cultura (mL)
1	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,3	1.0
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36	
	H ₃ BO ₃	33,6	
	EDTA	45,0	
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20,0	
	NaNO ₃	100	
2	Vitamina B12	10	0.1
	Vitamina B1	200	0.1
3	ZnCl ₂	2,1	1.0
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,9	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0	
	H ₂ O do mar filtrada		

Tabela 2. Composição do meio de cultura BG11.

Soluções	Reagentes	Solução estoque (g 1.000 mL ⁻¹)	Meio de cultura (mL)
1	EDTA	0,1	10
	Citrato de amônio e ferro III	0,6	
	Ácido cítrico H ₂ O	0,6	
	Cloreto de cálcio 2H ₂ O	3,6	
2	Sulfato de magnésio 7H ₂ O	7,6	10
3	Fosfato de potássio dibásico	3,05	10
4	Ácido bórico	2,86	1
	Cloreto de manganês II 4H ₂ O	1,81	
	Sulfato de zinco 7H ₂ O	0,222	
	Sulfato de cobre 5H ₂ O	0,079	
	Cloreto de cobalto 6H ₂ O	0,05	
	Molibdato de sódio 2H ₂ O	0,391	
5	Vitamina B12	0,001	1
	Biotina	0,001	
	Tiamina HCl	0,2	
6	Carbonato de sódio	0,02	
7	H ₂ O do mar filtrada		968

3.3 Isolamento de cianobactérias e obtenção de biomassa

O tecido de esponjas e corais analisados foi extraído utilizando um aparelho de waterpik (COSTA, SASSI; GORLACH-LIRA, 2008) O volume de 100 ml do tecido extraído foi transferido para balões de vidro de 250 ml com 100 ml de meio de cultura Conway ou BG11.

As amostras de zoantídeo e Ascídia foram maceradas com adição de 2 ml de água do mar filtrada em uma placa de Petri estéril e em seguida o tecido macerado foi transferido para balões de vidro de 250 ml contendo 100 ml dos meios de cultura Conway ou BG11.

Os balões com as amostras foram então mantidos numa câmara de cultivo a 25° C ($\pm 1^\circ$ C) dotada de sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, com fotoperíodo natural controlado por uma fotocélula externa.

Após a constatação de crescimento de células de microalgas, foi dado prosseguimento ao isolamento das mesmas em tubos de ensaio que consistiu em utilizar micropipetas capilares, observação em microscópio óptico (LEICA DM1000) e transferência individual de cada uma das possíveis espécies que cresceram nos balões que continham as amostras de diferentes locais de coleta para tubos de ensaio com novo meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, uma gota da amostra foi colocada em uma lâmina de vidro e levada ao microscópio óptico, onde por observação e auxílio da micropipeta de vidro acoplada a uma mangueira, foi realizado isolamento da célula de interesse por sucção e transferência para um tubo de ensaio, sendo este procedimento repetido tantas vezes quanto necessário até se obter a cepa pura (LOURENÇO, 2006). As culturas monoespecíficas obtidas foram codificadas, incorporadas ao Banco de Microalgas do LARBIM/UFPB e então armazenadas em câmara de cultivo climatizada com as mesmas condições descritas anteriormente (Figura 3) com sistema de iluminação e fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de $25^\circ \pm 1^\circ$ C.

Figura 3. Visão geral do banco de culturas de microalgas (LARBIM/LEA/UFPB).



Fonte: Giuseppe Fernandes (2015).

3.4 Manutenção de isolados de cianobactérias em meio sólido

Além das repicagens mensais em meio de cultura, os isolados de cianobactérias foram também inoculados e mantidos em meio sólido seguindo um protocolo modificado de Syiem e Bhattacharjee (2010).

As cianobactérias foram cultivadas em câmara de cultivo durante 10 dias com um volume inicial de 100 ml e inóculo de 2 ml a partir do banco de cultura.

Foi preparado ágar bacteriológico (KASVI) a 2,5% e fundiu-se com 50 ml de meio de cultura Conway ou BG11. Todo o material necessário foi autoclavado a 121°C, a uma pressão de 1 atm., durante 15 a 20 minutos.

As cianobactérias foram cultivadas em câmara de cultivo por 10 dias com temperatura de 25°C. O volume inicial de 100 ml das culturas em fase de crescimento exponencial foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos a 25°C obtendo o volume concentrado de 10 ml. Em seguida a suspensão de células foi misturada suavemente e despejada em 40 ml de ágar nutriente com temperatura em torno de 40°C, resultando em um volume final de 50 ml. Essa

mistura foi colocada em placas de Petri e deixada em repouso para solidificar durante 30 minutos na câmara de fluxo laminar (Figura 4).

Figura 4. Suspensão de células de cianobactérias imobilizadas em ágar.

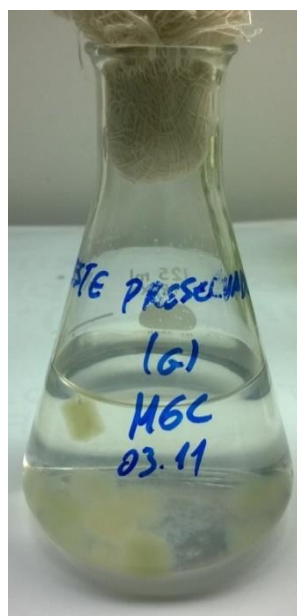


Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

Após a solidificação, o conteúdo das placas foi cortado em cubos (dimensões: ~ 0,5 centímetros x 0,5 centímetros). Esses cubos foram secos ao ar sob condições assépticas em fluxo laminar durante 24 h e armazenados em tubos Falcon e frascos de vidro em temperatura ambiente no escuro.

Após um mês foi realizada a verificação da viabilidade e pureza de culturas de cianobactérias preservadas pelo cultivo no meio líquido Conway mar e BG11 mar (Figura 5).

Figura 5. Cultura de cianobactérias provenientes de blocos de ágar imersos em meio líquido Conway com água do mar.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

3.5 Identificação de cianobactérias

As características morfológicas (filamentosas e coloniais) foram verificadas através de observações morfológicas dos principais caracteres usados na taxonomia de cada cepa isolada, utilizando microscópio óptico Leica DM2500 equipado com câmera fotográfica digital e sistema de captura de imagens. Os isolados foram fotografados em aumento final de 1000X com óleo de imersão. Os gêneros/espécies foram identificados através de literatura especializada a partir de obras como Bicudo e Menezes (2006) e Franceschini et al. (2010) e também artigos de referência publicados em revistas especializadas (SANT'ANNA et al., 2012; KOMÁREK et al. 2014; SANTOS; SANTA'ANNA, 2010) e pesquisas na internet (<http://www.algaebase.org/>; <http://www.cyanodb.cz/>).

3.6. Cultivo para obtenção de biomassa dos isolados de cianobactérias

O crescimento dos isolados foi efetuado em meio sintético Conway ou BG11 com água do mar, na câmara de cultura climatizada em balões de fundo chato de 1 litro contendo 500 ml do meio sintético mencionado e inóculo inicial de 2 ml da cultura pura a partir do banco de cultivo. Os cultivos desenvolvidos tanto para a produção de biomassa como para a avaliação do perfil de ácidos graxos foram realizados em câmara de cultura climatizada (como descrito anteriormente) em balões de 6 litros contendo 5000 ml de meio de cultura (Conway ou BG11) com inóculo inicial de 10 ml, sob aeração constante através de minicompressor de membrana Resun AOC2, durante um período de 14 a 20 dias. Ao atingir a fase estacionária, procedeu-se à colheita da biomassa através de centrifugação do material em centrífuga refrigerada (NOVATECNICA NT825) a 3500 rpm, 20°C por 15 minutos e o pellet resultante foi transferido para os tubos Falcon (15 ml) ou eppendorf (1,5 ml) e armazenados em ultrafreezer a -30°C.

As células cianobacterianas foram utilizadas para extração de DNA genômico, enquanto que o sobrenadante resultante foi congelado a -30°C e utilizado na detecção de microcistina pela técnica ELISA.

3.7. Caracterização molecular dos isolados de cianobactérias

Os trabalhos referentes à caracterização molecular dos isolados foram realizados no Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba.

3.7.1 Extração de DNA genômico

O procedimento de extração foi realizado de acordo com o protocolo de extração de DNA de cianobactérias utilizando beta-mercaptoetanol e brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) descrito por metodologia modificada de Rogers e Bendich (1985).

As amostras de células de cianobactérias contendo 120 a 130mg de biomassa em tubos de eppendorf foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em banho Maria a 37°C, repetindo o procedimento três vezes. As amostras foram centrifugadas (6000 rpm, 10 min., temperatura ambiente 25°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 750 µl da solução de CTAB 2x (20 ml de 1M Tris-HCl; 56 ml de 5M NaCl; 16 ml de 0,5M EDTA; 4g de CTAB - 200 ml de água destilada) com [1,5 µl] de β-mercaptoetanol, a qual foi preaquecida a 60°C por 30 minutos. Os tubos foram mantidos em banho maria a 60°C overnight. Após isso, procedeu-se a centrifugação dos tubos a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C (Centrifuge 5430R, EPPENDORF). Transferiu-se a fase superior para novos tubos e adicionou-se 750 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturou-se suavemente e centrifugou-se a 12000 rpm, 15 minutos a 4°C. Transferiu-se 450 µl da fase superior para outros tubos e adicionou-se 400 µl do isopropanol gelado. As amostras, então, foram mantidas no freezer por um período de 5-6 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C, descartou-se o isopropanol e virou-se os tubos sobre o papel absorvente para remover o restante do isopropanol. Adicionou-se etanol 70% gelado e centrifugou-se a 12000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Descartou-se o etanol e os tubos foram virados sobre o papel absorvente para remover o restante do etanol. Os tubos com DNA foram secados em estufa a 37°C por 40 minutos. Após secagem, adicionou-se 30 µl de tampão TE e as amostras foram mantidas a 4°C por 24 horas, e em seguida foram mantidas a -20°C.

A qualidade das amostras de DNA obtidas na extração foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (SAMBROOK et al., 2012). A eletroforese foi conduzida em tampão

Tris-Borate-EDTA (TBE) utilizando 4µL de DNA, 3 µL de tampão de corrida azul de bromofenol, 1 µL de GelRed™ (Biotium), a 80V e 75mA. O gel foi visualizado e fotografado em fotodocumentador (L PIX, Loccus Biotecnologia).

3.7.2 Amplificação do gene RNAr 16S e purificação dos produtos de PCR

O gene RNAr 16S foi amplificado em termociclador (Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler) utilizando os primers universais 26F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (5' -ACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3') (LANE, 1991), um kit Master Mix (PROMEGA) e 200 ng de DNA genômico.

A amplificação do gene RNAr 16S foi realizada nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 94°C; 25 ciclos: 94°C por um minuto, 57°C por dois minutos e 72°C por dois minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos.

Foi realizada a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,8% como foi descrito no item 3.4.1. O gel foi visualizado em aparelho transiluminador de luz UV e fotodocumentador (L PIX, Loccus Biotecnologia) para verificar e registrar a presença da banda de 1500 pb correspondente ao gene de RNAr 16S.

Em seguida os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação da AxyPrep™ DNA Gel Extraction (AxiGen Biosciences, EUA) conforme recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA purificado foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

3.7.3 Sequenciamento e análise filogenética do gene RNAr 16S dos isolados de cianobactérias

O sequenciamento dos produtos da PCR purificados foi realizado através da empresa ACT Gene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) e da Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central (LABCEN) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

As sequencias de gene RNAr 16S dos isolados foram comparadas com as sequencias depositadas no banco de sequencias do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando-se BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foram analisadas as similaridades das sequencias

obtidas com as sequências presentes no banco de dados e as sequências que apresentaram similaridade $\geq 97\%$ foram consideradas. O alinhamento múltiplo das sequências e a construção das árvores filogenéticas realizou-se através do programa MEGA versão 6.0 (KIMURA, 1980; FELSENSTEIN, 1985; SAITOU; NEI, 1987; TAMURA et al., 2011)

3.8 Produção de microcistina por isolados de cianobactérias

A detecção de microcistina dos isolados foi realizada no laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO) do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba.

3.8.1 Detecção de microcistinas pela técnica de ELISA

A produção de microcistinas-LR por isolados de cianobactérias foi analisada pelo método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Todas as amostras de células de cianobactérias congeladas (ver item 3.3) foram submetidas a ciclos de gelo-degelo para romper quaisquer células de cianobactérias e liberar as toxinas para que assim se realize a análise de microcistina total (dissolvida e particulada) na água. As amostras foram em seguida centrifugadas para remover material particulado e em seguida a quantidade de microcistina foi determinada através das reações de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay) utilizando um kit de ELISA para microcistina (DM ELISA kit 96 TESTS; ABRAXIS) de acordo com as instruções do fabricante. Para a leitura das placas, a 450nm, a leitora modelo EL-800 (Biotek), juntamente com o programa Gen-5 (Biotek) foram utilizados. Uma cepa de *Microcystis aeruginosa* produtora de microcistinas, foi utilizada como controle positivo.

3.8.2 Detecção do gene *mcyB* envolvido na síntese de microcistina

Para verificação dos genes relacionados com a produção de microcistina nas amostras, foi utilizada uma reação de PCR para amplificar o gene de *mcyB*. Foram utilizados os primers *mcyB* F (5 - TTC AAC GGG AAA ACC BAA AG) e *mcyB* R (5 - CYT GAT TAT CAA TSC GYC CT) (DYBLE et al., 2008) a partir do DNA genômico extraído de isolados de cianobactérias, utilizando o kit PCR Master Mix (PROMEGA).

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C durante cinco minutos, 30 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguido de uma

extensão de 7 minutos a 72°C. Foi realizada a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,8% como foi descrito no item 3.7.1.

O gel foi visualizado no sistema de fotodocumentação (L PIX , Locus Biotecnologia) para verificar e registrar a presença das bandas de 800pb correspondentes ao gene *mcyB*.

3.9 Atividade antibacteriana dos extratos de isolados de cianobactérias marinhas

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos e etanólicos obtidos dos 22 isolados de cianobactérias foi realizada pelo método de difusão em poços com meio de cultura ágar Mueller-Hinton (HiMedia) segundo o NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (WIKLER et al., 2006) com modificações. Os testes foram realizados utilizando-se dois isolados de bactérias, sendo uma Gram positiva e uma Gram negativa: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), respectivamente.

Para obter o extrato hidrofóbico e hidrofílico da biomassa de isolados, foi realizada uma extração com solvente metanol ou etanol de acordo com a metodologia modificada descrita em Kumar et al. (2012). A obtenção de biomassa dos isolados foi descrita no item 3.6.

As células de cianobactérias foram liofilizadas (TERRONI LD 1500) e as amostras de 100 mg foram utilizadas para a preparação dos extratos. As amostras foram agitadas em aparelho de homogeneização (TS200, ARSEC) em 10 ml de metanol ou etanol em tubos de Falcon de 50 ml por 1 minuto. A suspensão foi centrifugada (10000 rpm, 15 min., 4°C) e o sobrenadante foi transferido para um béquer e mantido na capela de exaustão até completar a evaporação. Em seguida pesou-se o extrato seco resultante, o qual foi dissolvido em metanol ou etanol (1 ml) e transferido para um tubo Eppendorf.

Os isolados de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram cultivadas primeiramente em meio ágar Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories Detroit, USA) por 24 horas a 37°C e em seguida os isolados foram inoculados no caldo BHI (10 ml) e incubados por 24 horas a 37°C. O volume de 1 ml de cada cultura bacteriana foi espalhado na superfície do meio ágar Mueller-Hinton (KASVI) em placas de Petri. As placas com meio foram deixadas em repouso por 30 min e em seguida foram formados três a quatro poços por placa com pipeta de vidro estéril. Aos poços foram adicionadas alíquotas de 20µl do extrato metanólico ou etanólico de isolados de cianobactérias. A incubação das culturas foi realizada a 37°C por 18 a 24 horas.

Após este período verificou-se a presença do halo ao redor dos poços indicando a inibição do crescimento de isolados padrões de bactérias analisadas. Os experimentos foram realizados em duplicata. Como controle positivo, foram utilizados os discos de antibióticos (DME) (vancomicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico e estreptomicina), colocados no meio Muller-Hinton ágar.

3.10 Análise de perfil de ácidos graxos dos isolados de cianobactérias

A determinação da composição de ésteres metílicos e os cálculos do teor de ésteres dos isolados foram realizados no Laboratório de Métodos de Extração e Separação (LAMES) da Universidade Federal de Goiás, pela equipe do Prof. Dr. Nelson Antoniosi Filho. As análises foram feitas através de cromatografia gasosa, usando um cromatógrafo à gas Agilent 7890, equipado com detector FID e injetor split/splitless, seguindo a metodologia de Hartman e Lago (1973) adaptada para microescala por Antoniosi-Filho (1995) (apud Menezes et al., 2013). A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada pela comparação direta com amostras de composição conhecida, tal como óleo de soja, pela análise de padrões de referência de ésteres metílicos (Nu-Check Prep®) e por análises via cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação morfológica dos isolados de cianobactérias marinhas

Foram isoladas 22 linhagens de cianobactérias das amostras coletadas de ambientes marinhos nos Estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Santa Catarina, provenientes de água do mar e de água salobra de estuários e também de organismos marinhos como esponjas-do-mar do gênero *Cinachyrella* e *Haliclona*, do zoantídeo *Protopalythoa variabilis*, metazoários da classe Ascidiacea e corais da espécie *Siderastrea stellata* (Tabela 4).

Do total, dez isolados foram identificados ao nível de gênero (*Synechocystis*, *Synechococcus*, *Phormidium*, *Cyanothece*, *Romeria* e *Planktolyngbya*) e doze ao nível de espécie (seis isolados de *Synechocystis aquatilis*, quatro de *Synechococcus nidulans* e dois de *Romeria gracilis*) (Tabelas 3 e 4). Os isolados foram distribuídos em seis famílias (Merismopediaceae, Synechococcaceae, Romeriaceae, Leptolyngbyaceae, Cyanothecaceae, Oscillatoriaceae) e duas ordens (Synechococcales e Oscillatoriales) pertencentes à classe Cyanophyceae, filo Cyanobacteria (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação de isolados de cianobactérias nos respectivos gêneros segundo sistema de Komárek (KOMÁREK et al., 2014).

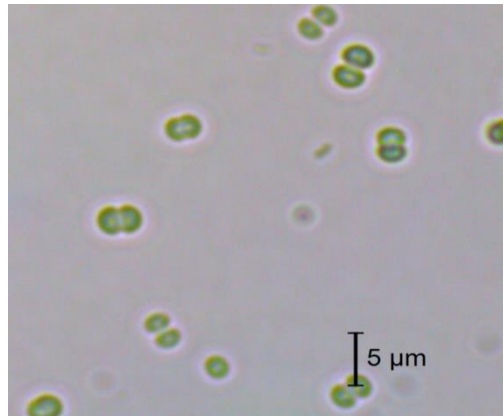
Ordem	Família	Gêneros	Código (CMUFPB)
Synechococcales	<i>Merismopediaceae</i>	<i>Synechocystis</i>	M3C, M20C, M60C, M62C, M129C, M130C, M163C, M204BG, M242BG, M305C
	<i>Synechococcaceae</i>	<i>Synechococcus</i>	M38C, M41C, M80C, M94C, M100, M290C
	<i>Romeriaceae</i>	<i>Romeria</i>	M6C, M138C, M304C
	<i>Leptolyngbyaceae</i>	<i>Planktolyngbya</i>	M333C
Oscillatoriales	<i>Cyanothecaceae</i>	<i>Cyanothece</i>	M181C
	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Phormidium</i>	M216C

Tabela 4. Relação de cianobactérias isoladas de ambientes e organismos marinhos do litoral dos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Santa Catarina.

Isolado	Táxon	Procedência
M3C	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau, 1892	Água do mar (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M6C	<i>Romeria gracilis</i> (Koczwara) Koczwara, 1932	Água do mar (Cabo Branco, João Pessoa - PB)
M20C	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau, 1892	Água salobra (Laguna de intermares, João Pessoa- PB)
M38C	<i>Synechococcus nidulans</i> (Pringsheim) Komárek, 1970	Esponja <i>Cinachyrella</i> sp. (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M41C	<i>Synechococcus nidulans</i> (Pringsheim) Komárek, 1970	Zoantídeo <i>Protopalythoa variabilis</i> (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M60C	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau, 1892	Água do mar (Cabo Branco, João Pessoa - PB)
M62C	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau, 1892	Água do mar (Cabedelo – PB)
M80C	<i>Synechococcus nidulans</i> (Pringsheim) Komárek 1970	Água do mar (Acaú, João Pessoa - PB)
M94C	<i>Synechococcus</i> Nägeli 1849	Água salobra (Estuário do rio Pirangí - RN)
M100C	<i>Synechococcus nidulans</i> (Pringsheim) Komárek, 1970	Esponja <i>Cinachyrella</i> sp. (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M129C	<i>Synechocystis</i> Sauvageau, 1892	Água salobra (Estuário do rio Mamanguape - PB)
M130C	<i>Synechocystis</i> Sauvageau, 1892	Água salobra (Estuário do rio Mamanguape - PB)
M138C	<i>Romeria gracilis</i> (Koczwara) Koczwara, 1932	Água do mar (Praia da Armação, Florianópolis - SC)
M163C	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau, 1892	Esponja <i>Haliclona</i> sp. (Carapibus, João Pessoa - PB)
M181C	<i>Cyanothece</i> Komárek, 1976	Esponja <i>Haliclona</i> sp. (Cabo Branco, João Pessoa - PB)
M204BG	<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau 1892	Água salobra (Estuário do rio Bucatú, Conde - PB)
M216C	<i>Phormidium</i> Kützing ex Gomont, 1892	Água do mar (Praia de Coqueirinho, João Pessoa - PB)
M242BG	<i>Synechocystis</i> Sauvageau, 1892	<i>Siderastrea stellata</i> (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M290C	<i>Synechococcus</i> Nägeli, 1849	Ascidia (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M304C	<i>Romeria</i> (Koczwara) Koczwara, 1932	<i>Siderastrea stellata</i> (Praia do Seixas, João Pessoa- PB)
M305C	<i>Synechocystis</i> Sauvageau, 1892	Ascidia (Cabo Branco, João Pessoa- PB)
M333BG	<i>Planktolyngbya</i> Anagnostidis & Komárek, 1988	<i>S. stellata</i> branqueada (Cabo Branco, João Pessoa- PB)

Dentre os isolados analisados, 20 pertenceram à ordem *Synechococcales*, sendo que o gênero *Synechocystis* foi representado por um maior número de isolados. Dentre 10 isolados pertencentes a esse gênero, 6 foram classificados como *S. aquatilis* (Tabelas 2 e 3; Figura 8, ANEXO A). A ocorrência de cianobactérias do gênero *Synechocystis* Sauvageau, 1892 se dá principalmente no plâncton e no metafíton de ambientes aquáticos continentais e marinhos e mais de 20 espécies desse gênero foram relatadas (BICUDO; MENEZES, 2006). Segundo Sant'Anna et al. (2012), células da espécie *S. aquatilis* são solitárias ou em pares, esféricas com mucilagem hialina.

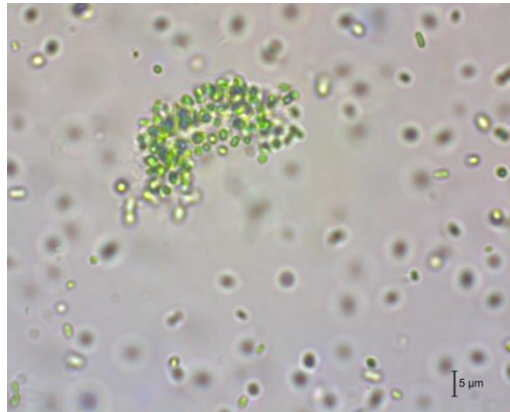
Figura 6. Isolado M20C - *Synechocystis aquatilis*.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

O gênero *Synechococcus* foi representado por 6 isolados, dos quais 4 pertenceram a espécie *S. nidulans* (Tabelas 2 e 3; Figura 9, ANEXO B). Segundo Komárek et al. (2014), *Synechococcus* Nägeli, 1849 é um gênero abrangente que é morfológicamente e ecologicamente pouco definido e inclui muitas linhagens ainda sem descrição. A espécie *S. nidulans* apresenta células isoladas de forma cilíndrica, ou curvada ou sigmóide, com aproximadamente 3 µm de comprimento por 2 µm de largura, envelope mucilaginoso ausente e sem aerotópos, com conteúdo homogêneo (SANTOS; SANTA'ANNA, 2010; SAN'TANNA et al., 2012). Bicudo e Menezes (2006) relataram que após a fissão binária, o crescimento das células-filha atinge o tamanho da célula original antes de outra divisão e quanto à ocorrência, foram relatadas 21 espécies, com poucos registros no Brasil, que habitam ambientes aquáticos e subaéreos, principalmente, plâncton, metafíton e superfícies rochosas.

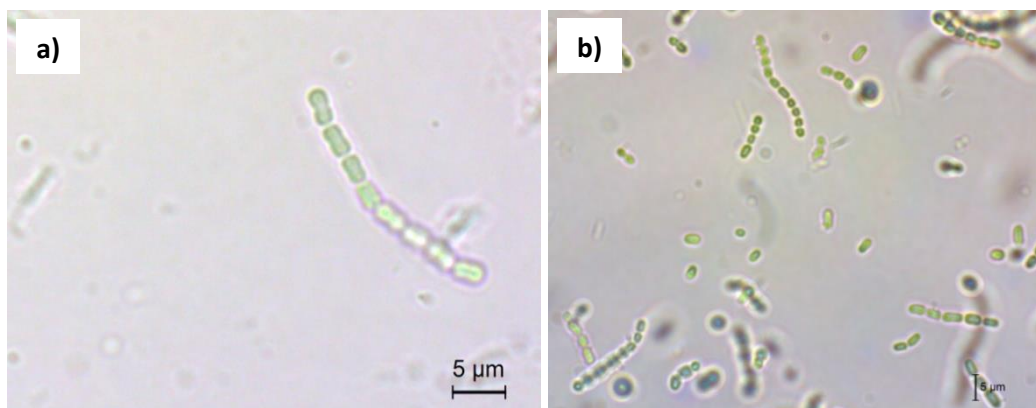
Figura 7. Isolado M94C - *Synechococcus* sp.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

Três isolados pertenceram ao gênero *Romeria* (Koczwara) Koczwara, 1932 (Tabelas 2 e 3, Figura 10, ANEXO C). Esse gênero é geralmente formado por células que formam filamentos curtos de três a oito células, quase retos ou suavemente curvados com células cilíndricas de 2,6-8 μm de comprimento por 0,8-2 μm de largura, com paredes transversais constrictas, com conteúdo celular palidamente azul esverdeado, sem aerótopos (KOMÁREK; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 2007). Reproduzem-se por divisões transversais ou fragmentação dos tricomas (BICUDO; MENEZES, 2006). Segundo Komárek et al. (2014), a família *Romeriaceae* é um grupo pequeno e pouco conhecido que necessita de uma caracterização mais abrangente.

Figura 8. Isolados M6C (a) e M304C (b) - gênero *Romeria*.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

Apenas um isolado (Figura 11, ANEXO D) foi classificado no gênero *Planktolyngbya* Anagnostidis & Komárek, 1988 (Tabela 3). De acordo com Sant'Anna et al. (2012), as

espécies desse gênero geralmente possuem filamentos solitários com tricomas retos, sem constrição, não atenuados e os septos não granulados; possui bainha mucilaginosa hialina e firme e as células são cilíndricas, a célula apical é cilíndrica possuindo ápice arredondado; o conteúdo celular é homogêneo, com ausência de aerótopos. A reprodução é realizada através de formação de hormogônios imóveis, e ausência de necrídios. Há aproximadamente 15 espécies que ocorrem comumente no plâncton e algumas estão restritas às regiões tropicais e subtropicais (BICUDO; MENEZES, 2006).

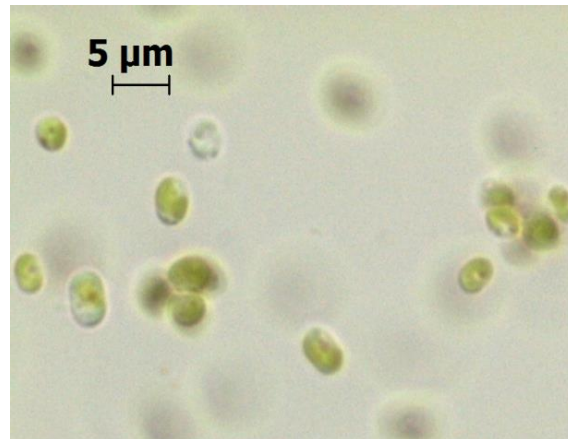
Figura 9. Isolado M333C – *Planktolyngbya* sp.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

Apenas dois isolados pertenceram à ordem Oscillatoriales, classificados como *Cyanothece* sp. e *Phormidium* sp. (Tabelas 2 e 3; Figuras 12 e 13, ANEXO D). Segundo Komárek (2009), o gênero *Cyanothece* Komárek, 1976, foi originalmente separado do gênero *Synechococcus* com base em marcadores citológicos e morfológicos. Ele apresenta células solitárias amplamente ovais ou cilíndricas, a divisão binária das células ocorre através de clivagem e em plano perpendicular por sucessivas gerações. Sua ocorrência se dá principalmente em ambientes aquáticos e subaéreos (BICUDO; MENEZES, 2006).

Figura 10. Isolado M181C - *Cyanothece* sp.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2015).

O gênero *Phormidium* Kützing *ex* Gomont 1892 é encontrado isoladamente entre algas ou formando massas emaranhadas de filamentos com mucilagem, possuindo variada coloração entre tons verde-escuro, verde azulado, avermelhada, castanha ou marrom, entre outras e habita diferentes ambientes extremos, polares, desérticos ou águas termais. Esse gênero possui cerca de 200 espécies (BICUDO; MENEZES, 2006).

Segundo Santos e Sant'Anna (2010) o gênero apresenta tricomas solitários, retos ou com extremidades apicais curvas, relativamente longos, com até 3,6 mm de comprimento, os quais são levemente constrictos e atenuados para um ou ambos os ápices, e algumas vezes não atenuados. As células são isodiamétricas podendo ser mais longas que largas e vice-versa. As células apicais possuem formato cônico-arredondado ou arredondado e o conteúdo celular é granuloso, às vezes com 1 - 2 grânulos grosseiros por célula. A fragmentação do tricoma ocorre através de necrídios.

Figura 11. Isolado M216C - *Phormidium* sp.



Fonte: Roberto Sassi (2014).

Cianobactérias marinhas são mais encontradas em faixas de picoplâncton ou nanoplâncton de oceanos tropicais, variando também entre regiões equatoriais e polares, e estão relacionadas com variações de concentração de carbono nos oceanos, aumento de temperatura global e ciclagem de nutrientes (HUANG et al., 2012; FONSECA, 2012; CUNHA et al., 2013).

Em ambientes marinhos, a diversidade de cianobactérias já foi associada a organismos que agem como hospedeiros de uma relação simbiótica, apresentando uma imensa diversidade de microrganismos ainda sem caracterização (ROHWER et al., 2002; HIROSE; HIROSE; NEILAN, 2006; STEINDLER et al., 2005; LINS-DE-BARROS et al., 2009). Alguns estudos investigaram a diversidade filogenética de cianobactérias associadas a gêneros de Ascídias da família *Didemnidae*, que abrigavam cianobactérias do gênero *Synechocystis* (MÜNCHHOFF et al., 2007; HIROSE, 2015).

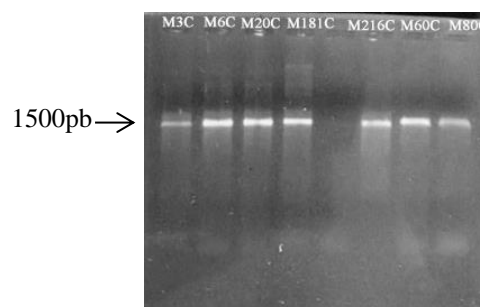
Entretanto, há uma enorme escassez de estudos sobre associações de cianobactérias e caracterização das mesmas, principalmente com esponjas de gêneros como *Cinachyrella* e *Haliclona*, também com o zoantídeo *Protopalythoa variabilis*, além de corais do gênero *Siderastrea*.

4.2 Análises moleculares de isolados de cianobactérias marinhas

4.2.1 Análise filogenética de isolados de cianobactérias

O DNA genômico total foi extraído dos 22 isolados de cianobactérias. As amostras de DNA apresentaram a concentração entre 29,7 ng/μl e 110,5 ng/μl e alto grau de pureza (OD₂₆₀₋₂₈₀ entre 1,8 – 2,0). Todos os isolados apresentaram amplificação do gene RNAr 16S obtendo-se fragmentos de 1500pb (Figura 14).

Figura 12. Produtos da amplificação do gene RNAr 16S de alguns isolados de cianobactérias.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2015).

As sequencias parciais do gene RNAr 16S de apenas 7 isolados apresentaram boa qualidade e foram submetidas à consulta de similaridade com os dados depositadas no GenBank utilizando o programa BLAST - “Basic Local Alignment Search Tools”. Os resultados desta análise revelaram que apenas seis isolados (M6C, M38C, M41C, M80C, M304C e M305C) apresentaram a similaridade igual ou superior a 97% com as sequencias depositadas no GenBank. As sequencias parciais de RNAr 16S destes isolados apresentaram alta identidade com as sequencias de cianobactérias do gênero *Synechococcus* (similaridade $\geq 98\%$) (Tabela 4). As sequencias de RNAr 16S dos demais isolados apresentaram identidade muito baixa (88 - 95%) com as sequencias de cianobactérias do GenBank.

Segundo Stackebrandt e Goebel (1994), a similaridade para definição de gêneros entre dois organismos utilizando o gene RNAr 16S precisa ser superior a 95%, enquanto que a similaridade entre organismos para a mesma espécie deve ser superior a 97,5%, valores determinados por estudos, os quais demonstraram que no domínio *Bacteria*, dois organismos são considerados da mesma espécie quando apresentam aproximadamente 70% ou mais de reassociação DNA-DNA e que valores de sequencia de gene RNAr 16S abaixo de 97,5% são improváveis de possuírem essa reassociação em um valor maior que o estipulado e consequentemente improváveis de pertencerem à mesma espécie.

Tabela 5. Resultados da análise das sequencias parciais de gene RNAr 16S dos isolados de cianobactérias marinhas pela ferramenta BLAST Microbial Genomes (Megablast).

Isolados	Alinhamento mais significativo ($\geq 97\%$)	E-value	Máxima identidade
M6C	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002* (NC 010475.1)	0,0	98%
M38C	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 (NC 010475.1)	2e-173	99%
M41C	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 (NC 010475.1)	0,0	99%
M80C	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 (NC 010475.1)	0,0	100%
M304C	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 (NC 010475.1)	0,0	99%
M305C	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002 (NC 010475.1)	0,0	100%

* Filo, classe, ordem e família: Cyanobacteria/Cyanophyceae/Synechococcales/Synechococcaceae

Dos 6 isolados que revelaram 98 - 100% de similaridade do gene RNAr 16S com *Synechococcus* sp. (Tabela 5), apenas 3 (M38C, M41C, M80C) foram classificados baseado nas características morfológicas com o gênero *Synechococcus*.

Guimarães et al. (2015) relataram que o gênero *Synechococcus* possui elevada diversidade genética devido a ampla distribuição em ambientes marinhos e dulcícolas e que as evidências moleculares para a polifilia desse gênero indica uma necessidade de revisão em sua classificação atual, já que apenas poucas sequências genômicas do gênero estão disponíveis no GenBank.

Dentre os demais isolados, M6C e M304C foram identificados utilizando as ferramentas de taxonomia tradicional como *Romeria* spp. e o isolado M305C como *Synechocystis* sp.

É possível que alguns isolados analisados nesse estudo não puderam ser identificados com base nos dados dos bancos de gene RNAr 16S devido a ausência dos dados referentes a algumas espécies ou até os gêneros de cianobactérias. Por exemplo, os bancos de dados disponíveis não possuem as sequências de RNAr 16S de cianobactérias do gênero *Romeria*, ao qual pertenceram os isolados M6C e M304C.

Mellmann et al. (2008) relatam que com a utilização de sequências do gene RNAr 16S não é possível identificar os isolados bacterianos analisados ao nível de espécie, sugerindo uma abordagem polifásica para identificação com o uso combinado de características fenotípicas e genotípicas. Essa mesma abordagem, incluindo caracteres genotípicos, morfológicos, fisiológicos e quimiotaxonômicos, é apoiada por Oren (2011) que relata que as diretrizes para propostas taxonômicas de isolados procarióticos podem e devem ser utilizadas para a descrição de cianobactérias. Honda (2009) também ressaltou que apesar do gene RNAr 16S ser utilizado para delineamento de espécies, ele não possui resolução suficiente para defini-las, sendo mais indicado na comparação entre gêneros, famílias ou em níveis mais altos e como sugestão para cianobactérias, outras regiões além do RNAr 16S poderiam ser testadas como os genes *rpoC1* (RNA polymerase C1), *gyrB* (subunit B protein of DNA gyrase) e *rbcLX* (Rubisco).

Marques (2006) relatou que apesar do refinamento das técnicas de sequenciamento, das análises de informações obtidas e da maior disponibilidade de dados comparáveis, as dificuldades ainda existem, como é o caso de muitos organismos terem mais de uma cópia do gene RNAr 16S no banco de dados, gerando equívocos, pois as sequências de um mesmo organismo podem ser interpretadas como de organismos diferentes, o que compromete a interpretação dos resultados.

Por outro lado, Singh et al. (2014) relataram a plasticidade fenotípica como outro ponto de destaque, devido a sua incoerência com os dados genéticos estar afetando fortemente a taxonomia cianobacteriana e infelizmente, o esquema tradicional taxonômico não tem sido capaz de responder questões altamente discutíveis quanto a essa plasticidade fenotípica com restrições ambientais, provando-se assim, inadequada e imprecisa.

4.2.2 Produção de microcistinas e presença do gene *mcyB* em isolados de cianobactérias

A Tabela 5 correlaciona a produção de microcistinas detectada pelo método ELISA com a presença do gene *mcyB*, evidenciando que 5 isolados produziram microcistinas, enquanto que 12 isolados apresentaram o gene *mcyB*.

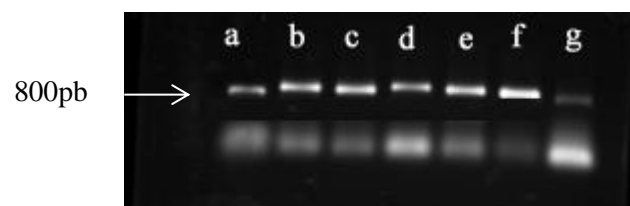
Apenas um dos isolados (M204BG) que apresentaram o gene *mcyB* mostrou produção de microcistinas. O isolado em questão foi identificado como *Synechocystis aquatilis*. Al-Layl (2003) observou a produção de microcistinas com alta toxicidade por cianobactérias pertencentes a esse gênero.

A produção de microcistinas foi observada apenas em isolados pertencentes ao gênero *Synechocystis* (M3C, M62C, M129C, M204BG, M242BG) (Tabela 6 e Figura 13). Outros trabalhos evidenciaram a produção de microcistinas pela espécie *Synechocystis aquatilis* (Magalhães et al., 2003; KIM; LEE; HWANG, 2013).

Já a presença do gene *mcyB* foi detectada em 3 isolados pertencentes a *Romeria* spp., 3 de *Synechocystis* spp. e 6 de *Synechococcus* spp.

O gene *mcyB* é um dos dez genes envolvidos na produção de microcistinas, sendo organizados em dois operons, os quais se encontram separados por uma região promotora bidirecional (CRESPIM, 2013). Os resultados obtidos indicaram a presença de *mcyB* em 12 isolados mostrando que estas cianobactérias são potenciais produtoras de microcistinas.

Figura 13 - Produtos de amplificação do gene *mcyB* dos isolados de cianobactérias marinhas. Linhas: a) *Microcystis aeruginosa* (cepa padrão); b) M38C; c) M41C; d) M80C; e) M94C; f) M100C; g) M204BG.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2015).

Tabela 6. Produção de microcistinas e a presença do gene *mcyB* nos isolados de cianobactérias marinhas.

Espécie/gênero	Isolado	Produção de microcistinas	<i>mcyB</i> (~800pb)
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M3C	+	-
<i>Romeria gracilis</i>	M6C	-	+
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M20C	-	+
<i>Synechococcus nidulans</i>	M38C	-	+
<i>Synechococcus nidulans</i>	M41C	-	+
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M60C	-	-
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M62C	+	-
<i>Synechococcus nidulans</i>	M80C	-	+
<i>Synechococcus</i>	M94C	-	+
<i>Synechococcus nidulans</i>	M100C	-	+
<i>Synechocystis</i>	M129C	+	-
<i>Synechocystis</i>	M130C	-	-
<i>Romeria gracilis</i>	M138C	-	+
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M163C	-	-
<i>Cyanothece</i>	M181C	-	-
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M204BG	+	+
<i>Phormidium</i>	M216C	-	-
<i>Synechocystis</i>	M242BG	+	-
<i>Synechococcus</i>	M290C	-	+
<i>Romeria</i>	M304C	-	+
<i>Synechocystis</i>	M305C	-	+
<i>Planktolyngbya</i>	M333BG	-	-

+ positivo; - negativo

Alguns isolados produziram microcistinas, apesar da não detecção do gene envolvido, possivelmente por se tratar de outra variante expressa por outro gene do conjunto *mcy*. Pimentel (2009) relatou problemas na amplificação de DNA por PCR atribuindo o problema a inibidores presentes no ambiente e/ou resíduos da extração de DNA, sugerindo que a metodologia de extração empregada poderia ser uma possível fonte de contaminação.

Temperaturas mais elevadas podem aumentar a toxicidade de cianobactérias, estimulando a sua biossíntese de toxinas. El-Shehawy et al. (2012) relataram que a produção

da hepatotoxina microcistina pode estar diretamente ligada a fatores ambientais como efeitos do aquecimento global sobre as mudanças fisiológicas e moleculares nestas cianobactérias por causar um aumento na expressão do grupo de genes *mcy* envolvidos na biossíntese de microcistinas.

4.3 Atividade antibacteriana de extratos dos isolados de cianobactérias marinhas

Os dados sobre a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e etanólicos dos isolados cianobacterianos estão demonstrados na Tabela 7.

Dos 22 isolados de cianobactérias analisados apenas 4 (M6C, M62C, M94C, M290C) mostraram inibição de *S. aureus* ou de *P. aeruginosa* (Tabela 7). O halo de inibição de crescimento de bactérias patogênicas testadas variou entre 10 e 14mm (Tabela 7 e Figura 16). Para o controle positivo e negativo foram utilizados discos de antibióticos como o ácido nalidíxico, estreptomicina, clorafenicol e vancomicina (Figura 17).

Os isolados que mostraram atividade antibacteriana correspondem às espécies *Romeria gracilis* (M6C), *Synechocystis aquatilis* (M62C), *Synechococcus nidulans* (M94C) e *Synechococcus* sp. (M290C).

Nenhum extrato etanólico apresentou atividade frente *S. aureus*, entretanto extratos etanólicos de 3 isolados inibiram *P. aeruginosa* (Tabela 7). Dentre os extratos metanólicos apenas um isolado (M62C) apresentou atividade inibitória frente *S. aureus* e um isolado (M6C) frente *P. aeruginosa*.

O isolado M6C (*Romeria gracilis*) apresentou atividade inibitória frente *P. aeruginosa* para os extratos metanólico e etanólico.

As cianobactérias são consideradas como organismos com grande potencial biotecnológico por possuir substâncias antimicrobianas que atuam sobre vários microrganismos, tanto procariotos quanto eucariotos (SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2011).

Muitos trabalhos realizam extrações de compostos bioativos de linhagens de cianobactérias utilizando solventes como metanol, etanol, acetona, entre outros (MADHUMATHI et al., 2011; BIONDI et al., 2008; HAMEED, 2013).

Tabela 7. Atividade antibacteriana de extratos metanólicos e etanólicos dos isolados de cianobactérias marinhas.

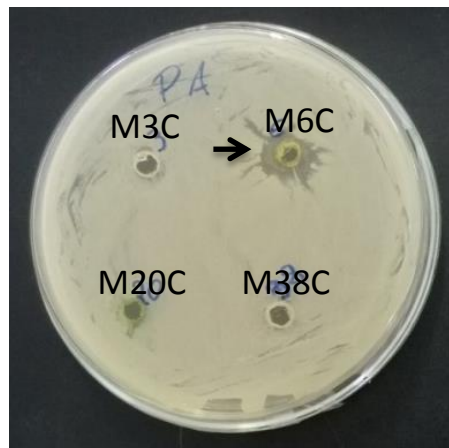
Espécie/gênero	Isolados	Extrato metanólico		Extrato etanólico	
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		Halo de inibição (mm)		Halo de inibição (mm)	
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M3C	0	0	0	0
<i>Romeria gracilis</i>	M6C	0	10	0	11
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M20C	0	0	0	0
<i>Synechococcus nidulans</i>	M38C	0	0	0	0
<i>Synechococcus nidulans</i>	M41C	0	0	0	0
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M60C	0	0	0	0
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M62C	11	0	0	0
<i>Synechococcus nidulans</i>	M80C	0	0	0	0
<i>Synechococcus</i>	M94C	0	0	0	12
<i>Synechococcus nidulans</i>	M100C	0	0	0	0
<i>Synechocystis</i>	M129C	0	0	0	0
<i>Synechocystis</i>	M130C	0	0	0	0
<i>Romeria gracilis</i>	M138C	0	0	0	0
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M163C	0	0	0	0
<i>Cyanothece</i>	M181C	0	0	0	0
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M204BG	0	0	0	0
<i>Phormidium</i>	M216C	0	0	0	0
<i>Synechocystis</i>	M242BG	0	0	0	0
<i>Synechococcus</i>	M290C	0	0	0	14
<i>Romeria</i>	M304C	0	0	0	0
<i>Synechocystis</i>	M305C	0	0	0	0
<i>Planktolyngbya</i>	M333BG	0	0	0	0

Além disso, há evidências de uma grande variedade de compostos orgânicos excretados por diversas espécies de cianobactérias para o ambiente com propriedades antimicrobianas (CAICEDO et al., 2011).

Segundo Kumar; Bhatnagar e Srivastava (2011), extratos cianobacterianos proporcionam uma atividade antimicrobiana mais consistente, indicando claramente que a polaridade dos compostos antimicrobianos facilita a sua extração por solventes orgânicos, além de não afetar negativamente a sua bioatividade contra espécies antibacterianas e antifúngicas.

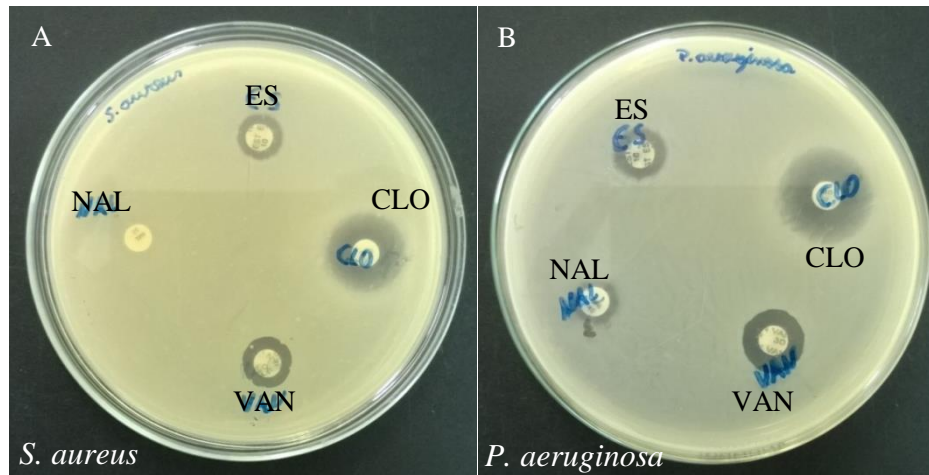
Martins et al. (2008) estudaram isolados de cianobactérias marinhas dos gêneros *Synechocystis* e *Synechococcus* que produziram substâncias com efeitos inibidores sobre organismos procariontes, inibindo as bactérias Gram-positivas, e com atividade apoptótica frente células eucariontes. Os autores observaram diferentes atividades dos extratos obtidos com solventes orgânicos e extratos aquosos, sugerindo desta forma que compostos com polaridades diferentes estariam envolvidos. Vários estudos destacaram a importância de cianobactérias marinhas como fontes de agentes farmacológicos (RASTOGI; SINHA, 2009; YADAV et al., 2011; NOWRUZI et al., 2012; KUMAR et al., 2013; PRADHAN; DAS; DAS, 2014).

Figura 14. Teste de sensibilidade de *P. aeruginosa* aos extratos metanólicos no ágar Muller-Hinton. Extrato do isolado M6C (seta) apresenta halo de inibição da cepa padrão.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2015).

Figura 15. Teste de sensibilidade de *S. aureus* (A) e *P. aeruginosa* (B) aos antibióticos (controle): ácido nalidíxico (NAL), estreptomicina (ES), cloranfenicol (CLO) e vancomicina (VAN).



Fonte: Giuseppe Fernandes (2015).

4.4 Biomassa dos isolados de cianobactérias marinhas

Os 22 isolados de cianobactérias apresentaram a biomassa entre 0,141g/L e 1,646g/L (Tabela 8). Os isolados que apresentaram maiores valores de biomassa foram M60C (*Synechocystis aquatilis*; 1,646 g/L), M80C (*Synechococcus nidulans*; 1,457g/L) e M3C (*Synechocystis aquatilis*; 1,267g/L). Tempo de cultivo para obtenção de biomassa variou entre 14 e 20 dias, dependendo da taxa de crescimento dos isolados.

Um dos fatores responsáveis pelo potencial sucesso das microalgas como matéria-prima para produção de biodiesel é a alta produtividade de biomassa frente a culturas oleaginosas como a soja, sendo assim considerada como uma vantagem economicamente competitiva (CHISTI, 2007; WAHLEN, WILLIS e SEEFELDT, 2011).

Tabela 8. Produção de biomassa dos isolados de cianobactérias marinhas.

Espécie/gênero	Isolado	Biomassa (g/L)	Tempo de cultivo (dias)
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M3C	1,267	14
<i>Romeria gracilis</i>	M6C	0,860	14
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M20C	0,141	14
<i>Synechococcus nidulans</i>	M38C	0,926	14
<i>Synechococcus nidulans</i>	M41C	0,264	20
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M60C	1,646	14
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M62C	0,482	20
<i>Synechococcus nidulans</i>	M80C	1,457	14
<i>Synechococcus</i>	M94C	0,750	14
<i>Synechococcus nidulans</i>	M100C	0,428	14
<i>Synechocystis</i>	M129C	0,573	14
<i>Synechocystis</i>	M130C	1,032	14
<i>Romeria gracilis</i>	M138C	0,211	14
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M163C	0,770	14
<i>Cyanothece</i>	M181C	0,741	20
<i>Synechocystis aquatilis</i>	M204BG	0,329	14
<i>Phormidium</i>	M216C	0,553	14
<i>Synechocystis</i>	M242BG	0,235	14
<i>Synechococcus</i>	M290C	0,717	14
<i>Romeria</i>	M304C	0,440	14
<i>Synechocystis</i>	M305C	0,370	14
<i>Planktolynghya</i>	M333BG	0,981	14

4.5 Perfil de ácidos graxos dos isolados de cianobactérias marinhas

O conteúdo total de lipídios e o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos foi analisado para 8 isolados de cianobactérias pertencentes aos gêneros *Romeria*, *Synechococcus* e *Synechocystis* (Tabela 9).

Os isolados pertencentes ao gênero *Synechococcus* apresentaram os maiores valores de conteúdo lipídico. O maior conteúdo de lipídios foi observado em isolados M94C (*Synechococcus* sp.), M6C (*Romeria gracilis*) e M80C (*Synechococcus nidulans*).

Karatay e Dönmez (2011) relataram que o alto custo do biodiesel é o maior obstáculo para uma efetiva comercialização e para superá-lo, a fonte de óleo utilizada na produção de biodiesel tem grande importância no custo do processo, evidenciando as cianobactérias *Synechococcus* sp. e *Phormidium* sp. como matérias-primas atrativas que permitem alta produção de lipídios.

Os principais ácidos graxos encontrados nos isolados de cianobactérias analisadas foram os ácidos palmítico (saturado), oléico (monoinsaturado) e linoléico (poliinsaturado), com predominância do ácido palmítico que apresentou os maiores percentuais no isolado M6C (47,3%), nos isolados do gênero *Synechococcus* (M100C, M38C e M94C) com os valores 40,7%, 35,6% e 35,5%, respectivamente (Tabela 9).

Sahu et al. (2013) observou também que os ácidos palmítico e oléico foram os dominantes entre os lipídios encontrados nas cianobactérias *Calothrix* sp., *Leptolyngbya* sp., *Oscillatoria marina*, *Oscillatoria acuta*, *Lyngbya* sp., *Spirulina platensis*, *Nostoc muscorum* e *Synechococcus* sp.

Os isolados M38C, M94C, M100C e M129C, também apresentaram os ácidos gama linolênico e mirístico em seus perfis, porém com baixos percentuais (ácido mirístico variou de 1,9 a 6,0% e gama linolênico variou de 1,3 a 7,3%) (Tabela 9), exceto o isolado M41C que apresentou um elevado percentual do ácido mirístico (25,9%) frente aos demais. Os isolados M80C e M60C apresentaram o maior percentual de ácido linoléico e linolênico, respectivamente.

Os isolados do gênero *Synechococcus* sp. apresentaram valores elevados de biomassa e conteúdo lipídico. Segundo Karatay e Donmez (2011), a produção de ácidos graxos por esse gênero pode chegar a 42,8% em condições ótimas de cultivo.

Rós (2012) observou que um isolado de *Synechococcus* sp. apresentou 30% de ácidos graxos saturados e 70% de ácidos graxos insaturados, destacando em maior quantidade os ácidos oléico, linoléico e palmítico.

Costa et al. (2014) ressaltaram que cianobactérias marinhas filamentosas e picoplantônicas de gêneros como *Synechocystis*, *Synechococcus* e *Romeria*, entre outros, raramente têm sido estudadas com relação aos seus potenciais como produtores de compostos bioativos.

Tabela 9. Composição de ácidos graxos (percentual do total de ácidos graxos) dos isolados de cianobactérias marinhas.

Ácidos graxos	Composição (%)							
	M6C	M38C	M41C	M60C	M80C	M94C	M100C	M129C
Saturados								
Caprílico C8:0	0,1							
Láurico C12:0	0,2	2,2	1,1			1,6	2,4	2,9
Mirístico C14:0	0,2	3,7	25,9			1,9	2,6	6,0
Pentadecílico C15:0	0,3		1,0				0,7	
Palmítico C16:0	47,3	35,6	19,5	25,6	17,4	35,5	40,7	22,4
Margárico C17:0	1,6							8,6
Estearico C18:0	0,6	2,8	1,7		2,7	3,5	2,8	2,5
Behênico C22:0					15,0			
Total	50,3	44,3	49,2	25,6	35,1	42,5	49,2	42,4
Monoinsaturados								
Miristoléico C14:1 <i>c9</i>			1,9					
Pentadecaenóico C15:1 <i>c10</i>							1,2	
Palmitoléico C16:1 <i>c9</i>	0,1		26,5		3,9	0,8	0,8	
Hexadecenóico C16:1 <i>c11</i>	15,0							
Heptadecenóico C17:1 <i>c9</i>	3,9							
Oléico C18:1 <i>c9</i>	14,6	18,3	1,1	7,4	15,3	14,6	19,1	14,5
Vacênico C18:1 <i>c11</i>	0,5	1,8	3,1			0,8	1,9	1,1
Total	34,1	20,1	32,6	7,4	19,2	16,2	23,0	15,6
Poliinsaturados								
Hexadecadienóico C16:2 <i>c7,10</i>		11,3	3,5	13,4		17,9	0,6	
Hexadecatrienóico C16:3 <i>c6,9,12</i>						3,9	3,7	5,1
Hexadecatrienóico C16:3 <i>c7,10,13</i>			4,1	13,2				
Linoléico C18:2 <i>c9,12</i>	9,9	12,8	1,0	26,1	37,4	9,7	12,2	21,1
Gama-Linolênico C18:3 <i>c6,9,12</i>		4,4				1,3	1,8	7,3
Linolênico C18:3 <i>c9,12,15</i>	5,3	7,1	0,5	14,3	8,3	6,3	6,8	8,6
Estearidônico C18:4 <i>c6,9,12,15</i>						2,2	2,7	
Total	15,2	35,6	9,1	67,0	42,7	41,3	27,8	42,1

Lang et al. (2011) relataram que as cianobactérias possuem pouca quantidade de ácidos graxos de forma saturada e mono insaturada, bem como apenas vestígios de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), geralmente o ácido linoléico. Porém, o rápido aumento de biomassa que possui composição invariável, além da indução de aumento de síntese de vários compostos, entre eles proteínas, carboidratos e lipídeos, são algumas das vantagens que tornam as cianobactérias microrganismos interessantes para aplicações biotecnológicas (DERNER et al., 2006).

Embora o cultivo dos isolados utilizados neste estudo não tenha objetivado um aumento da síntese de ácidos graxos, o perfil analisado e o rendimento de biomassa de algumas cianobactérias se apresentaram bastantes promissores para pesquisas futuras.

5. CONCLUSÕES

- Os isolados de cianobactérias provenientes de água e organismos marinhos do litoral dos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Santa Catarina foram classificados na base das características morfológicas no nível do gênero ou espécie, e pertenceram aos gêneros *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Romeria*, *Planctolyngbya*, *Cyanothece* e *Phormidium*.
- A presença do gene *mcyB* foi constatada em maior número de isolados de cianobactérias do que a produção de microcistina. A produção de microcistina e a presença do gene *mcyB* foram detectadas simultaneamente apenas em um isolado.
- Os extratos metanólicos e etanólicos de quatro isolados apresentaram atividade inibitória frente às bactérias patogênicas *S. aureus* ou *P. aeruginosa*.
- Dentre os ácidos graxos observados no perfil dos isolados de cianobactérias os ácidos: palmítico, oléico, mirístico, linoléico e linolênico apresentaram maiores teores. Alguns isolados apresentaram um potencial biotecnológico para ser explorado para a produção de ácidos graxos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. G. Heterocyst formation in cyanobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 618–624, 2000.
- AIKAWA, S.; NISHIDA, A.; HO, S. H.; SHANG, J. S.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 88, 2014.
- AL-LAYL, K. L. M.; Liver injury induced by the hepatotoxicity of the nanoplanktonic cyanobacterium *Synechocystis aquatilis* isolated from Makkah, Saudi Arabia. **Umm Al-Qura University Journal of Science - Medicine – Engineering**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2003.
- AL-WATHNANI, H.; ARA, I.; TAHMAZ, R. R.; AL-DAYEL, T. H.; BAKIR, M. A. Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 18, p. 3425-3433, 16 May, 2012.
- ANAGNOSTIDIS, K; KOMÁREK J. Modern approach to the classification system of cyanophytes 1—introduction. . **Algological Studies**, v. 38, n. 39 p. 291–302, 1985.
- ANAGNOSTIDIS, K; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3—Oscillatoriales. **Algological Studies**, v. 50–53, p. 327–472, 1988.
- ANAGNOSTIDIS, K; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes 5—Stigonematales. . **Algological Studies**, v. 59, p. 1–73, 1990.
- BICUDO C. E M.; MENEZES, M. Gêneros de Algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. Ed. Rima. 2006, 2ª ed., p.3.
- BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; TATON, A.; WILMOTTE, A. HODGSON, D. A.; LOSI, D.; MARINELLI, F. Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 105–115, 2008.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Detection of potential microcystin-producing cyanobacteria in Brazilian reservoirs with a *mcyB* molecular marker. **Harmful Algae**, v. 2, p. 51–60, 2003.
- BLÁHA, L.; BABICA, P.; MARŠÁLEK, B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms – toxicity and risks. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 36–41, 2009.
- BORGES, H. L. F; BRANCO, L. H. Z.; MARTINS, M. D.; LIMA, C. S.; BARBOSA, P. T.; LIRA, G. A. S. T.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; MOLICA, R. J.R. Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil. **Harmful Algae**. v. 43, p. 46-57, 2015.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 3-15, 1995.

BORTOLI, S.; PINTO, E. Cianotoxinas: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. In: POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA, P. Y.; SILVA, S. BOYER, S. L.; FLECHTNER, V. R.; JOHANSEN, J. R. Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v.18(6), p. 1057–1069, 2015.

BRANDÃO, L. H.; DOMINGOS, P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n.2, p. 40-50, 2006.

CAICEDO, N. H.; HEYDUCK-SÖLLER, B.; FISCHER, U.; THÖMING, J. Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 811–818, 2011.

CAIRES, T. A. **Cianobactérias marinhas bentônicas filamentosas do litoral do Estado da Bahia, Brasil**. 2013. 10 p. Dissertação. (Mestrado em Botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2013.

CALIJURI, M.C.; ALVES, M.S.A.; DOS SANTOS, A.C.A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. Ed. Rima. 2006.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C, v. 146, p. 60–78, 2007.

CARNEIRO, T. G.; LEITE, F. Cianobactérias e suas toxinas. **Revista Analytica**, n. 32, dez/jan, 2007/2008.

CARVALHO, M. C.; AGUJARO, L. F.; PIRES, L. A.; PICOLI, C. **Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais**. CETESB, Biblioteca, 2. Ed. São Paulo, SP, Brasil, 2013. 56 p.

CASTIGLIONI, B.; ERMANNIO, R.; FROSINI, A.; SIVONEN, K.; RAJANIEMI, P.; RANTALA, A.; MUGNAI, M. A.; VENTURA, S.; WILMOTTE, A.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; BALTHASART, P.; CONSOLANDI, C.; BORDONI, R.; CARVALHO, M. C.; AGUJARO, L. F.; PIRES, D. A.; PICOLI, C. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16s rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p.7161-7172, 2004.

CHEN, F.; WANG, K.; KAN, J.; SUZUKI, M. T.; WOMMACK, K. W. E. Diverse and Unique Picocyanobacteria in Chesapeake Bay, Revealed by 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, N. 3, p. 2239–2243, 2006.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHU, W. Biotechnological applications of microalgae. **International E-Journal of Science, Medicine and Education**, v. 6 n. 1, p. 24-37, 2012.

CHURRO, C.; DIAS, E.; VALÉRIO, E. Risk assessment of cyanobacteria and cyanotoxins, the particularities and challenges of *planktothrix* spp. monitoring. Book edited by Yuzhou Luo, ISBN 978-953-51-0519-0, **Published:** APR 20, 2012.

COSTA, C. F.; SASSI, R.; GORLACH-LIRA, K. Uma abordagem metodológica para o estudo das zooxantelas de corais do Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 21, p. 83-94, 2008.

COSTA, M.; COSTA-RODRIGUES, J. FERNANDES, M. H.; BARROS, P.; VASCONCELOS, V.; MARTINS, R. Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: a review on the implication of apoptosis. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2181-2207, 2012.

COSTA, M.; GARCIA, M.; COSTA-RODRIGUES, J.; COSTA, M. S.; RIBEIRO, M. J.; FERNANDES, M. H.; BARROS, P.; BARREIRO, A.; VASCONCELOS, V.; MARTINS, R. Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the portuguese coast: high potential as a source of anticancer compounds. **Marine Drugs**, v.12, p. 98-114, 2014.

CRESPIM, E. **Identificação e sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese de microcistinas e saxitoxinas na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* SPC777**. 2013. p. 24. Tese (Doutorado em Centro de Energia Nuclear na Agricultura), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CRISPINO, L. M. B. **Cianobactérias Marinhas Bentônicas do litoral do Estado de São Paulo**. 2007. 154 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2007.

CUNHA, M. S. C.; JUNIOR, A. M. M.; CARDOSO, A. S.; ROCHA, C. M. C.; ALVES, A. E. Estrutura das populações fitoplanctônicas e microflora epífita em zona de arrebentação no litoral do estado de Pernambuco, **Brasil. Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, n. 5, p. 1449-1462, 2013.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, NOV/DEZ, 2006.

DVORÁK, P.; POULÍCKOVÁ, A.; HASLER, P.; BELLI, M.; CASAMATTA, D. A.; PAPINI, A. **Biodiversity and Conservation**, v, 24, p. 739-757, 2015.

DYBLE, J.; FAHNENSTIEL, G. L.; LITAKER, R. W.; MILLIE, D. F.; TESTER, P. A.; Microcystin concentrations and genetic diversity of microcystis in the lower great lakes. **Environmental Toxicology**, article first published online: 4 FEB 2008 | DOI 10.1002/tox.

EHRENREICH, I. M.; WATERBURY, J. B.; WEBB, E. A. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7401–7413, NOV., 2005.

EL-SHEHAWY, R.; GOROKHOVA, E.; FERNÁNDEZ-PIÑAS, F.; DEL CAMPO, F. F. Global Warming and Hepatotoxin Production by cyanobacteria: what can we learn from experiments? **Water Research**, v. 46, p. 1420-1429, 2012.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791, 1985.

FONSECA, B. M.; Impactos de mudanças climáticas globais sobre algas e cianobactérias. **Heringeriana**, v. 6, n. 1, p. 49-51, 2012.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; RÉZIG, S.H. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre, Brasil: Artmed Editora, 2010, p. 60.

FRAZÃO, B.; MARTINS, R.; VASCONCELOS, V. Are Known Cyanotoxins Involved in the Toxicity of Picoplanktonic and Filamentous North Atlantic Marine Cyanobacteria? **Marine Drugs**, v. 8, p. 1908-1919, 2010.

FWR. **Cyanobacterial Toxins (Cianotoxins) in Water. A review of current knowledge**, fr/r0009. Foundation For Water Research, Marlow, 13-14 p., 2014.

GEHRINGER, M. M.; ADLER, L.; ROBERTS, A. A.; MOFFITT, M. C.; MIHALI, T. K.; MILLS, T. J. T.; FIEKER, C.; NEILAN, B. A. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. **International Society for Microbiology Ecology Journal**, v. 6, p. 1834-1847, 2012.

GENUÁRIO, D. B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia diversidade genética**. 2010. p. 96. Dissertação (Mestrado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

GENUÁRIO, D. B.; SILVA-STENICO, M. E.; WELKER, M.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a brazilian isolate of nostoc. **Toxicon**, v. 55, p. 846–854, 2009.

GIDDINGS, M.; ARANDA-RODRIGUEZ, R.; YASVINSKI, G.; WATSON, S. B.; ZURAWELL, R. (2012). Canada: Cyanobacterial Toxins: Drinking and Recreational Water Quality Guidelines. In I. CHORUS (Ed). **Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries**, (p. 29-39). Germany: Federal Environment Agency.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 4. ed. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.: 2012.

GUIMARÃES, P. I.; LEÃO, T. F.; MELO, A. G. C.; RAMOS, R. T. J.; SILVA, A.; FIORE, M. F.; SCHNEIDER, M. P. C. Draft Genome Sequence of the Picocyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain GFB01, Isolated from a Freshwater Lagoon in the Brazilian Amazon. **Genome announcements**, v. 3, n. 4, 2015.

- GUNASEKERA, S. P.; ROSS, C.; PAUL, V. J.; MATTHEW, S.; LUESCH, H. Dragonamides C and D, Linear lipopeptides from the marine cyanobacterium brown *Lyngbya polychroa*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 887–890, 2008.
- HAMEED, S. **Investigation of the production and isolation of bioactive compounds from cyanobacteria**. 2013. p. 412. Tese (Doutorado em filosofia), Robert Gordon University, Aberdeen, 2013.
- HASLER, P.; DVOŘÁK, P.; JOHANSEN, J. R.; KITNER, M.; ONDŘEJ, V.; POULÍČKOVÁ, A. Morphological and molecular study of epipelagic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria). **Fottea**, v. 12, n. 2, p. 341–356, Olomouc, 2012.
- HEJAZI, M. A.; WIJFFELS, R. H. Milking of microalgae. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 4, 2004.
- HIROSE, E. Ascidian photosymbiosis: diversity of cyanobacterial transmission during embryogenesis. **Genesis**, v. 53, p. 121–131, 2015.
- HIROSE, E.; HIROSE, M.; NEILAN, B. A. Localization of symbiotic cyanobacteria in the colonial Ascidian *Trididemnum miniatum* (Didemnidae, Ascidiaceae). **Zoological Science**, v. 23, p. 435 – 442, 2006.
- HOICZYK, E.; HANSEL, A. cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1191–1199, 2000.
- HONDA, R. Y.; **Caracterização morfológica e molecular de cianobactérias do gênero *Anabaena* isoladas de corpos d'água brasileiros**. 2009. p.154. Tese (Doutorado em agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- HUANG, S.; WILHELM, S. W.; HARVEY, H. R.; TAYLOR, K.; JIAO, N.; CHEN F. Novel lineages of Prochlorococcus and Synechococcus in the global oceans. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 6, p. 285-297, 2012.
- ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; MARSAC, N. T. de; HERDMAN, M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 146, p.1275-1286, 2000.
- JANDA, J. M.; ABBOT, S. L. 16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.
- JARDIM, F. A. **Potenciais mecanismos de redução da toxicidade de microcistinas e a sua utilização no tratamento da água**. 2008. p. 81. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
- JUNIOR, W. A. G. **Cianobactérias unicelulares e coloniais de ambientes terrestres de áreas da Mata Atlântica no Estado de São Paulo, Brasil**. 2012. 160 p. Dissertação

(Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 20 p., 2012.

KARATAY, S. E.; DONMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, p.3632–3635, 2011.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A.; BORNER, T.; DITTMANN, E. Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3387–3392, 2000.

KIM, J. D. Screening of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy soil for antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, v. 34 n. 3, p. 138-142, 2006.

KIM, B. H.; LEE, J. H.; HWANG, S. J. Removal of Cyanobacteria and Microcystin by Natural Plant-Mineral Combinations in Eutrophic Waters. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, p. 216-221, 2013.

KOMÁREK J, ANAGNOSTIDIS K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4— Nostocales. **Algological Studies**, v. 56, p. 247–345, 1989.

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

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

KOMÁREK, J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia**, p. 639:245–259, Article first published online: 18 DEC 2009 | DOI 10.1007/s10750-009-0031-3

KOMÁREK, J; KASTOVSKY, J. MARES; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86: p.295–335, 2014.

KOMÁREK, J; KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. Several rare freshwater planktic Cyanobacteria (Cyanoprokaryotes) from reservoirs in South America. **Hoehnea**, v. 34 n. 1, p. 49-58, 2007.

KUMAR, M.; TRIPATHI, M. K.; SRIVASTAVA, A.; NATH, G.; ASTHANA, R. K. A comparative study of antibacterial activity of brackish and fresh water cyanobacterials strains. **Asian Journal of Experimental Biology Sciences**, v.3, n.3, p.548-542, 2012.

KUMAR, V.; BHATNAGAR, A. K.; SRIVASTAVA, J. N. Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 32, p. 7043-7048, 2011.

KUMAR, V.; TIRUMALAI, P. S.; SINGH, A.; BHATNAGAR, A. K.; SHRIVASTAVA, J. N. Natural compounds from Aalgae and *Spirulina platensis* & its antimicrobial activity. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 212-223, 2013.

KUMAR, K.; MELLA-HERRERA, R. A.; GOLDEN, J. W. Cyanobacterial Heterocysts. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2010 | DOI: 10.1101/cshperspect.a000315.

LANE, DJ. **16S/23S rRNA sequencing**. In: E. STACKEBRANDT AND M. GOODFELLOW (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons; 1991, p. 115–175.

LANG, I.; HODAC, L.; FRIEDL, T.; FEUSSNER, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 124, 2011.

LINS-DE-BARROS, M. M.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; MONTEIRO, V. A.; TURQUE, A. S.; SILVEIRA, C. B.; ALBANO, R. M.; CLEMENTINO, M. M.; MARTINS, O. B. Archaea, Bacteria, and Algal Plastids Associated with the Reef-Building Corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, v. p. 59:523–532, Article first published online: 16 DEC 2009 | DOI 10.1007/s00248-009-9612-y.

LIU, X.; FALLON, S.; SHENG, J.; CURTIS III, R. CO₂-limitation-inducible Green Recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 17, 6905-6908, 2011.

MACHADO, I. M. P.; ATSUMI, S. Cyanobacterial biofuel production. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 50-56, 2012.

MADHUMATHI, V.; DEEPA, P.; JEYACHANDRAN, S.; MANOHARAN, C.; VIJAYAKUMAR, S. Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake. **International Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 3, p.213-216, 2011.

MAGALHÃES, V. F.; MARINHO, M. M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A. C.; COSTA, S. M.; AZEVEDO, L. O.; AZEVEDO, S. M. F. O. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). **Toxicon**, v. 42, p. 289-295, 2003.

MARQUES, K. N.; **Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio desativada com ênfase em Aphanotece e sua capacidade de biossorção do ²²⁶Ra**. 2006. p. 117. Dissertação (Mestrado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARTINS, R. F.; RAMOS, M. F.; HERFINDA, L.; SOUSA, J. A.; SKARVEN, K.; VANSCONCELOS, V. M. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - *Synechocystis* and *Synechococcus*. **Marine Drugs**, v. 6, n. 1, p.1-11, 2008.

MAZARD, S. L.; FULLER, N. J.; ORCUTT, K. M.; BRIDLE, O.; SCALAN, D. J. PCR Analysis of the distribution of unicellular cyanobacterial diazotrophs in the arabian sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7355–7364, Dec., 2004.

MAZUR-MARZEC, H.; SUTRYK, K.; KOBOS, J.; HEBEL, A.; HOHLFELD, N.; BŁASZCZYK, A.; TORUNSKA, A.; KACZKOWSKA, M. J.; ŁYSIAK-PASTUSZAK, E.; KRAS NIEWSKI, W.; JASSER, I. Occurrence of cyanobacteria and cyanotoxin in the Southern Baltic Proper. Filamentous cyanobacteria versus single-celled picocyanobacteria. **Hydrobiologia**, v. 701, p. 235–252, 2013.

McPHAIL, K. L.; CORREA, J.; LININGTON, R. G.; GONZÁLEZ, J.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T. L.; GERWICK, W. Antimalarial Linear Lipopeptides from a Panamanian Strain of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 6, p. 984–988, 2007.

MELLMANN, A.; CLOUD, J.; MAIER, T.; KECKEVOET, U.; RAMMINGER, I.; IWEN, P.; DUNN, J.; HALL, G.; WILSON, D.; LaSALA, P.; KOSTRZEWA, M.; HARMSSEN, D. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1946-1954, 2008.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 10-15, 2013.

METTING, B.; PYNE, J. Biologically active compounds from microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, 1986.

MOREIRA, C.; VASCONCELOS, V.; ANTTUNES, A. Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4350-4369, 2013.

MÜNCHHOFF, J.; HIROSE, E.; MARUYAMA, T.; SUNAIRI, M.; BURNS, B. P.; NEILAN, B. A. Host specificity and phylogeography of the prochlorophyte *Prochloron* sp., an obligate symbiont in didemnid ascidians. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 890–899, 2007.

MUNDT, S.; BUI, H.T.; PREISITSCH, M.; KREITLOW, S.; BUI, H.T.; PHAM, H.T.; ZAINUDDIN, E.; LE, T.T.; LUKOWSKI, G.; JÜLICH, W.D. Microalgae - A promising source of novel therapeutics. **JSM Biotechnology Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1032, 2014.

NABOUT, J.C.; ROCHA, B. S.; CARNEIRO, F. M.; SANT'ANNA, C. L. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. **Biodiversity and Conservation**, v. 22, p. 2907-2918, 2013.

NAGARAJAN, M.; MARUTHANAYAGAM, V.; SUNDARARAMAN, M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32: p. 153–185, 2012.

NOWRUZI, B; KHAVARI-NEJAD, R.-A.; SIVONEN, K.; KAZEMI, B.; NAJAFI, F.; NEJADSATTARI, T. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. **Algae**, v. 27, n. 4, p. 303-313, 2012.

NUNNERY, J. K.; MEVERS, E.; GERWICK, W. H. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 787–793, 2010.

PALINSKA, K. A.; SUROSZ, W.; Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. **Hydrobiologia**, v. 740, p. 1-11, 2014.

O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W. BURFORD, M. A.; GLOBER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, 2011.

OJIT, S. K.; THADOI, D. A.; INDRAMMA, T. H.; AVIJEET, S. O.; GUNAPATI, O.; TIWARI, O. N.; SHARMA, G. D. Fatty acid profiling of filamentous non-heterocystous cyanobacteria from Loktak Lake, the largest freshwater lake in North-Eastern region of India. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 6, p. 69-74, 2015.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459- 466, 2003.

OLIVEIRA, M. M.; FILHO, M. V. S.; BASTOS, J. C.; NEVES, M. H. C. B. Toxinas de cianobactérias e microalgas marinhas: um desafio para a ecotoxicologia aquática. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, v. 4 n. 1, p. 57-80, jan./jun. 2010.

OLIVEIRA, M. M.; Neves, M. H. C. B.; ALBANO, R. M.; BASTOS, J. C.; FILHO, M. V. S. Presença de microcistina durante eventos de florações de microalgas na Lagoa de Araruama. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**. Campos dos Goytacazes/RJ, v. 5, n. 1, p. 35-45, jan. / jun. 2011.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1895–1902, 2004.

OREN, A. Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy/International Journal of Systematic Bacteriology/International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 10-15, 2011.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, p. 1349 – 1363, 2011.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; KAUSHAL, A.; SONAWALA, S.; MADAMWAR, D. Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1795 – 1802, 2011.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10163-10172, 2011.

PICCIN-SANTOS; V.; BRANDÃO, M. M.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Phylogenetic study of *Geitlerinema* and *Microcystis* (cyanobacteria) using PC-IGS and 16S–23S ITS as markers: investigation of horizontal gene transfer. **Journal of Phycology**, v. 50, p. 736-743, 2014.

PIMENTEL, J. S. M. **Quantificação de cianobactérias produtoras de microcistina no reservatório de furnas (mg), através da pcr em tempo real, e sua relação com fatores ambientais**. 2009. p.94. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

PRADHAN, J.; DAS, S.; DAS, B. K. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 32, p. 808 – 819, 2014.

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

RAJESHWARI, K. R.; RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, southern India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n.5, p. 849-857, Sept/Oct, 2011.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 521–539, 2009.

REEHANA, N.; AHAMED, P.; THAJUDDIN, N. *In vitro* studies on bactericidal effect of selected cyanobacteria against bacterial pathogens. **Internacional Journal of Medicobiological Research**, v.1, n. 7, p. 345-347, 2012.

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

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, v. 5, p. 69-76, 1985.

ROHWER, F; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 243, p. 1–10, 2002.

RÓS, P. C. M. **Avaliação de óleos de cianobactérias como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel pela rota etílica**. 2012. p.175. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

ROSS, C.; SANTIAGO-VÁZQUEZ, L.; PAUL, V. Toxin release in response to oxidative stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 66–73, 2006.

ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B. L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R.; SIVONEN, K. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* Strain 90. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 686–692, 2004.

SAHU, A.; PANCHA, I.; JAIN, D.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; PATIDAR, S.; BHATTACHARYA, S.; MISHRA, S. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53-58, 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. C.; SOUZA, R. C.; CARVALHO, L. R. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras**. Ed. Interciência. 1.^a ed. Rio de Janeiro, 2006.

SANT'ANNA, C.L.; TUCCI, A.; AZEVEDO, M.T.P.; MELCHER, S.S.; WERNER, V.R.; MALONE, C.F.S.; ROSSINI, E.F.; JACINAVICIUS, F.R.; HENTSCHKE, G.S.; OSTI, J.A.S.; SANTOS, K.R.S.; GAMA-JÚNIOR, W.A.; ROSAL, C. & ADAME, G. 2012. Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras. Publicação eletrônica, Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia. www.ibot.sp.gov.br.

SANTOS, K. R. S.; SANT'ANNA, C. L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, n. 1, p. 61-83, 2010.

SILAMBARASAN, R. C.; ABRAHAM, J. Biodiversity of marine cyanobacteria and its antibacterial activity. **IJPI's Journal of Biotechnology and Biotherapeutics**, v. 1 n.4, p. 17-19, 2011.

SILVANIA, S. N. **Remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina-LR por coagulação, floculação, sedimentação e filtração seguida de coluna de carvão ativado granular**. 2012. p. 82. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

SINGH, D. K.; MALLICK, N. Accumulation potential of lipids and analysis of fatty acid profile of few microalgal species for biodiesel feedstock. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, n. 1, p. 37-44, 2014.

SINGH, P.; SINGH, S. S.; ABOAL, M.; MISHRA, A. K. Decoding cyanobacterial phylogeny and molecular evolution using an evonumeric approach. **Protoplasma**, 2014 | DOI: 10.1007/s00709-014-0699-8.

SINGH, R. K.; TIWARI, S. P.; RAI, A. K.; MOHAPATRA, T. M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 401–412, 2011.

SIQUEIRA, D. B.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cianobactérias de água doce e saúde pública: uma revisão. **Universitas - Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p.109 – 127, 2005.

SKJÅNES, K.; REBOURS, C.; LINDBLAD, P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 172–215, 2013.

SOARES, M. C. S. HUSZAR, V. L. M.; MIRANDA, M. N.; MELLO, M. M; ROLAND, F.; LÜRLING, M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. **Hydrobiologia**, v. 717, p. 1-12, 2013.

STACKEBRANDT, E; GOEBEL, BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHENBAZIRE, G. Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, v. 35, p. 171205, 1971.

STANIER, R. Y. The position of cyanobacteria in the world of phototrophs. **Carlsberg Research Communications**, v. 42, p. 77 – 98, 1977.

STEINDLER, L.; HUCHON, D.; AVNI, A.; ILAN M. 16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4127–4131, 2005.

STEINHOFF, F. S.; KARLBERG, M.; GRAEVE, M.; WULFF, A. Cyanobacteria in Scandinavian coastal waters - A potential source for biofuels and fatty acids?. **Algal Research**, v. 5, p. 42–51, 2014.

SUBRAMANIAN, G.; ANUSHA, M. B.; CHANDRASAKARAN, R.; MANIVANNAN, M.; SASIKALA, J.; JAYANTHI, V.; PUNITHA, S. Lipid and fatty acid profile of some species of marine cyanobacteria from pamban and Vadakadu (Rameswaram) coastal regions, Tamilnadu, India. **International Journal of Advances in Interdisciplinary Research**, v. 1 n. 7, p.15-20, 2014.

SYIEM, M. B.; BHATTACHARJEE, A. An efficient protocol for long-term preservation of cyanobacteria. **Journal of Advanced Laboratory Research in Biology**, v. 1, p. 41-45, 2010.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, 24: p. 1596-1599, 2011.

VAZ, M. G. M V. **Cianobactérias de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas**. 2014. 21 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VOLK, R.; FURKERT, F. H. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. **Microbiological Research**, v. 161, p. 180-186, 2006.

WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2724-2730, 2011.

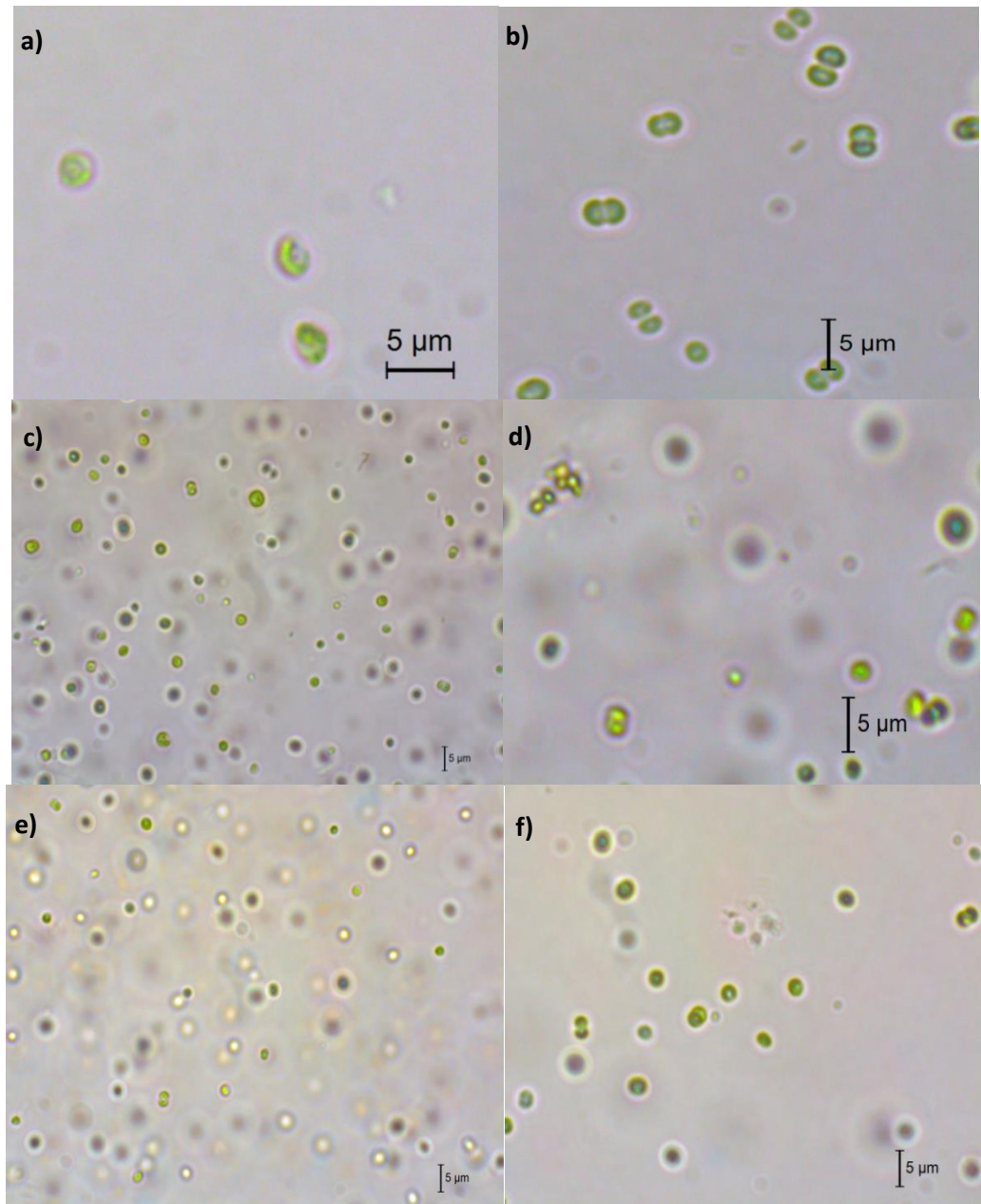
WALNE, P. R. Studies on the food values of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. **Fishery Investigations, Series II**, v.26, n. 5, p. 62, 1970.

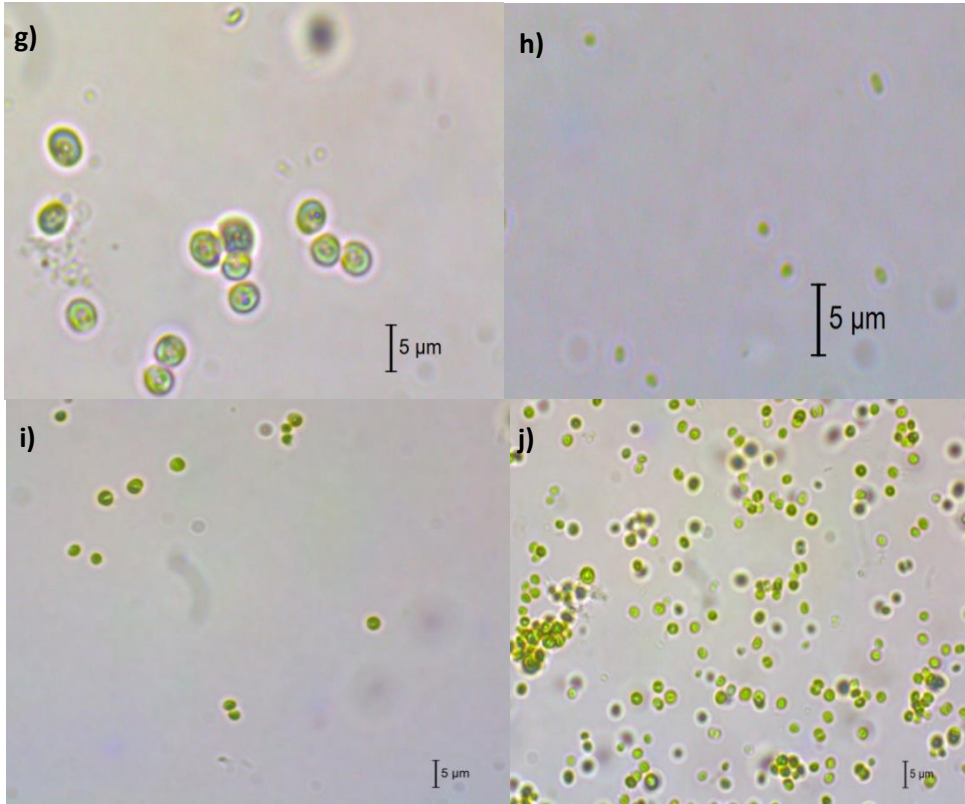
WIKLER, M. A.; COCKERILL, F. R.; CRAIG, W. A.; DUDLEY, M. N.; ELIOPOULOS, G. M.; HECHT, D. W.; HINDLER, J. F.; FERRARO, M. J.; SWENSON, J. M.; LOW, D. E.; SHEEHAN, D. J.; TENOVER, F. C.; TURNIDGE, J. D.; WEINSTEIN, M.P.; ZIMMER, B. L. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 7th ed. Document M7-A7. Wayne, PA: CLSI; 2006.

YADAV, S.; SINHA, R. P.; TYAGI, M. B.; KUMAR, A. CYANOBACTERIAL SECONDARY METABOLITES. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 2, APR./JUN., 2011.

ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. **Toxins**, v. 5, p. 1896-1917, 2013.

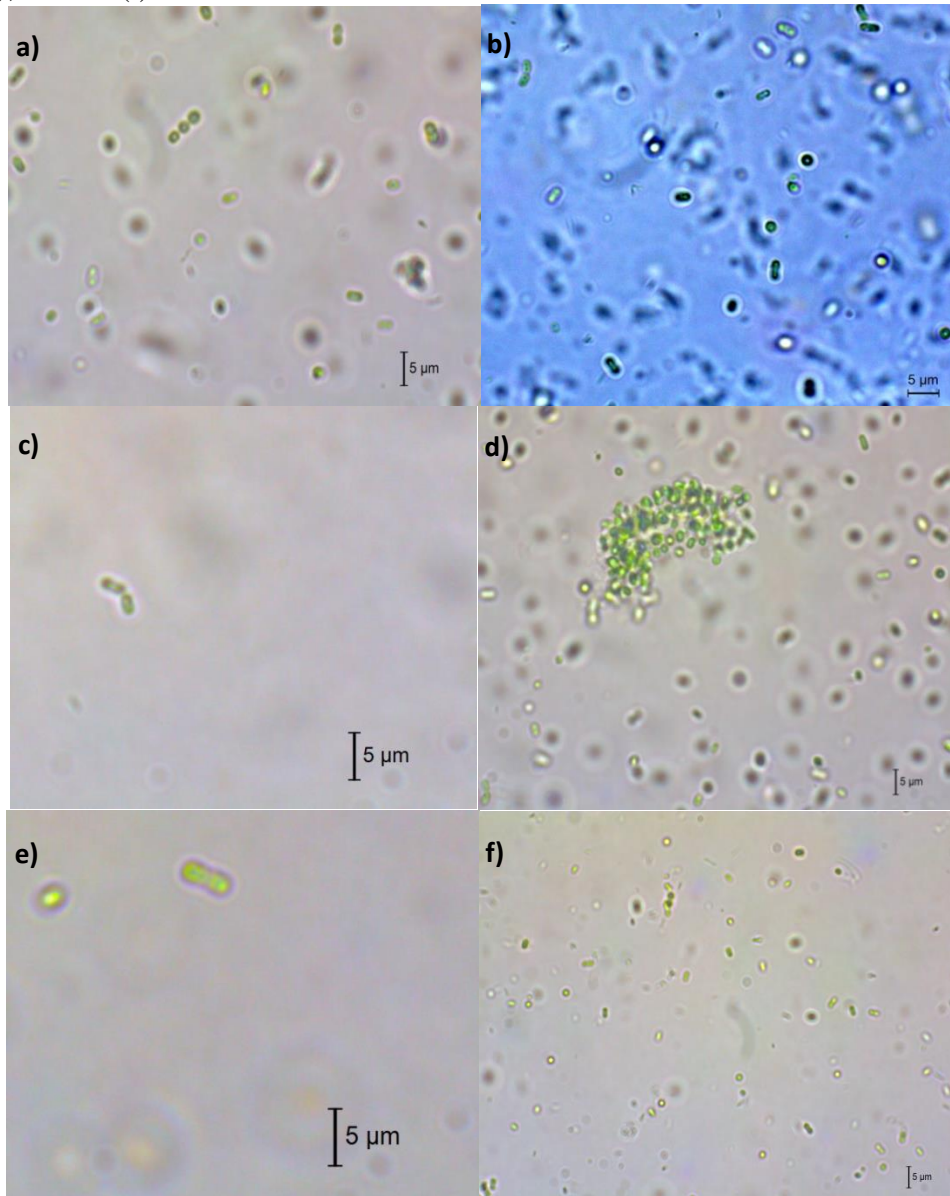
ANEXO A - Isolados do gênero *Synechocystis*. M3C (a); M20C (b); M60C (c); M62C (d); M129C (e); M130C (f); M163C (g); M204BG (h); M242BG (i); M305C (j) Aumento final: 1000x.





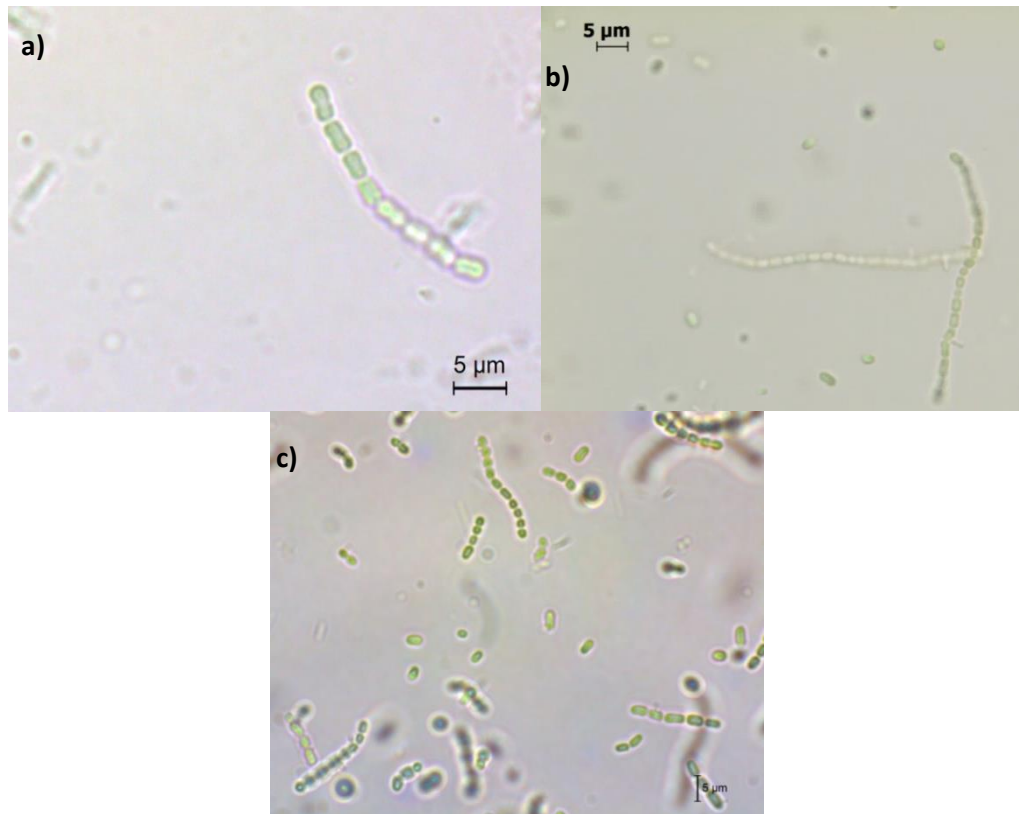
Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

ANEXO B – Isolados do gênero *Synechococcus*. M80C (a); M41C (b); M38C (c); M94C (d); M100C (e); M290C (f). Aumento final: 1000x.



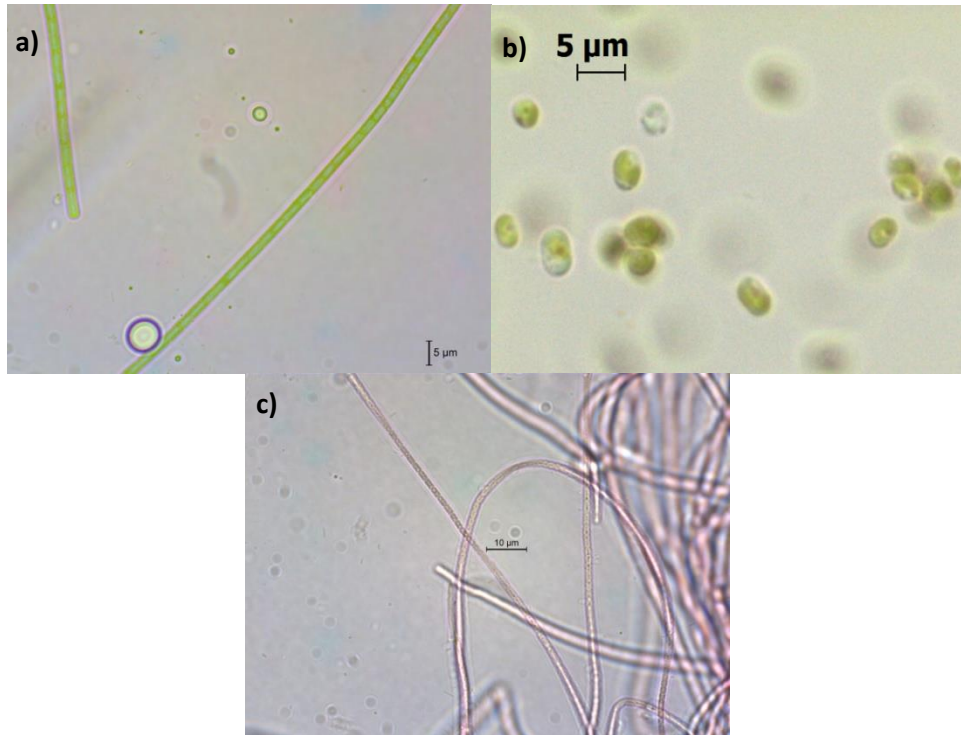
Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

ANEXO C - Isolados do gênero *Romeria*. M6C (a); M138C (b); M304C (c). Aumento final: 1000x.



Fonte: Giuseppe Fernandes (2014).

ANEXO D - Isolados dos gêneros *Planktolyngbya* (M333C) (a); *Cyanothece* (M181C) (b); *Phormidium* (M216C) (c). Aumento final: 1000x.



Fonte: Roberto Sassi (2015).