

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

DIEGO BONALDO GENUÁRIO

**Cianobactérias em ecossistemas de manguezais:
isolamento, morfologia e diversidade genética**

**Piracicaba
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DIEGO BONALDO GENUÁRIO

**Cianobactérias em ecossistemas de manguezais:
isolamento, morfologia e diversidade genética**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba
2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Genuário, Diego Bonaldo

Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética / Diego Bonaldo Genuário; orientador Marli de Fátima Fiore. - - Piracicaba, 2010.

97 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bactérias aeróbicas gran-negativas 2. Cromatografia a gás 3. Filogenia 4. Fixação de nitrogênio 5. Produção primária (Biologia) I. Título

CDU 631.461.5:633.876

*Aos meus pais, Eliana e Moacir,
pelas oportunidades oferecidas e pelo carinho,
DEDICO*

*Aos meus irmãos, Luciano e Bruna,
pelo apoio e incentivo,
OFEREÇO*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore pela orientação, confiança e oportunidade;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro no projeto e pela bolsa de estudos concedida;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro no projeto;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

Ao Prof. Dr. Jan Hanys Kaštovský (Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade do Sul da Bohemia) pelo auxílio nas identificações morfológicas das linhagens de cianobactérias;

À Profa. Dra. Heloíza Ramos Barbosa (Laboratório de Fisiologia de Microorganismos, Instituto de Ciências Biomédicas/ USP) pelo suporte técnico com as análises de redução de acetileno;

À Profa. Dra. Elisabete A. N. Fernandes (Laboratório de Radioisótopos do CENA/USP) pela disponibilização da balança analítica;

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Ruiz Pessenda (Laboratório de Carbono 14 do CENA/USP) pela disponibilização do microscópio óptico;

Ao Dr. Itamar Soares de Melo (EMBRAPA/Meio Ambiente) pela oportunidade de participar no projeto temático;

Ao João Luiz da Silva (EMBRAPA/Meio Ambiente) pela logística e suporte nas coletas, dicas de campo e conversas;

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai (Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP) pelo suporte oferecido;

À Profa. Dra. Cláudia Barros Monteiro Vitorello pelo auxílio na análise das sequências de nucleotídeos;

À Dra. Adriana Sturion Lorenzi pelos constantes ensinamentos, apoio e revisão da dissertação;

*À Dra. Estela Maria Silva-Stenico pelas conversas, apoio e revisão da dissertação;
Ao Dr. Carlos Vidoso pelo auxílio com as análises estatísticas e revisão da dissertação;*

A todos os funcionários do CENA, em especial ao Chico, Gera, Marília, ao pessoal da secretaria da pós-graduação e Alzira;

Ao pessoal do Lab. de Fisiologia de Micro-organismos do ICBIII em especial a Iris, Felipe e Renata.

Aos companheiros diários de laboratório: Carol P.; Janaína R., Danillo, A.; Carol H., Elaine C., Tânia K., Ana Paula A., Natália N., Marina G., Luciana E., Anaíle, Camila, Paula, e especialmente a Isabela Ascêncio;

Aos colegas e amigos dos laboratórios vizinhos pelos momentos de descontração no bandeirão e nos corredores, em especial a Lucélia Borgo e Elissena Zabotto;

À mestre e amiga Karla Nishiyama Marques pela amizade, conversas e conselhos durante e após sua passagem por Pira;

Ao doutorando e amigo Armando Dias pelas conversas e conselhos científicos, pelas louças lavadas, pelas pizzas prontas e revisão da dissertação;

E aqueles que de forma direta ou indireta participaram e contribuíram para a realização desse trabalho.

Obrigado.

*"Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe e
vencer com ousadia, pois o mundo pertence a
quem se atreve, e a vida é MUITO pra ser
insignificante"*

Charles Chaplin

RESUMO

GENUÁRIO, D. B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética.** 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Manguezais são ecossistemas de transição entre ambientes terrestres e marinhos encontrados em regiões tropicais e subtropicais. A ampla faixa de variações de salinidade e teor oxigênio, típica desses ambientes, está entre os principais fatores condicionantes da colonização e desenvolvimento da biota. Apesar disso, são ambientes com elevada produção primária. Entre os nutrientes, o nitrogênio é um dos principais fatores limitantes que afetam o desenvolvimento da vegetação do manguezal e somente baixa disponibilidade de formas reduzidas está presente. Portanto, há a necessidade de determinar os micro-organismos fixadores de nitrogênio que colonizam os ecossistemas de manguezais. Dentre esses, existem as cianobactérias, um grupo bem conhecido de micro-organismos fotossintéticos oxigênicos e fixadores de nitrogênio. Neste estudo, 50 linhagens de cianobactérias foram isoladas de amostras ambientais de solos, água e material perifítico, coletadas nos ecossistemas de manguezais da Ilha do Cardoso e Bertioga, São Paulo. Essas linhagens foram isoladas usando meios específicos de crescimento e análises morfológicas identificaram representantes das ordens Chroococcales (35 linhagens, 70%), Oscillatoriales (9 linhagens, 18%) e Nostocales (6 linhagens, 12%). Dezesesseis linhagens distribuídas entre as ordens Chroococcales e Nostocales foram selecionadas para os estudos de filogenia usando o gene *rpoC1*. A maioria das sequências de *rpoC1* geradas pela amplificação por PCR usando o conjunto específico de primer *rpoC1-1/rpoC1-T* mostraram baixas similaridades (menor que 90%) com sequências disponíveis no GenBank, indicando que estas linhagens de cianobactérias são únicas. As exceções foram somente duas linhagens (*Synechococcus* sp. CENA177 and *Cyanothece* sp. CENA169) que apresentaram altas similaridades com sequências de cianobactérias isoladas de ambientes de água doce do Brasil. A análise filogenética “Neighbor-Joining” mostrou que várias das novas linhagens cianobactérias dos manguezais se agruparam, sem relação com a descrição taxonômica baseada na caracterização morfológica. Uma busca pelo gene funcional *nifH*, o qual codifica para a redutase da nitrogenase, em 27 isolados dos manguezais, revelou a sua presença em 21 linhagens (77%) dispersas entre as ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales. Os 21 fragmentos do gene *nifH* amplificados foram clonados e sequenciados e todas as sequências também mostram baixas similaridades (menor que 95%) com sequências de cianobactérias disponíveis no GenBank. A análise filogenética do gene *nifH* posicionou as novas linhagens de cianobactérias dos manguezais em vários agrupamentos distribuídos ao longo da árvore, e como também observado para o gene *rpoC1*, sem correlação com a descrição taxonômica baseada na caracterização morfológica. Atividade da nitrogenase, avaliada pela técnica de redução de acetileno, foi encontrada em cinco linhagens pertencentes à ordem Nostocales e em uma linhagem pertencente à ordem Chroococcales. A estimativa da fixação biológica de nitrogênio por essas linhagens variaram de 327,01 a 1.954,15 pmol N₂.g⁻¹ de biomassa seca.dia⁻¹.

Palavras-chave: *rpoC1*. *nifH*. Filogenia. Fixação biológica do nitrogênio. Análise de redução de acetileno.

ABSTRACT

GENUÁRIO, D. B. **Cyanobacteria in mangrove ecosystems: isolation, morphology and genetic diversity.** 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Mangroves are transitional ecosystems between terrestrial and marine environments found in tropical and subtropical regions. The broad range of variations of salinity and oxygen content, typical of these environments, is among the main constraint factors for the establishment and development of biota. Nevertheless, mangroves have high primary production. Among the nutrients, nitrogen is one of the most important limiting factors affecting the development of mangrove vegetation and only low availability of reduced forms is present. Therefore, there is a need to determine the nitrogen fixing microorganisms that colonize mangrove ecosystems. Among those, there are the cyanobacteria, a well known group of oxygenic photosynthetic and nitrogen fixing microorganisms. In this study, 50 cyanobacterial strains were isolated from environmental samples of soil, water and periphytic material collected in the Cardoso Island and Bertioiga mangrove ecosystems, São Paulo. These strains were isolated using specific growth media and morphological analyses identified representatives of the orders Chroococcales (35 strains, 70%), Oscillatoriales (9 strains, 18%) and Nostocales (6 strains, 12%). Sixteen strains belong to the orders Chroococcales and Nostocales were selected for phylogeny studies using the gene *rpoC1*. The majority of *rpoC1* sequences generated by PCR amplification using the specific set primer rpoC1-1/rpoC1-T showed low similarities (below 90%) with sequences available in the GenBank, indicating that these cyanobacterial strains are unique. The exceptions were only two strains (*Synechococcus* sp. CENA177 and *Cyanothece* sp. CENA169) that had high similarities with cyanobacterial sequences isolated from Brazilian freshwater environments. The Neighbor-Joining phylogenetic analysis showed that several of the new mangrove cyanobacterial strains clustered together, with no relationship with the taxonomical description based on morphotypic characterization. A search for the functional *nifH* gene, which coding for nitrogenase reductase, on 27 mangrove isolates revealed its presence in 21 strains (77%) dispersed among the orders Chroococcales, Oscillatoriales and Nostocales. The 21 amplified fragments of *nifH* were cloned and sequenced, and all the sequences also showed low similarities (below 95%) with cyanobacterial sequences available in the GenBank. The phylogenetic analysis of *nifH* gene positioned the new mangrove cyanobacterial strains in several clusters distributed along the tree, and as also observed for *rpoC1* gene, with no correlation with the taxonomical description based on morphotypic characterization. Nitrogenase activity, measured by the acetylene reduction technique, was found in five strains belonging to the order Nostocales and one strain belonging to the order Chroococcales. The estimation of biological nitrogen fixation by these strains ranged from 327.01 to 1954.15 pmol N₂.g⁻¹ dry biomass.day⁻¹.

Keywords: *rpoC1*. *nifH*. Phylogeny. Biological nitrogen fixation. Acetylene reduction analysis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Ecossistemas de manguezais	11
2.2 Nitrogênio nos ecossistemas de manguezais.....	15
2.3 Cianobactérias	16
2.4 Sistemática das cianobactérias	18
2.5 Fixação biológica do nitrogênio.....	20
2.6 Agrupamento gênico envolvido na fixação biológica do nitrogênio	23
2.7 Técnicas de medição da fixação biológica do nitrogênio	26
3 HIPÓTESES	29
4 OBJETIVOS	30
5 MATERIAS E MÉTODOS	31
5.1 Coleta, isolamento, identificação e manutenção das linhagens	31
5.2 Análise molecular das linhagens isoladas de cianobactérias	35
5.2.1 Extração de DNA	35
5.2.2 Amplificação por PCR do gene <i>rpoC1</i>	36
5.2.3 Amplificação por PCR do gene <i>nifH</i>	36
5.2.4 Clonagem dos fragmentos.....	37
5.2.5 Transformação em <i>Escherichia coli</i>	37
5.2.6 PCR de colônias	38
5.2.7 Extração de DNA plasmidial	38
5.2.8 Sequenciamento dos genes	39
5.2.9 Processamento e análise filogenética das sequências.....	39
5.3 Análises de redução de acetileno e atividade específica da nitrogenase	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1 Isolamento e identificação morfológica das linhagens de cianobactérias.....	42
6.2 Amplificação por PCR e sequenciamento do gene <i>rpoC1</i>	53
6.3 Amplificação por PCR e sequenciamento do gene <i>nifH</i>	48
6.4 Análise da atividade da nitrogenase e atividade específica da nitrogenase.....	68
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

Manguezais são considerados ecossistemas de importância econômica e ecológica para as regiões costeiras tropicais e subtropicais e desempenham papel essencial na entrada de nutrientes nas cadeias alimentares estuarinas e marinhas e na oferta de recursos florísticos e faunísticos. Fatores biológicos, físico-químicos, estáticos e dinâmicos são conhecidos por influenciarem o desenvolvimento e estabilidade desses ecossistemas e as interações desses fatores têm papel significativo nos ciclos biogeoquímicos. Esses ecossistemas apresentam carência de determinados nutrientes, tal como de nitrogênio ocasionada pela perda através da ação das marés. Acredita-se que a reposição desse nutriente ocorra principalmente pela atividade da fixação biológica do nitrogênio (FBN) mediada pelo complexo enzimático da nitrogenase presente em determinados grupos de micro-organismos incluídos nos domínios *Bacteria* e *Archaea*. A capacidade de FBN não está difundida amplamente entre os membros desses domínios embora já tenha sido comprovada a habilidade de determinados grupos específicos em realizar a FBN. Dentre esses, alguns gêneros/espécies de cianobactérias realizam a FBN e contribuem para entrada de formas reduzidas de nitrogênio em ecossistemas aquáticos e terrestres. No entanto a contribuição das cianobactérias para o ciclo do nitrogênio nos ecossistemas de manguezais brasileiros ainda não foi reportada, uma vez que a maioria dos estudos envolvendo esses micro-organismos restringe-se a levantamentos florísticos por meio de observações em microscopia óptica e sem a aplicação de técnicas de isolamento e cultivo. Dessa forma, neste estudo a realização do isolamento de linhagens de cianobactérias provenientes desse ambiente possibilitou a avaliação da distribuição do gene *nifH* e a atividade do complexo enzimático nitrogenase pela análise de redução do acetileno, gerando resultados inéditos que contribuem para melhorar o conhecimento sobre o papel das cianobactérias nesses ecossistemas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecossistemas de manguezais

Manguezais são ecossistemas de transição entre os ambientes terrestres e marinhos, sujeitos ao regime das marés e característicos de regiões tropicais e subtropicais (CUNHA-LIGNON et al., 2009). A formação e evolução desses ecossistemas estão associadas ao aporte de materiais sedimentares provenientes do mar e dos continentes (DELAUNE; PATRICK; BURESH, 1978; WOODWELL et al., 1977) e os principais fatores condicionantes de sua ocorrência, estrutura e funcionamento são: temperatura elevada, substrato aluvial, proteção contra as ondas oceânicas, presença de água salgada e amplitude das marés (WALSH, 1974).

Esses ecossistemas apresentam importância econômica e ecológica nas regiões costeiras e desempenham papel fundamental como fonte de entrada de nutrientes para manutenção das cadeias alimentares estuarinas e marinhas e oferta de recursos florísticos e faunísticos (DUGAN, 1992; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Outras funções importantes, como a purificação e armazenamento de água, proteção contra tempestades, estabilização das condições climáticas locais, recarga e descarga de aquíferos, retenção de contaminantes, turismo e recreação, também são atribuídas a esse ambiente (DUGAN, 1992; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Variações espaciais de parâmetros abióticos como temperatura, salinidade na água e solo são bastante amplos nesses ecossistemas (THOM, 1982). A salinidade nesses ambientes pode variar de 0,5‰ a 30‰ (ODUM; CAROLE; SMITH, 1985; YAÑES-ARANCIBA, 1986) e em geral os teores de oxigênio dissolvido obedecem a um padrão decrescente desde a área próxima a baía até a parte superior (TUNDISI et al., 1978). Devido a essas variações físico-químicas a biota presente nesse ambiente deve possuir grande adaptação fisiológica para persistir sob as condições ambientais características desses ecossistemas de transição (RICKLEFS, 2003). A cobertura vegetal é constituída predominantemente por três espécies vegetais lenhosas (*Rhizophora mangle*, *Avicennia schaueriana* e *Laguncularia racemosa*), além de micro e macro algas (criptógamas) adaptadas às variações de salinidade e aos baixos teores de oxigênio (SCHAEFFER-NOVELLI, 1991).

Os ecossistemas de manguezais apresentam-se amplamente distribuídos pelo planeta, cobrindo cerca de 60 a 75% da linha costeira mundial (HOLGUIN; GUZMAN; BASHAN, 1992), sendo Brasil, Indonésia e Austrália os países mais abundantes desse ecossistema. Na América Latina, cerca de 400.000 hectares são ocupados por esses ecossistemas (HOLGUIN;

VAZQUEZ; BASHAN, 2001). No Brasil, dos 7.408 km de zona costeira, 6.786 km contêm florestas de mangues que cobrem em torno de 25.000 km² (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2001). Os ecossistemas de manguezal estão inseridos no “Domínio Florestal Atlântico” (“Floresta Ombrófila Densa”, sensu IBGE 1997) e podem ser encontrados desde o extremo norte no Amapá até o sul de Santa Catarina, na foz do rio Rio Aranguá (AQUINO, 1987).

O Estado de São Paulo possui parcela significativa desse ecossistema, sendo maior parte remanescente florestal do bioma de Mata Atlântica. Segundo o Plano Estadual de Gerenciamento Costeiro do Estado de São Paulo, a zona costeira desse Estado possui uma área com aproximadamente de 27.000 km², dos quais 240 km² são ocupados pelos ecossistemas de manguezais (São Paulo, 1998).

De acordo com a divisão em quatro regiões do litoral do Estado de São Paulo, realizada pelo Plano Estadual de Gerenciamento Costeiro (Figura 1), os ecossistemas de manguezais estudados estão inseridos no Litoral Sul e Baixada Santista, representado respectivamente pelo sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape e Bertioga (São Paulo, 1998) (Figura 2).

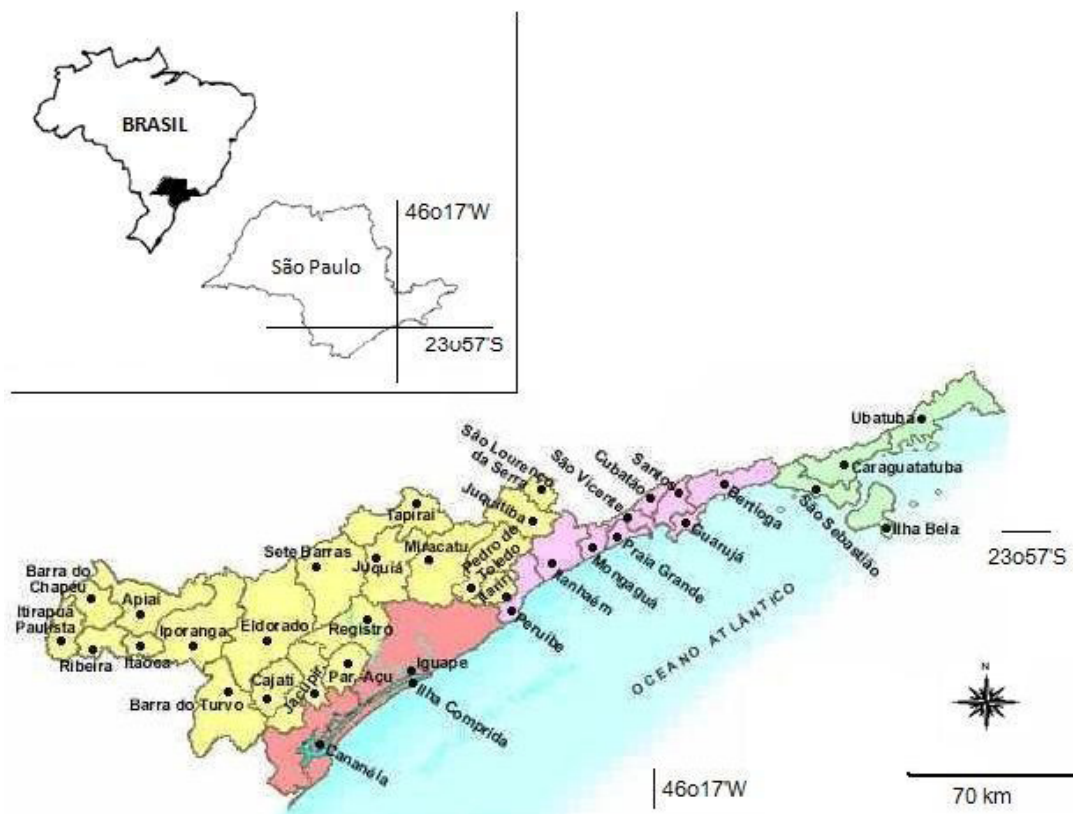


Figura 1 - Mapa mostrando a divisão em 4 setores da Zona Costeira do Estado de São Paulo (São Paulo, 1998)

No litoral sul, o sistema estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape está situado entre as latitudes 24°40'S e 25°20'S e inserido numa região classificada como Área de Preservação Ambiental (APA) sendo um dos trechos melhor estudados do litoral brasileiro (BERNARDES, 2001). A diversidade paisagística da região, formada por manguezais, restingas, florestas, praias, estuário, rios e alagados proporciona elevada diversidade biológica. Os manguezais nesse sistema ocupam área em torno de 72 km² (HERZ, 1991).

Esse sistema apresenta temperatura média anual de 23,8°C com precipitação média anual de 2.300 mm (SILVA, 1989) e maré do tipo mista, com nível médio de 0,81 m (MESQUITA; HARARI, 1983). Ele é composto por três ilhas principais (Cardoso, Cananéia e Comprida), separadas por sistemas de canais lagunares e rios. A comunicação dos canais lagunares com o Oceano Atlântico é feita por três desembocaduras (Icapara, Cananéia e Ararapira). A parte interna do sistema apresenta tendência ao assoreamento, com a formação de esporões, baixios e ilhas, onde se desenvolvem os manguezais (TESSLER; MAHIQUES, 1998). O ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso é um ambiente com baixa interferência antrópica localizado no município de Cananéia e estende-se dos paralelos 25°03'05" e 25°18'18" de latitude sul e dos meridianos 47°53'48" e 48°05'42" de longitude oeste. A ilha possui 30 km de comprimento e 10 km de largura com domínio de topologia montanhosa e área de aproximadamente 22.500 hectares.

A Baixada Santista está localizada entre as latitudes 24°50'S e 23°45'S na região central do litoral de São Paulo, integrada pelos municípios de Bertioga, Praia Grande, Guarujá, Santos, Cubatão e São Vicente (São Paulo, 1998). Essa região representa um ambiente tipicamente tropical com temperatura média anual de 22°C, precipitação média anual entre 2.000 e 2.500 mm (SANTOS, 1965) e maré do tipo mista, com nível médio de 0,77 m (Brasil, 1984).

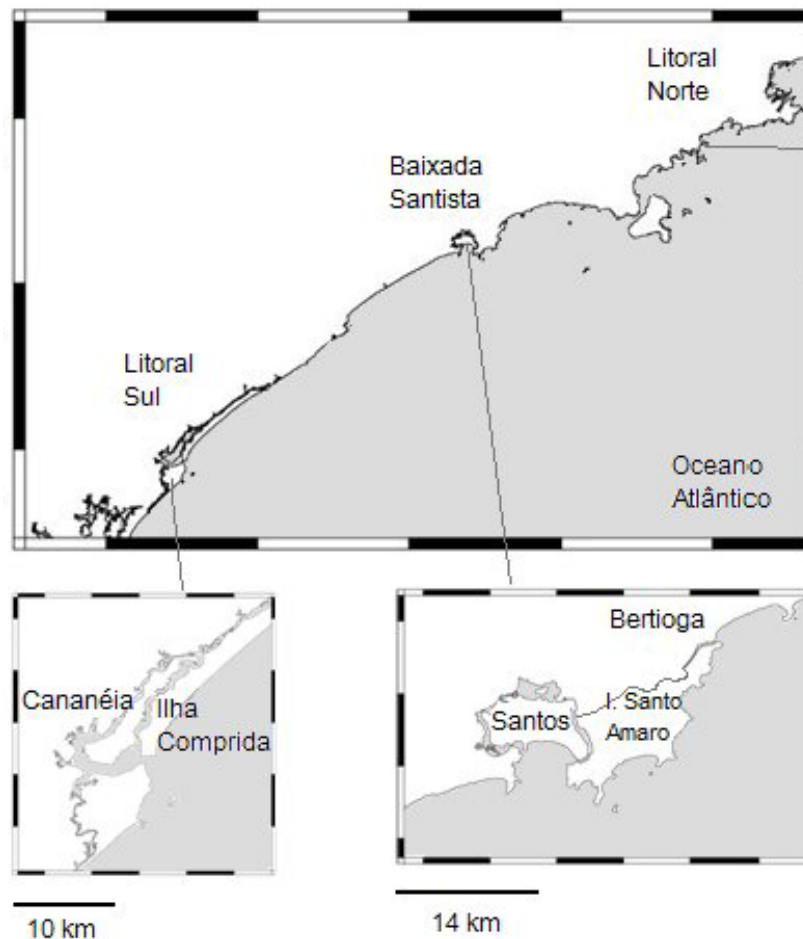


Figura 2 – Áreas de estudo utilizadas para coleta de material. Retirado de Cunha-Lignon et al. (2009)

Em todo mundo, a perda anual de ecossistemas de manguezais está estimada em mais de 1 milhão de hectares (MOSCATELLI, 1999), sendo mais expressiva em países em desenvolvimento, onde estão localizados mais de 90% dos manguezais do mundo (DUKE et al., 2007).

De maneira geral, o desenvolvimento sem o planejamento adequado de atividades ligadas ao setor industrial, portuário, pesqueiro, exploração mineral e turístico colocam em risco os atributos básicos dos estuários e ecossistemas associados com os de manguezais. Esses ecossistemas estão submetidos a impactos negativos de diversas origens, como expansão urbana desordenada, poluição e presença de pólos industriais e petroquímicos, acarretando diretamente em perda de biodiversidade (OLIVEIRA et al., 2007). Essas atividades favorecem o acúmulo de diferentes poluentes no solo tais como petróleo, metais pesados, lixo industrial e urbano, os quais afetam diretamente a microbiota e alteram a capacidade respiratória e osmoresgulatória das raízes na vegetação dos mangues, ocasionado sua morte (GETTER; SCOTT; MICHEL, 1981). Como resultado desse processo, constata-se

a diminuição da qualidade da água, da produtividade, da biodiversidade e dos valores estéticos e paisagísticos do sistema estuarino (FILDEMAN, 1999).

2.2 Nitrogênio nos ecossistemas de manguezais

Fatores biológicos, físico-químicos, estáticos e dinâmicos são conhecidos por influenciarem o desenvolvimento e estabilidade dos ecossistemas de manguezais. Esses fatores e suas interações têm um papel significativo nos ciclos biogeoquímicos dos elementos dentro desse sistema (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Como exemplo dessa interação, a carência de formas reduzidas de nitrogênio afeta diretamente o desenvolvimento da vegetação (LOVELOCK et al., 2006). Frações desse elemento são encontradas em baixa concentração na matéria particulada (detritos das plantas) que frequentemente são exportados do ecossistema pela ação das marés (LOVELOCK et al., 2006). Apesar da grande quantidade de matéria particulada exportada, a perda de nitrogênio é relativamente pequena ($3,7 \text{ g N} \cdot \text{ano}^{-1}$), o que equivale a 13% da média anual da produção primária líquida das florestas de manguezais (BOTTO; BUNTS, 1982; BOTTO; ROBERTSON, 1990). A perda reduzida também é atribuída à reposição por formas assimiláveis de nitrogênio provenientes da decomposição das folhas das árvores dos manguezais e da fixação biológica do nitrogênio (FBN) atmosférico (SCHMITT, 2006).

Os ecossistemas de manguezais são considerados um sistema aberto no que diz respeito aos fluxos de energia e matéria (LUGO; SNEDAKER, 1974). Nesse ambiente, a ciclagem de nutrientes, tais como o do nitrogênio, reflete em um equilíbrio entre a entrada de nutrientes (*input*), sua disponibilidade, ciclagem interna e sua exportação (*output*) do sistema (LEE et al., 2008). Esse balanço é controlado por fatores físicos (marés, chuvas) e biológicos (queda das folhas, fixação biológica do nitrogênio e decomposição) (RIBAS, 2007).

Em ambientes não impactados, a principal via de entrada de nutrientes para os ecossistemas de manguezais é pela ação das marés cheias que trazem os nutrientes em solução da água do mar, dos rios e demais cursos d'água da rede de drenagem (RIBAS, 2007). Esse fluxo de água carrega as partículas contendo os nutrientes adsorvidos para o interior desses sistemas (RIBAS, 2007). As chuvas e a deposição marinha também agem no transporte e deposição de nutrientes provindos da atmosfera (RIBAS, 2007). A exportação de nutrientes acontece principalmente pela saída de material vegetal produzido internamente pelos ecossistemas de manguezais, decorrente da ação das marés vazantes (LACERDA, 1984).

A vegetação dos manguezais é eficiente na conservação e reciclagem de nutrientes por meio de mecanismos que incluem a retranslocação de nitrogênio e fósforo antes da abscisão das folhas (ALONGI et al, 1992). Esse processo é uma adaptação evolutiva das plantas à ambientes com baixa disponibilidade nutricional e que visa diminuir sua dependência aos aportes externos de nutrientes (WANG et al., 2003). A retranslocação consiste na mobilização dos nutrientes das folhas maduras e sua redistribuição para zonas de crescimento ativo tais como folhas novas, raízes, frutos em desenvolvimento e até mesmo para restabelecer o estoque de nutrientes interno da plantas (RIBAS, 2007).

A atividade microbiana também exerce um papel importante na ciclagem de nutrientes do manguezal por meio dos processos de decomposição da matéria orgânica (HOLGUIN; VASQUEZ; BASHAN, 2001). No que se refere ao nitrogênio, os micro-organismos estão envolvidos nos processos de fixação biológica do nitrogênio, amonificação, nitrificação e desnitrificação (BEMAN; FRACIS, 2006; JOYE, 2002; JOYE; LEE, 2004).

2.3 Cianobactérias

As cianobactérias correspondem a um dos grupos mais importantes, bem sucedidos e diversos metabolicamente, ecologicamente e morfológicamente dentro do domínio *Bacteria* (WILMOTTE, 1994; WHITTON; POTTS, 2000). Esses micro-organismos possuem estrutura celular típica de células Gram-negativas (DOOLITTLE et al., 1987) e, como modo nutricional dominante, o autotrófico. Seu aparato fotossintético é similar ao das plantas e algas, onde a H₂O é o agente redutor e o oxigênio é liberado (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; SMITH, 1983; STAL; MOEZELAAR, 1997). Suas células contêm clorofila-*a* e outros pigmentos acessórios característicos (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina), organizados em tilacóides, e responsáveis pela coloração verde-azulada (LORENZI, 2008).

Além da capacidade de redução do dióxido de carbono pelo processo da fotossíntese, algumas espécies de cianobactérias podem realizar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (RAI, 1990; STEWART, 1973), contribuindo para a fertilidade dos solos e águas (RAI, 1990).

Evidências geológicas, paleontológicas e geoquímicas indicam que as cianobactérias existam há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SHOPF, 1996), sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica do período a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva. (SCHOPF; WALTER, 1982). Em geral, necessitam apenas de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para sua sobrevivência. Mas,

apesar de sua natureza tipicamente fotossintética aeróbica, algumas espécies são heterotróficas facultativas, crescem no escuro e na presença de certos substratos orgânicos (SMITH, 1983; STAL; MOEZELLAR, 1997). Outras, porém, em condições anaeróbicas, utilizam o sulfeto como doador de elétrons para a fotossíntese (COHEN et al., 1986).

Sua longa história evolutiva reflete em uma grande diversidade metabólica, favorecendo sua sobrevivência no ambiente inóspito da Terra primitiva e também sua ocorrência nos mais diversos ambientes (SCHOPF, 1994). Elas estão presentes em todos os tipos de ecossistemas iluminados (exceto em ambientes com pH muito baixo), inclusive em ambientes extremos, como areia e rocha desérticas, águas termais (“hot springs”) e lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1973; DOR; DANIN, 1996; SKULBERG, 1995). Entretanto, ambientes de água doce são os mais propícios para o crescimento das cianobactérias, pois a maioria das espécies se desenvolve melhor em água com pH neutro-alcalino (pH 6-9), temperatura aproximada de 25°C, elevada concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999; RIPPKA, 1988).

Morfologicamente, as cianobactérias exibem grande variedade de formas, arranjos e tamanhos. Podem apresentar-se desde as formas mais simples, como os cocos ou bacilos unicelulares, até formas mais complexas como as filamentosas multicelulares ramificadas (WHITTON; POTTS, 2000). Não possuem flagelos, mas algumas espécies filamentosas podem apresentar movimento deslizante (DREWS, 1973), movendo-se em superfícies úmidas. Apesar de serem organismos microscópicos com tamanho de célula variando de 1 a 100 μm , podem muitas vezes ser observados a olho nu nos locais de ocorrência, pois formam densos tapetes ou mantos, contendo também algumas outras espécies bacterianas (BROCK, 1973).

As cianobactérias, juntamente com as algas, compreendem a maior parte da biomassa do mundo (CANEL, 1993; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) e, em condições apropriadas, algumas espécies são capazes de formar florações que consistem num aumento muito grande de biomassa fitoplanctônica, com predomínio de uma ou duas espécies e valores de clorofila-*a* de 10 mg (m³)⁻¹ ou cerca de 2×10^4 células · mL⁻¹ (OLIVER; GANF, 2000).

Além de sua importância ecológica, as cianobactérias apresentam importância econômica na produção de alimentos com valores nutricionais elevados e na conversão de energia solar. Ainda, são identificadas como um dos grupos de organismos mais promissores para o isolamento de novos produtos naturais bioquimicamente ativos, com potencial de aplicação biotecnológica, como em biorremediação, biodegradação e no desenvolvimento de

biosensores e fármacos entre outros (SKULBERG, 1995; CHAY; SURIF; HENG, 2005; SHASHIREKHA; RAJARATHNAM; BANO, 2005).

2.4 Sistemática das cianobactérias

Sistemática é a ciência que procura maneiras de interpretar a diversidade biológica e tem como principais objetivos a descrição da biodiversidade, a busca por padrões ou ordem na diversidade, a compreensão dos processos responsáveis pela formação da diversidade e apresentação de um sistema geral de classificação. Esse último deve abranger o arranjo dos organismos em grupos taxonômicos (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001), baseando-se nas relações evolutivas entre eles (KOMÁREK, 2003; WILMOTTE; GOLUBIC, 2001), além de reger identificação e fornecer linguagem comum aos especialistas (BRENNER; STALEY; KRIEG, 2001).

A sistemática do grupo das cianobactérias tem uma história consideravelmente conturbada, uma vez que esse grupo de micro-organismos foi classificado de acordo com vários sistemas de classificação. Entretanto, esse dilema tem sido, e ainda será tema recorrente nas discussões entre botânicos e microbiologistas.

Para os botânicos, a presença de clorofila e a liberação de O₂ a partir do processo fotossintético são elementos que as caracterizam fisiologicamente como fotoautotrófica aeróbias, e constituem argumentos bastante significativos para a inclusão das cianobactérias junto ao grupo das algas eucarióticas (BOLD; WYNNE, 1985) e sua inserção no Código Internacional de Nomenclatura Botânica.

No entanto, para os microbiologistas, a organização da estrutura celular, baseada em microscopia eletrônica e as análises bioquímicas da composição da parede celular e estrutura dos ribossomos, revelam a natureza procariótica de suas células, e justificam o posicionamento desse grupo junto às bactérias Gram-negativas (BONEN; DOOLITTLE, 1978; RIPPKA, 1988; STANIER et al., 1971; STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977; DOOLITTLE et al., 1987) e inserção do grupo ao Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana.

Atualmente ambas as abordagens vêm sendo empregadas na sistemática de cianobactérias e como referências são utilizados os sistemas de classificação proposto por Anagnostidis e Komárek (1985; 1990), Komárek e Anagnostidis (1989; 1999; 2005) e o Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001), respectivamente conforme as normas botânicas e microbiológicas.

No entanto, esses códigos estão se convergindo cada vez mais ou ambos. Nomes botânicos são usados na classificação bacteriológica e a divisão das cianobactérias em subseções reflete as ordens usadas na classificação botânica. Além disso, informações genéticas somadas às características morfológicas, citológicas, ecológicas e bioquímicas das cianobactérias estão sendo usadas na classificação botânica (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 2005). Não obstante, a nomenclatura difere entre esses dois sistemas, apesar de várias propostas para sua unificação (HOFFMANN; KOMÁREK; KAŠTOVCKÝ, 2005; OREN; TINDALL, 2005). Além do mais, a cultura pura da espécie descrita é referência no código de bacteriologia, ao passo que espécimes conservadas em herbários, fotografias e/ou desenhos são usados no código botânico (OREN, 2004; OREN; TINDALL, 2005).

A classificação de cianobactérias, assim como sua revisão, é bastante complicada pelo fato de que, na maior parte das vezes, os organismos são caracterizados com base apenas em sua morfologia, sem qualquer informação genética (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; WILMOTTE; HERDMAN, 2001). Há casos, porém, em que existem sequências moleculares de cianobactérias disponíveis em bases de dados, mas sem sua descrição morfológica (CASTENHOLZ, 2001), uma vez que métodos moleculares (GÜRTLER; MAYALL, 2001) e oligonucleotídeos específicos de cianobactérias (URBACH; ROBERTSON; CHISHOLM, 1992) tornaram possível estudos filogenéticos em linhagens não-axênicas e sem cultivo prévio.

Entretanto, uma proposta mais recente para a classificação de cianobactérias elaborada por Hoffmann, Komárek e Kastovsky (2005) propõe um sistema de classificação unificado e baseado nas relações filogenéticas (principalmente sequências de RNAr 16S), morfologia e arranjo dos tilacóides dentro das células (ultra-estrutura). Autores dos sistemas botânicos e bacteriológicos afirmam que a classificação atual de cianobactérias é temporária por causa da escassez de informações genéticas e ressaltam que revisões importantes necessariamente ocorrerão no futuro (CASTENHOLZ, 2001; KOMÁREK, 2003). Nesse sentido, existe uma tendência geral de que abordagens moleculares devem ser aplicadas na tentativa de solucionar o problema da sistemática de cianobactérias (WILMOTTE, 1994; TURNER, 1997). Nos últimos anos, o interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana deve-se muito ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as quais aumentaram em muito a disponibilidade de métodos que permitem a identificação e classificação mais rápida e precisa de micro-organismos (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999). A utilização dessas técnicas e o emprego de oligonucleotídeos para acessar genes ou regiões específicas em cianobactérias, como RNAr 16S (BONEN; DOOLITTLE, 1975; DOOLITTLE et al., 1975), *rpoC1*

(FERGUSON; SAINT, 2000; PALIK, 1992), *nifH* (ZEHR MELLON; HIORNS, 1997) e *cpcBA*-IGS (BOLCH et al., 1996; NEILAN; JACOBS; GOODMAN, 1995), tem auxiliado na organização da sistemática desses seres vivos, revelando grande diversidade microbiana em muitos ecossistemas.

Nos estudos envolvendo a caracterização molecular e filogenia de cianobactérias, o gene RNAr 16S tem sido o mais amplamente utilizado e apresenta o maior número de sequências depositadas nos bancos de dados públicos, como o GenBank. Entretanto, o gene da RNA polimerase dependente de DNA (*rpoCI*) tem sido descrito como gene marcador com maior capacidade discriminatória (PALENIK; HASELKORN, 1992). Esses genes têm sido usados nas inferências filogenéticas de bactérias por serem ubíquos, extremamente conservados, e transcreverem macromoléculas (PÜHLER et al., 1989). Estudos sorológicos mostraram que as cianobactérias possuem todas as subunidades da RNA polimerase, como em *Escherichia coli* (β' , β e 2α), mais a subunidade γ (SCHNEIDER; HASELKORN, 1988). Posteriormente, foi verificado que os genes *rpoB*, *rpoCI* e *rpoC2*, análogos ao operon *rpoBC* de *E. coli*, codificavam as subunidades β , α e β' da polimerase de *Anabaena sp.* PCC7120 (BERGSLAND; HASELKORN, 1991). Portanto, o gene *rpoCI*, equivalente ao gene *rpoC* de *E. coli*, é codificador da subunidade γ da RNA polimerase e específico para as cianobactérias (BERGSLAND; HASELKORN, 1991).

2.5 Fixação biológica do nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é uma fonte de entrada de formas assimiláveis de nitrogênio na Biosfera, por meio da redução do dinitrogênio atmosférico (N_2) a amônio (NH_3) (ZEHR et al., 2003). Por meio da FBN, o nitrogênio (N_2), gás mais abundante na atmosfera terrestre (78,03%) e extremamente inerte, torna-se disponível aos ecossistemas deficientes em formas reduzidas deste elemento. Globalmente, esse é o mais importante processo após a fixação de CO_2 , contribuindo diretamente para a entrada de formas assimiláveis de nitrogênio em ambientes aquáticos e terrestres (VITOUSEK; HOWARTH, 1991; ARP, 2000).

No entanto, a disponibilidade líquida de nitrogênio na biosfera é determinada pelo balanço entre a FBN e seu processo inverso, a desnitrificação (ARP, 2000). Além disso, a interação da FBN com outros ciclos biogeoquímicos regulam sua atividade em determinadas condições nos ecossistemas (ZEHR et al., 2003). A disponibilidade limitada de N_2 nos ecossistemas seleciona organismos com capacidade para fixação do nitrogênio, os quais

podem levar o ambiente à deficiência de outros elementos, como o fósforo (ZEHR et al., 2003). Assim, a deficiência de N_2 no ambiente pode estar relacionada a outros fatores que limitam a fixação de N_2 (VITOUSEK, 1999), como disponibilidade de Fe, P ou Mo (HOWARTH; MARINO, 1988; WU et al., 2000).

As comunidades microbiológicas são componentes essenciais nos ecossistemas, pois desempenham papéis fundamentais no metabolismo da matéria orgânica e na transformação bioquímica dos elementos, incluindo a fixação biológica do nitrogênio (ATLAS; BARTHA, 1998; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Dentre os micro-organismos, as cianobactérias são as únicas capazes de realizar os dois principais processos para a manutenção da vida na Terra, ou seja, fotossíntese oxigênica e fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Desse modo, elas são consideradas importantes para a produção primária de matéria orgânica e como fonte de nitrogênio nos ecossistemas (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989; FAY, 1992; WOLK; ERNST; ELHAI, 1994; BERMAN-FRANK et al., 2001).

Ecologicamente, a capacidade para a FBN possibilita a ocupação e a dominância por esse grupo de micro-organismos em ambientes carentes desse elemento (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). Entretanto, essa capacidade não está universalmente distribuída dentro do grupo das cianobactérias e adaptações morfológicas e eco-fisiológicas são verificadas dentro de alguns táxons para realização da FBN. Em condições onde somente o N_2 atmosférico está disponível como fonte de nitrogênio, as cianobactérias heterocitadas sofrem modificações morfológicas e fisiológicas, culminando com o desenvolvimento dos heterócitos e o aparecimento da atividade do complexo enzimático da nitrogenase (HASELKORN; BUIKENA, 1992; WOLK; ERNST; ELHAI, 1994).

No geral, as adaptações morfológicas apresentadas pelas cianobactérias visam à criação de ambientes anaeróbios e ou micro-aeróbios, onde o complexo enzimático da nitrogenase fica protegido dos efeitos deletérios do oxigênio molecular presentes no ambiente ou então daquele produzido durante a fotossíntese. Dentre as adaptações morfológicas podem ser citadas a ocorrência de células verdadeiramente diferenciadas, conhecidas como heterócitos, nas ordens Stigonematales e Nostocales (GOLDEN; YOON, 2003; THIEL, 2004; WOLK; ERNST; ELHAI, 1994) e células não diferenciadas verdadeiramente, conhecidas como diazófitos nas ordens Oscillatoriales e Chroococcales (BERMAN-FRANK et al., 2001; COMPAORÉ; STAL, 2010). Nesse caso, esses micro-organismos desempenham a Fixação pela adoção da estratégia de separação espacial entre os processos da fotossíntese e da FBN. Nas ordens Oscillatoriales e Chroococcales a formação de arranjos de células vegetativas, tais

como formação de colônias e ou agregados celulares, também podem ser consideradas estratégias morfológicas que favorecem condições anóxicas ou micro-anóxicas.

As alterações fisiológicas observadas no grupo das cianobactérias heterocitadas envolvem o aumento intracelular das concentrações de glutamina sintetase e da atividade respiratória, seguida da perda das enzimas ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e nitrato redutase e, algumas vezes, das ficobiliproteínas, além da inibição da liberação de O₂ pelo processo fotossintético (BERGMAN et al., 1997). Estudos similares no metabolismo das formas não-heterocitadas (Chroococcales e Oscillatoriales) revelaram mudanças semelhantes durante a transferência dessas linhagens para meios de cultura com carência de formas nitrogenadas diretamente assimiláveis, como o amônio (BERGMAN et al., 1997). Entretanto, nesse grupo de cianobactérias, as células vegetativas fixadoras de nitrogênio retêm a enzima ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (rubisco) e as ficobiliproteínas (BERGMAN et al., 1997). No grupo das cianobactérias heterocitadas, as alterações morfológicas e fisiológicas do heterócito são permanentes, enquanto que para as formas não heterocitadas elas podem ser revertidas.

Adaptações eco-fisiológicas também são verificadas para realização da FBN e estão relacionadas à separação temporal da FBN e à criação de ritmos circadianos em muitas espécies de cianobactérias (FAY 1992; GALLON, 1992). Nas espécies unicelulares da ordem Chroococcales e das filamentosas não heterocitadas da ordem Oscillatoriales, a FBN ocorre durante o período de escuro quando o processo da fotossíntese está cessado e não existe a produção do O₂ prejudicial ao complexo enzimático da nitrogenase.

A FBN tem sido estudada em vários ecossistemas usando diversas técnicas de medições das taxas de fixação (ZEHR et al., 2003). Em ambientes marinhos, a fixação de N₂ por cianobactérias é subestimada (MONTROYA et al., 2004; ZEHR; CARPENTER; VILLAREAL, 2000; ZEHR; TURNER, 2001). Estimativas atuais indicam que a fixação de N₂ global é de aproximadamente 240 Tg N₂·ano⁻¹ (Tg = 1 milhão de toneladas), sendo a contribuição marinha de 100 a 190 Tg N₂·ano⁻¹ (BERMAN-FRANK; LUNDGREN; FALKOWSKI, 2003). Desses, um único gênero de cianobactéria marinha não heterocitada (*Trichodesmium*) contribui com aproximadamente 100 Tg N₂·ano⁻¹. Nos ecossistemas de manguezal, apesar de existirem alguns estudos de levantamentos florísticos de cianobactérias (BAETA-NEVES; TRIBUZI, 1992; BRANCO; SILVA; SANT'ANNA, 1994; BRANCO et al., 1996; 1997; 2003; NOGUEIRA; FERREIRA-CORREIA, 2001), a contribuição desses micro-organismos como fonte de nitrogênio ainda não foi avaliada.

2.6 Agrupamento gênico envolvido na fixação biológica do nitrogênio

Nas cianobactérias, a identificação da região do genoma contendo o agrupamento dos genes envolvidos na fixação biológica do nitrogênio e responsável pela codificação do complexo enzimático da nitrogenase ocorreu há mais de 20 anos (MAZUR; RICE; HASELKORN, 1980). Desde então, esses genes e proteínas relacionadas tem sido caracterizados e sequenciados em diferentes espécies de cianobactérias (HASELKORN; BUIKEMA, 1992; WOLK; ERNST; ELHAI, 1994). Com a descrição desses genes, tornou-se possível utilizar abordagens moleculares para detectar e identificar linhagens potencialmente fixadoras de nitrogênio atmosférico.

Os genes da fixação foram identificados em várias cianobactérias, mas têm sido caracterizados em mais detalhes em *Nostoc (Anabaena)* PCC7120, *Nostoc punctiforme*, *Anabaena variabilis* ATCC29413 e *Synechococcus* RF-1. Entretanto, com a facilidade atual do sequenciamento de genomas, outros gêneros de cianobactérias poderão ter descritos seus agrupamentos gênicos responsáveis pelo complexo nitrogenase (FIORE; HONDA, 2008)

Os genes envolvidos na FBN são altamente conservados e ocorrem amplamente dentro dos domínios *Bacteria* e *Archaea* (YOUNG et al., 1992), tornando os micro-organismos representantes desses domínios os únicos a apresentarem a capacidade de FBN (YOUNG, 1992; ZEHR; CARPENTER; VILLAREAL, 2000; ZEHR; TURNER, 2001).

Esses genes funcionais intercedem importantes reações químicas e podem ter sido distribuídos em função da força de seleção na natureza (SHORT; ZEHR, 2007; YOUNG, 1992). Entretanto, existem duas hipóteses sobre a distribuição e evolução desse agrupamento de genes (POSTEGATE; EADY, 1988; YOUNG, 1992). A primeira delas enfatiza a transferência vertical desses genes a partir de um ancestral comum, a qual é suportada pela comparação entre árvores filogenéticas geradas pelo sequenciamento do RNAr 16S e *nifH* e que, quando analisadas conjuntamente, apresentam topologias semelhantes (ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). A hipótese de transferência horizontal desses genes é demonstrada por estudos envolvendo espécies da cianobactéria *Microcoleus chthonoplastes* (BOLHUIS et al., 2009). Nesse estudo, os autores demonstraram por análises filogenéticas que os genes estruturais da nitrogenase de *M. chthonoplastes* agrupam-se com membros do grupo de *Deltaprotobacteria* (BOLHUIS et al., 2009). Eles ainda verificaram a existência de duas regiões adjacentes ao *operon* *nif* com valores médios de G+C inferiores ao restante do genoma, indicando incorporação exógena desse fragmento de DNA contendo o agrupamento de genes (BOLHUIS et al., 2009).

A organização do agrupamento gênico do complexo nitrogenase nas cianobactérias é muito semelhante ao de *Klebsiella pneumoniae* e de outras bactérias fixadoras de nitrogênio (Figura 3).

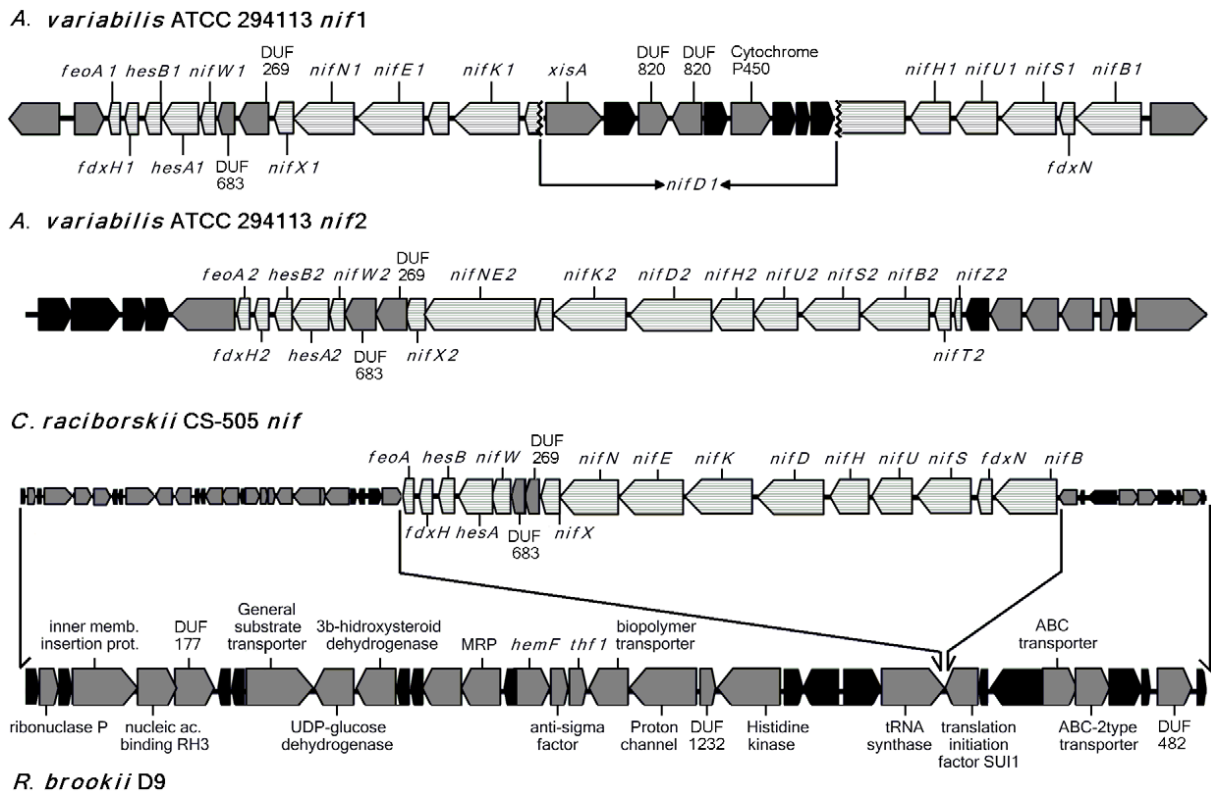


Figura 3 – Representação esquemática do agrupamento de genes *nif*. O esquema representa o agrupamento gênico de 15 kb contendo os genes *nifHDK* e outros 13 genes relacionados a FBN na linhagem *Cylindropermopsis raciborskii* CS-505 e sua comparação com os agrupamentos gênicos (*nif1* e *nif2*) da linhagem *Anabaena variabilis* ATCC29413 e sua ausência na linhagem *Raphidiopsis brookii* D9. Retirado de Stuken et al. (2010)

No genoma da *Nostoc* (*Anabaena*) PCC7120 foi encontrado somente um agrupamento de genes codificando para a nitrogenase (MAZUR; RICE; HASELKORN, 1980; RICE et al., 1982; KANEKO et al., 2001). Esse agrupamento gênico é formado por quinze genes agrupados na seguinte ordem: *nifB*-*fdxN*-*nifS*-*nifU*-*nifH*-*nifD*-*nifK*-*nifE*-*nifN*-*nifX*-*orf2*-*nifW*-*hesA*-*hesB* e *fdxH*. Os genes estruturais da nitrogenase, ou seja, *nifH*, *nifD* e *nifK* e aqueles das proteínas complementares, codificados pelos genes *nifE* e *nifN*, formam dois operons nas cianobactérias heterocitadas assim como nas não-heterocitadas (BUIKEMA; HASELKORN, 1993; FLORES; HERRERO, 1994; THIEL; LYONS; ERKER, 1997; THIEL; LYONS; THIELEMIER, 1998). Esses genes estão organizados no mínimo em seis unidades de transcrição: *nifB*-*fdxN*-*nifS*-*nifU*, *nifHDK*, *nifEN*, *nifX*-*orf2*, *nifW*-*hesA*-*hesB* e *fdxH*

(FLORES; MURO-PASTOR.; HERRERO, 1999; HASELKORN; BUIKEMA, 1992; HUANG et al., 1999).

O complexo enzimático da nitrogenase é codificado pelo agrupamento dos genes estruturais *nifDKH* (ZEHR et al., 2003) e é constituído de duas enzimas: dinitrogenase ou proteína Mo-Fe (proteína ferro-molibdênio) e dinitrogenase redutase ou proteína-Fe (proteína-ferro). A dinitrogenase (proteína Mo-Fe) é um tetrâmero composto de duas subunidades α idênticas codificadas pelo gene *nifD* (LAMMERS; HASELKORN, 1983) e duas subunidades β idênticas codificadas pelo *nifK* (MAZUR; CHUI, 1982) que unidas apresentam massa molecular de aproximadamente 250 kDa (ZEHR et al., 2003). Cada tetrâmero apresenta dois cofatores ferro-molibdênio que são os sítios de ligação e redução do nitrogênio (ORME-JOHNSON, 1992). A dinitrogenase redutase (proteína-Fe) possui massa molecular de 70 kDa e é um homodímero codificado pelo gene *nifH* (MEVARECK; RICE; HASELKORN, 1980) e suas funções são hidrolisar o ATP e mediar a transferência de elétrons do doador de elétron externo (a ferredoxina ou a flavodoxina) para a dinitrogenase (ORME-JOHNSON, 1992; FAY, 1992; ZEHR et al., 2003). Existem dois outros sistemas alternativos de nitrogenase que diferem em seus cofatores. Um desses sistemas contém vanádio em lugar de molibdênio como cofator e é codificado pelos genes *vnfH/vnfDGK*; o outro sistema contendo somente ferro é codificado pelos genes *anfHDGK* (BISHOP; JOERGER, 1990; ZEHR et al., 2003). Esses complexos enzimáticos alternativos exibem diferenças cinéticas e de especificidades nas reações (BURGESS; LOWE, 1996; EADY, 1996) e somente a nitrogenase vanádio foi encontrada até o momento em cianobactérias (BOISON et al., 2006).

A reação enzimática da nitrogenase é energeticamente custosa e consome 16 ATPs e 8 elétrons por molécula de N_2 reduzido (POSTGATE, 1998; ZEHR et al., 2003) e em condições *in vitro* esse complexo enzimático torna-se inativado na presença de oxigênio molecular ou formas reativas de oxigênio (POSTGATE, 1998; ZEHR et al., 2003).

O gene conservado *nifH* é mais utilizado nos estudos envolvendo a caracterização da comunidade diazotrófica de cianobactérias, pois além de identificar linhagens com potencial para fixação de N_2 , também pode servir para fazer inferências filogenéticas quando sequenciado (BEN-PORATH; ZEHR, 1994; DYBLE; PAERL; NEILAN, 2002; ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997). Dentre os demais genes envolvidos na FBN, o gene *nifH* é aquele que possui o maior número de sequências depositadas nos bancos de dados público, como o do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (ZEHR; CAPONE, 1996).

2.7 Técnicas de medição da fixação biológica do nitrogênio

Por muitos anos, a detecção da FBN somente foi possível por meio da verificação do crescimento dos organismos em meios de cultura preparados com baixa concentração ou completa ausência de formas nitrogenadas em sua formulação. Esse método demandava longos períodos de incubação, pois muitos organismos eram capazes de manterem-se vivos mesmo em meios de cultura contendo traços de nitrogênio, e mesmo assim, induzia a falsa constatação de serem fixadores de nitrogênio (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2009).

Atualmente, existem três principais técnicas aplicadas aos estudos de FBN do nitrogênio atmosférico que são: o aumento do conteúdo do N-total (método de Kjeldahl), as técnicas isotópicas (métodos da redução do ^{15}N , de marcação do solo com ^{15}N ou de diluição isotópica com ^{15}N e do uso das variações naturais de ^{15}N) e a técnica de redução de acetileno (TRIVELIN, 2001).

A determinação da FBN pelo aumento de N-total baseia-se no método de Kjeldahl e é a técnica mais convencional e antiga. Com o desenvolvimento dessa técnica as medições do conteúdo de N tiveram somente uma pequena melhora em relação à técnica anterior devido a sua baixa sensibilidade ($\pm 30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido), incapacidade de distinção do nitrogênio presente originalmente nas amostras daquele fixado e restrição de uso somente aos organismos com maior atividade fixadora (leguminosas, *Azotobacter*). O fundamento dessa técnica de quantificação de nitrogênio baseia-se no cálculo da diferença entre o organismo teste e organismo controle (leguminosa e não leguminosa, respectivamente) cultivadas nas mesmas condições. Entretanto, a precisão na medição por essa técnica é questionável, uma vez que as espécies podem explorar volumes diferentes de solo e acessar diferentes fontes de nitrogênio (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2009).

Pelas técnicas isotópicas com N marcado, as possibilidades de uso estão com o radioisótopo ^{13}N que possui meia-vida ($T_{1/2}$) igual a 9,98 minutos ou com os isótopos estáveis de ^{15}N e ^{14}N (0,3663 e 99,6337% de átomos respectivamente). Embora o ^{13}N tenha sido usado, e continua sendo na identificação de organismos com baixa atividade fixadora, trata-se de uma técnica difícil e que depende de laboratórios especiais para a sua produção, purificação e detecção (MEEKS, 1992). O uso de ^{15}N tem-se tornado a forma mais prática de medir a fixação, principalmente em sistemas simbióticos com leguminosas (TRIVELIN, 2001).

O emprego da técnica isotópica com $^{15}\text{N}_2$ marcado para estimar a FBN iniciou-se no ano de 1941 e atualmente é considerada técnica padrão e de referência para as demais

técnicas. O isótopo estável $^{15}\text{N}_2$ presente na atmosfera na concentração de 0,3663% pode ser separado do $^{14}\text{N}_2$ e concentrado. O fundamento do método da redução do $^{15}\text{N}_2$ consiste em incubar os organismos fixadores de nitrogênio dentro de um recipiente contendo atmosfera enriquecida com $^{15}\text{N}_2$ e após determinado período, amostras do material incubado são retiradas e analisadas por espectrometria de massas para identificar e quantificar a incorporação desse isótopo. Esse tipo de análise apresenta alta sensibilidade ($\pm 0,75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de tecido). No entanto o elevado custo para obtenção do $^{15}\text{N}_2$ e dos equipamentos requeridos limitam o número de amostras que podem ser analisadas, aliado a dificuldade/impossibilidade de incubação de plantas de grande porte, como a cana-de-açúcar ou experimentos de campo (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2009).

Pelo método de marcação do solo com ^{15}N ou da diluição isotópica com ^{15}N , pequenas áreas inscritas numa área maior são tratadas com fertilizantes enriquecidos com $^{15}\text{N}_2$, normalmente sulfato de amônio marcado ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ ou uréia marcada ($^{15}\text{NH}_2$) $_2\text{CO}$. Assim, os organismos que não possuem a capacidade para FBN absorvem a maioria do N proveniente do solo/fertilizante durante seu desenvolvimento e tornam-se enriquecidos em ^{15}N , enquanto que aqueles com capacidade para fixação acessam o N_2 atmosférico e tornam-se enriquecidos em ^{14}N . Uma preocupação e limitação deste método é a inibição da capacidade fixadora de alguns organismos ocasionada pela introdução mesmo de pequenas quantidades de fertilizante (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2009).

A técnica da variação natural de ^{15}N baseia-se na premissa de que os níveis de ^{15}N no solo são mais elevados do que na atmosfera, em decorrência da denitrificação preferencial do $^{14}\text{N-NO}_3$ em relação ao $^{15}\text{N-NO}_3$ e da estabilidade da concentração de $^{15}\text{N}_2$ na atmosfera. Desse modo, os organismos que dependem do N proveniente do solo tenderão a ser enriquecidos em ^{15}N enquanto que os fixadores incorporarão mais ^{14}N da atmosfera. Assim, essas diferenças de incorporação podem ser medidas e as taxas de fixação de N_2 podem ser calculadas (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2009).

A técnica de redução de acetileno foi desenvolvida no final da década de 60 por Stewart et al. (1967; 1968) e Hardy et al. (1968) e baseia-se na habilidade do complexo enzimático da nitrogenase em reduzir outros substratos além do N_2 atmosférico. Embora o N_2 molecular seja um substrato natural para o complexo enzimático da nitrogenase, outros análogos do nitrogênio com tripla ligação, tais como acetileno ($\text{HC}\equiv\text{CH}$), cianeto ($\text{H-C}\equiv\text{N}$), óxido nitroso ($\text{N}\equiv\text{N-O}$) e metil isocianeto ($\text{CH}_3\text{-N}\equiv\text{C}$) também são reduzidos por esse complexo.

O acetileno (C_2H_2) é o gás mais frequentemente usado para medir a atividade da nitrogenase devido sua fácil disponibilidade e não toxicidade. A redução do acetileno a etileno é tido como um método viável para medição da atividade do complexo enzimático da nitrogenase e a taxa de conversão é proporcional a quantidade da enzima presente. No entanto, considera-se que essa técnica é semi-quantitativa, pois existe a necessidade de utilizar um fator de equivalência para expressar os resultados de redução de C_2H_2 em N_2 . Esse fator é muito variável em condições diversas, e inicialmente, o fator usado era igual a 3, porém, em estudos comparativos usando as técnicas isotópicas com ^{15}N marcado definiu-se como fator mais apropriado o valor de 4.

Apesar de suas limitações, essa técnica foi e continua sendo a mais utilizada em medições da fixação do N_2 atmosférico (HARDY; BURNS; HOLSTEN, 1973), devido ao conjunto de facilidades como simplicidade e rapidez de execução, baixo custo de utilização aliada a sua sensibilidade de detecção (STAAL et al., 2001).

Essa técnica é amplamente utilizada na medição da atividade da nitrogenase em amostras ambientais, em extratos celulares e isolados de bactérias e tem contribuído de forma significativa nos estudos envolvendo FBN dentro do grupo das cianobactérias (STAAL et al., 2001). Sem dúvida, essa técnica tem conduzido à uma maior compreensão dos efeitos da luz e do oxigênio sobre a atividade da nitrogenase nesse grupo de bactérias (STAAL et al., 2001).

Por essa técnica, o etileno (C_2H_4) produzido pela redução de acetileno deve ser medido pela técnica de cromatografia gasosa a qual consiste na separação de substâncias voláteis. Nesse equipamento os gases são separados por meio do fluxo diferencial numa coluna preenchida com partículas de fase estacionária. Após essa separação, os gases são individualmente medidos pelo detector quando estes saem da coluna.

3 HIPÓTESES

Os ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo são colonizados por cianobactérias adaptadas às condições extremas desse ambiente.

Nos manguezais, as cianobactérias desempenham papel fundamental principalmente no ciclo do nitrogênio contribuindo para o aporte desse elemento por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN).

4 OBJETIVOS

- Isolar e identificar morfológicamente as linhagens de cianobactérias isoladas dos ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo;
- Caracterizar por meio do sequenciamento do gene *rpoC1* as linhagens identificadas;
- Verificar a distribuição do gene *nifH*, responsável pela síntese da enzima nitrogenase redutase nas linhagens de cianobactérias estudadas;
- Investigar a expressão do complexo enzimático da nitrogenase nessas linhagens de cianobactérias.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta, isolamento, identificação e manutenção das linhagens

Neste estudo foram avaliados dois manguezais do Estado de São Paulo, um localizado em área de reserva ambiental na Ilha do Cardoso, município de Cananéia ($25^{\circ}05'02''\text{S}$, $47^{\circ}57'42''\text{W}$) considerado um ambiente sem efeito antrópico, e outro em Bertioga ($23^{\circ}53'49''\text{S}$, $46^{\circ}12'28''\text{W}$), um ambiente impactado devido ao derramamento de 35 milhões de litros de petróleo em 1983. No ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso, duas coletas foram realizadas nos meses de abril e dezembro de 2006. Nesse ecossistema foram coletadas amostras ambientais de solo, água e perifíton. Somente amostras de solo foram retiradas da única coleta realizada no ecossistema de manguezal de Bertioga, no mês de junho de 2006.

A amostragem no ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso foi realizada ao longo de um transecto com 340 metros de extensão. Três pontos ao longo desse transecto foram escolhidos para realização da coleta, sendo cada um localizado dentro de uma das três áreas distintas denominadas franja, bosque e restinga posicionadas perpendicularmente em relação ao mar (Figura 4). O ponto de número um (1), localizado na franja é aquele mais próximo da intersecção mar/mangue e mais susceptível às inundações das marés. O ponto de número dois (2), localizado no bosque, situa-se próximo a um soerguimento de relevo e corresponde aproximadamente ao meio do transecto. O terceiro e último ponto (3), localizado na restinga está no término do transecto e na intersecção mangue/restinga.

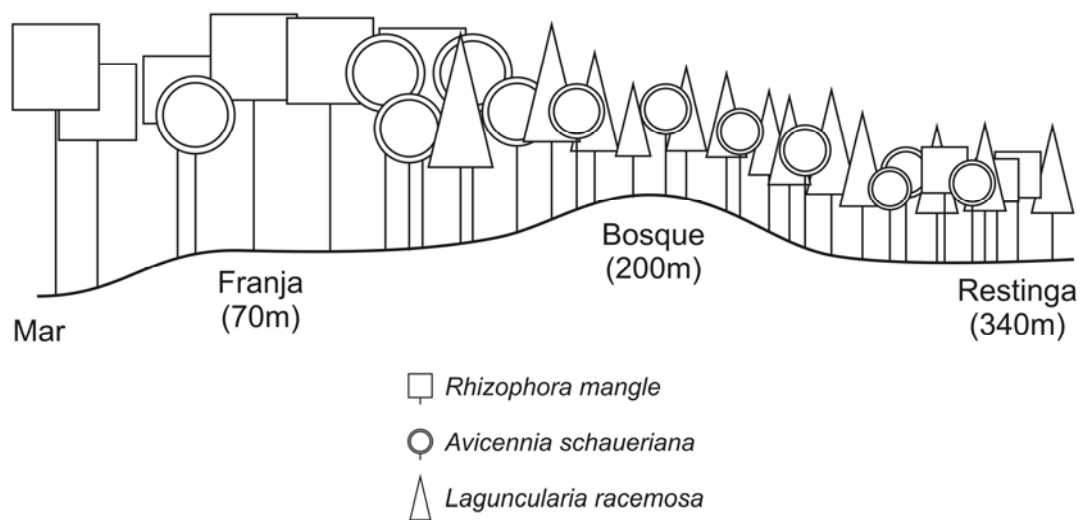


Figura 4 – Perfil da vegetação e da topografia do manguezal da Ilha do Cardoso, SP, e sua relação com os pontos amostrados

Em cada ponto, triplicatas das amostras de solo e perifiton foram coletadas, enquanto que quadruplicatas das amostras de água foram retiradas somente para os dois primeiros pontos. Para as amostras de solo foram amostrados três níveis de profundidade (0-10 cm, 10-20 cm, 20-40 cm) com auxílio de tubos de PVC de 40 cm de comprimento e 4,3 cm de diâmetro (Figura 5).

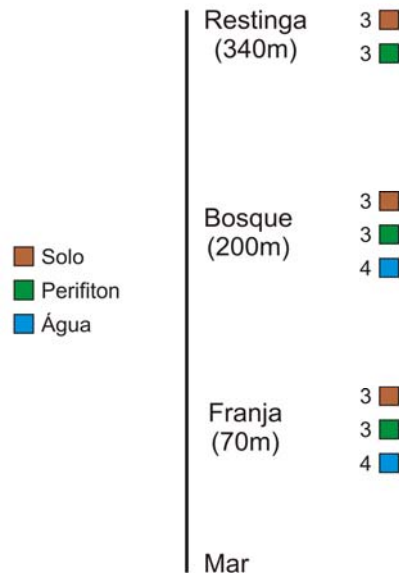


Figura 5 – Esquema da estratégia de coleta adotada no manguezal da Ilha do Cardoso, SP

No ecossistema de manguezal de Bertioga somente amostras de solo foram coletadas em três pontos (franja, bosque e restinga), distribuídos ao longo de um transecto com 300 metros de extensão (Figura 6). A estratégia de amostragem foi semelhante à adotada para o manguezal da Ilha do Cardoso, conforme descrito anteriormente, entretanto, as triplicatas de cada ponto foram misturadas de modo a formarem uma única amostra composta relativa a cada profundidade de solo.

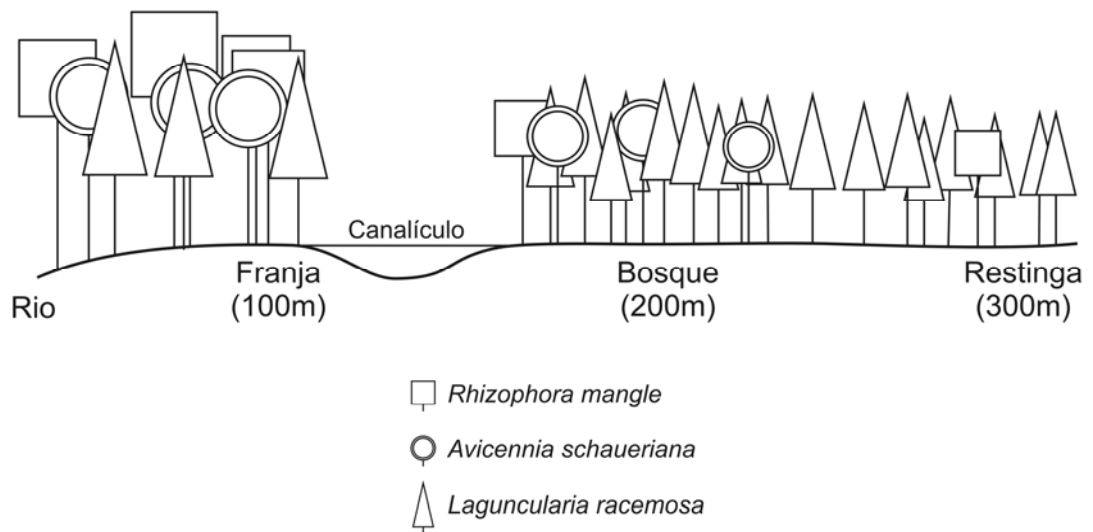


Figura 6 – Perfil da vegetação e da topografia do manguezal de Bertioga, SP, e sua relação com os pontos amostrados

Nesse manguezal o ponto mais próximo da intersecção rio/mangue denominado de franja possui pouca deterioração ambiental decorrente do derramamento de óleo de 1983 e é mais influenciado pela ação das marés. O segundo ponto designado de bosque fica adjacente a um canalículo perene de água que recorta esse manguezal, enquanto que o terceiro ponto nomeado de restinga está mais próximo à rodovia Rio-Santos. Esses dois últimos pontos sofreram fortemente os efeitos do rompimento do oleoduto na década de 80 (Figura 7).



Figura 7 – Esquema da estratégia de coleta adotada no manguezal de Bertioga, SP

A quantidade de 10 g foi retirada de cada amostra de solo e perifiton coletada, sendo diluída e homogeneizada em 90 mL da solução de NaCl 0,85%. Em seguida, 100 µL dessa mistura foram inoculados em placas de petri contendo os meios de cultura específicos para crescimento de cianobactéria (SWBG-11, ASN-III e MN, Anexo A) solidificados com 1,2% de ágar e acrescidos de ciclohexamida (75 mg.L^{-1}) visando a inibição do crescimento de organismos eucarióticos. Para as amostras de água não houve a necessidade de diluição em solução salina e, portanto, 100 µL desse material foram diretamente inoculados em placas de petri, conforme descrito anteriormente.

Posteriormente ao plaqueamento, as placas de petri foram vedadas e acondicionadas em sala de crescimento com condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e iluminação fluorescente constante de $40 \text{ } \mu\text{moles f\^otons.m}^2.\text{s}^{-1}$. Após observação do crescimento de massa de cianobactérias na superfície dos meios de cultura contidos nas placas de petri, iniciaram-se os procedimentos para isolamento das linhagens. Esses procedimentos envolveram repiques e estriamentos sucessivos das linhagens de cianobactérias e observações contínuas em microscópios ópticos Axioskop 40 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e MicroImaging GnbH (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) até a constatação da condição monoespecífica da cultura.

Em seguida à obtenção das culturas isoladas, frações do material biológico foram inoculadas em seus respectivos meios de cultura no estado líquido visando à aquisição de massa celular suficiente para as etapas de identificação e extração de DNA.

As identificações morfológicas até o nível de gênero foram realizadas seguindo o Sistema de Classificação de Komárek & Anagnostidis (1989; 2000; 2005), baseadas nos caracteres morfológicos diacríticos. A análise morfométrica das linhagens isoladas baseou-se nos seguintes caracteres morfológicos: diâmetros e comprimentos da célula vegetativa, heterócitos e acinetos. Foram realizadas vinte medições de cada caractere (5 células de 4 lâminas distintas) buscando obter os valores máximos e mínimos para cada caractere analisado e calculado a média de cada variação fenotípica. As identificações morfológicas foram confirmadas pelo sistemata Dr. Jan Kaštovský (Faculdade de Ciências, Universidade Sul da Bohemia, República Tcheca) para todos os gêneros identificados.

A manutenção dessas linhagens foi feita por meio de sub-cultivos periódicos nos meios de cultura líquido e sólido. Para manutenção das culturas em meio líquido utilizou-se frascos Erlenmeyer com capacidade para 125 mL contendo 50 mL dos respectivos meios de cultura, enquanto que a manutenção em meio sólido foi utilizado placas de petri contendo aproximadamente 15 mL dos respectivos meios de cultura acrescidos com 1,2% de ágar. Observações mensais ao microscópio óptico (Carl Zeiss, Alemanha) foram realizadas durante

os procedimentos de repicagem. As culturas foram mantidas sob iluminação fluorescente com $40 \mu\text{mol f\^otons.m}^2.\text{s}^{-1}$, com fotoper\u00edodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro e temperatura controlada de $24\pm 1^\circ\text{C}$.

5.2 An\u00e1lise molecular das linhagens isoladas de cianobact\u00e9rias

5.2.1 Extra\u00e7\u00e3o de DNA

A extra\u00e7\u00e3o de DNA gen\u00f4mico de cada linhagem de cianobact\u00e9ria foi feita usando 3 mL da cultura de c\u00e9lulas na fase exponencial de crescimento. As c\u00e9lulas foram concentradas por meio de centrifuga\u00e7\u00e3o a $10.000 g$ por 10 min, sobrenadante foi descartado e o p\u00e9lete formado foi lavado em \u00e1gua ultrapura esterilizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) visando retirar os nutrientes do meio de cultura. A lavagem do p\u00e9lete consistiu na adi\u00e7\u00e3o de 1 mL \u00e1gua ultrapura esterilizada seguida da homogeneiza\u00e7\u00e3o em *vortex* e centrifuga\u00e7\u00e3o. Esse procedimento foi realizado tr\u00eas vezes alterando as velocidades e tempos de centrifuga\u00e7\u00e3o na seguinte ordem $10.000 g$ por 5 min, $13.000 g$ por 2 min e $12.000 g$ por 3 min. O rompimento das c\u00e9lulas de cianobact\u00e9rias foi realizado por choque t\u00e9rmico. Os p\u00e9letes foram mergulhados em banho-maria a 55°C por 3 min e imediatamente transferidos e mantidos em nitrog\u00eanio l\u00edquido (-196°C) por 3 min. Esse procedimento foi repetido durante 5 vezes ou at\u00e9 a visualiza\u00e7\u00e3o macrosc\u00f3pica do rompimento das c\u00e9lulas. Posteriormente, os p\u00e9letes foram usados para extra\u00e7\u00e3o do DNA gen\u00f4mico, seguindo o m\u00e9todo descrito por Fiore et al. (2000). Aliquotas ($5 \mu\text{l}$) dos DNAs extra\u00eddos foram acrescidos de tamp\u00e3o de carregamento (ficol 15%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 0,1% de SYBER[®] Green I (Eugene, OR, EUA) e a integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1,2% ap\u00f3s corrida eletrofor\u00e9tica em tamp\u00e3o $0,5 \times \text{TBE}$ ($1 \times \text{TBE}$: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Como padr\u00e3o de tamanho de DNA foi utilizado o marcador molecular Lambda DNA/Eco R I + Hind III (Promega, Madison, WI, EUA) e/ou o padr\u00e3o de tamanho e massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A documenta\u00e7\u00e3o do gel foi feita usando o sistema de imagem KODAK Gel Logic 212 e o “Kodak Molecular Imaging Software” vers\u00e3o 5.0 (Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). O material foi armazenado a temperatura de -20°C at\u00e9 o procedimento seguinte.

4.2.2 Amplificação por PCR do gene *rpoC1*

A amplificação por PCR do fragmento do gene *rpoC1* (\pm 660 pares de base) foi realizada utilizando o conjunto de oligonucleotídeos iniciadores: rpoC1-1 (5'-GAGCTCYAWNACCATCCAYTCNGG-3') e rpoC1-T (5'-GGTACCNAAYGGNSARRTNGTTGG-3') (PALENIK; HASELKORN, 1992). A reação de amplificação continha: tampão para reação PCR 1 \times (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM MgCl₂; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, BR); 10 ng de DNA; 0,2 μ M de cada iniciador; e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada para um volume final de 25 μ L. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems). A otimização para algumas amostras foi feita usando a abordagem “*touchdown PCR*” com as seguintes condições de amplificação: 95°C/10 min; 8 ciclos de 95°C/45 s; 58°C-50°C/45 s; 72°C/1 min; com redução de 1°C por ciclo de anelamento, e 25 ciclos de 95°C/45 s; 50°C/45 s; 72°C/1 min; extensão final a 72 °C/10 min, finalizando a 4°C (modificado de WILSON et al., 2000). No restante das amostras aplicou-se a abordagem tradicional da PCR nas condições de amplificação foram: 95°C/10 min; 35 ciclos de 94°C/1 min; 50°C-42°C/1 min; 72°C/1 min; extensão final a 72 °C/ 10 min, finalizando a 4°C (modificado de WILSON et al., 2000). Nessas reações as temperaturas de anelamento variaram de 50 a 42°C. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 5.2.1.

5.2.3 Amplificação por PCR do gene *nifH*

A amplificação por PCR de fragmento do gene *nifH* (\pm 359 pares de base) foi feita utilizando a abordagem “*nested PCR*” e dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores. O primeiro conjunto de iniciadores foi o NIFH4 (5' – TTYTAYGGNAARGGNGG – 3') e o NIFH3 (5'- ATRTTRTTNGCNGCRTA – 3') (ZANI et al., 2000); e o segundo conjunto foi o NIFH1 (5'- TGYGAYCCNAARGCNGA – 3') e NIFH2 (5'- ADNGCCATCATYTCNCC – 3') onde N = A, G, C ou T; D = A, G ou T; Y = C ou T; R = A ou G (ZEHR; MCREYNOLDS, 1989). Para amplificação foi utilizada solução contendo: tampão para reação PCR 1 \times (Tris HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; 4 mM MgCl₂; 2,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, BR); 10 ng de DNA; 1 μ M de cada iniciador; e água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada para um volume final de 25 μ L. A abordagem “*nested PCR*” foi realizada no termociclador “Gene Amp PCR System

9700” (Applied Biosystems) com as seguintes condições de amplificação para primeira reação: 94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/1 min; 58°C/1 min; 72°C/1 min; extensão final a 72°C/3 min, finalizando a 4°C (adaptado, ZEHR; TURNER, 2001). Para a segunda reação, a solução de amplificação da PCR foi a mesma descrita anteriormente, exceto pela utilização de 1 µL do produto de amplificação resultante da primeira reação como DNA molde. As condições de amplificação para a segunda reação foram: 94°C/3 min; 35 ciclos de 94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1 min; extensão final a 72°C/3 min, finalizando a 4°C (modificado de ZEHR; TURNER, 2001). A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 5.2.1.

5.2.4 Clonagem dos fragmentos

A clonagem dos fragmentos de *rpoC1* e *nifH* produzidas nas reações de PCR foi feita usando o kit “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA). O vetor utilizado foi o pGEM®-T de 3015 pb que é oferecido linearizado com *EcoR* V e com a adição de 3’ terminal timidina em ambos os lados. Essas terminações 3’-T aumentam a eficiência de ligação. Esse vetor contém sítio de resistência a ampicilina, um sítio para múltipla clonagem e um fragmento *LacZ*. Os procedimentos para a clonagem foram seguidos conforme as instruções do fabricante disponíveis no Manual de Instrução do “pGEM®-T Easy Vector Systems”.

5.2.5 Transformação em *E. coli*

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5a foi feita por meio de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Aliquotas de 10 µL do produto de ligação e 50 µL de suspensão de células competentes foram adicionadas em microtubo de 1,5 mL esterilizado, misturadas gentilmente e incubadas no gelo durante 30 minutos. Após esse período, o microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42°C e mantido por 30 segundos, sem agitação. Em seguida, foi novamente resfriado em gelo por 2 minutos. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio SOC (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) à temperatura ambiente, e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio de cultivo Circlegrow® (MP Biomedicals, LCC, Solon, OH, EUA), solidificado com ágar 1,5%, contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹) (USB

Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Invitrogen). As placas foram incubadas por 14-16 horas, temperatura de 37°C .

5.2.6 PCR de colônias

Após o plaqueamento em meio Circlegrow[®] (MP Biomedicals) contendo ampicilina e X-Gal, seis colônias de cor branca de cada linhagem e genes estudados foram utilizadas para novas reações de PCR, visando a confirmação da presença dos fragmentos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a $25 \mu\text{L}$ de reação de PCR, realizada com os iniciadores: M13F ($5'$ -GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA- $3'$); M13R ($5'$ -GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG- $3'$). As amplificações foram feitas em solução contendo tampão para reação PCR $1 \times$ (Tris HCl 20 mM pH $8,4$; KCl 50 mM); $0,2 \text{ mM}$ de cada dNTP; 3 mM MgCl_2 ; $1,5 \text{ U}$ de Platinum[®] Taq DNA Polimerase (Invitrogen); 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de $25 \mu\text{L}$. A reação foi realizada no termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems) e as condições de amplificação foram $94^\circ\text{C}/5 \text{ min}$; 25 ciclos de $95^\circ\text{C}/20 \text{ s}$, $50^\circ\text{C}/15 \text{ s}$, $60^\circ\text{C}/1 \text{ min}$. A verificação do tamanho dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 5.2.1.

5.2.7 Extração de DNA plasmidial

As extrações de DNA plasmidial das células de *E. coli* DH5 α que continham os insertos foram feitas pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). As colônias brancas selecionadas foram transferidas para 4 mL de meio Circlegrow[®] (MP Biomedicals) contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de meio) e cultivadas por 14-16 horas, a 37°C , sob agitação de 200 rpm . Em microtubos de $1,5 \text{ mL}$ foram centrifugados $1,5 \text{ mL}$ da cultura produzida a 10.000 g por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi novamente repetido. O pélete formado foi ressuspenso em $100 \mu\text{L}$ de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM , pH $8,0$; EDTA 10 mM e glucose 50 mM). Em seguida, $200 \mu\text{L}$ de solução II (NaOH $0,2 \text{ M}$, SDS 1%) foram adicionados aos microtubos e os volumes foram gentilmente misturados por inversão. Após 5 minutos de incubação em gelo, foram acrescentados aos microtubos $150 \mu\text{L}$ de solução III gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico $1,8 \text{ M}$). Procedeu-se a mistura por inversão 20 vezes, e os microtubos foram incubados no gelo por mais 7 minutos. Posteriormente,

foram centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 270 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Os volumes foram misturados por inversão e, posteriormente centrifugados a 15.000 g durante 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado uma vez com 250 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 15.000 g por 2 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pélete foi seco. Após secagem dos DNAs plasmidiais, 30 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore) esterilizada e 2 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹) foram adicionados. Incubou-se essa mistura a 37°C por 30 minutos. Os DNAs plasmidiais extraídos foram armazenados a -20°C até o próximo uso.

5.2.8 Sequenciamento dos genes

A PCR para o seqüenciamento dos fragmentos de interesse foi feita usando-se o *kit* “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial, 5 pmol do iniciador T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'), 1 µL de “DYEnamic”, 2 µL de tampão “Save Money” 2,5 × (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura esterilizada para volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram 25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/15 s, 60°C/1 min. Após a reação, as amostras foram precipitadas conforme manual de instruções do *kit* “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” e enviadas ao seqüenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, para o seqüenciamento dos fragmentos de DNA por aproximadamente 2,5 horas. Os dados gerados pelo seqüenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

5.2.9 Processamento e análise filogenética das seqüências

As seqüências obtidas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) e assentadas em *contigs* por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional Linux. Posteriormente, essas seqüências foram comparadas com outras seqüências depositadas no *GenBank do National Center for*

Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção das árvores filogenéticas, as seqüências obtidas e outras selecionadas de bancos de dados públicos, foram alinhadas, editadas e o método de distância evolutiva “Neighbor-Joining” foi aplicado usando o pacote de programa MEGA 3.1 (TAMURA et al., 2007).

5.3 Análises de redução de acetileno e atividade específica da nitrogenase

A análise de redução de acetileno foi realizada para 27 linhagens de cianobactérias, em triplicatas, aplicando os tratamentos com luz e escuro em condições aeróbicas. Os gêneros amostrados são representativos das formas unicelulares, filamentosas não-heterocitadas e filamentosas heterocitadas sem ramificação verdadeira pertencentes às ordens Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales, respectivamente.

Os testes foram realizados em tubos de ensaio com capacidade para 15 mL contendo 5 mL dos respectivos meios de cultura preparados sem a adição de formas orgânicas e inorgânicas de nitrogênio.

Em seguida à esterilização e resfriamento dos meios de cultura, 3 mL de cada cultura preexistente foi utilizada para inocular os recém preparados meios de cultura. Essas novas culturas de cianobactérias foram mantidas sob iluminação constante e fluorescente com $40 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ até atingirem a fase exponencial de crescimento (± 15 dias). Após esse período, os tampões (algodão e gaze) dos tubos de ensaio foram substituídos por tampas de borracha visando a vedação hermética dos tubos, seguida da criação da atmosfera modificada contendo acetileno.

A atmosfera modificada contendo 10% de acetileno nos tubos foi alcançada retirando-se 10% da atmosfera interna do tudo ($\pm 0,7$ mL) com auxílio de seringa, seguida do acréscimo de $\pm 0,7$ mL de acetileno (C_2H_2). Posteriormente a adição do acetileno, tréplicas de cada linhagem foram mantidas em iluminação constante e fluorescente com $40 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para o tratamento com luz e tréplicas da mesma linhagem foram envoltas em sacos plásticos pretos e mantidas no escuro. Ambos os tratamentos foram conduzidos à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e incubadas por um período de 6 horas. Após esse período, amostras (± 6 mL) da atmosfera interna dos tubos foram retiradas e analisadas para o teor de etileno convertido em cromatógrafo à gás Gas Chromatograph GC-14 (Shimadzu Viena, Viena, Áustria) acoplado ao integrador C-R5A Chromatopac (Shimadzu, Viena, Áustria) no Laboratório de Fisiologia

de Micro-organismos no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo campus São Paulo coordenado pela Profa. Dra. Heloíza Ramos Barbosa.

A atividade específica da nitrogenase para as linhagens de cianobactérias foi efetuada relacionando-se os valores obtidos pela análise de cromatografia gasosa com os valores de biomassa seca das culturas de cianobactérias.

A quantificação da biomassa seca de cianobactérias foi realizada pelo método da diferença que consiste na pesagem de membrana/filtro anterior e posteriormente à filtração das culturas de cianobactérias. O resultado da subtração dos valores pós-filtração e pré-filtração das membranas é o valor utilizado no cálculo da atividade específica da nitrogenase. As membranas em éster de celulose de 0,22 μ (Millipore, Barueri, São Paulo, BR) foram secas durante 12 horas em estufa a 60°C antes e após a filtração das culturas de cianobactérias, assim como as pesagens em balança analítica Excellence Plus XP26 (Mettler Toledo, Greifensee, Zurique, Suíça) com precisão de seis casas decimais até a verificação de peso constante. As pesagens foram realizadas no Laboratório de Radioisótopos do CENA/USP coordenado pela Profa. Dra. Elisabete A. N. Fernandes do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e identificação morfológica das linhagens de cianobactérias

A metodologia de isolamento utilizada neste estudo propiciou a obtenção de culturas de 50 linhagens de cianobactérias a partir das amostras ambientais coletadas nos ecossistemas de manguezal da Ilha do Cardoso, Cananéia e Bertioga, SP (Tabela 1). Essas linhagens foram identificadas com base em critérios morfológicos ao nível de gênero com o auxílio de bibliografia especializada e com a colaboração do Prof. Dr. Jan Kaštovský (Faculdade de Ciências, Universidade Sul da Bohemia, República Tcheca). A linhagem CENA186 foi identificada somente ao nível de família (Xenococcaceae) devido à dificuldade de observação das características diacríticas para os gêneros incluídos nessa família. Esse material terá seus estádios de desenvolvimento estudados para assegurar uma identificação morfológica confiável.

Tabela 1 – Linhagens de cianobactérias isoladas dos ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo

Ordem	Identificação da linhagem	Local/ Material Coletado (Profundidade)/ Posição no transecto	Meio de Cultura
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> sp. CENA136	Ilha do Cardoso, SP/ Solo (10-20cm)/ bosque	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA138	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Cyanosarcina/Aphanothece</i> sp. CENA139	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ bosque	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA141	Ilha do Cardoso, SP / Água/ bosque	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA142	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA143	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA145	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA146	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA148	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA149	Ilha do Cardoso, SP / Água/ franja	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA150	Bertioga, SP / Solo (20-40cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA151	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA153	Ilha do Cardoso, SP / Perifiton/ franja	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA154	Ilha do Cardoso, SP / Solo(0-10cm)/ bosque	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA157	Ilha do Cardoso, SP / Solo(0-10cm)/ bosque	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA162	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA163	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA164	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA165	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA166	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Cyanoarbor/Aphanothece</i> sp. CENA168	Bertioga, SP / Solo (0-10cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Cyanothece</i> sp. CENA169	Ilha do Cardoso, SP / Solo (10-20cm)/ bosque	MN
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA170	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Aphanocapsa</i> sp. CENA171	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ franja	MN
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA172	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA174	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA177	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA178	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Synechocystis</i> sp. CENA180	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA181	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ franja	SWBG-11
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA185	Bertioga, SP / Solo (0-10cm)/ restinga	SWBG-11
	Xenococcaceae CENA186	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ restinga	SWBG-11

Tabela 1 – Linhagens de cianobactérias isoladas dos ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo

Oscillatoriales	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA134	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Phormidium</i> sp. CENA135	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	ASN-III
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA137	Ilha do Cardoso, SP / Perifiton/ bosque	SWBG-11
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA144	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ bosque	SWBG-11
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA147	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA155	Ilha do Cardoso, SP / Solo (20-40cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA156	Ilha do Cardoso, SP / Solo (10-20cm)/ bosque	SWBG-11
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA167	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA183	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	SWBG-11
Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	ASN-III
	<i>Nostoc</i> sp. CENA159	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	ASN-III
	<i>Nostoc</i> sp. CENA160	Ilha do Cardoso, SP / Solo (0-10cm)	ASN-III
	<i>Nostoc</i> sp. CENA175	Bertioga, SP/ Solo (0-10cm)/ restinga	SWBG-11
	<i>Microchaete</i> sp. CENA176	Bertioga-SP/Solo (0-10 cm) – restinga	SWBG-11
	<i>Nostoc</i> sp. CENA184	Ilha do Cardoso –SP/ Água – bosque	SWBG-11

Nesse trabalho, foi observada a predominância das formas unicelulares de cianobactérias incluídas na ordem Chroococcales (35 linhagens, 70%), seguidas das formas filamentosas não heterocitadas representantes da ordem Oscillatoriales (9 linhagens, 18%) e finalmente pelas formas filamentosas heterocitadas pertencentes à ordem Nostocales (6 linhagens, 12%). Essas linhagens estão distribuídas entre nove famílias, ou seja, Synechococcaceae, Entophysalidaceae, Chroococcaceae, Xenococcaceae e Merismopediaceae da ordem Chroococcales, Phormidiaceae e Pseudanabaenaceae da ordem Oscillatoriales, e Nostocaceae e Microchaetaceae da ordem Nostocales.

No trabalho realizado por Branco et al. (2003) é apresentada uma compilação de estudos sobre a diversidade de cianobactérias em manguezais brasileiros por meio de levantamentos florísticos. Em todos os trabalhos mencionados por esses autores é verificada a predominância das formas filamentosas não heterocitadas (Oscillatoriales) sobre as demais formas de cianobactérias, seguida das unicelulares (Chroococcales), heterocitadas sem ramificação (Nostocales) e com ramificação verdadeira (Stigonematales). Os dados apontados nesse estudo, entretanto, indicam predomínio das Chroococcales, seguida das Oscillatoriales e das Nostocales. Nenhum membro representante da ordem Stigonematales foi isolado. As diferenças encontradas entre os resultados de Branco et al. (2003) e os obtidos nesse trabalho podem estar relacionadas com o fato de que esses autores realizaram investigações florísticas em amostra da natureza, enquanto que a técnica de isolamento em meio de cultura específico foi utilizada no presente estudo. Os métodos de isolamento com a utilização de meios específicos de crescimento são seletivos e tendem a favorecer o desenvolvimento de determinados grupos de micro-organismos em função de suas taxas de crescimento e reprodução.

Em comparação aos trabalhos de Branco et al. (1996, 1997 e 2003), Nogueira e Ferreira-Correia (2001) e Crispino e Sant'Anna (2006) metade dos gêneros/família (5/10) isolados nesse estudo já tiveram sua ocorrência registrada nos levantamentos florísticos de cianobactérias em manguezais (Tabela 2).

Tabela 2 - Gêneros isolados neste estudo e os relatos anteriores de suas ocorrências em ecossistemas de manguezais brasileiros

Ordem	Gêneros isolados nesse estudo	Branco et al. (1996)	Branco et al. (1997)	Nogueira e Ferreira-Correia (2001)	Branco et al. (2003)	Crispino e Sant'Anna (2006)
Chroococcales	<i>Synechococcus</i>	+	Nd	-	-	-
	<i>Chlorogloea</i>	-	Nd	-	-	-
	<i>Cyanothece</i>	-	Nd	-	-	-
	<i>Aphanocapsa</i>	-	Nd	-	-	-
	<i>Synechocystis</i>	-	Nd	-	-	-
	<i>Xenococcaceae</i>	+	nd	+	+	+
Oscillatoriales	<i>Phormidium</i>	nd	+	+	+	+
	<i>Leptolyngbya</i>	nd	+	+	+	-
Nostocales	<i>Nostoc</i>	nd	nd	-	-	-
	<i>Microchaete</i>	nd	nd	-	-	+

(nd) não determinado; (+) positivo; (-) negativo

Dentro da ordem Chroococcales, somente o gênero *Synechococcus* e a família Xenococcaceae isolados nesse estudo foram reportadas nos trabalhos de levantamento taxonômico, enquanto que na ordem Oscillatoriales os gêneros *Phormidium* e *Leptolyngbya* foram citados na maioria deles. O trabalho de Crispino e Sant'Anna realizado em ilhas costeiras do Estado de São Paulo é o único que faz referência à observação de um membro de cianobactéria pertencente a ordem Nostocales, gênero *Microchaete*, com ocorrência em ambiente marinho. A detecção de maior número de gêneros unicelulares encontrado neste estudo pode ser devido aos meios de cultura artificiais utilizados no isolamento que provavelmente favoreceram o seu crescimento, enquanto que os representantes das Nostocales possuem células de resistência, os acinetos, que também se desenvolvem em meios de cultura apropriados.

Nesse estudo o maior número de linhagens obtidas a partir do isolamento pertence ao gênero *Synechococcus*. As formas picoplânctônicas de *Synechococcus* spp. são consideradas as mais abundantes no plâncton marinho e desempenham papel importante na produção primária dos oceanos (BERGMAN et al., 1997). Esses mesmos autores enfatizam que poucas linhagens dessa espécie de cianobactéria têm sido isoladas desses ambientes e que não existem estudos sistemáticos investigando sua contribuição na FBN. No geral, todas as linhagens isoladas dessa espécie e testadas para FBN apresentaram resultado negativo e, portanto, não contribuem para a entrada de nitrogênio nos oceanos. Segundo Bergman et al. (1997) o tamanho reduzido desses micro-organismos reflete sua adaptação morfológica a ambientes oligotróficos tais como os marinhos e que a razão elevada entre a área superficial e

o volume celular permite a essas cianobactérias picoplanctônicas acessar formas nitrogenadas reduzidas mais eficientemente do que as formas maiores de cianobactérias.

Até recentemente, acreditava-se que a cianobactéria filamentosa *Trichodesmium* era o organismo mais abundante e com maior participação na FBN nos oceanos (CAPONE et al., 1997) atribuindo pouca participação das espécies unicelulares no ciclo do nitrogênio. Entretanto, duas novas espécies unicelulares de cianobactérias têm mostrado taxas de abundância e de FBN iguais e até mesmo superiores aos observados em *Trichodesmium* (ZEHR et al., 2001; MONTOYA et al., 2004; LANGLOIS, HUMMER, LAROCHE, 2008; CHURCH et al., 2005). Essas espécies identificadas como UCYN-A e *Crocospaera watsonii* são encontradas em alto mar nas regiões tropicais e subtropicais (ZEHR et al., 2001) e possuem tamanhos celulares reduzidos, respectivamente, menor que 1 μm e 3-8 μm (MOISANDER et al., 2010). No trabalho de Moisander et al. (2010) é mostrado que os distintos padrões de distribuição dessas formas unicelulares em relação a *Trichodesmium* é função da profundidade, temperatura e densidade da água e que, portanto, não ocupam o mesmo hábitat ecológico.

Análises morfométricas foram realizadas para vinte e sete linhagens distribuídas entre as três ordens encontradas neste estudo (Tabela 3). Nas figuras 8, 9 e 10 são apresentadas microfotografias de representantes das linhagens estudadas.

Tabela 3 – Linhagens de cianobactérias identificadas morfológicamente e utilizadas nesse estudo

Ordem	Identificação da linhagem	Organização celular	Morfologia do tricoma /célula	Tamanho da célula (µm) ^a			Coloração	
				Comprimento (C)	Largura (L)	Relação C/L		
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> sp. CENA136 (Fig.8A)	Células solitárias e ou levemente agregadas em mucilagem difluente.	Células cilíndricas e ou oval-alongadas.	3,7 – 20,5 (14,9)	1,0 – 1,3 (1,2)	3,7 – 15,7 (12,4)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140 (Fig.8B)			3,4 – 17,8 (12,7)	1,0 – 1,4 (1,3)	3,4 – 6,3 (12,7)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA153 (Fig.8C)			3,1 – 50,4 (16,7)	1,0 – 1,7 (1,4)	3,1 – 29,6 (11,9)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA154 (Fig.8D)			1,0 – 10,0 (4,8)	1,0 – 1,5 (1,2)	1,0 – 6,6 (4,0)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA162 (Fig.8E)			5,2 – 20,0 (8,5)	0,9 – 1,0 (1,0)	5,7 – 20,0 (8,5)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA164 (Fig.8F)			3,5 – 20,3 (9,7)	1,0 – 1,3 (1,2)	3,5 – 15,6 (8,0)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA177 (Fig.8G)			2,3 – 7,0 (5,6)	1,0 – 1,5 (1,3)	2,3 – 4,6 (4,3)	Verde	
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179 (Fig.8H)			2,1 – 5,3 (4,1)	1,0 – 1,2 (1,1)	2,1 – 4,4 (3,7)	Verde	
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA146 (Fig.9A)	Células dispersas em mucilagem	Células esféricas e ou levemente alongadas.	1,0 – 5,0 (3,3)	1,0 – 1,2 (1,0)	1,0 – 4,1 (3,3)	Verde	
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA149 (Fig.9B)			1,0 – 2,0 (1,9)	1,0 – 1,3 (1,2)	1,0 – 1,5 (1,5)	Verde	
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152 (Fig.9C)			1,0 – 4,0 (2,3)	1,0 – 1,3 (1,2)	1,0 – 3,0 (1,9)	Verde	
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA174 (Fig.9D)			2,0 – 2,2 (2,1)	1,0 – 1,1 (1,1)	2,0 (1,9)	Verde	
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA181 (Fig.9E)			3,1 – 4,0 (3,5)	1,0 – 1,4 (1,2)	2,8 – 3,1 (2,9)	Verde	
	<i>Cyanothece</i> sp. CENA169 (Fig.9F)	Células solitárias e ou levemente agregadas em mucilagem difluente.	Células esféricas e ou levemente alongadas, com grânulos.	2,2 – 7,1 (5,3)	4,1 – 4,9 (4,7)	0,5 – 1,4 (1,1)	Marrom esverdeada	
	<i>Aphanocapsa</i> sp. CENA171 (Fig.9G)			Células densamente agrupadas no interior de colônias	Células levemente alongadas.	2,0 – 2,3 (2,1)	1,0 – 1,1 (1,0)	2,0 (2,1)
Xenococcaceae CENA186 (Fig.9H)				Células esféricas.		3,3 – 6,5 (3,7) ^d		Marrom escura
	<i>Synechocystis</i> sp. CENA180 (Fig.9I)	Células solitárias.	Células esféricas.		1,0 – 1,1 (1,0) ^d		Verde	
Oscillatoriales	<i>Phormidium</i> sp. CENA135 (Fig.10A)	Células quadráticas organizadas em tricomas	Tricomas com bainha, movimento, necrídeos e grânulos.	3,0 – 5,0 (3,9)	5,0- 6,0 (5,1)	0,6 – 0,8 (0,7)	Verde azulada	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA137 (Fig.10B)	Células retangulares organizadas em tricomas	Tricomas com necrídeos	2,1 – 5,0 (3,3)	1,1 – 1,7 (1,3)	1,9 – 2,9 (2,5)	Verde	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA183 (Fig.10C)			1,5 – 2,0 (1,9)	1,0 – 1,7 (1,5)	1,1 – 1,5 (1,2)	Verde	
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA167 (Fig.10D)			1,0 – 3,0 (2,5)	0,8 – 1,4 (1,3)	1,2 – 2,1 (1,9)	Verde	
			Tricomas com falsa-ramificação e necrídeos					

Tabela 3 – Linhagens de cianobactérias identificadas morfológicamente e utilizadas nesse estudo

Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158 (Fig.10E)	Células organizadas em tricomas isopolares. Tricomas dispersos em mucilagem difusa. Sem formação de colônias	Tricomas com falsa-ramificação, movimento, e grânulos.	2,0 – 5,0 (4,1) H ^b : 6,0 – 7,1 (6,7) A ^c : 3,0 – 5,0 (4,5)	2,0 – 3,0 (2,5) H ^b : 4,5 – 6,5 (5,3) A ^c : 3,0 – 5,0 (4,4)	1,0 – 1,6 (1,6) H ^b : 1,0 – 1,2 (1,2) A ^c : 1,0 (1,0)	Marrom
	<i>Nostoc</i> sp. CENA159 (Fig.10F)			3,3 – 6,8 (5,7) H ^b : 7,0 – 8,8 (8,0) A ^c : 4,9 – 7,0 (6,4)	2,3 – 3,4 (3,0) H ^b : 5,1 – 6,8 (6,3) A ^c : 3,0 – 6,4 (5,1)	1,4 – 2,0 (1,9) H ^b : 1,2 – 1,3 (1,2) A ^c : 1,0 – 1,6 (1,2)	Marrom
	<i>Nostoc</i> sp. CENA160 (Fig.10G)			4,2 – 7,1 (6,3) H ^b : 7,2 – 9,1 (8,5) A ^c : 4,0 – 6,1 (5,5)	2,1 – 3,1 (2,9) H ^b : 5,4 – 6,6 (6,1) A ^c : 4,0 – 5,2 (4,9)	2,0 – 2,2 (2,1) H ^b : 1,3 (1,3) A ^c : 1,0 – 1,1 (1,1)	Marrom
	<i>Nostoc</i> sp. CENA175 (Fig.10H)		Tricomas com grânulos	4,5 – 8,1 (6,8) H ^b : 6,4 – 7,4 (6,7) A ^c : 5,7 – 10,0 (8,4)	3,0 – 4,1 (3,6) H ^b : 5,0 – 5,9 (5,4) A ^c : 7,1 – 7,9 (7,3)	1,5 – 1,9 (1,8) H ^b : 1,2 (1,2) A ^c : 0,8 – 1,2 (1,1)	Marrom
	<i>Nostoc</i> sp. CENA184 (Fig.10I)	Células organizadas em tricomas isopolares. Tricomas densamente arranjados no interior de colônias.	Células em forma de barril.	2,0 – 4,0 (2,9) A ^c : 3,0 – 4,0 (3,8) A ^c : 4,0 – 5,5 (4,8)	3,0 – 4,0 (3,4) H ^b : 4,0 – 5,0 (4,4) A ^c : 4,0 – 5,2 (4,4)	0,6 – 1,0 (0,8) H ^b : 0,7 – 0,8 (0,8) A ^c : 1,0 (1,0)	Marrom
	<i>Microchaete</i> sp. CENA176 (Fig.10J)	Células organizadas em tricomas heteropolares.	Tricomas com falsa-ramificação, grânulos, necrídeos e bainha.	1,0 – 3,0 (2,2) H ^b : 6,0 – 7,2 (6,6)	4,0 – 5,4 (4,4) H ^b : 6,0 – 6,4 (6,1)	0,2 – 0,5 (0,5) H ^b : 1,0 – 1,1 (1,0)	Verde escura

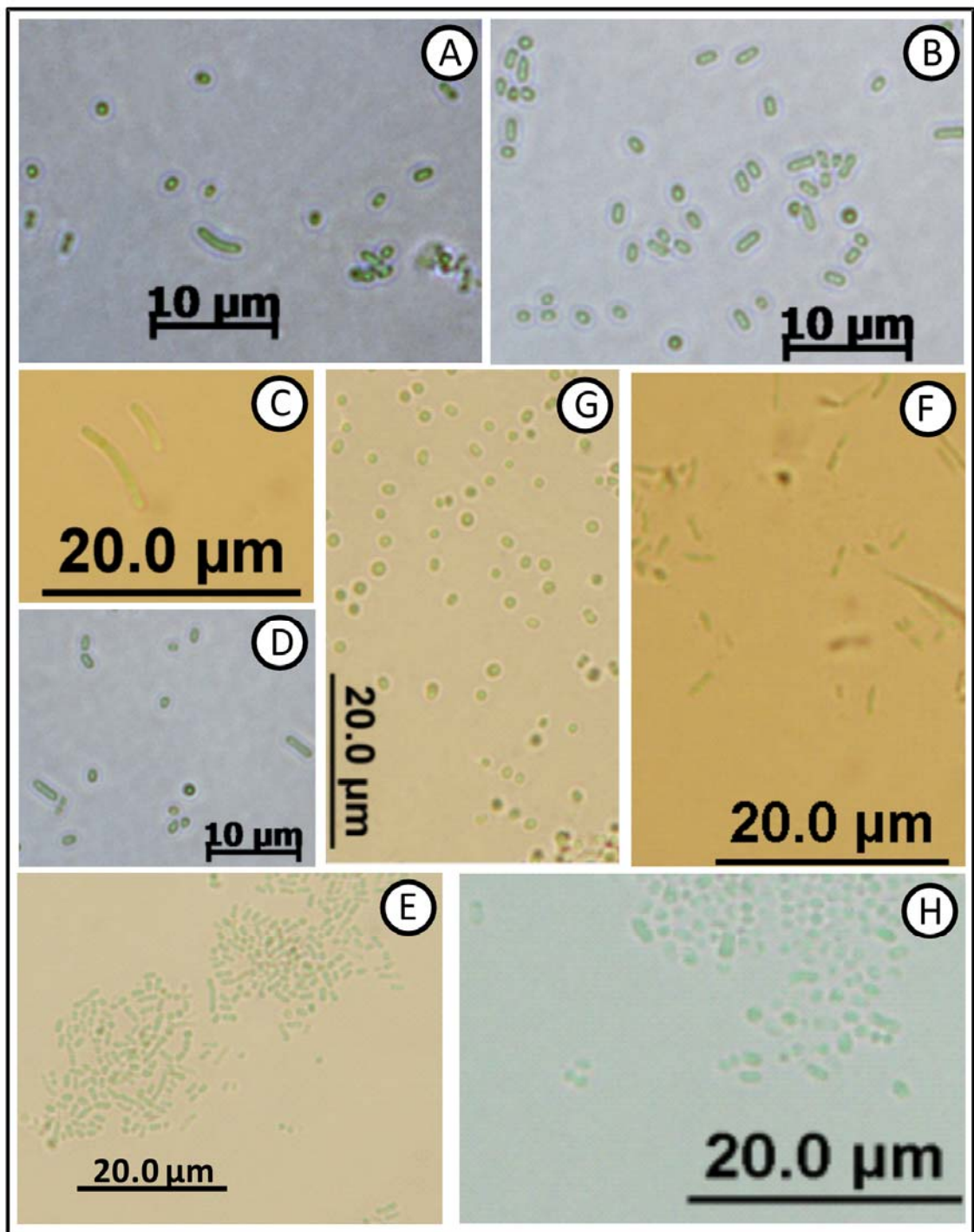


Figura 8 – Microfotografias das linhagens de cianobactérias utilizadas nesse estudo. A. *Synechococcus* sp. CENA136; B. *Synechococcus* sp. CENA140; C. *Synechococcus* sp. CENA153; D. *Synechococcus* sp. CENA154; E. *Synechococcus* sp. CENA162; F. *Synechococcus* sp. CENA164; G. *Synechococcus* sp. CENA177; H. *Synechococcus* sp. CENA179

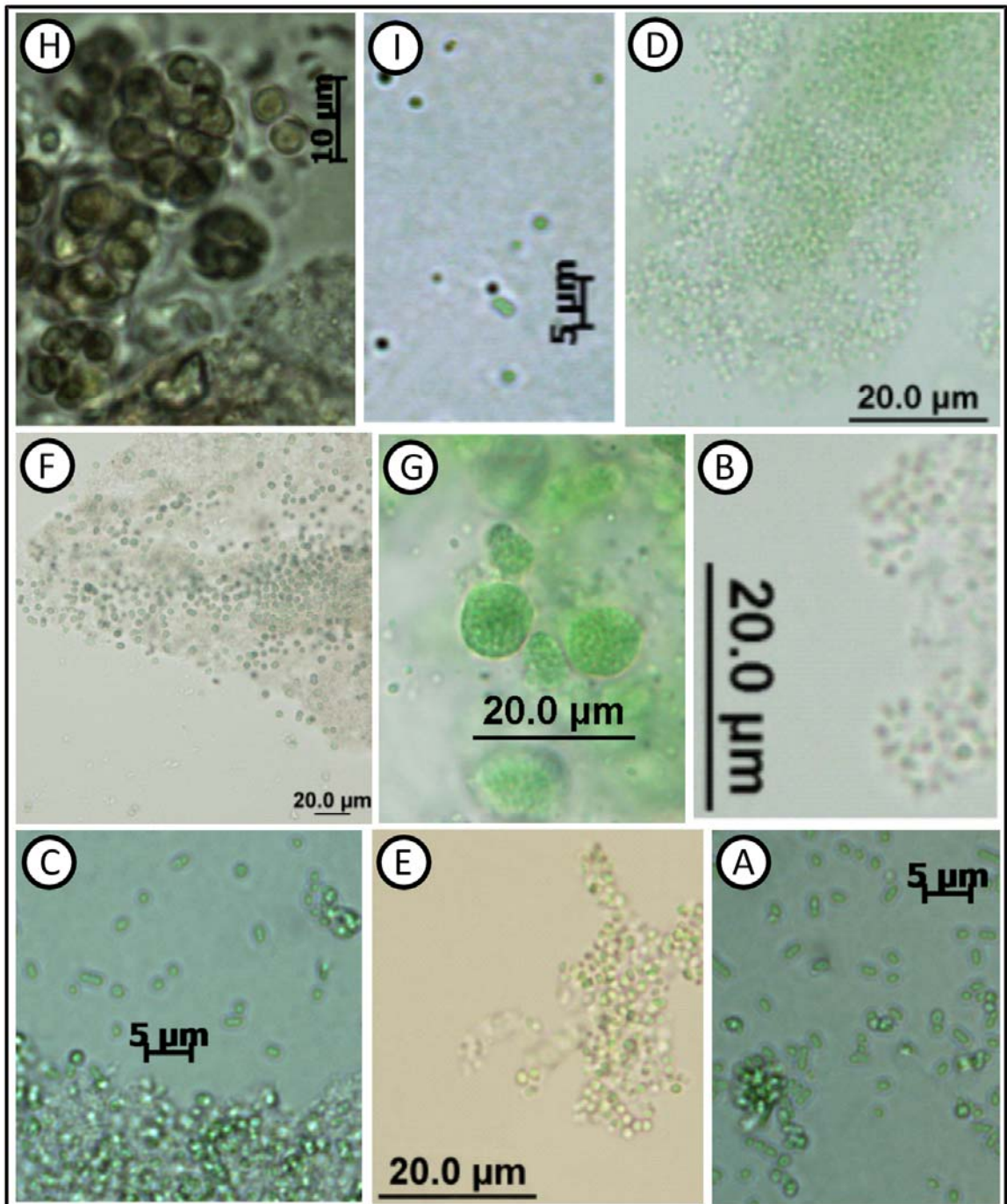


Figura 9 – Microfotografias das linhagens de cianobactérias utilizadas nesse estudo. A. *Chlorogloea* sp. CENA146; B. *Chlorogloea* sp. CENA149; C. *Chlorogloea* sp. CENA152; D. *Chlorogloea* sp. CENA174; E. *Chlorogloea* sp. CENA181; F. *Cyanothece* sp. CENA169; G. *Aphanocapsa* sp. CENA171; H. Xenococcaceae CENA186; I. *Synechocystis* sp. CENA180

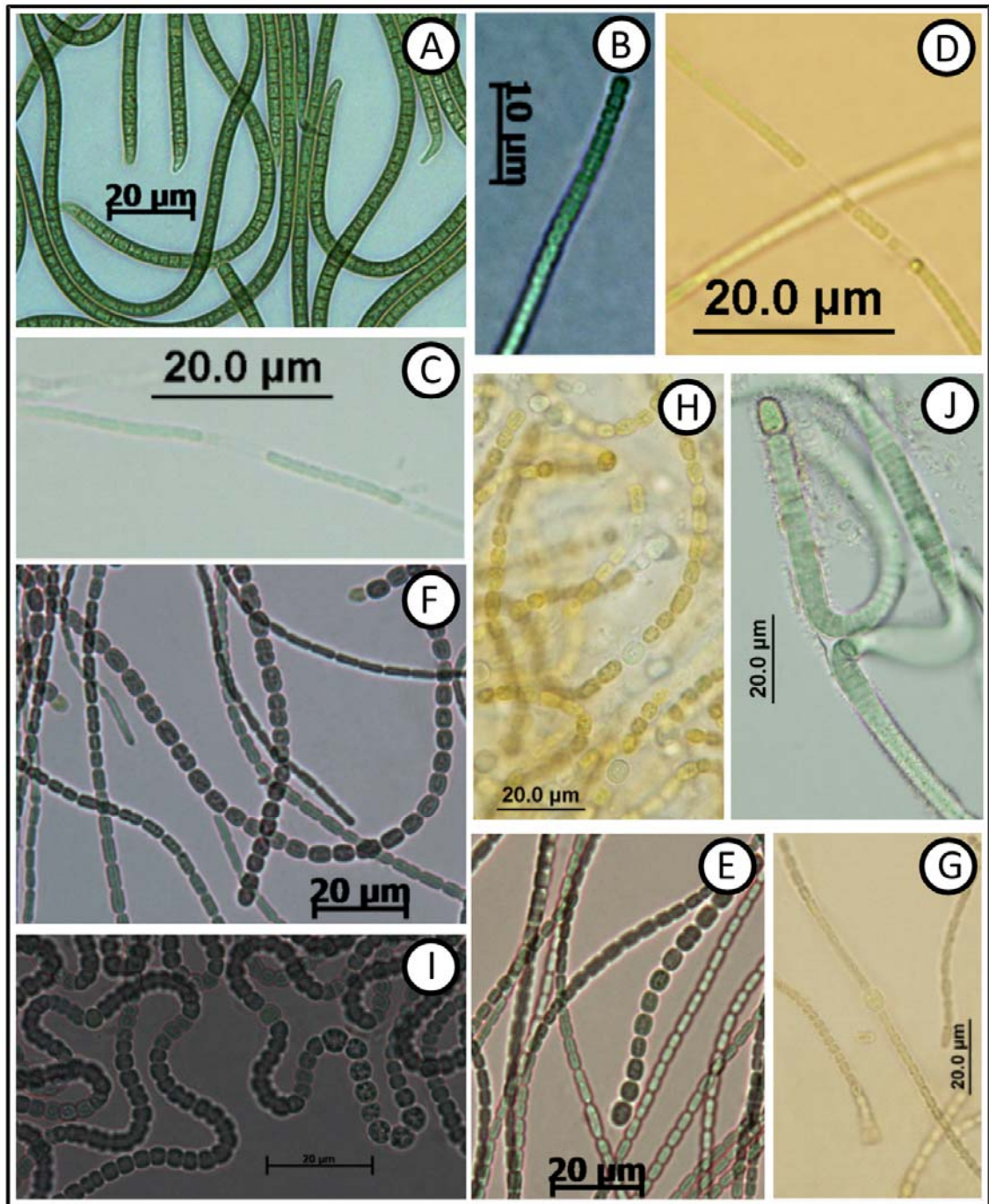


Figura 10 – Microfotografias das linhagens de cianobactérias utilizadas nesse estudo. A. *Phormidium* sp. CENA135; B. *Leptolyngbya* sp. CENA137; C. *Leptolyngbya* sp. CENA183; D. *Leptolyngbya* sp. CENA167; E. *Nostoc* sp. CENA158; F. *Nostoc* sp. CENA159; G. *Nostoc* sp. CENA160; H. *Nostoc* sp. CENA175; I. *Nostoc* sp. CENA184; J. *Microchaete* sp. CENA176

6.2 Amplificação por PCR e sequenciamento do gene *rpoC1*

Dezesseis linhagens de cianobactérias isoladas de manguezais do Estado de São Paulo tiveram o fragmento do gene *rpoC1* com aproximadamente 610 pares de base sequenciados com sucesso. Na Tabela 4 estão apresentados os valores de identidade e cobertura obtidos a partir da comparação pela ferramenta BLAST das 16 seqüências do gene de *rpoC1* geradas a partir das linhagens isoladas com outras disponíveis em banco de dados públicos (Anexo B).

Com exceção das seqüências das linhagens de cianobactérias *Cyanothece* sp. CENA169 e *Synechococcus* sp. CENA177 que apresentaram valores elevados de identidade com seqüências das linhagens *Anabaena* cf. *fallax* CENA208 (99,0% e 99,1%) e *Anabaena crassa* CENA202 (98,8% e 99,1%) isoladas de reservatórios do Estado de São Paulo, as seqüências das demais linhagens de cianobactérias isoladas obtiveram valores baixos de identidade na comparação com outras seqüências depositadas no banco de dados públicos do GenBank.

As seqüências das linhagens unicelulares *Chlorogloea* sp. CENA146, *Synechococcus* sp. CENA154, *Synechococcus* sp. CENA162, *Aphanocapsa* sp. CENA171, *Chlorogloea* sp. CENA174, *Synechococcus* sp. CENA179, *Synechocystis* sp. CENA180 e Xenococcaceae CENA186 apresentaram valores de identidade que variaram de 87,6% a 90,2% com as seqüências das linhagens *Synechococcus* sp. PCC6307 e *Synechococcus* sp. (isolada de um lago de água doce no Parque Nacional de Yosemite, EUA) e *Synechococcus* sp. SS9401 (isolada do Mar de Sargaços).

As seqüências das linhagens filamentosas heterocitadas *Nostoc* sp. CENA158, *Nostoc* sp. CENA159 e *Nostoc* sp. CENA160 apresentaram valores de identidade que variaram de 77,4% a 88,2% com as seqüências das linhagens produtoras de toxina de *Aphanizomenon* sp. 10E6, *Anabaenopsis circularis* e *Nostoc* sp. 152 isoladas respectivamente de lagoas de água doce da Alemanha, Japão e Finlândia.

A seqüência da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 apresentou valores de identidade com as seqüências das linhagens *Nostoc* sp. PCC 7120 (88,5%), *Anabaena* sp. (88,5%) e *Anabaenopsis circularis* (86,9%); enquanto que a seqüência da linhagem *Microchaete* sp. CENA176 apresentou valores de identidade com as seqüências das linhagens *Fischerella* sp. PCC7414 (81,4%), *Anabaena* sp. XP6C (81,3%) e *Anabaena* sp. XPORK36C (80,4%). A seqüência da linhagem *Nostoc* sp. CENA184 apresentou valores de identidade com as seqüências das linhagens *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (87,0%), *Nostoc* sp. 152 (87,1%) e *Nodularia spumigena* F81(85,1%).

Tabela 4 – Identities (%) das sequências de *rpoCI* (± 610 pares de base, sem iniciadores) geradas a partir das linhagens selecionadas para este estudo com outras sequências depositadas no *GenBank*

Ordem	Linhagem	Cobertura (%)	Identidade (%)	Organismo mais próximo no GenBank (no. de acesso)
Chroococcales	<i>Chlorogloea</i> sp.CENA146	99	88,9	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	88,4	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
		99	88,2	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA154	98	88,6	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		98	88,4	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
		99	87,9	<i>Synechococcus</i> sp. CC9701 (AF155131)
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA162	99	90,2	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	89,3	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
		99	87,6	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
	<i>Cyanothece</i> sp. CENA169	100	99,0	<i>Anabaena</i> cf. <i>fallax</i> CENA208 (FJ830565)
		100	98,8	<i>Anabaena crassa</i> CENA202 (FJ830561)
		99	84,6	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
	<i>Aphanocapsa</i> sp.CENA171	99	88,6	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	88,3	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
		99	88,1	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
	<i>Chlorogloea</i> sp.CENA174	99	88,9	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	88,5	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
		99	88,2	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA177	100	99,1	<i>Anabaena</i> cf. <i>fallax</i> CENA208 (FJ830565)
		100	99,1	<i>Anabaena crassa</i> CENA202 (FJ830561)
		99	84,6	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)

Tabela 4 – Identidades (%) das sequências de *rpoCI* (± 610 pares de base, sem iniciadores) geradas a partir das linhagens selecionadas para este estudo com outras sequências depositadas no *GenBank*

	<i>Synechococcus</i> sp. CENA179	99	88,7	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	88,2	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
		99	88,1	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
	<i>Synechocystis</i> sp CENA180	99	89,7	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
		99	89,6	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	88,1	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
	Xenococcaceae CENA186	99	88,4	<i>Synechococcus</i> sp. PCC6307 (U52342)
		99	87,9	<i>Synechococcus</i> sp. (E.Lake) (SSU52343)
		99	87,8	<i>Synechococcus</i> sp. SS9401 (AF154563)
Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	99	88,3	<i>Nostoc</i> sp. 152 (AY424997)
		99	85,2	<i>Anabaenopsis circularis</i> (AF159374)
		95	77,4	<i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6 (FJ234850)
	<i>Nostoc</i> sp. CENA159	99	88,2	<i>Nostoc</i> sp. 152 (AY424997)
		99	85,2	<i>Anabaenopsis circularis</i> (AF159374)
		95	77,4	<i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6 (FJ234850)
	<i>Nostoc</i> sp. CENA160	99	88,1	<i>Nostoc</i> sp. 152 (AY424997)
		99	85,3	<i>Anabaenopsis circularis</i> (AF159374)
		95	77,3	<i>Aphanizomenon</i> sp. 10E6 (FJ234850)
	<i>Nostoc</i> sp. CENA175	99	88,5	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (BA000019)
		99	88,5	<i>Anabaena</i> sp. (M60831)
		99	86,9	<i>Anabaenopsis circularis</i> (AF159374)
	<i>Microchaete</i> sp. CENA176	99	81,4	<i>Fischerella</i> sp. PCC7414 (Z11153)
		97	81,3	<i>Anabaena</i> sp. XP6C (EF568864)
		99	80,4	<i>Anabaena</i> sp. XPORK36C (EF568867)
	<i>Nostoc</i> sp. CENA184	99	87,0	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
		99	87,1	<i>Nostoc</i> sp. 152 (AY424997)
		99	85,1	<i>Nodularia spumigena</i> F81 (AY424998)

A árvore filogenética gerada usando as sequências de *rpoCI* obtidas das linhagens de cianobactérias isoladas dos ecossistemas de manguezais revelou a formação de dois principais clados (Figura 11).

No primeiro clado ficaram agrupadas todas as linhagens heterocitadas pertencentes à ordem Nostocales (*Nostoc* e *Microchaete*) e duas linhagens incluídas na ordem Chroococcales (*Cyanothece* e *Synechococcus*). Dentro desse clado, formaram-se três subgrupos. No primeiro subgrupo ficaram somente sequências de linhagens de cianobactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Nostoc*. No ramo mais interno desse subgrupo e com valor de reamostragem de 100% agruparam-se as sequências das linhagens *Nostoc* sp. CENA158, *Nostoc* sp. CENA159, *Nostoc* sp. CENA160, *Nostoc* sp. CENA184 do ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso. Ainda nesse clado, o segundo subgrupo formado agregou membros do gênero *Anabaena* e a linhagem *Nostoc* sp. CENA175 isolada do manguezal de Bertioxa com 59% de valor de reamostragem. Embora afiliada a esse subgrupo, a sequência da linhagem *Nostoc* sp. CENA175 parece estar distantemente relacionada às demais sequências desse subgrupo. No terceiro subgrupo estão agrupadas as sequências das linhagens unicelulares *Cyanothece* sp. CENA169 e *Synechococcus* sp. CENA177 isoladas do manguezal da Ilha do Cardoso com as sequências de linhagens filamentosas heterocitadas de *Anabaena* cf. *fallax* CENA208 e *Anabaena crassa* CENA202 provenientes de corpos d'água doce do Estado do São Paulo. A sequência da linhagem *Microchaete* sp. CENA176 não se agrupou com nenhuma outra sequência na árvore filogenética.

O segundo clado foi formado exclusivamente pelas formas unicelulares de cianobactérias (Chroococcales). Esse clado foi dividido em dois agrupamentos menores que apresentaram valores de reamostragem de 69% e 99%. No agrupamento com valor de reamostragem de 69% estão incluídas somente espécies de *Synechococcus* isoladas de ambientes marinhos provenientes de amostras do Oceano Atlântico, Corrente da Califórnia e do Mar de Sargãos. As linhagens de cianobactérias isoladas nesse estudo ficaram contidas no segundo agrupamento que apresentou elevado valor de reamostragem (99%). Esse valor indica que essas linhagens estão bem suportadas filogeneticamente e podem representar um novo grupo de sequências ainda não descritas.

A utilização do gene *rpoCI* para estudar a posição filogenética das linhagens de cianobactérias isoladas foi dificultada pela carência de sequências isoladas de ambientes similares como os manguezais. Observa-se pela análise da árvore filogenética que os membros de *Nostoc* (Nostocales) tiveram correspondência com outras sequências retiradas de banco de dados, enquanto que os membros da ordem Chroococcales formaram um clado

coeso onde nenhuma outra sequência foi inserida durante as simulações para construção da árvore filogenética. De acordo com Han, Fan e Hu (2009) o gene *rpoCI* fornece baixo sinal cladístico em função de que a maioria de suas substituições ocorrem na posição do terceiro códon e por seu caráter homoplásico. Os resultados obtidos para a linhagem *Cyanothece* sp. CENA169 e *Synechococcus* sp. CENA177 pode ser explicado pela homoplasia desse gene uma vez que três tentativas independentes de clonagem e sequenciamento retornaram o mesmo resultado.

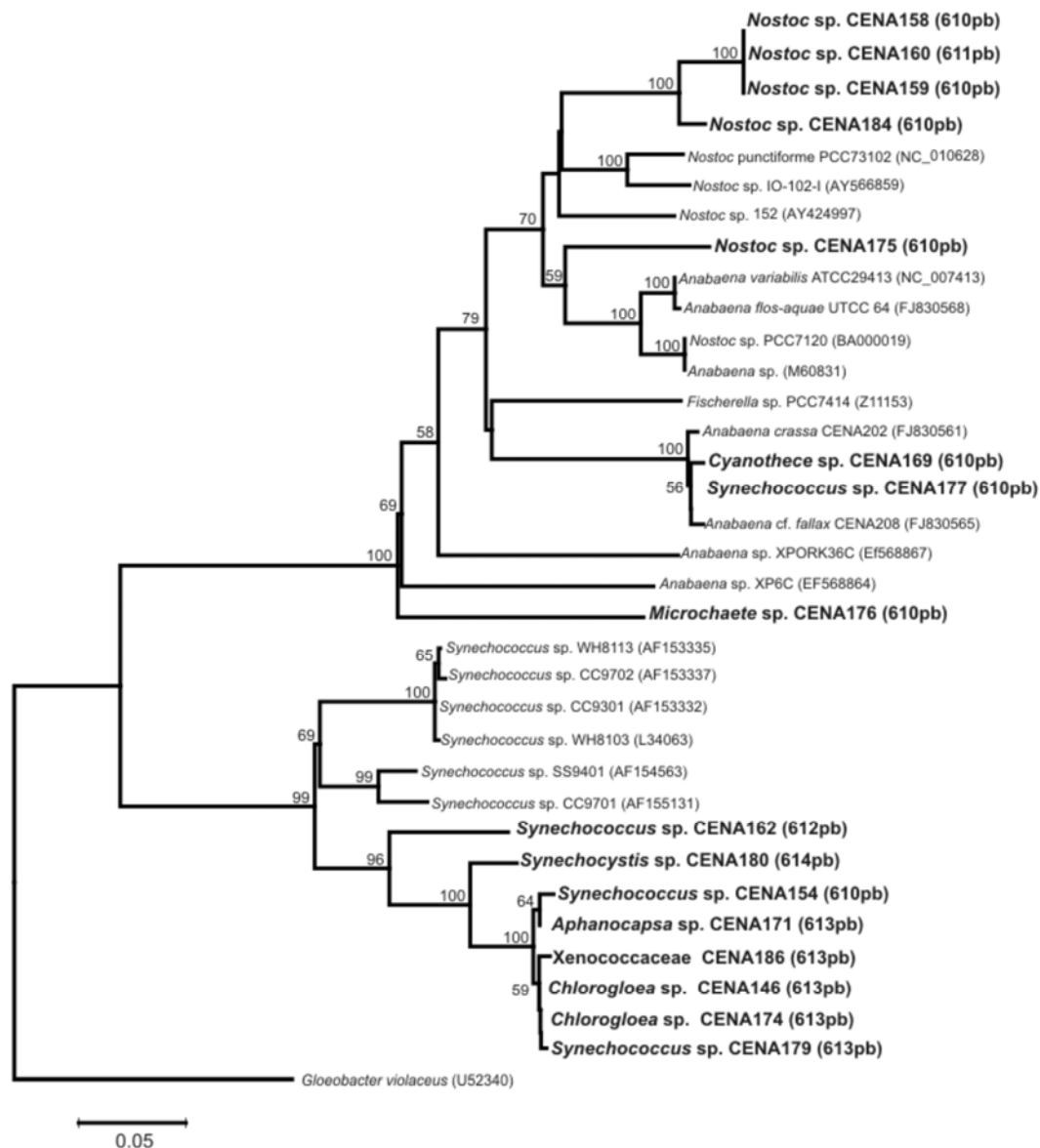


Figura 11 – Análise filogenética de sequências do gene *rpoCI* usando o método de *Neighbor-joining* (NJ). As sequências geradas nesse estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

6.3 Amplificação por PCR e sequenciamento do gene *nifH*

O gene *nifH* teve uma região amplificada (aproximadamente 325 pares de base) com sucesso em 21 das 27 linhagens de cianobactérias testadas, usando a técnica de “PCR *nested*”. As condições de amplificação das reações foram otimizadas visando aumentar a especificidade da reação e a obtenção de bandas únicas no perfil eletroforético. Para tanto, as temperaturas de anelamento da primeira e segunda reação foram aumentadas em 1°C e 3°C, respectivamente, em relação à temperatura recomendada por Zehr e Turner (2001). Seis linhagens de cianobactérias não tiveram o fragmento do gene *nifH* encontrado. Para essas linhagens verificou-se apenas a presença de fragmentos de *nifH* de outros grupos de bactérias diazotróficas. A ausência desse fragmento gênico nas linhagens de cianobactérias sugere a inexistência desse gene em seu genoma. Entretanto, modificações na sequência de nucleotídeos na região de ancoramento do conjunto degenerado de oligonucleotídeos específicos pode ter limitado a detecção do fragmento do gene *nifH* nessas linhagens de cianobactérias. Durante anos, culturas puras da espécie da cianobactéria *Microcoleus chthonoplastes* não revelaram atividade do complexo enzimático da nitrogenase nem a expressão do gene *nifH* (RIPPKA et al., 1979; STEPPE et al., 1996). Somente em 2009, Bolhuis et al. (2009), testando oligonucleotídeos específicos desenhados para espécies da cianobactéria *M. chthonoplastes*, demonstraram que todas as linhagens testadas continham o agrupamento de genes estruturais para a fixação biológica do nitrogênio corroborando os dados obtidos pelo seqüenciamento do genoma da linhagem *M. chthonoplastes* PCC7420 onde também foi encontrado o agrupamento completo dos genes *nif* (RUBIO; LUDDEN, 2008). Segundo esses autores, a interpretação desse dado dificulta e subestima a contribuição desses micro-organismos para o fluxo do nitrogênio uma vez que indica a incapacidade dos mesmos na realização da FBN (BOLHUIS et al., 2009).

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de identidade e cobertura obtidos por meio da análise BLAST das 21 seqüências de *nifH* geradas a partir das linhagens isoladas dos manguezais do Estado de São Paulo (Anexo C).

Tabela 5 – Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (± 325 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens selecionadas para este estudo com outras sequências depositadas no GenBank

Ordem	Linhagem	Cobertura (%)	Identidade (%)	Organismos mais próximos no GenBank (no. de acesso)
Chroococcales	<i>Synechococcus</i> sp. CENA136	98	84,1	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 (CP001344)
		98	83,0	<i>Lyngbya wollei</i> (EF397888)
		100	80,1	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (CP000117)
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA140	100	89,8	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7104 (AY768415)
		99	88,3	<i>Lyngbya lagerheimii</i> UTEX 1930 (L15550)
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA146	100	92,3	<i>Anabaena</i> sp. I1 (AF124378)
		98	91,9	<i>Anabaenopsis</i> sp. NRE1 (AY461415)
		99	91,4	<i>Anabaena</i> sp. CH1 (DQ294216)
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA149	100	90,1	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
		98	90,0	<i>Nostoc</i> sp. N2 (AF124379)
		95	90,6	<i>Nostoc</i> sp. MFG-1 (DQ531687)
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA152	100	90,1	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
		98	90,0	<i>Nostoc</i> sp. N2 (AF124379)
		95	90,6	<i>Nostoc</i> sp. MFG-1 (DQ531687)
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA153	99	94,8	<i>Anabaena</i> sp. L-31 (L04499)
		100	94,4	<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012 (DQ176436)
		94	94,8	<i>Anabaena</i> sp. CA (L15553)
	<i>Synechococcus</i> sp. CENA164	97	87,8	<i>Myxosarcina</i> sp. (U73133)
		99	83,7	<i>Richelia</i> sp. SC01 (DQ225765)
		99	83,5	<i>Richelia</i> sp. SC01 (DQ225762)
	<i>Cyanothece</i> sp. CENA169	97	87,8	<i>Myxosarcina</i> sp. (U73133)
		98	86,3	<i>Xenococcus</i> sp. (U73135)
	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA174	97	88,4	<i>Myxosarcina</i> sp. (U73133)
		98	86,9	<i>Xenococcus</i> sp. (U73135)
99		84,0	<i>Richelia</i> sp. SC01 (DQ225765)	

Tabela 5 – Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (± 325 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens selecionadas para este estudo com outras sequências depositadas no GenBank

	<i>Chlorogloea</i> sp. CENA181	99	91,9	<i>Mastigocladus laminosus</i> CCME 5323 (EF570556)
		100	91,3	<i>Mastigocladus laminosus</i> CCME 5272 (EF570560)
		100	91,3	<i>Mastigocladus laminosus</i> CCME 5326 (EF570559)
	Xenococcaceae CENA186	97	87,8	<i>Myxosarcina</i> sp. (U73133)
		98	86,4	<i>Xenococcus</i> sp. (U73135)
		99	83,4	<i>Richelia</i> sp. SC01 (DQ225765)
Oscillatoriales	<i>Phormidium</i> sp. CENA135	97	87,8	<i>Myxosarcina</i> sp. (U73133)
		98	86,4	<i>Xenococcus</i> sp. (U73135)
		99	83,4	<i>Richelia</i> sp. SC01 (DQ225765)
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA137	95	90,6	<i>Nostoc</i> sp. MFG-1 (DQ531687)
		95	90,6	<i>Nostoc</i> sp. MCT-1 (DQ531680)
		99	90,0	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA167	98	93,7	<i>Anabaena</i> sp. I1 (AF124378)
		98	93,1	<i>Anabaenopsis</i> sp. NRE1 (AY461415)
		98	92,5	<i>Nodularia sphaerocarpa</i> (EU381377)
	<i>Leptolyngbya</i> sp. CENA183	98	86,3	<i>Xenococcus</i> sp. (U73135)
		99	83,4	<i>Richelia</i> sp. SC01 (DQ225765)
		98	83,4	<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012 (DQ176436)
Nostocales	<i>Nostoc</i> sp. CENA158	100	90,1	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
		98	90,0	<i>Nostoc</i> sp. N2 (AF124379)
		95	90,6	<i>Nostoc</i> sp. MFG-1 (DQ531687)
	<i>Nostoc</i> sp. CENA159	99	92,9	<i>Anabaena</i> sp. I1 (AF124378)
		99	92,2	<i>Anabaenopsis</i> sp. NRE1 (AY461415)

Tabela 5 – Porcentagem de identidade entre as sequências de *nifH* (± 325 pares de base, sem iniciadores) geradas das linhagens selecionadas para este estudo com outras sequências depositadas no GenBank

	98	91,5	<i>Nodularia sphaerocarpa</i> (EU381377)
<i>Nostoc</i> sp. CENA160	98	89,7	<i>Nostoc muscorum</i> UTEX 1933 (U04054)
	100	88,9	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (CP001037)
	97	89,3	<i>Nodularia harveyana</i> CCAP 1452 (AY768424)
<i>Nostoc</i> sp. CENA175	99	96,3	<i>Anabaena</i> sp. L-31 (L04499)
	100	95,0	<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012 (DQ176436)
	99	94,4	<i>Anabaena azotica</i> FACHB-118 (DQ294218)
<i>Microchaete</i> sp. CENA176	99	91,6	<i>Mastigocladus laminosus</i> CCME 5323 (EF570556)
	100	91,0	<i>Mastigocladus laminosus</i> CCME 5272 (EF570560)
	100	91,0	<i>Mastigocladus laminosus</i> CCME 5326 (EF570559)
<i>Nostoc</i> sp. CENA184	100	92,3	<i>Anabaena</i> sp. I1 (AF124378)
	98	91,9	<i>Anabaenopsis</i> sp. NRE1 (AY461415)
	99	91,4	<i>Anabaena</i> sp. CH1 (DQ294216)

As sequências das linhagens *Nostoc* sp. CENA158 e *Nostoc* sp. CENA160 apresentaram valores de identidade superiores a 89,7% e com correspondência ao nível de gênero com outras linhagens de cianobactérias depositadas no GenBank. A sequência da linhagem *Nostoc* sp. CENA158 obteve 90,1% de identidade com *Nostoc punctiforme* PCC 73102 isolada a partir de uma associação simbiótica com *Macrozamia* sp., uma cicadácea encontrada na Austrália, enquanto que a sequência de *Nostoc* sp. CENA160 mostrou 89,7% de identidade com a espécie *Nostoc muscorum* UTEX1933 isolada do delta do Rio Mississippi nos Estados Unidos.

Na comparação ao nível de família, os valores de identidade variaram de 84,1 a 96,3% entre as sequências das linhagens utilizadas nesse estudo com outras depositadas no banco de dados GenBank. Dentro da família Synechococcaceae a sequência da linhagem *Synechococcus* sp. CENA136 exibiu 84,1% de identidade com a sequência da linhagem *Cyanothece* sp. PCC7425. Na família Xenococcaceae a sequência da linhagem *Xenococcaceae* CENA186 obteve 87,8% de identidade com sequência da linhagem *Myxosarcina* sp. Na família Nostocaceae as sequências das linhagens *Nostoc* sp. CENA159, *Nostoc* sp. CENA175, *Nostoc* sp. CENA184 mostraram 92,9, 96,3 e 92,3% de identidade, respectivamente, com as sequências das linhagens *Anabaena* sp. II, *Anabaena* sp. L-31 e *Anabaena* sp. II.

Na comparação entre sequências ao nível de ordem, os valores de identidade variaram de 87,8 a 88,4% e somente foram verificados para as linhagens *Synechococcus* sp. CENA164 (87,8%), *Cyanothece* sp. CENA169 (87,8%) e *Chlorogloea* sp. CENA174 (88,4%) incluídas na ordem Chroococcales. Para as sequências das demais linhagens de cianobactérias, os valores de identidade variaram de 86,4 a 94,8% e não mostraram correspondência com o nível de ordem, no entanto, retornaram resultados de outros representantes do grupo das cianobactérias.

A comparação entre sequências de *nifH* geradas nesse estudo com outras depositadas no banco de dados público do NCBI pela ferramenta BLAST indicou a sobreposição dos valores de identidade para o nível de família (84,1 - 96,3%) com os níveis de gênero (89,7 - 90,1%) e ordem (87,8 - 88,4%) e abrangência dos valores de identidade para as sequências não relacionadas ao nível de ordem (86,4 - 94,8%) com os níveis de gênero (89,7 - 90,1%), família (84,1 - 96,3%) e ordem (87,8 - 88,4%). Essa distorção na correspondência entre os valores de identidade e o nível taxonômico pode estar relacionada à existência de um banco de dados com número restrito de sequências do fragmento do gene *nifH* e também de sequências provenientes de ambientes tropicais.

Até o momento, o banco de dados de domínio público do NCBI possui 1.162 entradas para sequências do fragmento do gene *nifH*. Desse total apenas 252 entradas (21,7%) correspondem a sequências obtidas a partir de linhagens de cianobactérias isoladas e identificadas morfológicamente. As demais entradas para essas sequências (910 – 78,3%) estão categorizadas como pertencentes às cianobactérias não-cultiváveis. O grande número de sequências incluídas nessa categoria pode estar relacionado ao uso dos conjuntos de iniciadores em estudos de comunidade bacteriana principalmente de ambientes marinhos. Esses estudos empregam técnicas de identificação molecular independentes de cultivo e, portanto, fornecem informações limitadas a respeito da identificação morfológica do micro-organismo presente no ambiente.

A árvore filogenética gerada usando sequências de *nifH* obtidas das linhagens de cianobactérias isoladas e de outras sequências retiradas do banco de dados do GenBank revelou a formação de dois principais clados contendo as cianobactérias isoladas dos ecossistemas de manguezais (Figura 12).

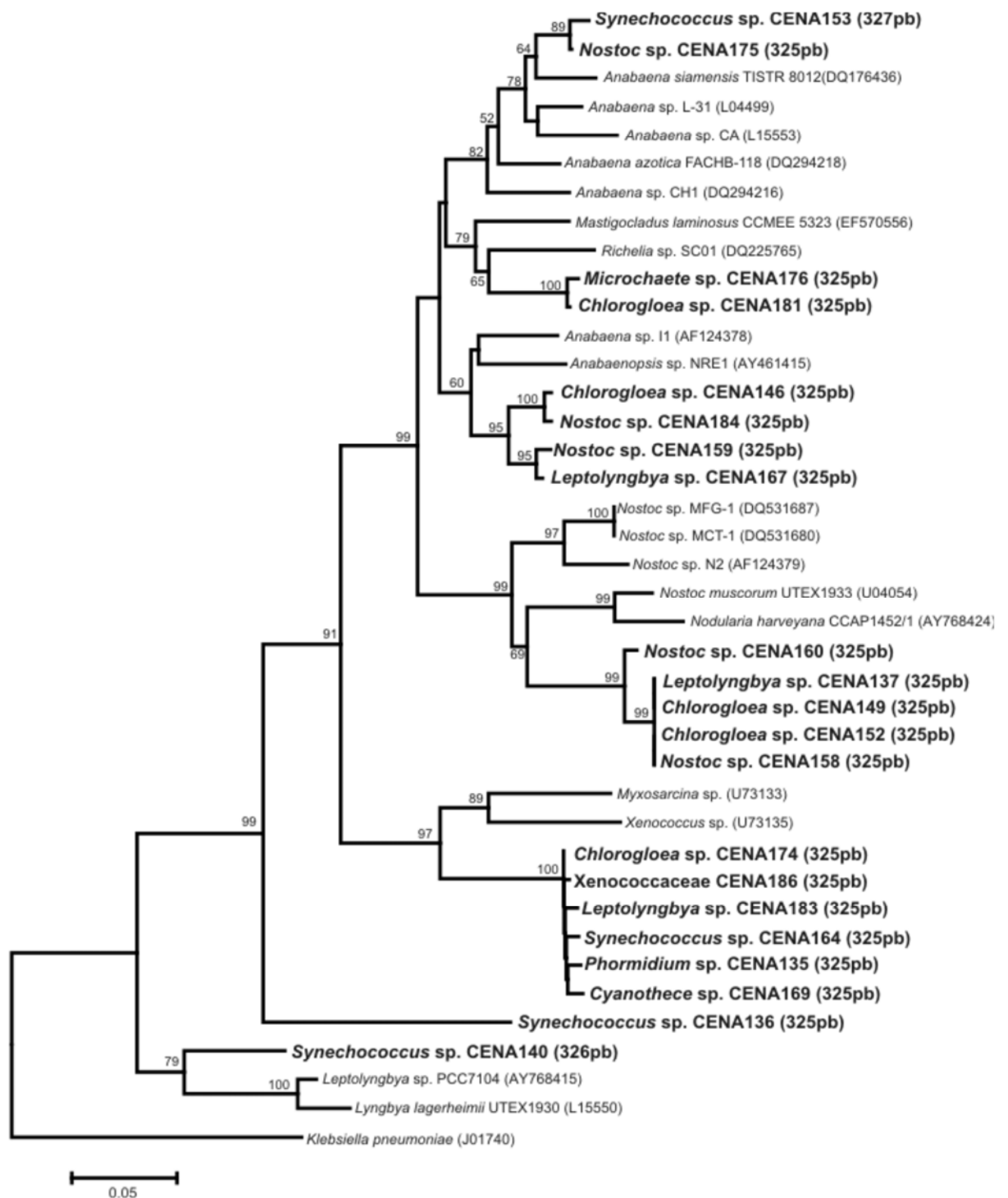


Figura 12 – Análise filogenética de sequências do gene *nifH* usando o método de *Neighbor-joining* (NJ). As sequências geradas nesse estudo estão em negrito. Os valores de reamostragem acima de 50% estão apresentados em cada nó

No primeiro clado formado com 79% de valor de reamostragem foram incluídas as linhagens *Synechococcus* sp. CENA140 isolada do ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso e as linhagens *Leptolyngbya* sp. PCC7104 (isolada de solo e rochas de praia em Montauk Point, Long Island, Nova York, EUA) e *Lynngbya lagerheimii* UTEX1930.

O segundo clado apresentou valor de reamostragem de 99% e incluiu 20 sequências geradas nesse trabalho em um total de 36 sequências. Esse grupo de sequências foi subdividido em 5 agrupamentos menores com valores de reamostragem de 82, 79, 60, 99 e 97% indicando estarem bem suportados filogeneticamente. Dentro desse clado, a sequência de *nifH* da linhagem *Synechococcus* sp. CENA136 não se agrupou com nenhuma outra sequência de membros de cianobactéria.

As linhagens *Synechococcus* sp. CENA153 e *Nostoc* sp. CENA175 isoladas respectivamente, dos ecossistemas de manguezais da Ilha do Cardoso e Bertioiga estão inseridas nesse primeiro subgrupo e apresentaram valor de reamostragem de 89% entre suas sequências. Valor de 100% de reamostragem entre sequências foi obtido para as linhagens *Microchaete* sp. CENA176 e *Chlorogloea* sp. CENA181, isoladas de Bertioiga e Ilha do Cardoso, respectivamente e estão posicionadas no segundo subgrupo. Todas as sequências inseridas no terceiro subgrupo pertencem a linhagens isoladas do manguezal da Ilha do Cardoso (*Chlorogloea* sp. CENA146, *Nostoc* sp. CENA184, *Nostoc* sp. CENA159 e *Leptolyngbya* sp. CENA167) e tiveram 95% de valor de reamostragem entre suas sequências. Dentro do quarto subgrupo somente linhagens isoladas do manguezal da Ilha do Cardoso estão incluídas e apresentam 99% de valor de reamostragem entre suas sequências. No quinto e maior subgrupo o valor de reamostragem entre as sequências foi de 100% e estão incluídas as linhagens *Chlorogloea* sp. CENA174, *Xenococcaceae* CENA186, *Leptolyngbya* sp. CENA183, *Synechococcus* sp. CENA164, *Phormidium* sp. CENA135 e *Cyanothece* sp. CENA169 isoladas dos ecossistemas de manguezais da Ilha do Cardoso e Bertioiga.

A análise da árvore filogenética revela que as sequências das linhagens de cianobactérias isoladas dos manguezais agrupam-se entre si com valores de reamostragem elevados. Esses valores variaram de 89 a 100% e indicam que essas sequências estão bem suportadas filogeneticamente. Os valores de reamostragem também sugerem que as sequências de nucleotídeos do fragmento do gene *nifH* são muito similares entre as linhagens isoladas dos ecossistemas de manguezais. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos que reportam o caráter conservado desse fragmento gênico entre todos os grupos de microorganismos (ZEHR; CAPONE et al., 1996).

Apesar da proximidade genética entre essas linhagens, os agrupamentos formados na árvore filogenética não refletiram o posicionamento dessas linhagens de acordo com a identificação por morfotipos de cianobactérias. Agrupamentos contendo formas unicelulares (Chroococcales), filamentosas (Oscillatoriales) e filamentosas heterocitadas (Nostocales) são observados em três dos cinco clados formados. De maneira geral, os resultados obtidos não condizem com aqueles disponíveis na literatura nos quais é mencionada a utilização desse fragmento gênico na comparação das relações de parentesco com a morfologia das espécies de cianobactérias. Ainda, esses trabalhos sugerem correlação positiva entre a topologia da árvore gerada com sequências de *nifH* com aquela obtida a partir de sequências do RNAr 16S (ZEHR; CAPONE et al., 1996, ZEHR et al., 2003; ZEHR; MELLON; HIORNS, 1997; BEN-PORATH; ZEHR, 1994).

Young (2000) em seu trabalho sobre a evolução molecular dos organismos diazotróficos apresenta três explicações para os casos em que a filogenia de um organismo não é refletida pela análise de seus genes. Na primeira delas enfatiza que similaridade alta entre sequências pode ser consequência de convergência evolutiva em resposta à pressões seletivas do ambiente. A segunda possibilidade levantada por esse autor refere-se à comparação de sequências homólogas originadas por eventos de duplicação e/ou divergência genética originando, respectivamente sequências parálogas e ortólogas. A terceira explicação baseia-se na transferência horizontal de determinados genes e sua incorporação nos genomas de organismos hospedeiros.

De acordo com essas explicações e com os resultados obtidos pela árvore filogenética acredita-se que o gene funcional *nifH* tenha sofrido convergência evolutiva devido às pressões seletivas impostas pelos ecossistemas de manguezais embora não tenha sido constatada a formação de grupos de cianobactérias específicos para cada manguezal estudado. Sabe-se que em ambientes onde existe forte pressão seletiva as taxas de mutação para caracteres funcionais são aumentados em relação às mutações neutras e, portanto, eventos como esse podem estar ocorrendo no ambiente estudado.

A interpretação da árvore filogenética do gene *nifH* foi comprometida pelo número reduzido de sequências disponíveis nos bancos de dados públicos (NCBI) que tenham sido geradas a partir de linhagens de cianobactérias isoladas e identificadas morfologicamente. Esse é o primeiro trabalho envolvendo o seqüenciamento do gene *nifH* em espécies de cianobactérias brasileiras obtidas a partir de linhagens isoladas de ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo. Portanto, o caráter inédito dessas sequências geradas, somado ao número restrito de sequências no banco de dados pode ter dificultado uma melhor

compreensão das relações filogenéticas desse grupo de micro-organismos ou ter revelado um novo e coerente grupo de cianobactérias dentre os já existentes.

6.4 Análise da atividade da nitrogenase e atividade específica da nitrogenase

A atividade da nitrogenase avaliada em 27 isolados pela análise de redução de acetileno (ARA) em cromatógrafo a gás foi positiva para 6 linhagens (22,2%) incluídas nas ordens Chroococcales e Nostocales. Essas linhagens apresentaram atividade da nitrogenase para os tratamentos com luz e/ou escuro nas condições aeróbicas empregadas. Pela definição da técnica de ARA os valores de conversão do acetileno (C_2H_2) em etileno (C_2H_4) detectados por cromatografia gasosa permitem fazer uma relação direta e proporcional com a atividade da enzima nitrogenase presente nos micro-organismos.

Nos membros da ordem Nostocales, a fotossíntese e a FBN ocorrem simultaneamente na cianobactéria devido à existência de um mecanismo de separação espacial entre esses dois processos. Nesse caso, a fotossíntese ocorre nas células vegetativas, enquanto que a FBN é realizada no interior de células especializadas conhecidas como heterócitos que protegem a enzima nitrogenase do efeito deletério do oxigênio molecular. Nas linhagens isoladas nesse trabalho e pertencentes a essa ordem, três padrões distintos de resultado de atividade da nitrogenase foram identificados. O padrão mais reportado para esse grupo de micro-organismos é aquele em que a atividade do complexo enzimático da nitrogenase somente ocorre durante o período claro quando a fotossíntese está ativa e existe a produção de formas reduzidas de carbono que sustentam a FBN (HROUZEK; LUKESOVA; SIMEK, 2004). Esse sistema foi encontrado apenas na linhagem *Microchaete* sp. CENA176 isolada da camada de solo entre 0 e 10 cm de profundidade do manguezal de Bertioiga no ponto mais próximo à restinga e mais afetado pelo derramamento de petróleo (Tabela 9). Curiosamente, as linhagens *Nostoc* sp. CENA158, *Nostoc* sp. CENA160 e *Nostoc* sp. CENA184 demonstraram atividade da nitrogenase em ambos os tratamentos (claro e escuro) indicando que esse sistema opera durante 24 horas e que essas linhagens apresentam boa adaptação fisiológica na conversão e armazenamento de carboidratos visto que a FBN é energeticamente custosa (YUNES et al., 1990). Nota-se, no entanto, que essas linhagens mostram tendência de diminuição da atividade da nitrogenase quando mantidas sob as condições de escuro (Tabela 9). Essas linhagens foram isoladas a partir de amostras de solo e água coletadas no ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso. Em oposição ao padrão esperado para esse grupo de cianobactérias a linhagem *Nostoc* sp. CENA175 apresentou atividade da nitrogenase somente

para o período de escuro (Tabela 9). Essa linhagem foi isolada a partir da mesma amostra ambiental que a linhagem *Microchaete* sp. CENA176. Atividade da nitrogenase em períodos de escuro já foi verificada para espécies representantes desse grupo de micro-organismos, porém na maioria delas os valores encontrados foram baixos e considerados como FBN residual da etapa de FBN durante o período claro (HROUZEK; LUKESOVA; SIMEK, 2004).

Para os membros das ordens Chroococcales e Oscillatoriales existe a separação temporal entre os processos da fotossíntese e da FBN. Por essa estratégia a FBN fica restrita aos períodos de escuro quando a fotossíntese está cessada e não existe a inibição do complexo enzimático da nitrogenase pelo oxigênio produzido durante esse processo. Nesse mesmo período as taxas de respiração são elevadas e consomem o restante do oxigênio difundido entre as células. No entanto, alguns representantes dessas ordens podem exibir variações entre os padrões de variação espacial e temporal (BERGMAN-FRANK et al., 2001; COMPAORÉ; STAL, 2010). Nesse sistema “híbrido” de FBN, a separação espacial é promovida pela formação de colônias e agregados celulares e a separação temporal pela sua ocorrência durante a etapa de escuro. As células vegetativas presentes mais internamente aos agregados celulares sofrem alterações de função passando de fixadoras de carbono a fixadoras de nitrogênio. Nesse caso, as alterações enzimáticas sofridas por essas células vegetativas são reversíveis diferentemente do que ocorre nos heterócitos dos membros heterocitados. Esse sistema é encontrado nas formas filamentosas de *Trichodesmium* (BERGMAN-FRANK et al., 2001) e acredita-se que na forma unicelular de *Gloeotheca* sp. PCC6909 (COMPAORÉ; STAL, 2010).

Somente a linhagem Xenococcaceae CENA186 representante da ordem Chroococcales apresentou resultado positivo para atividade do complexo enzimático da nitrogenase. Essa linhagem foi isolada a partir de amostra de solo coletada entre as profundidades de 0 a 10 cm no ponto mais próximo à restinga do ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso. A linhagem Xenococcaceae CENA186 mostrou atividade da nitrogenase para os tratamentos com luz e no escuro indicando um padrão incomum de atividade dessa enzima para esse grupo de micro-organismos. Esperava-se encontrar atividade da nitrogenase somente no período de escuro quando a fotossíntese está inativa e não existe a liberação de oxigênio, o qual inibe a ação enzimática da nitrogenase. Embora não exista diferença estatística entre os tratamentos é possível notar a predominância de atividade da nitrogenase durante o período de escuro com decaimento dessa atividade durante o período claro. Sugere-se desse modo que a tendência de diminuição da nitrogenase durante o período de luz é ocasionada pela produção de oxigênio molecular durante a fotossíntese (Tabela 9). Suspeita-se também que o sistema

“híbrido” de FBN possa estar presente nessa linhagem de cianobactéria, porém estudos empregando variações dos teores de oxigênio e de técnicas mais precisas e de monitoramento contínuo das taxas de redução de acetileno, como o sistema *on-line* de medição devem ser utilizadas para confirmar essa hipótese.

Todas as linhagens que tiveram atividade da nitrogenase para os tratamentos com luz e no escuro (*Nostoc* sp. CENA158, *Nostoc* sp. CENA160, *Nostoc* sp. CENA184 e *Xenococcaceae* CENA186) foram isoladas de amostras de solo e água coletadas no ecossistema de manguezal da Ilha do Cardoso. As linhagens que apresentaram variação da atividade da nitrogenase entre os tratamentos de luz e escuro foram isoladas a partir de amostras de solo coletadas no manguezal de Bertioga (*Nostoc* sp. CENA175 e *Microchaete* sp. CENA176). Esses resultados sugerem que os sistemas de FBN adotados por essas linhagens foram fortemente influenciados por pressões seletivas do ambiente, as quais podem estar relacionadas ao grau de perturbação de cada ecossistema de manguezal estudado.

Segundo Zehr e Capone (1996) medições das taxas de FBN pelas técnicas de redução de acetileno ou ^{15}N marcado informam sobre as taxas de conversão no momento da obtenção das medidas, mas fornecem informações limitadas sobre os fatores regulatórios da FBN. Esses mesmos autores salientam que quando as taxas de conversão não são detectadas por essas técnicas, extrapolações sobre a causa da inatividade não podem ser confirmadas. Entretanto, algumas considerações sobre a ausência de atividade da nitrogenase serão discutidas a seguir.

Os resultados negativos de atividade da nitrogenase verificados para o restante das linhagens de cianobactérias podem estar relacionados à inexistência dos genes responsáveis pela codificação desse sistema enzimático nas linhagens mencionadas. No entanto, os resultados obtidos pelo seqüenciamento do fragmento do gene *nifH*, responsável pela codificação da nitrogenase redutase, demonstraram que esse gene está amplamente distribuído entre as linhagens de cianobactérias testadas. Somente as linhagens *Synechococcus* sp. CENA154, *Synechococcus* CENA162, *Aphanocapsa* sp. CENA171, *Synechococcus* CENA177, *Synechococcus* CENA179 e *Synechocystis* CENA180 apresentaram relação entre os resultados negativos de atividade da nitrogenase com a ausência do fragmento do gene *nifH* indicando ser a ausência do aparato genético envolvido na FBN o responsável pela falta da atividade da nitrogenase nessas linhagens.

Nas demais linhagens de cianobactérias, que apresentaram o fragmento do gene *nifH* e ausência da atividade da nitrogenase, fatores externos como a concentração de formas reduzidas de nitrogênio, teores de oxigênio dissolvido, intensidade luminosa, temperatura,

concentração de elementos como boro e cálcio e concentração de fitohormônios podem ter inibido o complexo enzimático da nitrogenase (HROUZEK; LUKESOVA; SIMEK, 2004; COMPAORÉ; STAL, 2010; YUNES et al., 1990). Especula-se, entretanto, que a condição aeróbica empregada durante a condução do experimento tenha sido a principal causa da inibição dessa enzima nas linhagens testadas. Sabe-se que a manutenção prolongada de linhagens de cianobactérias em laboratório induz modificações na organização celular das formas heterocitadas e não heterocitadas desses micro-organismos, tais como a perda da capacidade de produção de mucilagem e da formação de colônias ou agregados celulares. Essas alterações possibilitam a difusão de formas reativas de oxigênio no interior das massas de cianobactéria provocando a inativação do complexo enzimático da nitrogenase (COMPAORÉ; STAL, 2010).

Como mencionado por Hrouzek, Lukesova e Simek (2004), a formação de envelopes mucilaginosos, a agregação dos filamentos no interior de densas colônias e a formação de biofilmes são os fatores que mais influenciam as taxas de atividade da nitrogenase para as formas heterocitadas de cianobactérias e podem até mesmo suplantarem em importância as taxas de formação dos heterócitos nesse grupo de micro-organismos. De fato, a cultura da linhagem heterocitada *Nostoc* sp. CENA159 não possui mais a capacidade de formação de colônia e não apresentou atividade da nitrogenase muito embora tenha tido o seu gene *nifH* sequenciado.

Para as formas não heterocitadas (Chroococcales e Oscillatoriales) as quais não possuem células verdadeiramente especializadas para realização da FBN, a formação de colônias ou de agregados celulares são as estratégias adotadas para favorecer a criação de condições anóxicas ou micro-anóxicas e onde o complexo enzimático da nitrogenase fica protegido contra os efeitos deletérios do oxigênio molecular. De modo que a perda da capacidade de formação desses agregados celulares pode ter efeito na inibição da atividade da nitrogenase nas linhagens de cianobactérias estudadas. Vale ressaltar que todas as linhagens estudadas foram isoladas de ecossistemas de manguezais onde predominam condições anaeróbicas de tensão de oxigênio e, portanto assume-se que em seu ambiente natural essas espécies não tenham seu complexo enzimático da nitrogenase inativado pela ação do oxigênio e consigam realizar a FBN.

Para as linhagens de cianobactérias com resultado positivo de atividade da nitrogenase calculou-se as atividades específicas relacionando os valores de atividade da nitrogenase com os de biomassa seca provenientes das culturas de cianobactérias testadas. A estimativa da FBN diária para as linhagens de cianobactérias foi feita pela soma da multiplicação por 12 dos

valores encontrados nos tratamentos com luz e escuro [(luz*12) + (escuro*12)]. Os valores de atividade específica e a estimativa de fixação diária são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6- Atividade específica da nitrogenase para as linhagens de cianobactérias e estimativa do total diário de FBN

Linhagem	Atividade Específica da Nitrogenase ($\text{pmol N}_2\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca.hora ⁻¹)		Estimativa do Total Diário ($\text{pmol N}_2\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca.dia ⁻¹)
	Luz	Escuro	
Xenococcaceae CENA186	35,82	127,01	1.954,15
<i>Nostoc</i> sp. CENA158	44,60	18,71	759,83
<i>Nostoc</i> sp. CENA160	58,89	44,43	1.239,99
<i>Nostoc</i> sp. CENA175	-	76,53	918,44
<i>Microchaete</i> sp. CENA176	27,25	-	327,01
<i>Nostoc</i> sp. CENA184	60,73	30,80	1.098,50
Total	227,29	297,48	

Não houve diferença estatística para os valores de atividade específica da nitrogenase entre as linhagens de cianobactérias testadas para ambos os tratamentos e nem entre tratamentos. Essas análises basearam-se na transformação por raiz quadrada de $(x+1)$ dos valores e apresentou coeficiente de variação igual a 30,18%. A elevada variação dos valores é devida a relação entre dois fatores biológicos muito variáveis.

Pela análise dos resultados de estimativa do total diário de FBN verifica-se que a linhagem Xenococcaceae CENA186 apresentou o maior valor de FBN, seguida das linhagens *Nostoc* sp. CENA160, *Nostoc* sp. CENA184, *Nostoc* sp. CENA175, *Nostoc* sp. CENA158 e *Microchaete* sp. CENA176. A comparação entre os valores de atividade específica obtidos nesse trabalho com outros disponíveis na literatura revelam a baixa atividade específica da nitrogenase das linhagens isoladas dos ecossistemas manguezais do Estado de São Paulo. No entanto, a utilização por esses autores do peso de biomassa fresca (HROUZEK; LUKESOVA; SIMEK, 2004; COMPAORÉ; STAL, 2010) e do conteúdo de clorofila-*a* (YUNES et al., 1990; OHKI; ZEHR; FUJITA, 1992) para relacionar a atividade específica dificulta extrapolações entre os resultados.

Assumindo a presença dessas seis linhagens de cianobactérias nesse ecossistema, a contribuição total diária e anual para a entrada de nitrogênio é de respectivamente 6.284,49 e 2.293.838,85 $\text{pmol N}_2\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa seca de célula.

7. CONCLUSÃO

Os dois ecossistemas de manguezais do Estado de São Paulo estudados revelaram a existência de gêneros de cianobactérias nunca reportados anteriormente nesse ambiente. Algumas das linhagens isoladas foram caracterizadas pelo sequenciamento do gene *rpoCI* e a análise filogenética das sequências geradas revelou que as formas filamentosas heterocitadas do gênero *Nostoc* apresentam correspondência com sequências já disponíveis para membros relacionados (*Nostoc* e *Anabaena*). Entretanto as sequências da linhagem *Microchaete* sp. CENA176 e das demais formas unicelulares (Chroococcales) não tiveram a afiliação genética com nenhuma outra sequência disponível no banco de dados e, portanto podem ser consideradas sequências novas de fragmento do gene de *rpoCI* dentro desse grupo de micro-organismos.

O sequenciamento de fragmento do gene *nifH* nas linhagens permitiu conhecer a ocorrência e distribuição desse gene entre os membros das cianobactérias isoladas dos ecossistemas de manguezais. O gene *nifH* está distribuído entre representantes das três ordens de cianobactérias (Chroococcales, Oscillatoriales e Nostocales) e sua ocorrência está amplamente difundida entre essas linhagens. Esses resultados indicam que esse grupo de micro-organismos apresenta elevado potencial para realização da fixação biológica do nitrogênio podendo contribuir ativamente para a entrada de formas reduzidas de nitrogênio nos ecossistemas de manguezais. Pela análise de redução de acetileno, linhagens das ordens Chroococcales e Nostocales confirmaram a capacidade fixadora do nitrogênio mesmo na presença de oxigênio molecular. Acredita-se, no entanto, que as demais linhagens que apresentaram o gene *nifH* mas foram negativas para ARA, possam realizar a FBN em seu ambiente natural, uma vez que os ecossistemas de manguezais caracterizam-se majoritariamente pela condição anaeróbica.

REFERÊNCIAS

- ALONGI, D. M.; BOTO, K. G.; ROBERTSON, A. I. Nitrogen and phosphorus cycles. In: ROBERTSON, A. I.; ALONGI, D. M. (Ed.). **Tropical mangrove ecosystems**. . Washington, DC: American Geophysical Society, 1992. p. 231-238.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 1. Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 38-39, p. 291-302, 1985.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes.5 – Stigonematales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.
- AQUINO, M. C. A importância biológica do mangue. **Apicultura do Brasil**, São Paulo, v. 4, p. 8, 1991.
- ARP, D. J. The nitrogen cycle. In: TRIPLETT, E. W. (Ed.). **Prokaryotic Nitrogen Fixation**. Wymondham, GB: Horizon Scientific Press, 2000. p. 1-14.
- ATLAS, R. M.; BERTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 2. ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998. 694 p.
- BAETA-NEVES, M. H. C.; TRIBUZI, D. Les cyanophycées de la mangrove de la “Ponta do Pai Vitório” de la região de Cabo Frio (RJ, Brésil). **Acta Biológica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 14, p. 29-52, 1992.
- BEMAN, J. M.; FRANCIS, C. A. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 7767-7777, 2006.
- BEN-PORATH, J.; ZHER, J. P. Detection and chareacterization of cyanobacterial *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 880-887, 1994.
- BERGMAN, B.; GALLON, J. R.; RAI, A. N.; STAL, L. J. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 19, p. 139-185, 1997.
- BERGSLAND, K. J.; HASELKORN, R. Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, n. 11, p. 3446-3455, 1991.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.-B.; KÜPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, v. 294, n. 5546, p. 1534-1537, 2001.
- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 157-164, 2003.
- BERNARDES, M. E. C. **Circulação estacionária e estratificação de sal em canais estuarinos parcialmente misturados**: simulação com modelos analíticos. 2001. Dissertação

(Mestrado em Oceanografia Física) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2001.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BISHOP, P. E.; JOERGER, R. D. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 109-125, 1990.

BOISON, G.; STEINGEN, C.; STAL, L. J.; BOTHE, H. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 186, p. 367-376, 2006.

BOLCH, C. J. S.; BLACKBURN, S. I.; NEILAN, B. A.; GREWE, P. M. Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* Intergenic Spacer and flanking regions. **Journal of Phycology**, Malden, v. 32, p. 445-451, 1996.

BOLD, H. D.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae, structure and reproduction**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985. 720 p.

BOLHUIS, H.; SEVERIN, I.; CONFURIUS-GUNS, V.; WOLLENZIEN, U. I. A.; STAL, L. J. Horizontal transfer of the nitrogen fixation gene cluster in the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **The ISME Journal**, Hampshire, v. 4, p. 121-130, 2009. doi:10.1038/ismej.2009.99.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 72, p. 2310-2314, 1975.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F. Ribosomal RNA homologies and the evolution of the filamentous blue-green bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 10, p. 283-291, 1978.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology: the Archaea and deeply branching and phototrophic Bacteria**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. v. 1, 721 p.

BOTTO, K. J.; BUNT, J. S. Carbon export from mangroves. In: GALBALLY, I. E.; FRENCY, J. R. (Ed.). **Cycling of carbon, nitrogen, sulphur and phosphorus in terrestrial aquatic system**. Canberra: Australian Academy of Science, 1982. p. 105-110.

BOTTO, K. J.; ROBERTSON, A. L. The relationship between nitrogen fixation and tidal export of nitrogen in a tropical mangrove system. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 31, p. 531-540, 1990.

BRANCO, L. H. Z.; MOURA, A. N.; SILVA, A. C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Biodiversidade e considerações biogeográficas das Cyanobacteria de uma área de manguezal do estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Porto Alegre, v. 17, p. 585-596, 2003.

BRANCO, L. H. Z.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island, São Paulo State, Barzil. 1. Chroococales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 80, p. 99-111, 1996.

- BRANCO, L. H. Z.; SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangroves, São Paulo State, Brazil. 2. Oscillatoriales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 84, p. 39-52, 1997.
- BRANCO, L. H. Z.; SILVA, S. M. F.; SANT'ANNA, C. L. *Stichosiphon mangle* sp. nov. from mangrove environments. **Algological Studies**, Stuttgart v. 72, p. 1-7, 1994.
- BRASIL. Ministério da Marinha. **Tábua de marés**. Brasília: Diretoria de Hidrografia e Navegação, 1984.
- BRENNER, D. J.; STALEY, J. T.; KRIEG, N. R. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 27-31.
- BROCK, T. D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. **Science**, Washington, v. 179, p. 480-483, 1973.
- BUIKEMA, W. J.; HASELKORN, R. Molecular genetics of cyanobacterial development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 33-52, 1993.
- BURGESS, B. K.; LOWE, D. J. Mechanism of molybdenum nitrogenase. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 96, p. 2983-3011, 1996.
- CANNEL, R.J.P. Algae as a source of biologically active products. **Pesticide Science**, London, v. 39, p. 147-153, 1993.
- CAPONE, D. G.; ZEHR, J. P.; PAERL, H. W.; BERGMAN, B.; CARPENTER, E. J. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. **Science**, Washington, v. 276, n. 5316, p. 1221-1229, 1997.
- CASTENHOLZ, R. W. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Ed.). **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1973. p. 379-414.
- CASTENHOLZ, R. W. General characteristics of the cyanobacteria. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 474-487.
- CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Oxygenic photosynthetic bacteria (sect. 19), group I. Cyanobacteria. In: STALEY, J. T.; BRYANT, M. P.; PFENNING, N.; HOLT, J. P. (Ed.). **Bergey's of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1989, p. 1710-1728.
- CHAY, T. C.; SURIF, S.; HENG, L. Y. A copper toxicity biosensor using immobilized cyanobacteria *Anabaena torulosa*. **Sensor Letters**, Stevenson Ranch, v. 3, p. 49-54, 2005.
- CHURCH, M. J.; SHORT, C. M.; JENKINS, B. D.; KARL, D. M.; ZEHR, J. P. Temporal Patterns of Nitrogenase Gene (*nifH*) Expression in the oligotrophic north Pacific Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, n. 9, p. 5362-5370, 2005.
- COHEN, Y.; JØRGENSEN, B. B.; REVSBECH, N. P.; POPLAWSKI, R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanocabteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 51, p. 398-407, 1986.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Avaliação do estado da degradação dos ecossistemas da Baixada Santista – SP**. Relatório. São Paulo: CETESB, 1991.

COMPAORÉ, J.; STAL, L. J. Oxygen and the light-dark cycle of nitrogenase activity in two unicellular cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, London, v. 12, n. 1, p. 54-62, 2010.

CRISPINO, L. M. B.; SANT'ANNA, C. L. Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 639-656, 2006.

CUNHA-LIGNON, M.; MENGHINI, R. P.; SANTOS, L. C. M.; NIEMEYER-DINÓLA, C.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Estudos de casos nos Manguezais do estado de São Paulo (Brasil): Aplicações de ferramentas com diferentes escala espaço-temporais. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, Lisboa, v. 9, n. 1, p. 79-91, 2009.

DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H.; BURESH, R. J. Sedimentation rates determined by ¹³⁷Cs dating in a rapidly accreting salt marsh. **Nature**, London, v. 275, p. 532-533, 1978.

DOOLITTLE, W. F.; WOESE, C. R.; SOGIN, M. L.; BONEN, L.; STAHL, D. Sequence studies on 16S ribosomal RNA from blue-green alga. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 4, p. 307-315, 1975.

DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley. **Archives fur Hydrobiologie**, Stuttgart, v. 83, p. 197-206, 1996. Suppl.

DREWS, G. Fine structure and chemical composition of the cell envelopes. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Ed.). **The biology of blue-green algae**. Berkeley: University of California Press, 1973. p. 99-116. (Botanical Monographs, 9).

DUGAN, P. J. **Conservación de humedales**: un análisis de temas de actualidad y acciones necesarias. Gland: IUCN, 1992. 100 p.

DUKE, N. C.; MEYNECKE, J.; DITTMANN, A. M.; ELLISON, A. M.; ANGER, K.; BERGER, U.; CANNICCI, S.; DIELE, K.; EWEL, K. C.; FIELD, C. D.; KOEDAM, N.; LEE, S. Y.; MARCHAND, C.; NORDHAUS, I.; DAHDUOH-GUEBAS, F. A world without mangroves? **Science**, Washington, v. 317, n. 5834, p. 41-42, 2007.

DYBLE, J.; PAERL, H. W.; NEILAN, B. A. Genetic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates from diverse geographic origins based on *nifH* and *cpcBA*-IGS nucleotide sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 2567-2571, 2002.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, Baltimore, v. 96, p. 3013-3030, 1996.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

- FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 56, n. 2, p. 340-373, 1992.
- FERGUSON, K. M.; SAINT, C. P. Molecular phylogeny of *Anabaena circinalis* and its identification in environmental samples by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 4145-4148, 2000.
- FILDEMAN, P. I. J. Impactos causados por tensores de origem antrópica no sistema estuarino do Rio Santana, Ilhéus, Bahia. In: SEMANA NACIONAL DE OCEANOGRAFIA, 12., 1999, Rio de Janeiro. **Resumos expandidos...** Rio de Janeiro: AOCEANO, 1999. p. 405-407.
- FIORE, M. F.; MOON, D. H.; TSAI, S. M.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 39, p. 159-169, 2000.
- FLORES, E.; HERRERO, A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: BRYANT, D. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1994. p. 487-517.
- FLORES, E.; MURO-PASTOR, A. M.; HERRERO, A. Cyanobacterial nitrogen assimilation genes and NtcA-dependent control of gene expression. In: PESCHEK, L. W.; SCHMETTERER, G. (Ed.). **The phototrophic prokaryotes**. New York: Plenum Press, 1999. p. 487-517.
- GALLON, J. R. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and oxygen. **New Phytologist**, London, v. 122, p. 571-609, 1992.
- GETTER, C. D.; SCOTT, G. I.; MICHEL, J. The effects of oil spills on mangrove Forest: a comparison of five oil spills sites in the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. In: THE 1981 OIL SPILL CONFERENCE, 1981, Baltimore. **Proceedings...** Washington: American Petroleum Institute, 1981. p. 535-540.
- GOLDEN, J. W.; YOON, H.-S. Heterocyst development in *Anabaena*. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 557-563, 2003.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.
- GÜRTLER, V.; MAYALL, B. C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 3-16, 2001.
- HAN, D.; FAN, Y.; HU, Z. An evaluation of four phylogenetic markers in *Nostoc*: implications for cyanobacterial phylogenetic studies at the intrageneric level. **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 170-176, 2009.
- HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 47-81, 1973.
- HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HASELKORN, R.; BUIKEMA, W. J. Nitrogen fixation in cyanobacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 166-190.

HERZ, R. **Os manguezais do Brasil**. São Paulo: Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 1991. 233 p.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVCKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria) – state 2004. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 95-115, 2005.

HOLGUIN, G.; GUZMAN, M. A.; BASHAN, Y. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 101, p. 207-216, 1992.

HOLGUIN, G.; VASQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangrove ecosystems: and overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

HOLGUIN, G.; VASQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of the microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangroves ecosystem: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, n. 4, p. 265-278, 2001.

HOWARTH, R. W.; MARINO, R. Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2 Biogeochemical controls. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 33, n. 4, p. 669-687, 1988.

HROUZEK, P.; LUKESOVÁ, A.; SIMEK, M. Comparison of light and dark nitrogenase activity in selected soil cyanobacteria. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 49, n. 4, p. 435-440, 2004.

HUANG, T-C.; LIN, R-F.; CHU, M-K.; CHEN, H-M. Organization and expression of nitrogen-fixation genes in the aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain RF-1. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 743-753, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa da série Brasil geográfico**. Rio de Janeiro: IBGE, 1997.

JOYE, S. B. Denitrification in the marine environment. In: COLLINS, G. (Ed.). **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. New York: Wiley & Sons, 2002. p. 1010-1019.

JOYE, S. B.; LEE, R. Y. Benthic microbial mats: important sources of fixed nitrogen and carbon to the Twin Cays, Belize ecosystem. **Atoll Research Bulletin**, Washington, n. 528, p. 1-24, 2004.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; WOLK, C. P.; KURITZ, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IRIGUCHI, M.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAZAWA, M.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **DNA Research**, Tokyo, v. 8, n. 5, p. 205-213, 2001.

- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangroves ecosystems. **Advances in Marine Biology**, London, v. 40, p. 81-251, 2001.
- KOMÁREK, J. Problem of the taxonomic category “species” in Cyanobacteria. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 109, p. 281-297, 2003.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H.; Gärtner, G.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustave Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 2. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B.; Krienitz, L.; Gärtner, G.; Schagerl, M. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Munique: Elsevier GmbH, 2005. v. 19/2, p. 1-759.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 56, p. 247-354, 1989.
- LACERDA, L. D. Manguezais: florestas de beira mar. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 13, p. 63-70, 1984.
- LAMMERS, P. J.; HASELKORN, R. Sequence of the *nifD* gene coding for the alpha subunit of dinitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 80, p. 4723-4727, 1983.
- LANGLOIS, R. J.; HÜMMER, D.; LAROCHE, J. Abundances and distributions of the dominant *nifH* Phylotypes in the Northern Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, n. 6, p. 1922-1931, 2008.
- LEE, R.Y.; PORUBSKY, W.P.; FELLER, I.C.; MCKEE, K.L.; JOYE, S.B. Porewater biogeochemistry and soil metabolism in dwarf red mangrove habitats (Twin Cays, Belize). **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 87, p. 181–198, 2008.
- LORENZI, A. S. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos potencialmente produtores de microscistinas**. 2008. 174 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- LOVELOCK, C. E.; FELLER, I. C.; BALL, M. C.; ENGELBRECHT, B. M. J.; EWE, M. L. Differences in plant function in phosphorus- and nitrogen-limited mangrove Ecosystems. **New Phytologist**, London, v. 172, p. 514-522, 2006.
- LUGO, A. E.; SNEDAKER, S. C. The ecology of mangroves. **Annual Review of Ecology and Systematic**, Palo Alto, v. 5, p. 39-64, 1974.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- MAZUR, B. J.; CHUI, C. F. Sequence of the gene coding for the beta-subunit of dinitrogenase from the blue-green alga *Anabaena*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 79, p. 6782-6786, 1982.
- MAZUR, B. J.; RICE, D.; HASELKORN, R. Identification of blue-green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 77, p. 186-190, 1980.

- MEEKS, J. C. ^{13}N techniques. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. (Ed.). **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 272-303.
- MESQUITA, A. R.; HARARI, J. **Tides and gauges of Cananéia and Ubatuba**. São Paulo: Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 1983. p. 1-14. (Relatório Internacional, 11).
- MEVARECK, M.; RICE, D.; HASELKORN, R. Nucleotide sequence of a cyanobacterial *nifH* gene coding for nitrogenase reductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 77, p. 6476-6480, 1980.
- MOISANDER, P. H.; BEINART, R. A.; HEWSON, I.; WHITE, A. E.; JOHNSON, K. S.; CARLSON, C. A.; MONTOYA, J. P.; ZEHR, J. P. Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N_2 fixation domain. **Science**, Washington, v. 327, n. 5972, p. 1512-1514, 2010.
- MONTOYA, J. P.; HOLL, C. M.; ZEHR, J. P.; HANSEN, A.; VILLAREAL, T. A.; CAPONE, D. G. High rates of N_2 fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific. **Nature**, London, v. 430, p. 1027-1032, 2004.
- MOSCATELLI, M. Salvando o manguezal. **Revista Brasileira de Ecologia do Século 21 – Eco**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 41-42, 1999.
- MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p. 15-37.
- NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; GOODMAN, A. E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 11, p. 3875-3883, 1995.
- NOGUEIRA, N. M. C.; FERREIRA-CORREIA, M. M. Cyanophyceae; Cyanobacteria in red mangrove forest at Mosquitos and Coqueiros estuaries, São Luís, State of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 61, p. 347-356, 2001.
- ODUM, W. E.; CAROLE, C. M.; SMITH, T. J. **Ecology of the mangroves of South Florida: a community profile**. Washington, DC: U.S. Fish and Wildlife Service, 1985. 144 p.
- OHKI, K.; ZEHR, J. P.; FUJITA, Y. *Trichodesmium*: Establishment of culture and characteristics of N_2 -fixation. In: CARPENTER, E. J.; CAPONE, D. G.; RUETER, J. G. (Ed.). **Marine pelagic cyanobacteria: *Trichodesmium* and other diazotrophs**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. p. 307-318.
- OLIVEIRA, M. A. J.; VIDAL-TORRADO, P.; OTERO, X. L.; FERREIRA, R. J. Mercúrio total em solos de manguezais da Baixada Santista e Ilha do Cardoso, estado de São Paulo. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 519-524, 2007.
- OLIVER, R. L.; GANF, G. G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria, their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 149-194.
- OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the bacteriological code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1895-1902, 2004.

OREN, A.; TINDALL, B. J. Nomenclature of the cyanophyta/cyanobacteria/cyanoprokaryotes under the international code of nomenclature of prokaryotes. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, p. 39-52, 2005.

ORME-JOHNSON, W. H. Nitrogenase structure: Where to now? **Science**, Washington, v. 257, p. 1639-1640, 1992.

PALENIK, B.; HASELKORN, R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll *b*-containing prokaryotes. **Nature**, London, v. 355, n. 6357, p. 265–267, 1992.

POSGATE, J. R.; EADY, R. R. The evolution of biological nitrogen fixation. In: BOTHE, H.; DE BRUJIN, F. J.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation**: hundred years after. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. p. 31-40.

POSTGATE, R. J. **Nitrogen fixation**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 112 p.

PÜHLER, G.; LEFFERST, H.; GROPP, F.; PALM, P.; KLENK, H-P.; LOTTSPREICH, F.; GARRETT, R. A.; ZILLIG, W. Archaeobacterial DNA-dependent RNA polymerase testify to the evolution of the eukaryotic nuclear genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 86, p. 4568-4573, 1989.

RAI, A. N. **CRC Handbook of symbiotic cyanobacteria**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 253 p.

RIBAS, L. M. **Concentração e aporte de elementos da serapilheira do manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul, estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) –Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2007.

RICE, D.; MAZUR, B. J.; HASELKORN, R. Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, p. 13157-13163, 1982.

RICKLEFS, R. E. **Economia da natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503 p.

RIPPKA, R. Recognition and identification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, New York, v. 167, p. 28-76, 1988.

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

RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 62, p. 93-111, 2008.

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

SANTOS, E. O. Características climáticas. In: AZEVEDO, A. (Ed.). **A Baixada Santista**. Aspectos geográficos. As bases físicas. São Paulo: EDUSP, 1965. cap. 4, p. 95-150.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezais brasileiros**. 1991. 42 p. Tese (Livre-Docência) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G.; SOARES, M. L.; DE-ROSA, M. M. P. T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, New York, v. 3, n. 4, p. 561-570, 2001.

SCHMITT, B. B. **Characterization of organic nitrogen compounds in sediment and leaves of a mangrove ecosystem in north Brazil**. 2006. 186 p. Thesis (Doctoral) - University of Bremen, Bremen, Germany. 2006.

SCHNEIDER, G. J.; HASEKORN, R. RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria, other eubacteria and archeobacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 170, n. 9, p. 4136-4140, 1988.

SCHOPF, J. W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Beihefte zur Nova Hedwigia**, Weinheim, v. 112, p. 13-32, 1996.

SCHOPF, J. W. Disparate rates, differing fates: Tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 91, p. 6735-6742, 1994.

SCHOPF, J. W.; WALTER, M. R. Origin and early evolution of Cyanobacteria: the geological evidence. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Ed.). **The biology of Cyanobacteria**. Oxford: Blackwell, 1982. p. 543-564.

SHASHIREKHA, M. N.; RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 2, p. 255-259, 2005.

SHORT, S. M.; ZEHR, J. Nitrogenase gene expression in the Chesapeake Bay Estuary. **Environmental Microbiology**, London, v. 9; n. 6; p. 1591-1596, 2007.

SILVA, J. F. Dados climatológicos de Cananéia e Ubatuba (Estado de São Paulo). **Boletim Climatológico do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 6, p. 1-21, 1989.

SKULBERG, O. M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. (Ed.). **Hydrogen energy system**. Production and utilization of hydrogen and future aspects. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 95-110. (NATO ASI Series E – Applied Sciences, 295).

SMITH, A. J. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. **Annals of Microbiology**, Paris, v. 134B, p. 93-113, 1983.

STAAL, M.; LINTEL-HEKKERT, S. T.; HARREN, F.; STAL, L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. **Environmental Microbiology**, London, v. 3, p. 343-351, 2001.

STAL, L. J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 179-211, 1997.

STANIER, R. Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 225-274, 1977.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 35, p. 171-205, 1971.

STEPPE, T. F.; OLSON, J. B.; PAERL, H. W.; LITAKER, R. W.; BELNAP, J. Consortial N₂ fixation: a strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 149-156, 1996.

STEWART, W. D. P. Nitrogen fixation. **Botanical Monographs**, Washington, v. 9, p. 260-278, 1973.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 70 p. (Documentos, 93).

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TESSLER, M. G.; MAHIQUES, M. M. Erosional and depositional processes on the Southern Coast of the State of Sao Paulo: a case study of Cananeia-Iguape System. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 2, p. 267-275, 1998.

THIEL, T. Nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J. R.; NEWTON, W. E. **Genetics and regulation of nitrogen fixing bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004.

THIEL, T.; LYONS, E. M.; ERKER, J. C. Characterization of genes for a second Mo-dependent nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 5222-5225, 1997.

THIEL, T.; LYONS, E. M.; THIELEMIER, J. Organization and regulation of two clusters of nif genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. In: PESCHEK, L. W.; SCHMETTERER, G. (Ed.). **The phototrophic prokaryotes**. New York: Plenum Press, 1998. p. 517-521.

THOM, B. G. Mangrove ecology - A geomorphological perspective. In: CLOUGH, B. (Ed.). **Mangrove ecosystem in Australia: structure, function, and management**. Canberra: Australian National University Press, 1982. p. 3-17.

TRIVELIN, P. C. O. **Técnicas com ¹⁵N em estudos de fixação biológica do nitrogênio (FBN)**. Piracicaba: CENA/USP, 2001.

TUNDISI, J.; TEIXEIRA, C.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; KUTNER, M. B.; KINOSHITA, L. Planckton studies in a mangrove environment. IX Comparative investigations with coastal oligotrophic water. **Brazilian Journal Biology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 301-320, 1978.

TURNER, S. Molecular systematics of oxygenic photosynthetic bacteria. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 11, p. 13-52, 1997.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. **The measurement of N₂ fixation**. St. Paul: Department of Soil, Water and Climate. Disponível em:

http://www.soils.umn.edu/academics/classes/soil3612/Nitrogen_Fixation/Measurement.htm.

Acesso em: 18 jul. 2009.

URBACH, E.; ROBERTSON, D. L.; CHISHOLM, S. W. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. **Nature**, London, v. 355, p. 267-270, 1992.

VITOUSEK, P. M. Nutrient limitation to nitrogen fixation in young volcanic sites. **Ecosystems**, New York, v. 2, p. 505-510, 1999.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 87-115, 1991.

WALSH, G. E. Mangroves forest: a review. In: REINOLD, R. J.; QUEEN, W. H. (Ed.). **Ecology of Halophytes**. New York: Academic Press, 1974. p. 151-154.

WANG; W. Q.; WANG, M.; LIN, P. Seasonal changes in element contents in mangrove element retranslocation durin leaf senescence. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 187-193, 2003.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: _____. **The ecology of cyanobacteria**. Their diversity in time and space. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-11.

WILMOTTE, A. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: BRYANT, D. A. (Ed.). **The molecular biology of the Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 1-25.

WILMOTTE, A.; GOLUBIC, S. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 64, p. 1-24, 2001.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 487-493.

WILSON, K. M.; SCHEMBRI, M. A.; BAKER, P. D.; SAINT, C. P. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, n. 1, p. 332-338, 2000.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WOLK, C. P.; ERNST, A. ELHAI, J. Heterocysts metabolism and development. In: BRYANT, D. A. (Ed.). **Molecular biology of the Cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 769-823.

WOODWELL, G. M.; WHITNEY, D. E.; HALL, C. A. S.; HOUGHTON, R. A. The Flax Pond Ecosystem Study: Exchanges of Carbon in Water Between a Salt Marsh and Long Island Sound. **Limnology and Oceanography**, Grafton, v. 22, n. 5, p. 833-838, 1977.

WU, J.; SUNDA, W.; BOYLE, E. A.; KARL, D. M. Phosphate depletion in the western North Atlantic Ocean. **Science**, Washington, v. 289, p. 759-762, 2000.

- YAÑES-ARANCÍBIA, A. **A ecologia de La Zona Costera**: Analisis de Siete Topicos México, DF: AGT, 1986. 189 p.
- YOUNG, J. P. W. Molecular evolution in diazotrophs: do the genes agree? In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen Fixation**: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 161-164.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. London: Chapman & Hall, 1992. p. 43-86.
- YUNES, J. S.; SUZUKI, M. T.; SILVERA, A. G.; CAMARGO, M.; WERNER, V. R. Cianobactérias fixadoras d nitrogênio do estuário da lagoa dos Patos, RS: *Nostoc muscorum*. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 375-383, 1990.
- ZANI, S.; MELLON, M. T.; COLLIER, J.; ZEHR, J. P. Application of a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of *nifH* expression in Lake George, New York. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3119-3124, 2000.
- ZEHR, J. P.; CARPENTER, E. J.; VILLAREAL, T. A. New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, p. 68-73, 2000.
- ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, London, v. 5, p. 539-554, 2003.
- ZEHR, J. P.; MCREYNOLDS, L. A. Use for degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 55, p. 2522-2526, 1989.
- ZEHR, J. P.; MELLON, M. T.; HIORNS, W. D. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. **Microbiology**, Reading, v. 143, p. 1443-1450, 1997.
- ZEHR, J. P.; TURNER P. J. Nitrogen fixation: nitrogenase genes and gene expression. In: PAUL, J. H. (Ed.). **Methods in marine microbiology**. New York: Academic Press, 2001. p. 271-286.
- ZEHR, J. P; CAPONE, D. G. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. **Microbial Ecology**, New York, v. 32, p. 263-281, 1996.

ANEXOS

ANEXO A: Meios de cultura utilizados

Meio de cultura SWBG-11 – Sea Water BG-11 utilizado para manutenção das culturas de cianobactérias (CASTENHOLZ, 1988).

Componentes	Solução Estoque (g/L)	Usar por litro de meio	Concentração Final no meio (g.L ⁻¹)
1.NaCl	-	-	12,5
2.MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	1,0
3 KCl	-	-	0,25
4.NaNO ₃	150	10 ml	1,5
5.K ₂ HPO ₄	40	1 ml	0,04
6.MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1 ml	0,075
7.CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1 ml	0,036
8.Ácido Cítrico	6	1 ml	0,006
9.Citrato de Amônio Férrico	6	1 ml	0,006
10.Na ₂ EDTA	1	1 ml	0,001
11.Micronutrientes	-	1 ml	-
12.Carbonato de sódio	20	1 ml	0,02

Completar o volume com H₂O deionizada para 1000 mL

Autoclavar e ajustar o pH após autoclavagem e esfriamento: 7,4

Notas:

Se fizer aeração com CO₂, deve-se adicionar 1 M HEPES, pH 8,0 numa concentração final de 10 a 20 mM (ou seja, 10 a 20 ml por litro).

Solução de Micronutrientes:

H₃BO₃ 2,86 g.L⁻¹

MnCl₂.4H₂O 1,81 g.L⁻¹

ZnSO₄.7H₂O 0,222 g.L⁻¹

Na₂MoO₄.2H₂O 0,39 g.L⁻¹

CuSO₄.5H₂O 0,079 g.L⁻¹

Co(NO₃)₂.6H₂O 0,049 g.L⁻¹

Meio de cultura ASN-III utilizado para manutenção das culturas de cianobactérias (RIPPKA et al. 1979)

Componentes	Concentração Final no meio (g.L⁻¹)
1.NaCl	12,5
2.MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0
3.KCl	0,25
4.NaNO ₃	0,75
5.K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,02
6.MgSO ₄ .7H ₂ O	3,5
7.CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5
8.Ácido Cítrico	0,003
9.Citrato de Amônio Férrico	0,003
10.Na ₂ EDTA	0,0005
11.Na ₂ CO ₃	0,02
12. Micronutrientes	1 mL

Completar o volume com H₂O deionizada para 1000 mL

Autoclavar e ajustar o pH após autoclavagem e esfriamento: 7,5

Solução de Micronutrientes:

H₃BO₃ 2,86 g.L⁻¹

MnCl₂.4H₂O 1,81 g.L⁻¹

ZnSO₄.7H₂O 0,222 g.L⁻¹

Na₂Mo₄.2H₂O 0,39 g.L⁻¹

CuSO₄.5H₂O 0,079 g.L⁻¹

Co(NO₃)₂.6H₂O 0,049 g.L⁻¹

Meio de cultura MN utilizado para manutenção das culturas de cianobactérias (<http://www.pasteur.fr/recherche/banques/PCC/Media.htm#MN>)

Componentes	Concentração Final no meio (g.L⁻¹)
1. NaNO ₃	0,75
2. K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,02
3. MgSO ₄ .7H ₂ O	0,038
4. CaCl ₂ .2H ₂ O	0,018
5. Ácido Cítrico	0,003
6. Citrato de Amônio Férrico	0,003
7. Na ₂ EDTA	0,0005
8. Na ₂ CO ₃	0,02
12. Micronutrientes	1 mL
13. Água marinha	750 mL

Completar o volume com H₂O deionizada para 1000 mL

Autoclavar e ajustar o pH após autoclavagem e esfriamento: 8,3

Solução de Micronutrientes:

H₃BO₃ 2,86 g.L⁻¹

MnCl₂.4H₂O 1,81 g.L⁻¹

ZnSO₄.7H₂O 0,222 g.L⁻¹

Na₂MoO₄.2H₂O 0,39 g.L⁻¹

CuSO₄.5H₂O 0,079 g.L⁻¹

Co(NO₃)₂.6H₂O 0,049 g.L⁻¹

ANEXO B: Sequências de nucleotídeos do gene *rpoC1* geradas nesse estudo

>*Chlorogloea* sp. CENA146 (613 bp)

TGAGGTGACCAAGCCGGAGACCATCAACTACCGCACCTCAAGCCCGAGATGGACGGGCTGTTCT
GCGAGAAGATCTTCGGCCCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCATTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGCGC
CACCGCGGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGGTCACCGAGAGCCGGGTGCGGCGCCACCG
GATGGGCTTCATCAAGCTGGCGGCTCCGGTCTCCACGTCTGGTATCTGAAGGGGATCCCCAGCTA
TGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCCTTCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGTC
GTCCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTGCTCACCGAGGACGAGTGGCTG
GAGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCCGAGATCGAGAACGAGCCGCGCGTGGGCATCGG
CGCGGAGGCCCTCAAGGAACTGCTGGAGAACCTCGAGCTCGCCGCGATCGCCGAGCAGCTGCGGG
AGGAGATCAGTGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGATCGAC
AACTTCATCGCCACCGATGCCCCG

>*Synechococcus* sp. CENA154 (610pb)

TGAGGTGACCAAGCCGGAGACCATCAACTACCGCACCTCAAGCCCAAGATGGACGGGCTGTTCT
GCGAGAAGATCTTCGGCCCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCATTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGCGC
CACCGCGGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGGTCACCGAGAGCCGGGTGCGGCGCCACCG
GATGGGCTTCATCAAGCTGGCGGCTCCGGTCTCCACGTCTGGTATCTGAAGGGGATCCCCAGCTA
CGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCCTGCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGT
CGTCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTTCTCACCGAGGACGAGTGGCT
GGAGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCCGAGATCGAGAACGAGCCGCGCGTGGGCATCG
GCGCGGAGGCCCTCAAGGAACTGCTGGAGAACCTCGAGCCCGCGCGATCGCCGAGCAGCTGCGG
GAGGAGATCAGTGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGATCGA
CAACTTCATCGCCACCGATGCC

>*Nostoc* sp. CENA158 (610 pb)

CGAAGTCACTAAACCAGAGACAATTAATTATCGAACTCTCAAGCCGGAAATGGATGGCTTGTTTTG
TGAGCGTATTTTTGGTCTCTGCAAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAAAGAGTACGTCA
CCGTGGCATTGTATGTGAGCGATGTGGAGTAGAAGTTACTGAGTCACGGGTACGTCGCCACCGCAT
GGGATATATCAAACCTTGCTGCTCCAGTAGCCCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATCCCCAGCTATATT
TCTATCCTGTTGGATATGCCCTTGCGAGATGTTGAGCAAATAGTATATTTCAACTCTTATGTTGTCC
TAAGTCTTGAAATGCCGAACTTTAACCTACAAACAGCTACTGAGTGAAGATCAGTGGTTGGAAA
TTGAAGACCAAATTTATAGCGAAGATTCTACTTTGCAGGGCGTTGAGGTAGGTATTGGTGCTGAAG
CATTGCTACGTTTGCTTGCTGATATTAACCTTAGAGCAAGAAGCTGAGAGCCTGCGTGAAGAAATTG
GTAATGCTAAAGGGCAAAAACGGGCCAAATTAATTAAGCGCCTGCGGGTAATTGACAACCTCATTG
CCACTGGTTCTAAA

>*Nostoc* sp. CENA159 (610pb)

CGAAGTCACTAAACCAGAGACAATTAATTATCGAACTCTCAAGCCGGAAATGGATGGCTTGTTTTG
TGAGCGTATTTTTGGTCTCTGCAAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAAAGAGTACGTCA
CCGTGGCATTGTATGTGAGCGATGTGGAGTAGAAGTTACTGAGTCACGGGTACGTCGCCACCGCAT
GGGATATATCAAACCTTGCTGCTCCAGTAGCCCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATCCCCAGCTATATT
TCTATCCTGTTGGATATGCCCTTGCGAGATGTTGAGCAAATAGTATATTTCAACTCTTATGTTGTCC
TAAGTCTTGAAATGCCGAACTTTAACCTACAAACAGCTACTGAGTGAAGATCAGTGGTTGGAAA
TTGAAGACCAAATTTATAGCGAAGATTCTACTTTGCAGGGCGTTGAGGTAGGTATTGGTGCTGAAG
CATTGCTACGTTTGCTTGCTGATATTAACCTTAGAGCAAGAAGCTGAGAGCCTGCGTGAAGAAATTG
GTAATGCTAAAGGGCAAAAACGGGCCAAATTAATTAAGCGCCTGCGGGTAATTGACAACCTCATTG
CCACTGGTTCTAAG

>*Nostoc* sp. CENA160 (611 pb)

CGAAGTCACTAAACCAGAGACAATTAATTATCGAACTCTCAAGCCGGAAATGGATGGCTTGTTTTG
TGAGCGTATTTTTGGTCTCTGCAAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGTAAGTATAAAAGAGTACGTCA
CCGTGGCATTGTATGTGAGCGATGTGGAGTAGAAGTTACTGAGTCACGGGTACGTCGCCACCGCAT
GGGATATATCAAACCTTGCTGCTCCAGTAGCCCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATCCCCAGCTATATT
TCTATCCTGTTGGATATGCCCTTGCGAGATGTTGAGCAAATAGTATATTTCAACTCTTATGTTGTCC
TAAGTCTTGAAATGCCGAACTTTAACCTACAAACAGCTACTGAGTGAAGATCAGTGGTTGGAAA
TTGAAGACCAAATTTATAGCGAAGATTCTACTTTGCAGGGCGTTGAGGTAGGTATTGGTGCTGAAG
CATTGCTACGTTTGCTTGCTGATATTAACCTTAGAGCAAGAAGCTGAGAGCCTGCGTGAAGAAATTG
GTAATGCTAAAGGGCAAAAACGGGCCAAATTAATTAAGCGCCTGCGGGTAATTGACAACCTCATTG
GCCACTGGTTCTAAA

>*Synechococcus* sp. CENA162 (612 pb)

TGAGGTCACCAAGCCTGAAACCATCAACTACCGCACCTCAAGCCGAGATGGACGGCCTCTTCTG
CGAGAAGATCTTCGGCCCGTCGAAAGACTGGGAGTGCCACTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGC
ACCGCGGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGCGTGGAGGTCACCGAGAGCCGGGTGCGGCGCCACCGC
ATGGGCTTCATCAAGTGGCGGCGCCGGTGAGCCATGTGTGGTATCTGAAGGGCATCCCCAGCTACG
TGCGGATCCTGCTCGACATGCCTCTGCGGGATGTGGAGCAGATCGTCTATTCAACTGCTACGTGGT
GCTCGATCCGGGCGACCACAAGTCACTCACCTACAAGCAGCTGCTCACCGAGGATGAGTGGCTGG
AGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCGGAGATCGAGAACGAGCCCGTGGTGGGCATCGGC
GCCGAGGCGCTGAAGCAGCTCCTCGAGGACATCGACCTTCCCGAAACCGCCGAGCAGCTGCGTGA
GGACATCGCCGCCAGCAAGGGCCAGAAGCGCGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGTATCGACA
ACTTCATCGCCACCAACGCCAAG

>*Cyanothece* sp. CENA169 (610 pb)

TGAAGTTACAAAGCCAGAAACTATAAATTACCGTACTTTAAAACCGGAGATGGATGGCTTGTCTG
CGAGCGCATCTTTGGTCCGGCTAAAGATTGGGAATGCCATTGTGGTAAGTATAAGAGAGTTCGTCA
CAGAGGAATTGTGTGTGAGCGCTGTGGCGTAGAAGTGACTGAATCACGAGTGCGCCGCCATCGCAT
GGGTTACATTAACCTCGCCGCACCTGTGCTCACGTTTGGTACCTCAAAGGCATTCCCAGCTATATC
TCCATCCTGCTAGATATGCCCTTACGGGATGTGGAGCAAATCGTTTATCTCAATTCCTATGTTGTC
TTAGTCCCGCAATGCTGAAACTTTAACTTACAAACAGTTACTAAGTGAAGACCAGTGGCTGGAAA
TCGAAGACCAAATTTATAGCGAGGATTCTACACTTCGAGGAGTAGAGGTTGGTATTGGTGCAGAAG
CCTTGTGCGATTACTCGCCGATATCCACTTAGAAGAAGAAGCTGAATCCTTGCGGGAAGAAATTG
GTACCGCAAAGGTCAAAGCGGGCAAAGCTCATTAACGGCTACGGGTGATTGACAACTTCATC
GCCACTGGTTCTAAG

>*Aphanocapsa* sp. CENA171 (613 pb)

TGAGGTGACCAAGCCGGAGACCATCAACTACCGCACCTCAAGCCGAGATGGACGGGCTGTTCT
GCGAGAAGATCTTCGGCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCATTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGC
CACCGCGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGGTCACCGAGAGCCGGGTGCGGCGCCACCG
GATGGGCTTCATCAAGCTGGCGGCTCCGGTCTCCACGTCTGGTATCTGAAGGGGATCCCCAGCTA
CGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCCTGCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGT
CGTCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTTCTCACCGAGGACGAGTGGCT
GGAGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCTGAGATCGAGAACGAGCCGCGCGTGGGCATCG
GCGCGGAGGCCCTCAAGGAACTGCTGGAGAACCTCGAGCTCGCCGCGATCGCCGAGCAGCTGCGG
GAGGAGATCAGTGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGTATCGA
CAACTTCATCGCCACCGATGCCCGG

>*Chlorogloea* sp. CENA 174 (613 pb)

TGAGGTGACCAAGCCGGAGACCATCAACTACCGCACCTCAAGCCGAGATGGACGGGCTGTTCT
GCGAGAAGATCTTCGGCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCATTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGC
CACCGCGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGGTCACCGAGAGCCGGGTGCGGCGCCACCG
GATGGGCTTCATCAAGCTGGCGGCTCCGGTCTCCACGTCTGGTATCTGAAGGGGATCCCCAGCTA
TGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCCTTCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGTC
GTCCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTGCTCACCGAGGACGAGTGGCTG
GAGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCCGAGATCGAGAACGAGCCGCGCGTGGGCATCGG
CGCGGAGGCCCTCAAGGAACTGCTGGAGAACCTCGAGCTCGCCGCGATCGCCGAGCAGCTGCGGG
AGGAGATCAGTGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGTATCGAC
AACTTCATCGCCACCGATGCCCGG

>*Nostoc* sp. CENA175 (610 pb)

TGAAGTCACCAAACCAGAAACTATTA ACTATCGGACTCTCAAGCCAGAGATGGATGGCTTATTTG
TGAGCGCATCTTTGGCCCGGCGAAAGATTGGGAATGTCACTGTGGTAAGTACAAGAGAGTCCGCCA
CAGAGGGATTGTTTGTGAACGTTGCGGCGTAGAAGTTACTGAATCACGGGTACGCCGTATCGAAT
GGGGTACATCAAACCTGGCAGCTCCTGTAGCCACGTTTGGTATCTCAAAGGGATTCCCTAGCTATAT
TTCCATCCTGCTAGATATGCCCTTTCGGGATGTGGAGCAAATTGTCTATTTCAACTCCTATGTTGTT
CTCAGCCCTGGTAACGCTGAAACATTAAGCTATAAACTACTGAGTGAAGATCAGTGGTTAGAA
ATCGAAGACCAAATTTACAGCGAAGATTCTCAGCTACAAGGTGTGCGAGGTAGGTATCGGTGCAGA
AGCATTGTTGCGCCTGCTGGCTGATATTAATCTAGAGCAAGAAGCCGAAAACCTCCGTGAAGAAAT
TGGCTCTGCTAAAGGGCAAACCGGGCAAACCTGATTAAACGCCTACGGGTAAATTGACAACTTTAT
CGCTACTGGTTCTAAA

>*Microchaete* sp. CENA 176 (610 pb)

GGAAGTAACCAAGCCAGAAACGATTAACCTACCGCACCTGAAGCCAGAAATGGATGGCTTATTTT
GTGAGCGGATTTTTGGTCCAGCGAAGGATTGGGAATGCCATTGCGGTAAATATAAACGGGTGAGA
CGCCGGGGGATTGTTTGCGAACGCTGCGGGGTGGAAGTCACCGAATCCCGCGTCCGTCGTCACCGC
ATGGGTTATATCAAACCTGCTGCCCCAGTGGCACATGTATGGTATCTCAAAGGTATCCCAGTTATA
TCGCTATCCTCCTGGATATGCCTCTGCGGGATGTGGAACAAATTGTTTATTTCAACTCCTATGTTGT
TCTCAGTGTGGTAACGCCGATACCCTCACCTATAAGCAACTGTTGACAGAAGACCAATGGCTGGA
AATTGAAGACCAAGTTTATGCTGAAGATTCTACCTTACAAGGGGTAGAGGTGGGGATTGGGGCTGA
GGCACTGTTGCGACTACTCTCAGATATCAACCTAGAACCAGAAGCGGAAACCTGCGGGAAGATA
TCGGCACTGCTAAGGGGCAAAAGCGGGCAAAAGTTAATTAACGGCTGCGGGTAATTGATAACTTT
ATCGCCACTGGTTCCAAA

> *Synechococcus* sp. CENA 177 (610pb)

TGAAGTTACAGAGCCAGAACTATAAAATTACCGTACTTTAAAACCGGAGATGGATGGCTTGTCTG
CGAGCGCATCTTTGGTCCGGCTAAAGATTGGGAATGCCATTGTGGTAAGTATAAGAGAGTTCGTCA
CAGAGGAATTGTGTGTGAGCGCTGTGGCGTAGAAGTGAATCACGAGTGCGCCGCCATCGCAT
GGGTTACATTAACCTCGCCGCACCTGTGCTCACGTTTGGTACCTCAAAGGCATTCCCAGCTATATC
TCCATCCTGCTAGATATGCCCTTACGGGATGTGGAGCAAATCGTTTATTTCAATTCCCTATGTTGTC
TTAGTCCCGCAATGCTGAAACTTTAACTTACAAACAGTTACTGAGTGAAGACCAGTGGCTGGAAA
TCGAAGACCAAATTTATAGCGAGGATTCTACACTTCGAGGGGTAGAGGTTGGTATTGGTGCAGAAG
CCTTGTGCGATTACTCGCCGATATCCACTTAGAAGAAGAAGCTGAATCCTTGCGGGAAGAAATTG
GTACCACCAAAGGTCAAAGCGGGCAAAGCTCATTAACGGCTACGGGTGATTGACAACCTTCATC
GCCACTGGTTCTAAG

>*Synechococcus* sp. CENA179 (613 pb)

TGAGGTGACCAAGCCGGAGACCATCAACTACCGCACCTCGAGCCCGAGATGGACGGGCTGTTCT
GCGAGAAGATCTTCGGCCCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCATTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGC
CACCGCGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGGTCACCGAGAGCCGGGTGCGGCGCCACCG
GATGGGCTTCATCAAGCTGGCGGCTCCGGTCTCCACGTCTGGTATCTGAAGGGGATCCCCAGCTA
TGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCTTCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGTC
GTCCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTGCTCACCGAGGACGAGTGGCTG
GAGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCCGAGATCGAGAACGAGCCGCGGTGGGCATCGG
CGCGGAGGCCCTCAAGGAACTGCTGGAGAACCTCGAGCTCGCCGCGATCGCCGAGCAGCTGCGGG
AGGAGATCAGTGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGTATCGAC
AACTTCATCGCCACCGATGCCCCG

>*Synechocystis* sp. CENA180 (614 pb)

CGAGGTGACCAAGCCGAAATCCATCAACTACCGCACCTCAAGCCCGAGATGGACGGGCTCTTCT
GCGAGAAGATCTTCGGTCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCACTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGC
CACCGCGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGGTCACCGAAAGTCGCGTGCGGCGCCACCG
CATGGGCTTCATCAAACCTGGCGGCCCGCTCTCCACGTCTGGTACCTGAAGGGCATCCCCAGCTA
TGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCTTCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGT
GGTCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTGCTCACCGAGGACGAGTGGCT
GGAGATCGAGGACGAGATCTATGCCGAGGATTCCGAGATCGAGAACGAGCCCGCGTGGCATCG
GCGCCGAGGCGCTCAAGGAACTGCTCGAGAACCTCGACCTCGGCGAGATCGCCGAGCAGCTGCGG
GAGGAGATCAGCGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGCCTGCGGGTGTATCG
ACAACCTTCATCGCCACCGATGCCCCG

>*Nostoc* sp. CENA184 (610 pb)

CGAAGTTACTAAACCAGAGACGATTAATTATCGAACCTCAAGCCGAAATGGATGGCTTGTTTT
TGAGCGTATCTTTGGCCCCGAAAAGATTGGGAATGTCATTGCGGCAAGTATAAAAGAGTACGTCA
CCGTGGTATTGTATGTGAGCGCTGTGGAGTAGAAGTTACCGAGTTCGCGGGTACGTGTCACCGCAT
GGGATATATCAAACCTGGCTGCTCCAGTAGCCCATGTTTGGTATCTCAAAGGTATTCCCAGCTATATT
TCCATCCTGTTGGATATGCCCTTGCGGGATGTGGAGCAAATAGTATATTTCAACTCTTATGTTGTCC
TGAGTCTGGAACGCCGAAACCTTAACCTACAAACAGCTACTGAGTGAAGATCAGTGGCTGGAA
ATTGAGGACCAAATTTATAGCGAAGATTCTACTTTGCAGGGCGTTGAGGTAGGTATTGGTGTGAA
GCATTGCTACGTTTGTGCTGATATTAACCTTAGAGCAAGAAGCTGAAAGCCTGCGTGAAGAAATT
GGCAATGCTAAAGGGCAAAAACAGGCCAAGTTAATTAAGCGCCTGCGGGCAATTGACAACCTTCAT
TGCCACCGGTTCTAAA

>Xenococaceae. CENA186 (613 bp)

TGAGGTGACCAAGCCGGAGACCATCAACTACCGCACCCCTCAAGCCCGAGATGGACGGGCTGTTCT
GCGAGAGGATCTTCGGCCCCTCCAAGGACTGGGAGTGCCATTGCGGCAAGTACAAGCGGGTGCGC
CACCGCGGCATCGTCTGCGAGCGCTGCGGTGTGGAGATCACCGAGAGCCGGGTGCGGGGCCACCG
GATGGGCTTCATCAAGCTGGCGGCTCCGGTCTCCACGTCTGGTATCTGAGGGGGATCCCCAGCTA
TGTGGCGATCCTGCTCGACATGCCCTTCGGGACGTGGAGCAGATCGTCTACTTCAACTGCTACGTC
GTCCTCGATCCCGGTGATCACAAGGACCTCTCCTACAAGCAGCTGCTCACCGAGGACGAGTGGCTG
GAGATCGAGGATGAGATCTACGCCGAGGATTCCGAGATCGAGAACGAGCCGCGCGTGGGCATCGG
CGCGGAGGCCCTCAAGGAACTGCTGGAGAACCTCGAGCTCGCCGCGATCGCCGAGCAGCTGCGGG
AGGAGATCAGTGCCAGCAAGGGGCAGAAGCGGGCCAAGCTGATCAAGCGTCTGCGGGTGATCGAC
AACTTCATCGCCACCGATGCCCGG

ANEXO C: Sequências de nucleotídeos do gene *nifH* geradas nesse estudo

>*Phormidium* sp. CENA135 (325 pb)

CTCTACTCGCTTAATGCTTCACTCTAAAACCTCAAACCTACCATCTTACACTTAGCAGCAGAAAAGAGG
ATCAGTCGAAGATCTCGAATTAGATGAAGTATTACTCACTGGTTACAATAACGTTTCGTCGCGTTGA
GTCTGGTGGTCCCTGAACCCGGTGTGGTTGTGCAGGTCGTGGTATTATCACGGCGATTAACCTTCCTC
GAAGAAGAAGGTGCTTACGAAGACTTAGATTTAGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTTTCG
GGTGGTTTCGCTATGCCTATTCGTGAAGGTAAGCTCAAGAAATCTACATTGTTACATCT

>*Synechococcus* sp. CENA136 (325 pb)

CTCGACCCGCTTAATGCTGCACAGCAAAGCCCAAACCACAATTCTGCACCTAGCAGCCGAACGCGG
TGCGGTTGAAGACCTGGAACCTGGATGAAGTGTGTTAACTGGATGGGGTGGTGTCCGTTGCGTGGA
ATCCGGTGGCCAGAACCTGGTGTGCGTTGCGCTGGACGGGAATTATTACCGCCATTAACCTTCCT
TGAAGAAAATGGTGCCTATGAAGATTTAGATTATGTCAGCTATGACGTATTAGGGGACGTTGTATG
CGGTGGTTTCGCCATGCCCATTCGGGAAGGCAAAGCCCAAGAAATTTGCATCGTCACCTCC

>*Leptolyngbya* sp. CENA137 (325 pb)

GATTACTCGTTTGTATGCTACACAGTAAAGCTCAAACAAGTGTCTGCAACTAGCTGCTGAAAGAGG
CGCTGTGGAAGACATCGAATTAGAAGAAGTGATGCTCACAGGCTTCCGCGATGTACGTTGTGTTGA
GTCAGGTGGTCCCTGAGCCTGGAGTAGGTTGCGCTGGTTCGTGGTATTATTACCGCCATCAACTTCTTA
GAAGAAAACGGTGTACAAAGATGTTGATTTTGTAAAGTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGT
GGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

>*Synechococcus* sp. CENA140 (326 pb)

CTCCACCCGTCTGATGCTGCACAGCAAGGCCCAAACCACCATCTGCACCTGGCGGCTGAGCGCGG
CGCGGTAGAAGACCTGGAACCTGGATGAAGTGCTGCTCAAAGGCTACAAAGACGTGAAGTGCGTTG
AGTCCGGCGGTCTGAGCCTGGGGTTCGGTTGTGCCGGTCGGGGCATCATCACCGCCATCAACTTCT
TAGAAGAAGAAGGCGCTTACGAAGACCTCGATTACGTTTCTACGACGTACTGGGCGACGTAGTTT
GCGGCGGTTTTGCCATGCCCATCCGGGAAGGTAAGGCCAGGAAATCTACATCGTCTGTTCC

>*Chlorogloea* sp. CENA146 (325 pb)

CTCTACCCGTTTGTATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACCTACCCTTCTTCACTTGGCTGCTGAACGTGGT
GCAGTTGAAGATTTGGAACCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGGAA
TCTGGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGTGCTGGTTCGTGGTATCATCACCGCCATTAACCTTCTAG
AAGAAAACGGTGTATCAAGACGTAGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATACG
GTGGTTTCGCTATGCCTATTCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCC

>*Chlorogloea* sp. CENA149 (325 pb)

CTCTACTCGTTTGTATGCTACACAGTAAAGCTCAAACAAGTGTCTGCAACTAGCTGCTGAAAGAGG
CGCTGTGGAAGACATCGAATTAGAAGAAGTGATGCTCACAGGCTTCCGCGATGTACGTTGTGTTGA
GTCAGGTGGTCCCTGAGCCTGGAGTAGGTTGCGCTGGTTCGTGGTATTATTACCGCCATCAACTTCTTA
GAAGAAAACGGTGTACAAAGATGTTGATTTTGTAAAGTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGT
GGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

>*Chlorogloea* sp. CENA152 (325 pb)

CTCTACTCGTTTGTATGCTACACAGTAAAGCTCAAACAAGTGTCTGCAACTAGCTGCTGAAAGAGG
CGCTGTGGAAGACATCGAATTAGAAGAAGTGATGCTCACAGGCTTCCGCGATGTACGTTGTGTTGA
GTCAGGTGGTCCCTGAGCCTGGAGTAGGTTGCGCTGGTTCGTGGTATTATTACCGCCATCAACTTCTTA
GAAGAAAACGGTGTACAAAGATGTTGATTTTGTAAAGTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGT
GGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

>*Synechococcus* sp. CENA153 (327 pb)

CTCTACCCGCTTCGATGTCCCACTCCAAAGCTCAAACCACAGTATTACACTTGGCTGCTGAACGCG
GTGCAGTAGAAGACCTCGAACTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTTCCGTGGTGTAAAGTGCGTAG
AATCTGGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCTGGTTCGTGGTATTATCACCGCTATTAACCTTCTT
GGAAGAAAACGGTGTACACAGACCTAGACTTCGTATCTTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTG
CGGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCACAGAGAAATCTACATCGTTACCTCC

>*Nostoc* sp. CENA158 (325 pb)

CTCTACTCGTTTGTATGCTACACAGTAAAGCTCAAACAAGTGTCTGCAACTAGCTGCTGAAAGAGG
CGCTGTGGAAGACATCGAATTAGAAGAAGTGATGCTCACAGGCTTCCGCGATGTACGTTGTGTTGA

GTCAGGTGGTCCTGAGCCTGGAGTAGGTTGCGCTGGTCGTGGTATTATTACCGCCATCAACTTCTTA
 GAAGAAAACGGTGCTTACAAAGATGTTGATTTTGTAAAGTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGT
 GGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

>*Nostoc* sp. CENA159 (325 pb)

CTCCACGCGTCTGATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACCACCGTTCTTCACTTGGCTGCTGAACGTGGT
 GCAGTTGAAGATTTGGAACCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGGAA
 TCTGGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCTGGTCGTGGTATCATTACCGCCATCAACTTCTTAG
 AAGAAAACGGTGCTTTCCAAGATGTTGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGTG
 GTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

>*Nostoc* sp. CENA160 (325 pb)

CTCTACTCGTTTGTGCTACACAGTAAAGCTCAAACAAGTGTCTGCAACTAGCTGCTGAAAGAGG
 CGCTGTGGAAGACATCGAATTAGAAGAAGTATGCTCACAGGCTTCCGCGATGTACGTTGTGTTGA
 GTCAGGTGGTCCTGAGCCTGGAGTAGGTTGCGCTGGTCGTGGTATTATTACCGCTATCAACTTCTTA
 GAAGAAAACGGTGCTTACCAAGATGTTGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGT
 GTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCT

>*Synechococcus* sp. CENA164 (325 pb)

TTCTGCTCGCTTAATGCTTCACTCTAAAGCTCAAACCTACCATCTTACACTTAGCAGCAGAAAGAGG
 ATCAGTCCAAGATCTCGAATTAGATGAAGTATTACTCACTGGTTACAATAACGTTTCGTTGCGTTGA
 GTCTGGTGGTCCTGAACCCGGTGTGGTTGTGCAGGTCGTGGTATTATCACGGCGATTAACCTCCTC
 GAAGAAGAAGGTGCTTACGAAGACTTAGATTTAGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTTGC
 GCGGTTTCGCTATGCCTATTCGTGAAGGTAAGCTCAAGAAATCTACATTGTTACATCT

>*Leptolyngbya* sp. CENA167 (325 pb)

CTCCACCCGTTTGTGCTGCACAGTAAAGCTCAAACCACCGTTCTTCACTTGGCTGCAGAACGTGGT
 GCAGTTGAAGATTTGGAACCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGGAA
 TCTGGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCTGGTCGTGGTATCATTACCGCCATCAACTTCTTAG
 AAGAAAACGGTGCTTACCAAGATGTTGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGTG
 GTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCACAAGAAATCTACATCGTTACTTCT

>*Cyanothece* sp. CENA169 (325 pb)

CTCTACTCGCTTAATGCTTCACTCTAAAGCTCAAACCTACCATCTTACACTTAGCAGCAGAAAGAGG
 ATCAGTCAAGATCTCGAATTAGATGAAGTATTACTCACTGGTTACAATAACGTTTCGTTGCGTTGA
 GTCTGGTGGTCCTGAACCCGGTGTGGTTGTGCAGGTCGTGGTATTATCACGGCGATTAACCTACCTC
 GAAGAAGAAGGTGCTTACGAAGACTTAGATTTAGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTTGC
 GGTGGTTTCGCTATGCCTTTTCGTGAAGGTAAGCTCAAGAAATCTACATTGTTACATCT

>*Chlorogloea* sp. CENA174 (325 pb)

CTCTACTCGCTTAATGCTTCACTCTAAAGCTCAAACCTACCATCTTACACTTAGCAGCAGAAAGAGG
 ATCAGTCAAGATCTCGAATTAGATGAAGTATTACTCACTGGTTACAATAACGTTTCGTTGCGTTGA
 GTCTGGTGGTCCTGAACCCGGTGTGGTTGTGCAGGTCGTGGTATTATCACGGCGATTAACCTCCTC
 GAAGAAGAAGGTGCTTACGAAGACTTAGATTTAGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTTGC
 GGTGGTTTCGCTATGCCTATTCGTGAAGGTAAGCTCAAGAAATCTACATTGTTACATCT

>*Nostoc* sp. CENA175 (325 pb)

CTTACCCGTTTGTGCTCCACTCCAAAGCTCAAACCACAGTATTACACTTGGCTGCTGAACGCGGT
 GCAGTAGAAGACCTCGAACTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTCCGTGGTGTAAAGTGCGTAGAA
 TCTGGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGCGCTGGTCGTGGTATTATCACCGCTATTAACCTTCTTG
 AAGAAAACGGTGCTTACGCAGACCTAGACTTCGTATCTTACGACGTATTGGGTGACGTTGTGTGCG
 GTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCACAAGAAATCTACATCGTTACCTCC

>*Microchaete* sp. CENA176 (325 pb)

CTCCACCCGTTGATGCTGCACTCTAAAGCTCAAACCACCGTGCTGCACTTAGCAGCAGAACGTGG
 TGCAGTTGAAGATTTAGAAGCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTCCGTGGTGTAAAATGCGTGGAA
 ATCTGGTGGTCCTGAGCCTGGTGTGGTTGTGCTGGTCGTGGTATTACCACCGCTATTAATTTCTTG
 GAAGAAAATGGTGCTTACCAAGACTTAGATTTTCGTATCTTACGACGTATTGGGTGACGTTGTATGC
 GGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAGCCCAAGAAATCTACATCGTTACCTCC

>*Chlorogloea* sp. CENA181 (325 pb)

CTCCACCCGTTTGATGCTGCACTCTAAAGCTCAAACCACCGTGCTACACTTAGCAGCAGAACGTGG
TGCAGTTGAAGATTTAGAAGCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTTCCGTGGTGTAAAATGCGTGGA
ATCTGGTGGTCCTGAGCCTGGTGTGGTTGTGCTGGTCGTGGTATTATCACCGCTATTAATTTCTTG
GAAGAAAATGGTGCTTACCAAGACTTAGATTTTCGTATCTTACGACGTATTGGGTGACGTTGTATGC
GGTGGTTTCGCTATGCCTATCCGTGAAGGTAAAGCCCAAGAAATCTACATCGTTACCTCC

>*Leptolyngbya* sp CENA183 (325 pb)

CTCTACTCGCTTAATGCTTCACTCTAAAGCTCAAACCTACCATCTTACACTTAGCAGCAGAAAAGAGG
ATCAGTCGAAGATCTCGAATTAGATGAAGTATTACTCACTGGTTACAATAACGTTTCGTTGCGTTGA
GTCTGGTGGTCCTGAACCCGGTGTGGTTGTGCAGGTCGTGGTATTATCACGGCGATTAACCTCCTC
GAAGAAGAAGGTGTTTACGAAGACTTAGATTTAGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTTTGC
GGTGGTTTCGCTATGCCTATTCGTGAAGGTAAAGGCTCAAGAAATCTACATTGTTACATCT

>*Nostoc* sp. CENA184 (325pb)

CTTACCCGTTTGATGCTGCACAGTAAAGCTCAAACCTACCGTTCTTCACTTGGCTGCTGAACGTGGT
GCAGTTGAAGATTTGGAAGCTCGAAGAAGTAATGCTCACCGGTTTCCGTGGTGTGCGTTGCGTGGA
TCTGGTGGTCCAGAACCCGGTGTAGGTTGTGCTGGTCGTGGTATCATCACCGCCATTAACCTCTTAG
AAGAAAACGGTGCTTATCAAGACGTAGACTTCGTATCTTACGACGTACTAGGTGACGTTGTATGCG
GTGGTTTCGCTGTGCCTATTCGTGAAGGTAAAGCGCAAGAAATCTACATCGTTACCTCC

>*Nostoc* sp. CENA186 (325pb)

CTCTACTCGCTTAATGCTTCACTCAAAGCTCAAACCTACCATCTTACACTTAGCAGCAGAAAAGAGG
ATCAGTCGAAGATCTCGAATTAGATGAAGTATTACTCACTGGTTACAATAACGTTTCGTTGCGTTGA
GTCTGGTGGTCCTGAACCCGGTGTGGTTGTGCAGGTCGTGGTATTATCACGGCGATTAACCTCCTC
GAAGAAGAAGGTGCTTACGAAGACTTAGATNTAGTATCCTACGACGTATTGGGTGACGTTGTTTGC
GGTGGTTTCGCTATGCCTATTCGTGAAGGTAAAGCTCAAGAAATCTACATTGTTACATCT

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)