

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

**ELAINE CRESPIM**

**Identificação e sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese de  
microcistinas e saxitoxinas na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* SPC777**

**Piracicaba**

**2013**



**ELAINE CRESPIM**

**Identificação e sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese de  
microcistinas e saxitoxinas na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* SPC777**

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na  
Agricultura da Universidade de São Paulo, para a  
obtenção do título de Doutora em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no  
Ambiente**

**Orientadora: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore**

**Piracicaba**

**2013**

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**

Crespim, Elaine

Identificação e sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese de microcistinas e saxitoxinas na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* SPC777 / Elaine Crespim; orientadora Marli de Fátima Fiore. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

137 p.: il.

Tese (Doutorado – 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 toxicogênicas 2. Cyanophyta 3. Filogenia 4. Genomas 5. Reação em Cadeia por Polimerase 6. Recombinação genética 7. Sequenciamento genético 8. Transferência de genes 9. Vigilância sanitária I. Título

CDU (561.232 + 577.19) : 575.82

*Dedico esta tese aos “anjos”... não me refiro aqui àqueles seres alados e com auréolas, e sim a pessoas normais que em diversas situações me deram força graças a gestos simples, até mesmo um sorriso. Aqueles desconhecidos que, inesperadamente no caminho ao laboratório, trocaram uma ou outra palavra de cortesia, ou fizeram favores mesmo que não solicitados. Alguns destes se tornaram grandes amigos, outros representaram somente uma simpatia em um momento difícil... alguns foram meus vizinhos, companheiros de república ou colegas de laboratório, outros ficaram há oceanos de distância... O importante é que, em todos os casos, estes momentos agradáveis trouxeram uma energia positiva que foi muito bem-vinda no decorrer desses quatro anos.*

*Como não poderia deixar de acontecer, houve também os “anjos” conhecidos há muito tempo, alguns reaparecendo após meses ou anos sem contato, já outros que sempre fizeram questão de me apoiar e acompanhar em todos os momentos. Estes últimos merecem uma atenção especial: são meus pais e meu irmão.*

\* \* \* \* \*

*I dedicate this thesis to the angels... I’m not referring here to those winged beings with halos, but to normal people that in various situations have given me strength due to simple gestures, even a smile. Those unknown people that, unexpectedly on my way to the lab, have exchanged one word or another of courtesy, or done favors even if not asked for. Some of them have become close friends, while others have represented just some sympathy in a hard moment... Some have been my neighbours, flatmates or lab mates, while others have stayed oceans away... What matters is that, in all these cases, these pleasant moments have brought a positive energy that was very welcome during these four years.*

*Of course, there were also the “angels” that I knew for a long time, some of them reappearing after months or years without much contact, while others were always making it a point to support and join me in all the moments. These last ones deserve a special attention: they are my parents and brother.*



## AGRADECIMENTOS

Durante o período de uma tese, muitas pessoas passam pela nossa vida, cada uma contribuindo de um jeito, seja com dicas e orientações, trabalho em conjunto ou companheirismo.

Em primeiro lugar, agradeço à Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore pela orientação durante o projeto. Pelo esforço para superar os desafios (nacionais e internacionais!) e principalmente por sempre acreditar na problemática principal deste trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à Petrobras, pelo fomento (Processo N°142115/2009-6) durante a parte deste projeto realizada no Brasil.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo fomento (processo número 1090-11-9) durante a etapa deste projeto realizada em Sydney (NSW, Austrália).

Aos Profs. Drs. Artur Silva, Paula Schneider e Evonnildo Costa Gonçalves, por me receberem de forma tão acolhedora em seu laboratório e permitirem que eu acompanhasse todas as etapas do sequenciamento por SOLiD e processamento dos dados. Agradeço também aos funcionários e estudantes do LPDNA pela troca de ideias, pela paciência em me explicar o princípio dos procedimentos e, claro, pelas risadas e amizade.

To Profs. Drs. Michelle C. Moffitt and Brett A. Neilan, for kindly receiving me in their laboratories and allowing a valuable exchange of knowledge. Also, for all the patience with endless visa and scholarship procedures, support in the challenges faced and for the trust in my work. I also thank Dr. Julia Muenchoff and BGGM lab mates for the welcome discussions of ideas involving a broad range of scientific subjects, for protocols and challenges shared. For all the care and friendship.

A toda a família Serruya, pela hospedagem em sua casa durante o período de experimentos realizados em Belém, sempre me tratando como parte da família, com a típica hospitalidade paraense.

Aos colegas de laboratório (e laboratórios vizinhos) do CENA/USP, por tantas experiências compartilhadas, de perto ou de longe, com expectativas, torcidas, conselhos e elaboração de “Planos B”. Acima de tudo, pela amizade que continuará após o projeto.

Aos amigos pessoais, que sempre estiveram na torcida pelo meu sucesso.

Finalmente, agradeço aos meus pais e irmão, companheiros de todas as monografias e que, apesar de não serem biólogos, foram os maiores torcedores para que eu encontrasse “os genes daquela toxina”.

*"Somos arquivos digitais do plioceno africano, até dos mares devonianos, repositórios ambulantes da sabedoria dos antigos dias. Pode-se passar uma vida inteira lendo nessa antiga biblioteca e morrer sem ainda estar saciado pelas suas maravilhas." (Richard Dawkins).*



## RESUMO

CRESPIM, E. **Identificação e sequenciamento de genes envolvidos na biossíntese de microcistinas e saxitoxinas na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* SPC777**. 2013.137 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

As toxinas produzidas por cianobactérias em ecossistemas aquáticos de superfície utilizados para abastecimento público constituem uma preocupação mundial, com casos de intoxicação relatados em diversos países. Sérios problemas de saúde e até mesmo óbito podem ocorrer como consequência dessas intoxicações. Em ambientes de água doce eutrofizados, florações de espécies de *Microcystis* são frequentemente observadas e, devido à sua ampla distribuição geográfica e capacidade de produzir toxinas, este é um dos gêneros de cianobactérias mais extensivamente estudados. *Microcystis* spp. são conhecidas pela produção da potente hepatotóxina microcistina. No entanto, um estudo recente com a linhagem *M. aeruginosa* SPC777 isolada da represa Billings (São Paulo, SP) relatou a sua capacidade de produção simultânea da [L-ser<sup>7</sup>] microcistina-RR e da neurotoxina saxitoxina (goniautoxinas 1, 2, 3 e 4). Esse foi o primeiro relato de produção de saxitoxina por uma cianobactéria unicelular. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar e sequenciar os genes envolvidos na biossíntese da microcistina e saxitoxina na linhagem *M. aeruginosa* SPC777 e reavaliar a produção destas toxinas após vários anos de cultivo em laboratório. Para isso, foi feito o sequenciamento do genoma de *M. aeruginosa* SPC777 na plataforma SOLiD V3 e a montagem *ab initio* das leituras foi realizada usando os algoritmos Edena e Velvet. Análises Blast no banco de dados do NCBI foram realizadas na busca de similaridade por sequências dos genes *mcy* e *sxt* e de genes que flanqueiam os agrupamentos envolvidos na biossíntese de ambas as toxinas. Além disso, PCR e sequenciamento Sanger foram empregados para auxiliar a busca dos genes de interesse. Os dez genes envolvidos na biossíntese da microcistina (*mcyA-J*) foram encontrados a partir do genoma da *M. aeruginosa* SPC777, assim como os genes *dnaN* e *eumA1*, que são normalmente encontrados flanqueando o agrupamento gênico da microcistina. O arranjo dos genes *mcy* no agrupamento seguiu a mesma ordem de outros descritos na literatura, mas foram encontradas diferenças na sequência de nucleotídeos para alguns dos genes. Para a saxitoxina, apenas cinco genes entre aqueles diretamente envolvidos na biossíntese da neurotoxina foram encontrados usando PCR e sequenciamento Sanger. As sequências parciais dos genes *sxt* apresentaram alta identidade com outros encontrados em cianobactérias tóxicas. Além disso, a tradução dessas sequências em aminoácidos e as funções protéicas e domínios preditos confirmaram sua identidade com os genes da síntese de saxitoxina. Análises químicas em HPLC-MS/MS mostraram a produção de microcistina, com a detecção do íon *m/z* 1036, que corresponde à microcistina-YM. Entretanto, não foi observada produção de saxitoxinas. Pelo que sabemos, este é o primeiro agrupamento gênico de microcistina sequenciado de uma linhagem de *Microcystis* isolada da América do Sul, além de serem os primeiros genes *sxt* descritos em uma cianobactéria unicelular. Este estudo propiciou novos conhecimentos sobre a origem dos genes *mcy* e *sxt* e contribuiu para uma melhor compreensão da evolução destas toxinas.

Palavras-chave: Genes *mcy*. Genes *sxt*. SOLiD. Hepatotoxinas. Neurotoxinas.



## ABSTRACT

CRESPIM, E. **Identification and sequencing of genes involved in the biosynthesis of microcystins and saxitoxins in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* SPC777.** 2013.137 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

The toxins produced by cyanobacteria in surface aquatic ecosystems used for public supply constitute a worldwide concern, with poisoning cases reported in several countries. Serious health problems and even death can occur as a consequence of these poisonings. In eutrophic freshwater environments, blooms of *Microcystis* species are often observed and, due to its wide geographic distribution and ability to produce toxins, this is one of the most extensively studied cyanobacterial genera. *Microcystis* spp. are known for the production of the potent hepatotoxin microcystin. Nonetheless, a recent study with the strain *M. aeruginosa* SPC777 isolated from Billings reservoir (São Paulo, SP) reported its ability for simultaneous production of [L-ser<sup>7</sup>] microcystin-RR and the neurotoxin saxitoxin (gonyautoxins 1, 2, 3 and 4). This was the first report of saxitoxin production by a unicellular cyanobacterium. In this context, the present study aimed at the identification and sequencing of the genes involved in the biosynthesis of microcystin and saxitoxin in the strain *M. aeruginosa* SPC777 and re-evaluation of the production of these toxins after several years of cultivation in laboratory. For this, whole genome sequencing of *M. aeruginosa* SPC777 was done in the platform SOLiD V3 and *ab initio* assembly of the reads was performed using the algorithms Edena and Velvet. Blast analyses in the NCBI database were performed in the search for similarity to *mcy* and *sxt* gene sequences and to genes flanking the clusters involved in the biosynthesis of both toxins. Furthermore, PCR and Sanger sequencing were employed to help the search for the genes of interest. The ten genes involved in microcystin biosynthesis (*mcyA-J*) were found and annotated from the genome of *M. aeruginosa* SPC777, as well as the genes *dnaN* and *umaI*, which are usually found flanking the microcystin gene cluster. The arrangement of *mcy* genes in the cluster has followed the same order than others described in literature, but differences were found in the sequence of nucleotides for some of the genes. For saxitoxin, only five genes among those directly involved in the biosynthesis of this neurotoxin were found using PCR and Sanger sequencing. The partial *sxt* gene sequences have shown high identities to others found in toxic cyanobacteria. Additionally, their translation into amino acids and the predicted protein functions and domains confirmed their identity as saxitoxin synthetase genes. HPLC-MS/MS chemical analyses have shown the production of microcystin, with the detection of the ion  $m/z$  1036, which corresponds to the microcystin-YM. Nevertheless, saxitoxin production was not observed. As far as we know, this is the first microcystin gene cluster sequenced from a *Microcystis* strain isolated from South America and it is also the first time that *sxt* genes are described in a unicellular cyanobacterium. This study has brought new insights on the origin of the *mcy* and *sxt* genes and contributed to a better understanding of the evolution of these toxins.

Keywords: *mcy* genes. *sxt* genes. SOLiD. Hepatotoxins. Neurotoxins.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	233
Figura 2 – Estrutura geral das microcistinas. ....	266
Figura 3 – Representação esquemática dos domínios enzimáticos de NRPS e PKS.....	28
Figura 4 – Organização do agrupamento gênico envolvido na biossíntese da microcistina em <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806. ....	29
Figura 5 – Etapas realizadas na biossíntese do aminoácido Adda e estrutura de domínios prevista para McyG, McyD e McyE .....	30
Figura 6 – Representação esquemática da biossíntese de microcistina-LR e estrutura prevista para os domínios McyE, McyA, McyB, e McyC.....	31
Figura 7 – Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de hepatotoxinas em diferentes cianobactérias. ....	32
Figura 8 – (A) Estrutura da molécula de saxitoxina; (B) Principais variantes estruturais de saxitoxinas .....	33
Figura 9 – Via biossintética proposta para a saxitoxina .....	34
Figura 10 – Agrupamento gênico envolvido na biossíntese de saxitoxinas em diferentes cianobactérias .....	37
Figura 11 – Principais etapas do sequenciamento por SOLiD .....	40
Figura 12 – Fluxograma das etapas de construção de biblioteca pareada 2 x 50 pb para sequenciamento por SOLiD 3 Plus .....	566
Figura 13 – Cianobactérias estudadas neste trabalho.....	777
Figura 14 – Microscopia óptica de células da <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 .....	800
Figura 15 – Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) baseada no gene que codifica para o RNAr 16S, situando as cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> SPC777 e Synechococcaceae .....	833
Figura 16 – Sintenia em nível de nucleotídeos dos contigs gerados e o genoma de referência 866	
Figura 17 – Organização estrutural do agrupamento gênico <i>mcy</i> no genoma da <i>M. aeruginosa</i> SPC777 em comparação com outras linhagens produtoras de microcistina e nodularina. ....	955
Figura 18 – Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) concatenada da sequência de aminoácidos dos produtos gênicos McyA-McyJ .....	97
Figura 19 – Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtA .....	100
Figura 20 – Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtB .....	102
Figura 21 – Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtG .....	104
Figura 22 – Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtH .....	105
Figura 23 – Árvore filogenética da sequência de aminoácidos de SxtI.....	109
Figura 24 – Espectro de massas em modo <i>full scan</i> do extrato referente ao cultivo em ASM-1, com destaque para o íon <i>m/z</i> 1036 .....	1155
Figura 25 – Fragmentação do íon <i>m/z</i> 1036 encontrado em cultivo em meio ASM-1. ....	115



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cianobactérias produtoras de toxinas.....	25
Tabela 2 – Concentrações de sacarose testadas.....	46
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do DNAr 16S e nas etapas de clonagem e sequenciamento.....	49
Tabela 4 – Iniciadores desenhados para a elucidação das lacunas na sequência do gene <i>mcyC</i> em <i>M. aeruginosa</i> SPC777 .....	61
Tabela 5 – Programas de PCR empregados para a elucidação de lacunas no agrupamento gênico da microcistina .....	62
Tabela 6 – Sequências utilizadas para o desenho de iniciadores específicos para genes <i>sxt</i> .....	63
Tabela 7 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes envolvidos na biossíntese de saxitoxinas .....	66
Tabela 8 – Programas de PCR empregados para a detecção de genes <i>sxt</i> .....	68
Tabela 9 – Iniciadores desenhados para a técnica de “pan-handle” .....	70
Tabela 10 - Resultado da análise de BlastX. Detecção das enzimas envolvidas na biossíntese de microcistina e enzimas codificadas por genes flanqueadores do agrupamento gênico <i>mcy</i> em <i>M. aeruginosa</i> SPC777.....	89
Tabela 11 - Resultado da análise de BlastX. Detecção de enzimas necessárias à biossíntese de saxitoxinas e possíveis genes flanqueadores do agrupamento gênico <i>sxt</i> em <i>M. aeruginosa</i> SPC777 .....	900
Tabela 12 – Porcentagem GC de cada gene do agrupamento gênico <i>mcy</i> da <i>M. aeruginosa</i> SPC777 e dos seus dois genes flanqueadores.....	93
Tabela 13 – Comparação da similaridade (%) dos produtos gênicos envolvidos na biossíntese de microcistina na linhagem <i>M. aeruginosa</i> SPC777 com as sequências de outras cianobactérias produtoras de microcistinas e a linhagem <i>N.spumigena</i> NSOR10, produtora de nodularina .....	977
Tabela 14 – Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene <i>sxtA</i> da linhagem SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI.....	99
Tabela 15 – Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene <i>sxtB</i> da linhagem <i>M. aeruginosa</i> SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI.....	101
Tabela 16 – Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene <i>sxtG</i> da linhagem <i>M. aeruginosa</i> SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI.....	103
Tabela 17 – Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene <i>sxtH</i> da linhagem SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI. ....	105
Tabela 18 – Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para a sequência parcial do gene <i>sxtI</i> da linhagem SPC777 com relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI .....	107
Tabela 19 – Tempos de retenção obtidos para as amostras analisadas por HPLC .....	114



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Filo Cyanobacteria.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 O gênero <i>Microcystis</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Toxinas de cianobactérias.....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Microcistinas .....	26
2.3.2 Saxitoxinas .....	32
<b>2.4 Plataforma SOLiD.....</b>	<b>38</b>
<b>2.5 Alterações no conteúdo genético de procariotos na natureza.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 Troca de informação genética .....	40
2.5.2 Rearranjos gênicos intracelulares .....	41
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>43</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Linhagem utilizada e manutenção.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Análise microscópica.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Obtenção de monocultura cianobacteriana.....</b>	<b>44</b>
4.3.1 Lavagem de células com extran 0,1 % .....	45
4.3.2 Cultivo em meio de cultura sólido .....	45
4.3.3 Micropipetagem de células em meio líquido .....	46
4.3.4 Centrifugação com gradiente diferencial de sacarose .....	46
4.3.5 Filtragem de células .....	47
4.3.6 Inibição do crescimento de células contaminantes por antibiose .....	47
4.3.7 Confirmação da pureza por microscopia de epifluorescência .....	48
4.3.8 Sequenciamento do DNAr 16S .....	48
<b>4.4 Sequenciamento do genoma da <i>M. aeruginosa</i> SPC777 na Plataforma SOLiD V3.....</b>	<b>52</b>
4.4.1 Extração de DNA .....	52
4.4.2 Amplificação do genoma.....	53
4.4.3 Biblioteca e sequenciamento por SOLiD .....	53
4.4.4 Aquisição e processamento das leituras obtidas após o sequenciamento .....	57
<b>4.5 Montagem do genoma de <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777.....</b>	<b>57</b>
4.5.1 Montagem por referência .....	57
4.5.2 Montagem ab initio .....	58
4.5.3 Alinhamento dos contigs gerados por montagem ab initio contra um genoma referência	59
<b>4.6 Análises por Blast.....</b>	<b>59</b>
<b>4.7 Identificação de plasmídeos.....</b>	<b>60</b>
<b>4.8 Caracterização do agrupamento gênico da microcistina.....</b>	<b>60</b>
4.8.1 Seleção e montagem dos contigs de interesse.....	60

4.8.2 Preenchimento de lacunas dentro do agrupamento gênico <i>mcy</i> .....	61
4.8.3 Anotação automática e curadoria manual do agrupamento gênico da microcistina .....	62
4.8.4 Análise de similaridade e construção de árvores filogenéticas .....	63
<b>4.9 Amplificação por PCR e sequenciamento de genes <i>sxt</i>.....</b>	<b>63</b>
4.9.1 Desenho de iniciadores .....	63
4.9.2 Amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes <i>sxtA</i> , <i>sxtB</i> , <i>sxtG</i> , <i>sxtH</i> e <i>sxtI</i> . .....	67
4.9.3 Extensão dos fragmentos de genes <i>sxt</i> pela técnica “pan-handle” .....	69
<b>4.10 Análises químicas de microcistinas e saxitoxinas.....</b>	<b>73</b>
4.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) .....	73
4.10.2 Análise por HPLC-MS.....	75
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>5.1 Análise microscópica.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2 Obtenção de monocultura cianobacteriana.....</b>	<b>78</b>
5.2.1 Sequenciamento do DNAr 16S .....	80
<b>5.3 Sequenciamento do genoma da <i>M. aeruginosa</i> SPC777 na Plataforma SOLiD V3.....</b>	<b>84</b>
5.3.1 Montagem do genoma da <i>M. aeruginosa</i> SPC777 .....	85
<b>5.4 Caracterização do agrupamento gênico da microcistina.....</b>	<b>93</b>
5.4.1 Organização dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina .....	94
5.4.2 Análise de similaridade e árvores filogenéticas .....	96
<b>5.5 Amplificação por PCR e sequenciamento de genes <i>sxt</i>.....</b>	<b>98</b>
5.5.1 Gene <i>sxtA</i> .....	988
5.5.2 Gene <i>sxtB</i> .....	101
5.5.3 Gene <i>sxtG</i> .....	102
5.5.4 Gene <i>sxtH</i> .....	104
5.5.5 Gene <i>sxtI</i> .....	106
5.5.6 PCR para a detecção de <i>sxtN</i> , <i>sxtX</i> , <i>sxtW</i> , <i>sxtV</i> e “ <i>sxtO</i> context” .....	109
5.5.7 Extensão dos fragmentos de genes <i>sxt</i> pela técnica “pan-handle” .....	110
<b>5.6 Análises químicas de microcistinas e saxitoxinas.....</b>	<b>113</b>
5.6.1 HPLC .....	113
5.6.2 Análise por HPLC-MS/MS .....	114
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias são micro-organismos fotossintéticos oxigênicos pertencentes ao domínio Bacteria com distribuição cosmopolita (CASTENHOLZ, 2001). Nos ambientes aquáticos, alguns gêneros produzem aerótopos, que propiciam o controle da flutuabilidade na coluna d'água (WALSBY, 1994). Além dessa característica, as cianobactérias planctônicas têm a capacidade de crescer em corpos d'água com alta turbidez, armazenar fósforo (CHORUS; BARTRAM, 1999) e algumas espécies conseguem assimilar o nitrogênio atmosférico (FIORE; HONDA, 2008). Essas características proporcionam vantagem competitiva em relação a outros tipos de organismos fitoplanctônicos e, quando sob condições ótimas de pH, temperatura, luminosidade e disponibilidade de nutrientes, podem crescer exageradamente, caracterizando as florações (ODEBRECHT et al., 2002). As florações de cianobactérias geram um impacto social, econômico e ambiental, provocando alterações indesejadas nas propriedades da água, as quais afetam a fauna local e impedem o consumo humano. Além disso, muitas vezes ocorre produção de toxinas, que caracterizam uma grande preocupação para a saúde pública.

Intoxicações humanas causadas por cianotoxinas já foram relatadas em diversos países, como Austrália, Brasil, China e Índia (KAEBERNICK; NEILAN, 2001). No Brasil, as florações de cianobactérias ocorridas no reservatório de Itaparica, na Bahia, em 1988, foram apontadas como possíveis responsáveis pela morte de 88 pessoas, dentre os cerca de 2000 casos de gastroenterite registrados em um período de 42 dias (TEIXEIRA et al., 1993). Já em 1996, no reservatório de Tabocas, em Caruaru, Pernambuco, 52 pacientes com problemas renais faleceram em decorrência da presença de microcistinas na água utilizada para a hemodiálise (AZEVEDO et al., 2002). Esse foi o primeiro registro mundial de envenenamento humano fatal atribuído às cianotoxinas. Esses episódios contribuíram para um aumento substancial nas pesquisas sobre cianobactérias e suas toxinas. Como resultado, muitas informações sobre toxicidade, estrutura das cianotoxinas e métodos analíticos para sua determinação estão disponíveis.

Dentre os gêneros mais comumente relatados como presentes em florações está *Microcystis* (Kützing), sendo provavelmente *M. aeruginosa* a espécie mais conhecida. O gênero *Microcystis* é composto por cerca de 50 espécies de cianobactérias planctônicas que são frequentemente encontradas em lagos em diversos países (KOMÁREK; HAUER, 2012). Suas principais características morfológicas são: colônias formadas por células cocoides arranjadas irregularmente em um envelope mucilaginoso, divisão celular em três planos perpendiculares e presença de aerótopos (KOMÁREK, 2003). As cianobactérias do gênero *Microcystis* são

conhecidas pela síntese de microcistina, uma hepatotoxina cujo mecanismo tóxico é a inibição específica das proteínas fosfatases tipo 1 e 2A (GOLDBERG et al., 1995; MACKINTOSH et al., 1990). Como consequência da inibição de fosfatases, as células hepáticas sofrem necrose. Nos casos de intoxicação aguda, ocorre óbito como consequência de hemorragia interna no fígado e choque hipovolêmico (CARMICHAEL, 1994). Se a dose ingerida não for letal, a intoxicação crônica pode provocar o aparecimento de nódulos neoplásicos no fígado (NISHIWAKI-MATSUSHIMA et al., 1992). Mais de 90 variantes estruturais de microcistinas já foram descritas (PEARSON et al., 2010), com variação em sua toxicidade, sendo a microcistina-LR uma das isoformas mais potentes.

Outro grupo de toxinas que já foi relatado em florações de cianobactérias é o das saxitoxinas. Saxitoxinas são alcaloides tricíclicos peridropurínicos que bloqueiam os canais de sódio dependentes de voltagem, desta forma inibindo a transmissão do estímulo nervoso (POMATI et al., 2004; GARCÍA et al., 2005; LLEWELLYN, 2006). Como consequência, o animal afetado sofre paralisia muscular, em alguns casos extremos levando à morte por asfixia. A ligação desta toxina ao seu receptor é reversível, portanto não são conhecidos casos de intoxicação crônica. Das cerca de 30 variantes estruturais, as saxitoxinas são consideradas as mais potentes (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012).

Até recentemente, as cianobactérias do gênero *Microcystis* eram conhecidas somente pela produção de microcistinas e houve um relato de produção da neurotoxina anatoxina-a (PARK et al., 1993). No entanto, Sant'Anna et al. publicaram em 2011 um estudo a respeito de uma linhagem de *Microcystis aeruginosa* (SPC777) isolada da represa Billings (São Paulo, SP) capaz da co-produção de [L-ser<sup>7</sup>] microcistina-RR e goniatoxinas (análogos de saxitoxinas) 1, 2, 3 e 4. A produção destas toxinas foi verificada por ELISA e técnicas de cromatografia e espectrometria de massas. Além disso, o gene *mcyA*, envolvido na biossíntese de microcistinas, foi detectado, porém não foram buscados genes envolvidos na biossíntese de saxitoxinas. Levando em consideração o risco para a saúde humana das cianobactérias toxigênicas encontradas em reservatórios de água utilizados para abastecimento público, torna-se importante o conhecimento aprofundado da biossíntese dessas toxinas, inclusive a caracterização dos genes e o entendimento dos processos de aquisição e perda desses genes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Filo Cyanobacteria

O Filo Cyanobacteria é composto por bactérias gram-negativas capazes de realizar fotossíntese oxigênica. Estes micro-organismos têm origem consideravelmente antiga. Registros geológicos revelam estromatólitos australianos de 2,7 bilhões de anos, além da detecção de 2-metilpanoídes, fósseis moleculares de origem sugerida como cianobacteriana, do mesmo período (BROCKS et al., 1999; BUICK, 1992; TOMITANI et al., 2006).

Essa longa história evolutiva proporcionou a este filo uma grande diversidade morfológica, fisiológica e ecológica, embora constitua um grupo monofilético. As cianobactérias podem ser unicelulares ou filamentosas, sendo que as filamentosas podem ou não apresentar ramificações e/ou células diferenciadas. Algumas espécies produzem uma bainha mucilaginosa ao redor de células individuais ou de colônias; as espécies aquáticas podem ou não apresentar vesículas gasosas para auxiliar em sua flutuabilidade; além de algumas cianobactérias filamentosas apresentarem heterócitos (células especializadas para a fixação de nitrogênio) e acinetos (envolvidos com a resistência a condições adversas) (CHORUS; BARTRAM, 1999; SIVONEN; JONES, 1999; WHITTON, 1992).

As cianobactérias possuem pigmentos tais como a clorofila-a, envolvida no processo de fotossíntese, as ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina) e as xantofilas, que são carotenoides amarelados (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Por realizarem fotossíntese oxigênica, as cianobactérias apresentam uma grande parcela de contribuição para a oxigenação da atmosfera terrestre, além de estarem envolvidas com o ciclo de carbono (HÜGLER; SIEVERT, 2011) e, em alguns casos, com o do nitrogênio (FIORE; HONDA, 2008).

As cianobactérias produzem uma grande variedade de metabólitos, muitos dos quais têm sido explorados por seu potencial farmacológico. Tais substâncias apresentam potencial atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, de proteção à radiação ultravioleta e inibição de proteases (BURJA et al., 2001; GARRIDO et al., 2005; GROMOV et al., 1991; LEÃO et al., 2012; SILVA-STENICO et al., 2012).

Cianobactérias são encontradas em diversos ambientes, compreendendo os aquáticos (água doce, salgada ou salobra), terrestres, subaerófitos, em associação com outros organismos e em ambientes extremos, como os ecossistemas Antártico e desértico (WHITTON; POTTS, 2002; SANTOS; SANT'ANNA, 2010; CASTENHOLTZ, 2001; HARDOIM et al.,

2009; KOMÁREK; NEDBALOVÁ; HAUER, 2012; RIGONATO et al., 2012; KAPLAN et al., 2012).

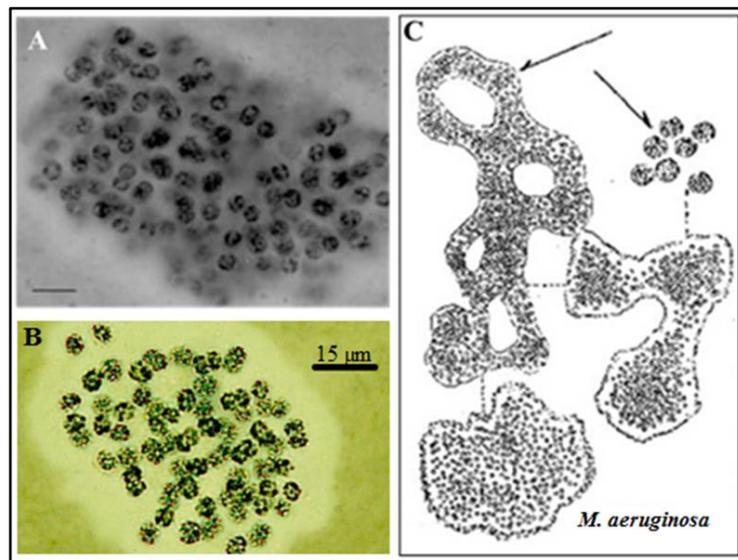
Em condições ótimas, como pH acima de 7,5, temperatura média acima de 25°C e alta concentração de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio (ODEBRECHT et al., 2002), alguns grupos de cianobactérias de água doce podem apresentar crescimento excessivo, caracterizando as florações. Esses eventos representam um grande impacto social, econômico e ambiental, afetando toda a biota aquática. Durante as florações, são produzidos, em grande quantidade, metabólitos que conferem odor e sabor desagradáveis à água, tais como o metilisoborneol (MIB) e a geosmina. Além disso, após a morte das cianobactérias, a quantidade de bactérias heterotróficas que se desenvolve provoca a redução da oxigenação da água e, em consequência, a morte de peixes (BRUNSON; LUTZ; DURBOROW, 1994; SEVRIN-REYSSAC; PLETIKOSIC, 1990; ZAGATTO; ARAGAO; CARVALHO, 1997). Ainda assim, a maior preocupação decorrente do aparecimento dessas florações relaciona-se à produção de toxinas.

## 2.2 O gênero *Microcystis*

Entre as cianobactérias capazes de formar florações, o gênero *Microcystis* é um dos mais estudados. Este gênero compreende um grande número de linhagens produtoras de toxinas e que possuem a capacidade de habitar reservatórios e lagoas de água doce com uma grande variação de nutrientes, conseqüentemente apresentando ampla distribuição mundial (WILSON et al., 2005). Além disso, por se tratar de cianobactérias unicelulares, as espécies de *Microcystis* representam um grupo de interesse para estudos fisiológicos e de biologia molecular.

O gênero *Microcystis* pertence à subclasse Oscillatoriothycidae, ordem Chroococcales, família Microcystaceae e compreende cerca de 50 espécies descritas. No momento, a taxonomia interna do gênero não se encontra totalmente elucidada, havendo ainda a necessidade de uma revisão acurada a esse respeito (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005; KOMÁREK; HAUER, 2012). As espécies deste gênero apresentam grande variedade com relação à formação de colônias, as quais podem ser micro- ou macroscópicas. As colônias mais novas geralmente são esféricas, podendo posteriormente tomar forma alongada, lobada ou mesmo irregular, sendo que em várias espécies são clatradas, algumas vezes compostas por subcolônias agrupadas. As células podem se encontrar mais ou menos densamente distribuídas dentro de uma mucilagem fina, hialina, a qual pode ser

difluyente ou delimitada(Figura 1). As células são esféricas, com diâmetro variando entre 4 e 6,5  $\mu\text{m}$ . Contêm aerótopos e o conteúdo celular é de cor verde escura. Para a reprodução, a divisão celular ocorre por fissão binária em três planos perpendiculares, somente nas células que já cresceram de volta ao seu tamanho original. Pequenos agrupamentos de células, ou mesmo células solitárias, acabam por se desprenderem das colônias iniciais, originando novas colônias (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1998; SANT'ANNA et al., 2004).



**Figura 1** – *Microcystis aeruginosa*. **A**, Arranjo de colônia densamente preenchido por células, no qual se evidenciam os três planos perpendiculares de divisão (fonte: SANT'ANNA et al., 2004); **B**, Colônia com bainha mucilaginosa evidenciada (Modificado de HONDA, 2005); **C**, desenho esquemático ilustrando a reprodução de *M. aeruginosa* (fonte: KOMÁREK; HAUER, 2012)

Atualmente, para a caracterização taxonômica de micro-organismos, a análise morfológica tem sido auxiliada pela detecção, sequenciamento e análise filogenética de genes constitutivos. Entre estes, o gene que codifica para a subunidade menor do ribossomo (em procariotos, RNA ribossomal 16S – RNAr 16S) é amplamente utilizado em estudos taxonômicos (TOMITANI et al., 2006), por estar presente em todos os organismos e possuir regiões conservadas e regiões internas variáveis.

Em relação à produção de toxinas, as linhagens tóxicas do gênero *Microcystis* são geralmente produtoras de microcistinas (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012; FUNARI; TESTAI, 2008; PEARSON et al., 2010). A produção de outras substâncias bioativas, tais como

aeruginosinas e cianopeptolinas, já foi relatada para cianobactérias deste gênero (NAMIKOSHI; RINEHART, 1996).

Entretanto, em um estudo recente (SANT'ANNA et al., 2011) foi descrita uma linhagem de *Microcystis aeruginosa* que sintetizava duas toxinas: a hepatotoxina [L-ser<sup>7</sup>] microcistina-RR e quatro análogos carbamoilados de saxitoxina (goniautoxinas 1, 2, 3 e 4). Essa linhagem foi isolada de um braço da represa Billings (São Paulo) utilizado para abastecimento público pelo grupo de ficologistas do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. Apesar de relato anterior da produção da neurotoxina anatoxina-a por uma cianobactéria do gênero *Microcystis* (PARK et al., 1993), a possibilidade de produção de neurotoxinas por cianobactérias unicelulares não é amplamente aceita pela comunidade científica, pela falta de dados mais robustos. Além disso, a co-produção de microcistina-RR com análogos de saxitoxinas representa um fato inédito na literatura. Em seu artigo, Sant'Anna et al. (2011) fizeram a caracterização do perfil de toxinas produzidas pela cianobactéria unicelular *M. aeruginosa* SPC777 por análises de ELISA, HPLC-FLD e HPLC-MS. Além disso, foi realizada análise filogenética do DNAr 16S e do gene *mcyA*, porém nenhum gene envolvido na biossíntese de saxitoxinas foi analisado.

### 2.3 Toxinas de cianobactérias

De acordo com seu efeito biológico em vertebrados, as toxinas de cianobactérias são classificadas em hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012). O efeito e exemplos de cianobactérias produtoras de cada toxina são listados na Tabela 1.

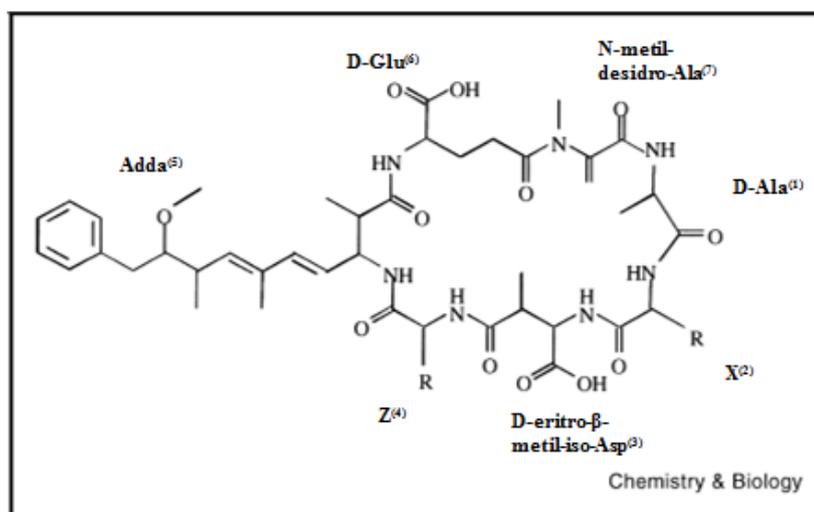
**Tabela 1** – Cianobactérias produtoras de toxinas (ARÁOZ; MOLGÓ; MARSAC, 2010; DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012; FIORE et al., 2009; FUNARI; TESTAI, 2008; LEÃO et al., 2012; PEARSON et al., 2010; SANT’ANNA et al., 2011)

Cianotoxina	Cianobactérias produtoras	Toxicidade
Microcistina	<i>Microcystis</i> sp.	Hepatotoxina. Inibição das proteínas fosfatases eucarióticas 1 e 2A
	<i>Planktothrix</i> sp.	
	<i>Dolichospermum</i> sp.	
	<i>Nostoc</i> sp.	
	<i>Hapalosiphon</i> sp.	
	<i>Phormidium</i> sp.	
	<i>Fischerella</i> sp.	
Nodularina	<i>Synechocystis</i> sp.	
	<i>Limnothrix redekei</i>	
Cilindrospermopsina	<i>Nodularia spumigena</i>	Hepatotoxina, citotoxina, neurotoxina. Inibição da síntese de glutatona, síntese protéica e citocromo P450
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	
	<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	
	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	
	<i>Umezakia natans</i>	
	<i>Raphidiopsis curvata</i>	
Anatoxina-a	<i>Dolichospermum</i> sp.	Neurotoxina. Simula neurotransmissor acetilcolina
	<i>Oscillatoria</i> sp.	
	<i>Anabaena flos-aquae</i>	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	
	<i>Anabaena</i> sp.	
Homoanatoxina-a	<i>Cylindrospermum</i> sp.	
	<i>Planktothrix</i> sp.	
	<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	
Anatoxina-a(s)	<i>Oscillatoria</i> sp.	Inibição irreversível de acetilcolinesterase
	<i>Aphanizomenon</i> sp.	
	<i>Raphidiopsis mediterranea</i>	
Saxitoxina	<i>Anabaena spirolides</i>	Neurotoxina. Bloqueia canais de sódio e cálcio e prolonga o fechamento de canais de potássio
	<i>Anabaena lemmermannii</i>	
	<i>Anabaena flos-aquae</i> NRC 525-17	
	<i>Dolichospermum circinale</i>	
	<i>Aphanizomenon</i> sp.	
BMAA	<i>Aphanizomenon gracile</i>	Neurotoxina. Dano e perda de coordenação motora
	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	
	<i>Lyngbya wollei</i>	
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	
Lyngbyatoxina	Grande número de cianobactérias	Promoção do aparecimento de tumor, ligação à proteína quinase C
Aplisiatoxina	<i>Lyngbya majuscula</i> ( <i>Moorea producens</i> )	

### 2.3.1 Microcistinas

#### 2.3.1.1 Estrutura e toxicidade

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos de fórmula estrutural ciclo(Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z), na qual “Adda” corresponde a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido decadienóico, “D-MeAsp” corresponde a 3-metil-ácido aspártico, “Mdha” significa N-metil-dehidroalanina e “X” e “Z” são L-aminoácidos variáveis (Figura 2).



**Figura 2**– Estrutura geral das microcistinas. Modificado de Tillett et al. (2000)

As microcistinas constituem o grupo de toxinas de cianobactérias (cianotoxinas) mais estudado até o momento. Cerca de 90 variantes estruturais já foram descritas (PEARSON et al., 2010), sendo a microcistina-LR a isoforma mais comumente encontrada na natureza e considerada a mais potente nos casos de intoxicação aguda. Sua estrutura química é caracterizada pela presença de leucina (L) e arginina (R) como L-aminoácidos nas posições X e Z, respectivamente (Figura 2). Estudos de toxicidade por injeção intraperitoneal em camundongos demonstraram valores  $LD_{50}$  de 25-150  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de massa corpórea, para a maioria das isoformas de microcistina, sendo geralmente aceitos os valores  $LD_{50}$  50-60  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de massa (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012).

A toxicidade da microcistina ocorre pela inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A eucarióticas, podendo haver hemorragia no fígado como resultado de intoxicação aguda, ou câncer hepático primário no caso de intoxicação crônica. Após a ingestão de microcistina, as

moléculas de toxina são transportadas do intestino delgado ao fígado por transporte ativo por intermédio do sistema de transporte de ânions orgânicos do ácido biliar. Dentro dos hepatócitos, as microcistinas provocam inibição das fosfatases 1 e 2A serina/treonina. Em seguida, ocorre desorganização do citoesqueleto das células hepáticas, peroxidação lipídica, perda da integridade da membrana, fragmentação do DNA, apoptose e necrose. O espaço que anteriormente era ocupado pelas células hepáticas é instantaneamente preenchido por sangue, podendo levar o organismo ao óbito por choque hemorrágico (DITTMANN; WIEGAND, 2006; GOLDBERG et al., 1995; MACKINTOSH et al., 1990; TILLET; PARKER; NEILAN, 2001).

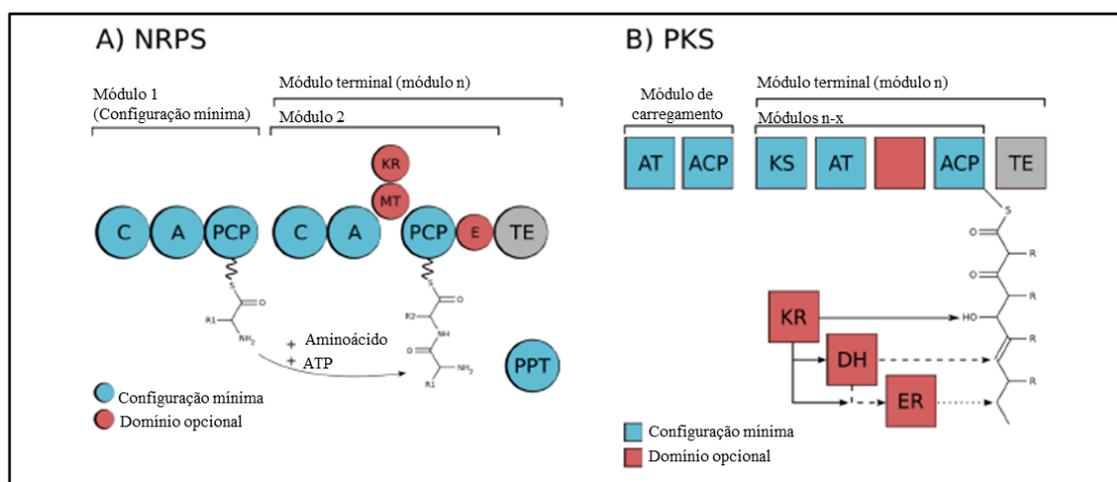
### 2.3.1.2 Biossíntese

A biossíntese de microcistinas é realizada pela via não ribossômica, ou seja, um grupo de enzimas age sobre um substrato até a formação da molécula final (Figura 3). A maioria das enzimas envolvidas na biossíntese de microcistinas consiste em complexos multienzimáticos contendo domínios. São de dois tipos: NRPS (*nonribosomal peptide synthetases*, peptídeo-sintetases não ribossomais) ou PKS (*polyketide synthases*, policetídeo sintases). Nas NRPSs, cada módulo é responsável pela incorporação de um aminoácido à molécula em formação. A identidade dos módulos de NRPS e a ordem na qual estão arranjados especifica a sequência de unidades de monômeros que são ativados e incorporados. As reações químicas que ocorrem em cada etapa da formação da nova molécula, o tamanho e a função química do produto que será liberado ao final da cadeia de montagem também são decorrentes deste arranjo (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011).

Os módulos de NRPS são compostos por pelo menos três domínios: (1) um domínio de adenilação (A), que catalisa a ativação de um aminoácido; (2) um domínio carreador de peptidil (PCP), que carrega o cofator fosfopanteteína; e (3) um domínio de condensação (C). Além destes três, domínios adicionais podem fazer parte de módulos NRPS, com funções como, por exemplo, epimerização de aminoácidos ou finalização da molécula. Os módulos de NRPS podem agir sobre cerca de 300 substratos diferentes, em comparação com os 20 aminoácidos a que se restringe a síntese ribossômica de substâncias (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011; STRIEKER; TANOVIC; MARAHIEL, 2010).

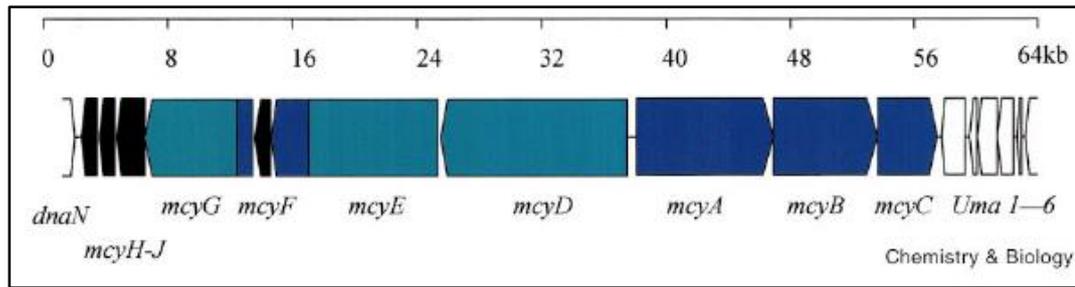
A estrutura modular encontrada nas NRPSs é também característica das PKSs, com a diferença de que os módulos de PKS agem sobre ácidos carboxílicos, ativando, unindo e, em alguns casos, modificando os mesmos. Um módulo de PKS pode ter no máximo seis domínios,

a saber: (1) cetossintase (KS); (2) aciltransferase (AT); (3) cetorredutase (KR); (4) desidratase (DH); (5) enoil-redutase (ER); e (6) proteína carreadora de acila (ACP) (Figura 3). Destes, os domínios AT, ACP e KS constituem um módulo mínimo de PKS. AAT é o domínio responsável pela seleção da região do substrato que será estendida ou que dará início à biossíntese da nova molécula. Tal unidade é então ligada covalentemente a um carreador de fosfopanteteína do domínio ACP adjacente à AT. O sítio ativo da cisteína do domínio KS é o responsável pela condensação da unidade extensora à cadeia crescente de policetídeo. Os domínios KR, DH e ER conferem adições extras à molécula crescente. Um domínio de tioesterase (TE) é geralmente necessário para a finalização do processo biossintético e remoção do produto final do complexo de PKS. Esta finalização pode ocorrer por transferência a um acceptor amino ou aminoacila, ou então por ciclização da molécula, como é o caso da biossíntese de microcistina (KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011; MOFFITT; NEILAN, 2003).



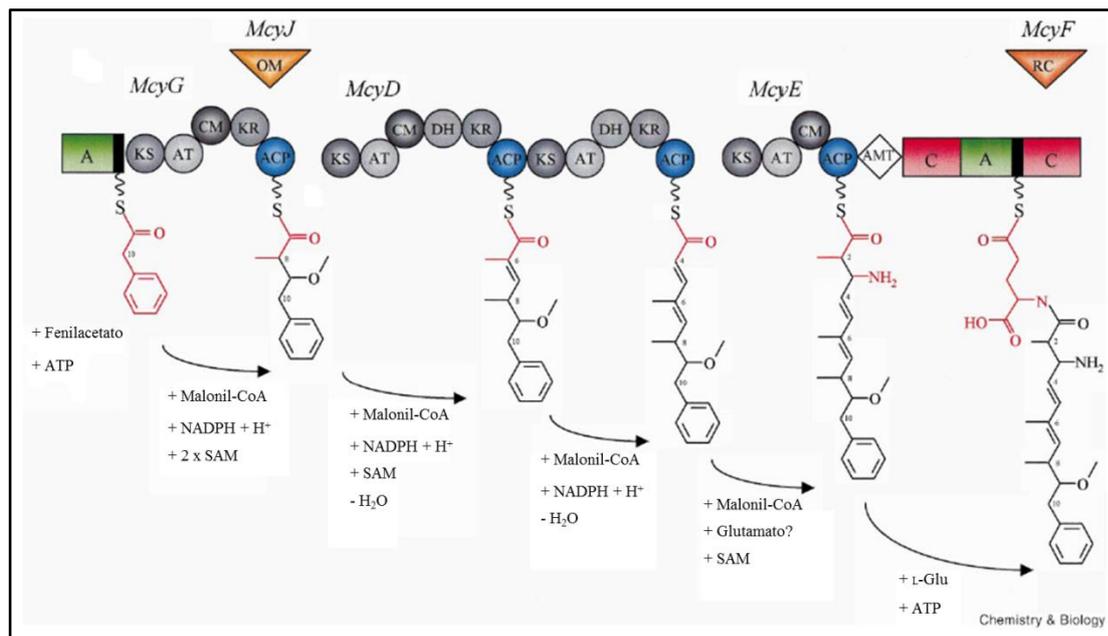
**Figura 3**– Representação esquemática dos domínios enzimáticos de: A) NRPS e B) PKS. Abreviações: C: domínio de condensação; A: domínio de adenilação; PCP: proteína carreadora de peptídeo; MT: metiltransferase; E: epimerase; AT: aciltransferase; ACP: proteína carreadora de acila; KS: cetossintase; KR: cetorredutase; DH: desidratase; ER: enoil-redutase; TE: tioesterase. (Modificado de KEHR; PICCHI; DITTMANN, 2011)

O primeiro agrupamento gênico envolvido na biossíntese de microcistinas em cianobactérias foi descrito para a linhagem *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (TILLET et al., 2000). Dez genes estão envolvidos neste processo (*mcyA-mcyJ*), sendo que seis destes codificam módulos de NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS ou PKS/NRPS. Estes genes estão dispostos em dois *operons* (*mcyA-C* e *mcyD-J*), que são transcritos em direções opostas, a partir de um promotor bidirecional (Figura 4).



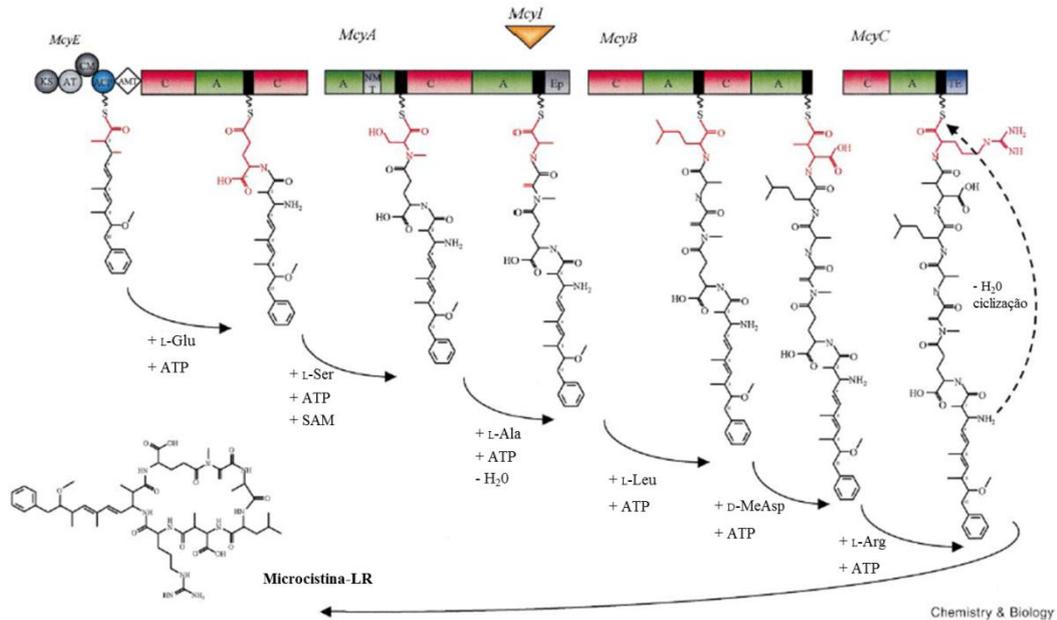
**Figura 4**– Organização do agrupamento gênico envolvido na biossíntese da microcistina em *M. aeruginosa* PCC 7806. O tamanho de cada gene e o sentido de transcrição são indicados. Os módulos de NRPS e PKS são indicados em azul escuro e claro, respectivamente. Genes adicionais são indicados em preto. Os genes flanqueadores do agrupamento gênico *mcyl* são ilustrados em branco (Fonte: TILLET et al., 2000)

A biossíntese do aminoácido Adda (Figura 5) tem início com a ação de McyG, um híbrido NRPS/PKS. O domínio de adenilação do módulo NRPS, localizado na extremidade amina de McyG, catalisa a ativação do fenilpropanoide, que é então transferido ao cofator fosfopanteteína do domínio PCP. A molécula é em seguida estendida e modificada por várias etapas de incorporação de malonil-CoA, C-metilação, redução e desidratação, realizadas por McyD (PKS) e pelo módulo de PKS de McyE (híbrido PKS/NRPS). McyE possui um domínio aminotransferase, responsável pela conversão de policetídeo para aminoácido, desta forma adicionando o grupo amino ao Adda. Ao lado deste domínio encontra-se o módulo NRPS de McyE, que finaliza a formação do Adda, catalisando a ligação peptídica entre o grupo  $\alpha$ -amino do D-glutamato e o Adda (TILLET et al., 2000). As enzimas McyJ e McyF são monofuncionais. Acredita-se que McyJ tenha função de O-metilação (DITTMANN; WIEGAND, 2006; ZHU et al., 2011) e McyF seja uma aspartato-racemase (SIELAFF et al., 2003).



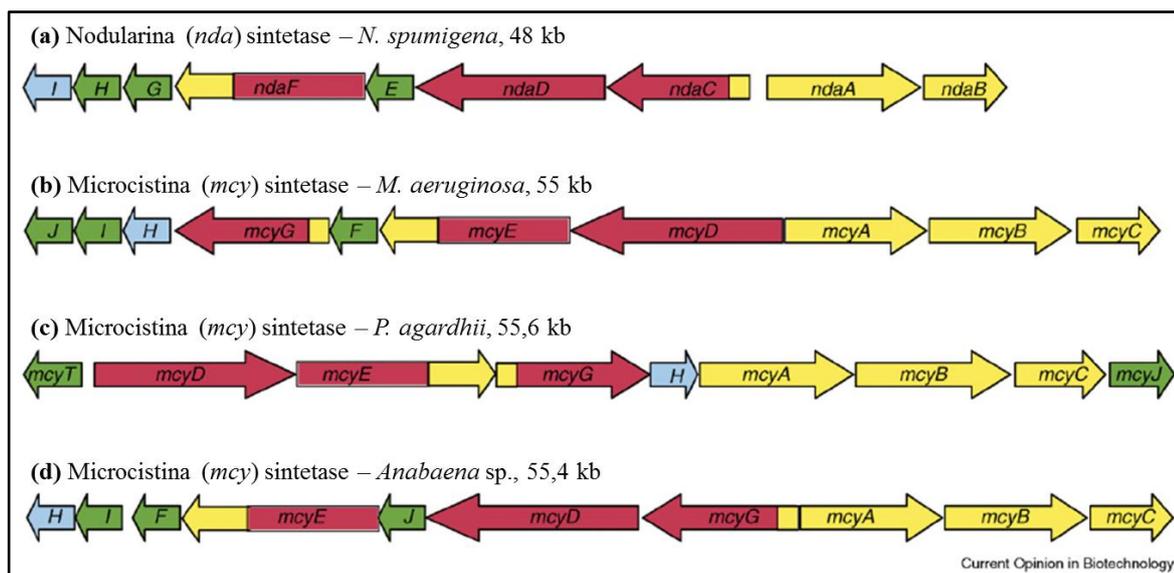
**Figura 5**– Etapas realizadas na biossíntese do aminoácido Adda e estrutura de domínios prevista para McyG, McyD e McyE. Os círculos representam domínios enzimáticos de PKS e os retângulos, de NRPS. Os triângulos invertidos representam as moléculas finalizadoras, McyJ e McyF. AMT se refere ao domínio de aminotransferase. KS,  $\beta$ -cetoacil sintase; AT, aciltransferase; ACP, proteína carreadora de acila; KR, cetoacil redutase; DH, desidratase; CM, C-metiltransferase; OM, O-metiltransferase; A, adenilação aminoacila; C, condensação; RC, racemase. A região de tioração no módulo NRPS é ilustrada em preto (Adaptado de TILLET et al., 2000)

Após a formação do Adda, a molécula de microcistina continua sendo formada por meio de elongação catalisada pelos domínios NRPS de McyA, McyB e McyC (Figura 6). O módulo NRPS McyA possui dois domínios de adenilação. O primeiro domínio catalisa a adição de L-serina e sua subsequente *N*-metilação pelo módulo NMT, que se encontra inserido nele. O segundo é responsável pela adição de L-alanina, que é convertida a D-alanina pelo domínio de epimerização encontrado na região carboxi-terminal de McyA. Em seguida, L-leucina e D-MeAsparagina são adicionadas à molécula em formação pelos domínios de adenilação e condensação de McyB. Por fim, McyC adiciona L-arginina à molécula crescente e esta é finalizada por intermédio de ciclização e liberação do complexo multienzimático. Esta etapa final é catalisada pelo domínio de tioesterase localizado na região carboxi-terminal de McyC (TILLET et al., 2000). A enzima McyI está envolvida na produção de metil aspartato (PEARSON; BARROW; NEILAN, 2007) e a enzima McyH está envolvida no transporte da microcistina ao meio extracelular (PEARSON et al., 2004).



**Figura 6**— Representação esquemática da biossíntese de microcistina-LR e estrutura prevista para os domínios McyE, McyA, McyB, e McyC. Os círculos e retângulos representam, respectivamente, um domínio enzimático de PKS ou NRPS. O domínio de aminotransferase está representado por um losango. O triângulo invertido representa a atividade prevista para McyI. KS,  $\beta$ -cetoacil synthase; AT, aciltransferase; CM, C-metiltransferase; ACP, proteína carreadora de acila; A, adenilação aminoacila; C, condensação; NMT, N-metiltransferase; Ep, epimerização; TE, tioesterase; AMT, aminotransferase. A região de tioilação de NRPS é ilustrada em preto. A ordem da ativação aminoacila é prevista como: L-Z-Adda, L-glutamato, L-metilserina, D-alanina, L-leucina, D-metil-aspartato, L-arginina, ciclização (Modificado de TILLET et al., 2000)

A estrutura dos agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese das microcistinas já foi descrita em outras cianobactérias, a saber: *M. aeruginosa* NIES-843 (KANEKO et al., 2007), *Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 126/8 (CHRISTIANSEN et al., 2003) e *Anabaena* sp. 90 (ROUHIAINEN et al., 2004). Além disso, o agrupamento gênico envolvido na biossíntese de nodularina em *Nodularia spumigena* NSRO10 já foi completamente caracterizado (MOFFIT; NEILAN, 2004). Cada agrupamento gênico apresenta suas particularidades com relação a ordem, presença e ausência de alguns genes (Figura 7).



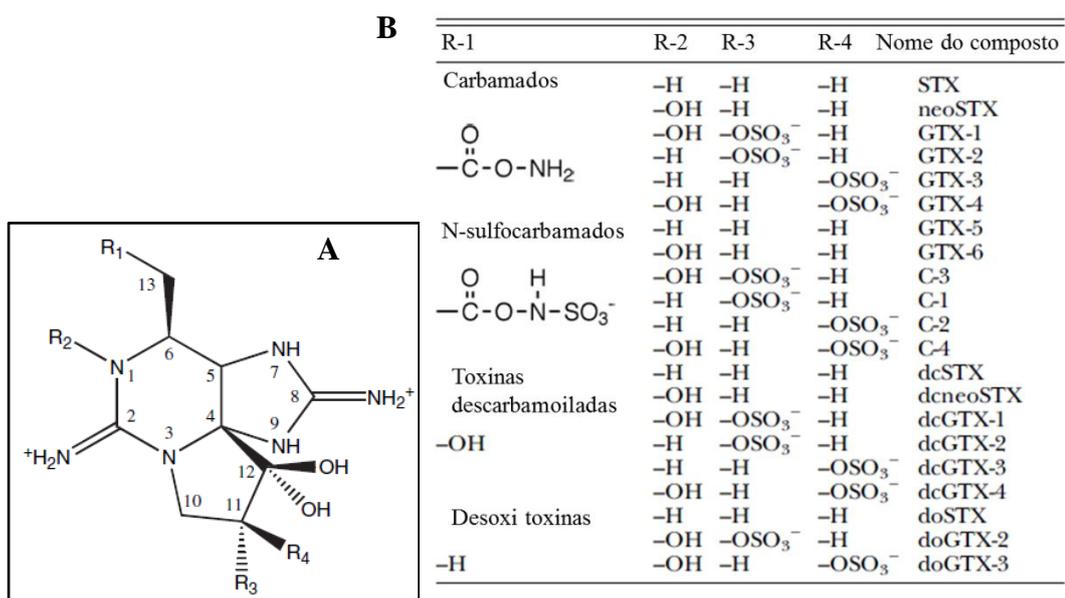
**Figura 7**–Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de hepatotoxinas em diferentes cianobactérias. Módulos de PKS estão ilustrados em vermelho, NRPS em amarelo, enzimas de finalização em verde e enzimas envolvidas no transporte em azul. Este diagrama não está desenhado em escala (Modificado de PEARSON; NEILAN, 2008)

## 2.3.2 Saxitoxinas

### 2.3.2.1 Estrutura e toxicidade

As saxitoxinas pertencem ao grupo das toxinas PSP (“Paralytic Shellfish Poison”). Sua produção já foi descrita para organismos pertencentes a dois Domínios da vida: dinoflagelados dos gêneros *Alexandrium*, *Pyrodinium* e *Gymnodinium* (CEMBELLA, 1998; DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012) e cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* e uma espécie do gênero *Microcystis* (FUNARI; TESTAI, 2008; LEÃO et al., 2012; SANT’ANNA et al., 2011). Elas interferem na função de pelo menos dois tipos de canais mediados por voltagem: os canais de cálcio e sódio são completamente bloqueados, enquanto os canais de potássio das células cardíacas têm seu fechamento prolongado (DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012; LLEWELLYN, 2006). Intoxicações por saxitoxinas já foram relatadas em diversos países e representam um sério problema de saúde pública.

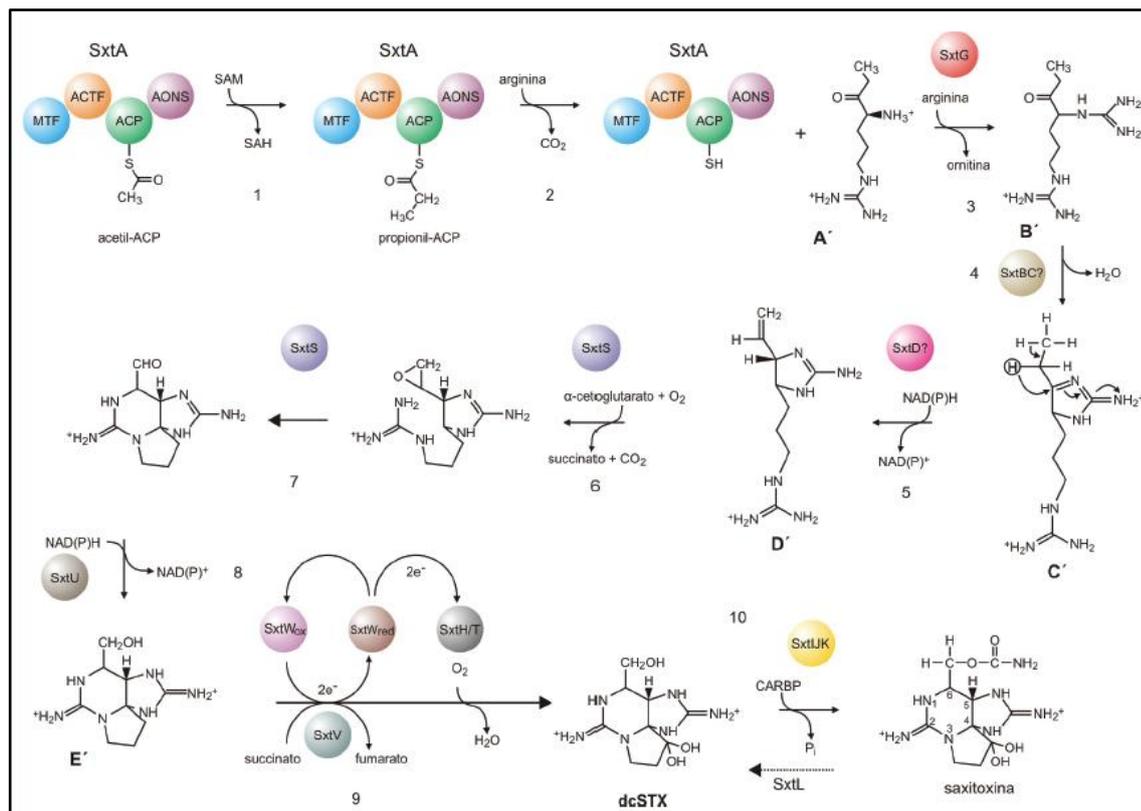
A saxitoxina é um alcaloide carbamato de estrutura tricíclica, que consiste em um grupo tetrahidropurínico e dois agrupamentos guanidínicos. Após a síntese da molécula-base, pode haver modificações em cinco posições de seus grupos funcionais, gerando mais de 30 análogos da mesma (Figura 8). As saxitoxinas são classificadas em não sulfatadas (saxitoxina - STX), monossulfatadas (goniautoxinas – GTX), duplamente sulfatadas (C-toxinas) e análogos descarbamoilados (DITTMANN;FEWER; NEILAN,2012; KELLMAN; NEILAN, 2007; MIHALI;CARMICHAEL; NEILAN, 2011).



**Figura 8** – (A) Estrutura da molécula de saxitoxina; (B) Principais variantes estruturais de saxitoxinas. C, C-toxina; dc, descarbamoil; do, desoxi; GTX, goniautoxina; STX, saxitoxina (Modificado de KELLMANN; NEILAN, 2007)

### 2.3.2.2 Biossíntese de saxitoxinas

O primeiro estudo a descrever o agrupamento gênico completo envolvido na biossíntese de saxitoxinas em uma cianobactéria foi realizado por Kellman e colaboradores (2008a). Apesar de não ter sido possível a confirmação da natureza bioquímica e, conseqüentemente, da ação das enzimas codificadas pelos genes descritos, uma comparação das sequências de aminoácidos obtidas para cada ORF do agrupamento gênico *sxt* no isolado de água doce *Cylindrospermopsis raciborskii*T3, juntamente com análises de LC-MS/MS e dados anteriores de testes bioquímicos *in vitro* (KELLMANN; NEILAN, 2007), possibilitaram que fosse predita a função de cada gene encontrado.



**Figura 9** – Via biossintética proposta para a saxitoxina (Fonte: FIORE; ALVARENGA; SILVA-STENICO, 2011)

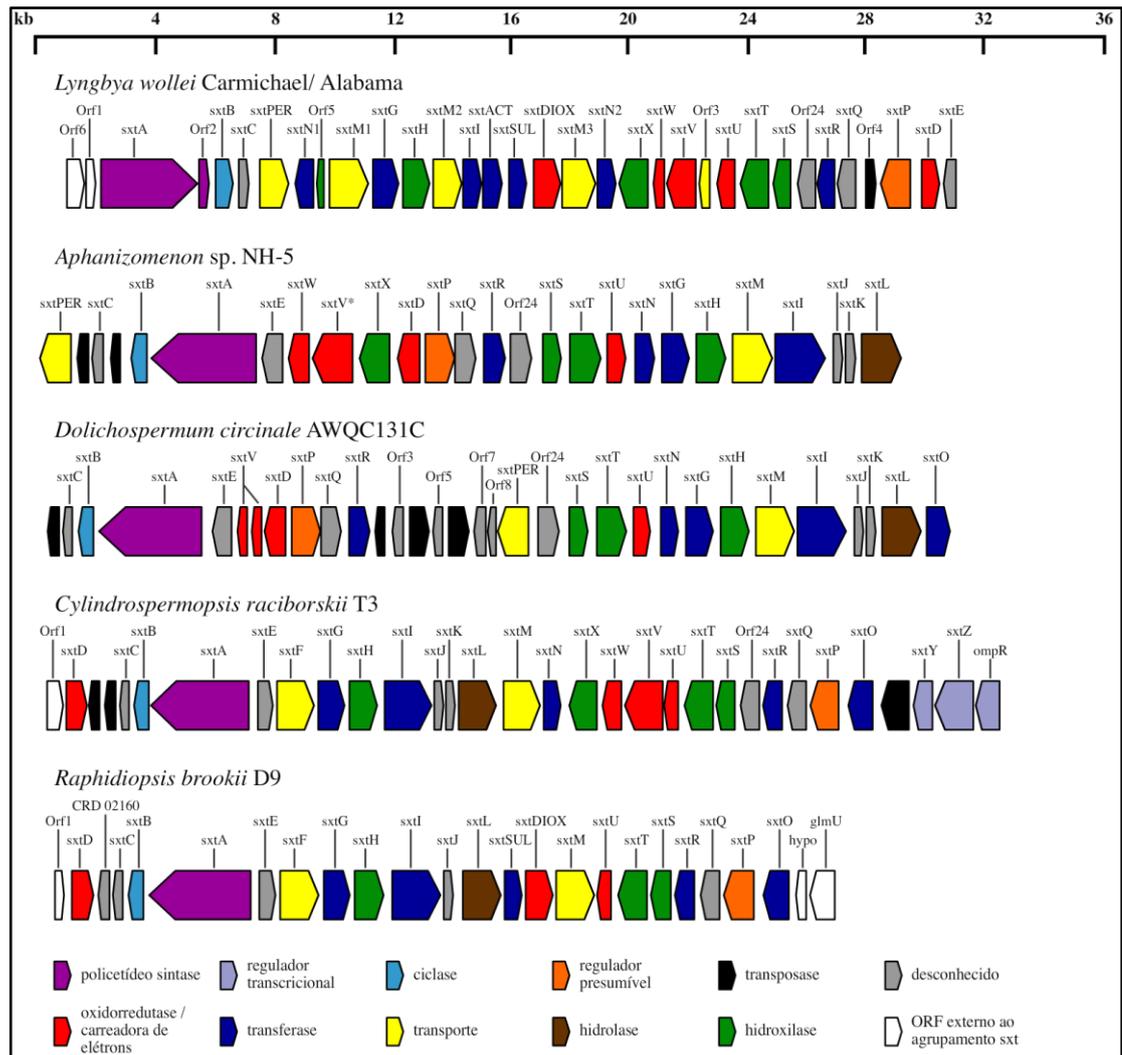
Assim, a via biossintética proposta para a produção de saxitoxinas (Figura 9) tem início usando uma arginina como molécula precursora. A única enzima que dá início à biossíntese de saxitoxinas é semelhante a uma PKS (poliketide sintase), codificada pelo gene *sxtA*. Esta enzima possui quatro domínios catalíticos: SxtA1 a SxtA4. O domínio SxtA3 está relacionado a uma ACP (proteína carreadora de acil) e possui um sítio de ligação de fosfopanteteinil. Inicialmente, este domínio é carregado com o acetato de uma acetil-CoA (acetil-coenzima A). Esta reação é catalisada pelo domínio SxtA2 (GNAT, “GCN5-related N-acetyl transferases”). A seguir, o SxtA1 (metil transferase dependente de SAM, S-adenosilmetionina) catalisa a metilação do acetil-ACP, convertendo-o a propionil-ACP. Então, o SxtA4 (aminotransferase classe II, provavelmente pertencente ao grupo das AONS – “8-amino-7-oxononanoate synthase”) realiza uma reação de condensação do tipo Claisen, ligando o grupo éster do propionil-ACP ao grupo éster da molécula de arginina. Ao que tudo indica, o produto formado após a ação dos quatro domínios da enzima SxtA é 4-amino-3-oxo-guanidinoheptano (chamado pelos autores de A’). Após esta etapa, tem ação a enzima codificada pelo gene *sxtG*, cuja natureza foi proposta como uma amidinotransferase. Esta enzima transfere um grupo

amidinoproveniente de uma segunda molécula de arginina ao grupo  $\alpha$ -amino do intermediário A', assim produzindo 4,7-diguanidino-3-oxoheptane (designado substância B'). Acredita-se que logo após esta etapa seja formado o primeiro heterociclo por uma condensação interna do tipo retro-aldol entre a amina do grupo amidino recém-incorporado e o carbono proveniente do acetato. Esta reação é catalisada pela SxtB, que é semelhante a enzimas do tipo citidina desaminase de gama-proteobactérias. O produto desta condensação é chamado de C'. A transformação do intermediário de saxitoxina prossegue com a ação conjunta de SxtD, SxtS e SxtU, resultando na incorporação de uma cadeia lateral composta por uma metil-metionina e sua subsequente hidroxilação. Tal hidroxilação ocorre via epoxidação de uma ligação dupla entre o grupo metílico derivado de SAM e o carbono 6 (C-6) da molécula, que foi derivado do acetato nas primeiras etapas da biossíntese desta molécula. Em detalhes: a enzima SxtD (uma esteroide desaturase) introduz uma ponte dupla entre C-1 e C-5 da substância C', resultando em uma mudança 1,2-H entre C-5 e C-6. Esta substância recém-formada é chamada de substância D'. A enzima SxtS (dioxigenase dependente de 2-oxoglutarato) catalisa a formação oxidativa dos heterociclos por intermédio de epoxidação da ponte dupla de D' e a abertura do epóxido a um aldeído com simultânea biciclização. Finalizando esta etapa, a enzima SxtU (álcool-desidrogenase de cadeia curta) reduz o grupo terminal aldeído do precursor D', formando a substância E'. Tendo-se E', observa-se que para a finalização da molécula de saxitoxina é necessário ocorrer uma *O*-carbamoilação de seu grupo hidroxila e uma hidroxilação dupla de C-12. Ao que tudo indica, a enzima SxtI (*O*-carbamoiltransferase) catalisa a transferência de um grupo carbamoil proveniente de um carbamoilfosfato ao grupo hidroxila livre de E'. Apesar de não ter sido possível inferir a natureza enzimática dos produtos gênicos de *sxtJ* e *sxtK*, os autores discorrem que homólogos a estes genes foram frequentemente encontrados adjacentes a genes de *O*-carbamoiltransferases. Por fim, os genes *sxtH* e *sxtT* codificam uma subunidade terminal de oxigenase de fenil-propionato bacteriano e dioxigenases relacionadas que hidroxilam estruturas químicas em anel. Portanto, acredita-se que as enzimas SxtH e SxtT sejam as responsáveis pela hidroxilação do C-12. A cada ciclo catalítico, os membros do grupo enzimático do qual SxtH e SxtT fazem parte necessitam de uma oxigenase redutase para sua regeneração. Os autores propõem que o agrupamento gênico *sxt* tenha seu próprio sistema de transporte de elétrons, constituído pelas enzimas SxtV e SxtW em *C. raciborskii* T3.

Uma vez formada a molécula-base da saxitoxina, enzimas codificadas por genes adicionais podem modificá-la, de forma a gerar diferentes análogos de saxitoxina. Um destes genes é o *sxtX*, que codifica uma cefalosporina hidroxilase. A atuação proposta para este gene é hidroxilar o N-1 da molécula de saxitoxina, produzindo análogos como, por exemplo, a

neoSTX. Já o gene *sxtN* codifica uma sulfotransferase, provavelmente do tipo dependente de 3'-fosfato 5'-fosfossulfato ("PAPS – 3'-phosphate 5'-phosphosulfate"). Este gene já foi encontrado em cianobactérias produtoras de análogos sulfatados da STX, como por exemplo goniautoxinas. Nesse contexto, homólogos ao gene codificante para a enzima SxtO (adenilil-sulfato quinase) estão envolvidos na formação de PAPS. Em relação às moléculas descarbamoidadas de saxitoxina, existe tanto a possibilidade de que sejam processados por enzimas próximas à SxtI, que agem sobre um amplo espectro de substratos, quanto a possibilidade de o grupo carbamoil ser removido por clivagem hidrolítica. A SxtL (GDSL lipase) é uma candidata a esta função. Já as enzimas SxtF e SxtM (MATE, "sodium-driven multidrug and toxic compound extrusion" da família de proteínas NorM) estariam envolvidas no transporte das saxitoxinas para o meio extracelular. A regulação da produção de saxitoxinas seria feita em nível transcricional, sendo *sxtY* (relacionado a PhoU) e *sxtZ* (relacionado a OmpR) fatores de transcrição (KELLMANN; NEILAN, 2007; KELLAMNN et al., 2008a).

O agrupamento gênico completo envolvido na biossíntese de saxitoxinas já foi descrito para cinco diferentes gêneros de cianobactérias (Figura 10), diferindo em sua organização e na presença ou ausência de alguns genes. A correlação entre a presença de cada gene e o análogo de saxitoxina produzido pelas diferentes cianobactérias tem sido discutida com o objetivo de confirmar a função estipulada para os genes *sxt* (MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011; SOTO-LIEBE et al., 2010).



**Figura 10** – Agrupamento gênico envolvido na biossíntese de saxitoxinas em diferentes cianobactérias (Modificado de MURRAY; MIHALI; NEILAN, 2010)

Atualmente, técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas como aliadas para uma rápida detecção de linhagens potencialmente produtoras de cianotoxinas na natureza. Paralelamente, com o avanço de novas estratégias e tecnologias de sequenciamento, a caracterização de agrupamentos gênicos completos tem sido buscada. O conhecimento do agrupamento gênico completo pode gerar uma visão em relação à presença das enzimas essenciais à produção da toxina estudada. Além disso, torna-se possível uma previsão de quais isoformas de toxina a linhagem tem capacidade de produzir.

Diversas estratégias podem ser empregadas para a caracterização de uma grande região do genoma de um organismo, entre elas a realização de bibliotecas genômicas (bibliotecas de BAC ou fosmídeos) e a técnica de “pan-handle”, um tipo de PCR inversa na qual os iniciadores amplificam uma região desconhecida do genoma, a partir de um fragmento de DNA conhecido, até que toda a região de interesse seja elucidada.

No entanto, o rápido crescimento das tecnologias de sequenciamento de DNA tem estimulado grupos de pesquisas a investirem no sequenciamento do genoma completo dos organismos de interesse. Com acesso a tecnologias de sequenciamento de nova geração e programas de bioinformática com algoritmos apropriados para cada tipo de sequenciador, o trabalho de bancada é reduzido, muitas vezes resultando em geração mais rápida dos resultados.

## 2.4 Plataforma SOLiD

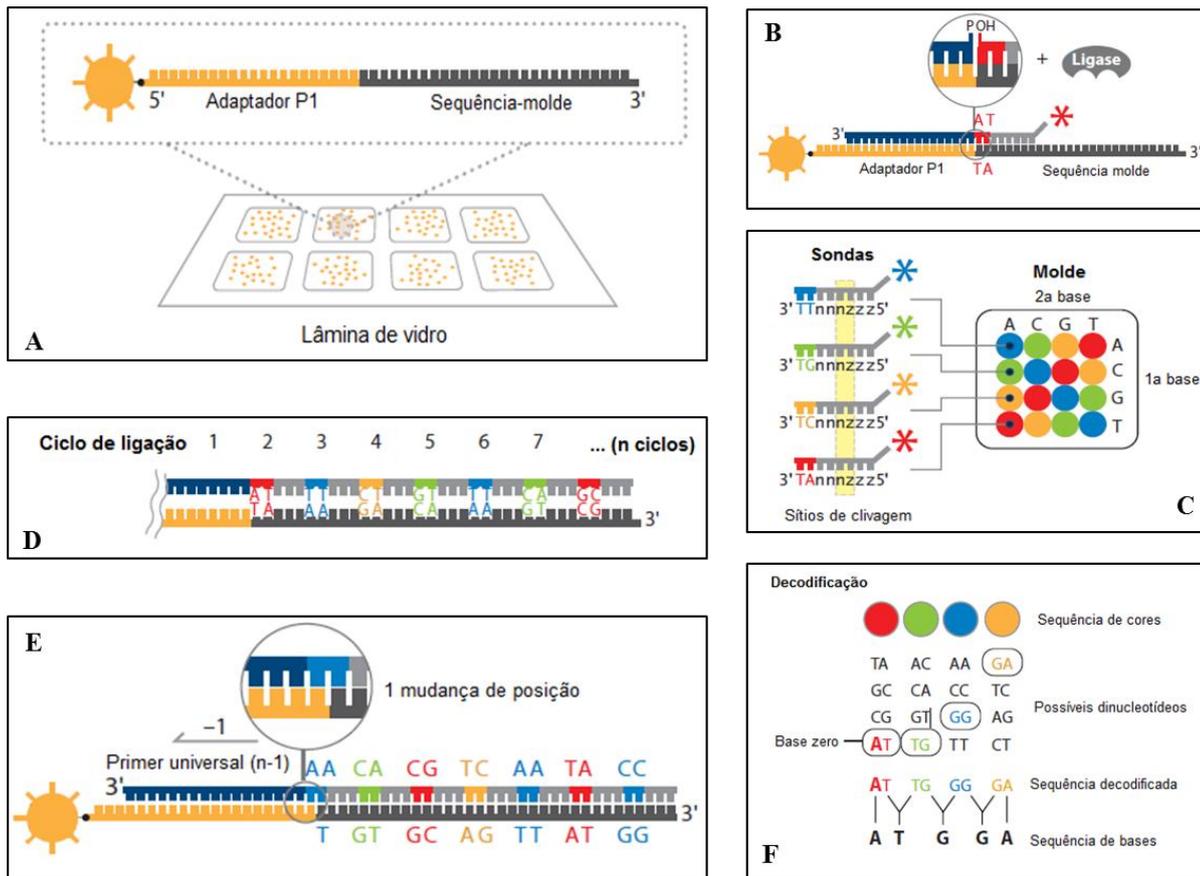
Entre os tipos de sequenciamento de nova geração (NGS, *New Generation Sequencing*), uma das tecnologias que se destacam é a plataforma SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*), desenvolvida pela empresa Applied Biosystems/Life Technologies para sequenciamento em larga escala. O método se baseia na fragmentação do genoma de um organismo e realização de PCR em emulsão com pequenas esferas magnéticas. O sequenciamento de cada fragmento pode ser feito a partir de biblioteca de *tags* únicas, com fragmentos de 60-90 pb, ou duplas, com fragmentos de 1-10 Kb (CARVALHO; SILVA, 2010; MARDIS, 2008).

No sequenciamento por SOLiD, a enzima DNA ligase é utilizada em substituição à polimerase empregada nas outras plataformas. Outra diferença com relação aos outros métodos é o uso de sondas contendo uma dupla de nucleotídeos marcados.

As etapas de sequenciamento são ilustradas na Figura 11. O sequenciamento tem início com a fragmentação do DNA. Os fragmentos são ligados a adaptadores universais (P1 e P2), um deles (P1) acoplado a uma esfera metálica de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Ocorre então a PCR de emulsão usando o adaptador P1 como molde para o anelamento do oligonucleotídeo iniciador. Bibliotecas compostas por milhões de moléculas únicas representando a sequência alvo inteira são geradas. O conjunto é aplicado em uma lâmina de vidro apropriada, à qual as microesferas se ligam covalentemente. A distribuição das microesferas na lâmina de vidro é aleatória. Ainda assim, cada lâmina (com capacidade para 100 mil microesferas) pode ser subdividida em oito áreas, assim permitindo a análise de oito bibliotecas diferentes. Nesse caso, existe a opção do

sistema de código de barras, ligando-se ao adaptador P2 uma sequência única de cinco nucleotídeos.

Após a ligação das microesferas à lâmina, são adicionados os oligonucleotídeos iniciadores universais de sequenciamento, a enzima ligase e as sondas específicas. Tais sondas são compostas por dois nucleotídeos específicos, seguidos por outros três degenerados para qualquer base e três inosinas ligadas a um fluoróforo. A cada ciclo da reação de sequenciamento, o iniciador se liga ao adaptador P1 e a sonda que for complementar à primeira dupla de nucleotídeos do fragmento de DNA molde se liga ao iniciador pela ação da ligase. Então, é emitida fluorescência, de cor relacionada à dupla de nucleotídeos que foi complementar àquela primeira região do DNA molde. Uma parte da sonda apresenta um sítio de clivagem logo após a emissão da fluorescência, a parte terminal da sonda é clivada e removida. Outra sonda se liga novamente de acordo com sua dupla de nucleotídeos e o ciclo se repete várias vezes. Então, um novo iniciador de sequenciamento é ligado ao adaptador P1, idêntico ao primeiro, porém com o último nucleotídeo 5' removido (iniciador n-1). Desta forma, conforme observado na Figura 11 (parte E), a sonda que se ligar a este iniciador avançará um nucleotídeo na sequência molde. Este ciclo se repete e o sequenciamento continua com outros iniciadores até a quinta etapa, na qual o iniciador possui n-4 bases. Como o oligonucleotídeo iniciador inicial (n) tem sequência conhecida e se anela à primeira base da extremidade livre do adaptador P1, a primeira base do fragmento de DNA molde pode ser determinada. A identificação da sequência de bases dos fragmentos é feita através da leitura da fluorescência emitida a cada ligação da sonda correspondente e correlação com a dupla de nucleotídeos possíveis para cada sonda. Ao final dos ciclos de sequenciamento, cada nucleotídeo terá sido registrado duas vezes, o que diminui a possibilidade de erros de leitura, tornando o sistema consideravelmente confiável (MARDIS, 2008).



**Figura 11**– Principais etapas do sequenciamento por SOLiD (modificado de MARDIS, 2008). **A**, microesferas acopladas ao adaptador ligado à sequência molde de DNA; **B**, ligação do primer de sequenciamento e da sonda ao adaptador e DNA molde; **C**, 16 tipos possíveis de sondas; **D**, extensão do sequenciamento ao longo dos ciclos de ligação das sondas; **E**, avanço da sonda pelo DNA molde usando primer com n bases -1

## 2.5 Alterações no conteúdo genético de procariotos na natureza

### 2.5.1 Troca de informação genética

Na natureza, a troca de informação genética (transferência lateral/horizontal de genes) entre procariotos pode ocorrer, essencialmente, de três formas: transformação, conjugação ou transdução. Transformação (ou transfecção) é o processo pelo qual a célula procariótica absorve moléculas de ácido nucleico ou plasmídeo do ambiente onde se encontra. Conjugação é a transferência de material genético de um micro-organismo diretamente ao outro, por intermédio da formação de uma fímbria sexual, que é o canal que une a célula doadora à receptora. Transdução é a aquisição de material genético por intermédio da infecção viral a um procarioto, sendo que regiões do DNA de algum micro-organismo infectado anteriormente por

este vírus podem ser retiradas e transferidas a novos receptores juntamente com o DNA ou RNA viral (CHEN; DUBNAU, 2004; MAZODIER; DAVIES, 1991). Além disso, já foram isolados da bactéria *Rhodobacter capsulatus* agentes de transferência gênica (GTA, *gene transfer agents*). Estes consistem em partículas semelhantes a vírus que se incorporam no genoma hospedeiro, tendo como única função a transferência de fragmentos do mesmo, sem nenhuma ação viral (LANG; BEATTY, 2000; MCDANIEL et al., 2010).

De acordo com a natureza do DNA adquirido pela célula receptora, este pode se replicar de forma autônoma dentro do organismo hospedeiro, ser degradado e ter os nucleotídeos reutilizados pela célula, ou então se integrar ao cromossomo. No caso de transdução, sequências de profagos ou locos de CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) apresentam uma parte do histórico de infecções virais anteriores sofridas pelo organismo. Profagos consistem em DNA viral inserido no DNA genômico da bactéria previamente infectada, durante o ciclo lisogênico do vírus, ou seja, quando não há lise celular imediata (CANCHAYA et al., 2003). Já os locos de CRISPR representam uma espécie de defesa interna de uma arqueia ou bactéria à aquisição de DNA exógeno, havendo todo um complexo enzimático e sequências repetitivas envolvidos no processo de armazenamento de uma parte do material genético de origem exógena, reconhecimento e eliminação do mesmo (DEVEAU; GARNEAU; MOINEAU, 2010; HORVATH; BARRANGOU, 2010; JORE; BROUNS; OOST, 2012).

### **2.5.2 Rearranjos gênicos intracelulares**

Além da troca de informação genética entre diferentes organismos, variações no conteúdo genético de procaríotos podem ocorrer no âmbito intracelular, por intermédio de mutações ou rearranjos no genoma. Tais rearranjos (inversões, deleções, duplicações, entre outros) podem ser originados por intermédio de elementos transponíveis presentes no próprio genoma do organismo. Os elementos transponíveis são amplamente distribuídos entre as arqueias e bactérias e podem ser divididos em duas principais classes, de acordo com a estrutura de sua sequência e mecanismos de transposição. A Classe I é representada por elementos capazes de se transportar a outros locais do genoma por meio de um RNA intermediário. Pertencem a esta classe de elementos transponíveis os retroposons e retrotransposons. Já os elementos da Classe II, caracterizados pelas sequências de inserção (SI) e transposons, utilizam para o seu transporte um intermediário de DNA catalisado por uma transposase (GRAY, 2000).

O estudo de elementos transponíveis pode revelar informações sobre a divergência entre populações, além de gerar dados a respeito da capacidade adaptativa dos organismos. Em relação a genomas de cianobactérias, Lin et al. (2011) realizaram uma busca por sequências de inserção em 17 genomas. Neste estudo, os autores verificaram que os dois genomas do gênero *Microcystis* analisados foram os que apresentaram maior quantidade de SI, correspondendo a 10,85 % do genoma de *M. aeruginosa* NIES-843 e 8,98 % do genoma de *M. aeruginosa* PCC 7806. Os autores discutem que a alta abundância de elementos transponíveis encontrada nas linhagens de *M. aeruginosa* demonstra que o genoma das mesmas pode sofrer um rearranjo que resulte em mutações positivas, de forma a acelerar sua adaptação a vários ecossistemas de água doce, e que esta alta plasticidade genômica possa ser uma explicação para o grande sucesso de competição de *Microcystis* spp. em relação a outros organismos. Nesse contexto, os autores sugerem que a diferença observada para a porcentagem e os tipos de SI entre as linhagens *M. aeruginosa* NIES-843 e *M. aeruginosa* PCC 7806 se deva aos diferentes ambientes onde cada uma foi coletada e ao período de manutenção das mesmas em laboratório. A primeira foi coletada do Lago Kasumigaura (Japão) em 1997 e a segunda, do reservatório Braakman (Holanda) em 1972.

### 3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi buscar e identificar no genoma da *Microcystis aeruginosa* SPC777 genes envolvidos na biossíntese de microcistinas e saxitoxinas, assim como verificar a produção destas toxinas.

Para isso, buscou-se:

- Analisar a organização dos genes envolvidos na biossíntese das toxinas estudadas, comparando filogeneticamente tanto os genes ou fragmentos gênicos isolados quanto agrupamentos gênicos inteiros com aqueles já descritos em literatura para outras cianobactérias.
- Estudar a evolução da toxigenicidade em *M. aeruginosa* SPC777.
- Verificar se ainda são produzidas as toxinas de interesse após cerca de 10 anos de cultivo e, em caso afirmativo, avaliar se continuam sendo os mesmos análogos descritos anteriormente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagem utilizada e manutenção

Neste estudo foi utilizada a linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777 (atualmente CCIBt 3173), obtida da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica de São Paulo em 18 de julho de 2003 e desde então mantida em cultivo no Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP. Essa linhagem foi coletada em 05 de fevereiro de 2000, em uma floração ocorrida na margem do Riacho Grande, um braço da Represa Billings localizado no Rancho do Milho Verde, Rodovia SP 148 (Rodovia Caminho do Mar), município de São Bernardo do Campo, São Paulo (coordenadas 23°46'42,61" S e 46°31'1,57" O), pelo grupo de pesquisadores do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente (SANT'ANNA et al., 2011).

O cultivo desta cianobactéria foi realizado em meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964, Anexo A), pH 7,0, mantido a 25 °C  $\pm$  1, sob iluminação fluorescente de 40 $\pm$ 5  $\mu\text{mol}$  fótons.  $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e com fotoperíodo de 14 h claro:10 h escuro.

### 4.2 Análise microscópica

As características morfológicas e métricas da linhagem *M. aeruginosa* SPC777 foram analisadas em microscópio óptico (AxioStar Plus, Zeiss) a cada 15 – 20 dias, na ocasião dos novos repiques. As seguintes características foram analisadas: forma das células, presença de aerótopos, formação de colônias e diâmetro celular (n=20).

### 4.3 Obtenção de monocultura cianobacteriana

Durante as análises da morfologia da linhagem *M. aeruginosa* SPC777 constatou-se a presença de outra cianobactéria unicelular na cultura e procedimentos foram realizados visando a obter o isolamento e a purificação da *M. aeruginosa* SPC777.

#### 4.3.1 Lavagem de células com extran 0,1 %

Inicialmente, várias alíquotas de 1 mL de cultura em meio ASM-1 líquido foram transferidas para microtubos Eppendorf de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados (centrífuga Mikro 200R, Hettich) a  $5.000 \times g$  por 5 minutos, para a formação de pélete. O sobrenadante foi retirado com pipeta e descartado, tomando-se o cuidado de não retirar as células que ficaram aderidas à parede do tubo.

O pélete foi ressuspensionado em 500  $\mu\text{L}$  de extran 0,1% e homogeneizado completamente, com cuidado para que as células não sofressem lise. Os tubos ficaram em repouso por 30 minutos. Após esse período, 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura líquido foram adicionados e os tubos foram homogeneizados cuidadosamente por inversão, seguindo centrifugação por 5 minutos a  $5.000 \times g$ . O sobrenadante foi descartado e o pélete foi novamente ressuspensionado em 500  $\mu\text{L}$  de extran 0,1%, repetindo-se as etapas anteriores até uma nova centrifugação, a  $7.000 \times g$  por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pélete, ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura líquido. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a  $7.000 \times g$  por 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado e 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura ASM-1 foram adicionados ao pélete, seguindo homogeneização e centrifugação a  $7.000 \times g$  por 5 minutos. Essa etapa foi repetida até a centrifugação, desta vez a  $5.000 \times g$  por 15 minutos.

Todo o sobrenadante foi descartado e o pélete foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura ASM-1 líquido. Uma alíquota das células foi observada ao microscópio óptico (Axiostar Plus, Zeiss) e o remanescente no microtubo foi utilizado como pré-inóculo em Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio de cultura, para crescimento nas condições apropriadas.

#### 4.3.2 Cultivo em meio de cultura sólido

O cultivo em meio de cultura sólido foi realizado em placas de Petri (90 x 15 mm lisas). Três estratégias foram testadas: (1) *pour-plate*, adicionando-se 300  $\mu\text{L}$  de inóculo a cerca de 30 mL de meio de cultura com ágar imediatamente antes que este fosse vertido nas placas de Petri; (2) *spread-plate*, espalhando-se, com alça de Drigalski, 100  $\mu\text{L}$  de inóculo sobre meio de cultura já solidificado; e (3) estrias de esgotamento (com alça de platina).

### 4.3.3 Micropipetagem de células em meio líquido

Umagota de cerca de 20 a 30  $\mu\text{L}$  da cultura foi colocada em lâmina de microscopia e diluída em água sucessivamente, até que ao microscópio óptico (Axiostar Plus, Zeiss), com aumento de 100 x, fossem observadas células consideravelmente isoladas uma da outra. Então, usando uma pipeta Pasteur esterilizada com uma extremidade manualmente afilada ao fogo do bico de Bunsen, tentou-se pipetar uma única célula para cultivo em ASM-1 líquido.

### 4.3.4 Centrifugação com gradiente diferencial de sacarose

Foram preparadas soluções de sacarose em água destilada deionizada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) esterilizada, nas seguintes concentrações: 0,2 M, 0,5 M e 1 M. Sete tubos Falcon esterilizados com capacidade para 15 mL foram utilizados para a centrifugação. O conteúdo de cada tubo é descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** – Concentrações de sacarose testadas

<b>Tubos</b>	<b>Concentrações de sacarose</b>
1	10 mL de solução 0,2 M
2	10 mL de solução 0,5 M
3	10 mL de solução 1 M
4	5 mL de solução 0,2 M + 5 mL de solução 0,5 M
5	5 mL de solução 0,5 M + 5 mL de solução 0,7 M
6	5 mL de solução 0,5 M + 5 mL de solução 1 M
7	3,3 mL de solução 0,2 M + 3,3 mL de solução 0,5 M + 3,3 mL de solução 1 M

No caso dos tubos 4, 5, 6 e 7, sempre as soluções de menor concentração de sacarose foram adicionadas sobre as de maior concentração, tomando-se o cuidado de evitar o máximo possível que as soluções fossem misturadas. Em todos os casos (tubos 1 a 7), 500  $\mu\text{L}$  de cultura de *M. aeruginosa* SPC777 cultivada em ASM-1 líquido foram cuidadosamente adicionados sobre as soluções, sem homogeneização.

Os tubos foram então centrifugados a  $1500 \times g$  por 15 minutos. A formação de camadas diferenciais foi verificada macroscopicamente e as regiões nas quais aparentemente havia células (levemente esverdeadas) foram observadas ao microscópio óptico.

Devido aos resultados obtidos, após a primeira observação ao microscópio os tubos 4 e 6 (Tabela 2), já contendo as células, foram centrifugados novamente, desta vez a  $2.500 \times g$  por 15 minutos, seguindo nova análise microscópica. As células centrifugadas na presente etapa não foram utilizadas em novos inóculos.

#### **4.3.5 Filtragem de células**

Esta etapa foi realizada com base no protocolo descrito por Rippka (1998). Para este experimento, foi utilizada a cultura de *M. aeruginosa* SPC777 em fase exponencial de crescimento. A fase exponencial foi determinada com base em curva de crescimento (dados não publicados), realizada por intermédio de contagem de células em câmara de Fuchs-Rosenthal e medição da densidade óptica a 750 nm em espectrofotômetro (UV-VIS - Spectrometer Lambda-Bio, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA).

A filtragem das células foi feita a partir de 10 mL da cultura, coletados com uma seringa esterilizada de 25 mL, sem o uso de agulha (evitando-se ao máximo a lise celular). Esta alíquota da cultura foi transferida a um sistema de filtração, contendo um filtro Millipore com poros de 8 µm. Foram adicionados cerca de 300 mL de meio de cultura ASM-1 esterilizado e a cultura foi filtrada quase totalmente, até que apenas cerca de 5 mL restassem. Durante a filtração, parte do meio de cultura foi continuamente puxada com a seringa e retornada ao sistema. Assim, a movimentação do líquido fazia com que mais células passassem pela membrana filtrante, em vez de ficarem aderidas a ela, o que provocaria entupimento da mesma. Esta lavagem de células foi repetida duas vezes e então as células capturadas no filtro foram cultivadas em meio de cultura ASM-1 líquido e sólido. Estes inóculos foram observados ao microscópio óptico assim que o crescimento começou a se evidenciar.

#### **4.3.6 Inibição do crescimento de células contaminantes por antibiose**

Com base no protocolo descrito por Rippka (1998), 10 mL da cultura não-axênica da *M. aeruginosa* SPC777 em fase exponencial de crescimento foram transferidos a um tubo de ensaio de vidro completamente envolvido em papel alumínio, de forma a evitar a entrada de luz. Após 24 horas de ausência luminosa, foram adicionados  $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) ao meio de cultura. Após 24 horas, as células foram observadas ao microscópio. Uma alíquota (100 µL) desta cultura (fase superior do tubo) foi inoculada por *spread plate* em placa de Petri contendo ASM-1 sólido.

### 4.3.7 Confirmação da pureza por microscopia de epifluorescência

Após o aparente isolamento da linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777, bem como da outra cianobactéria que estava presente na cultura de *Microcystis* (família Synechococcaceae), as duas culturas de cianobactérias foram analisadas à microscopia de epifluorescência (Zeiss, modelo Axioplan-2), aumento de 400 x, na Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo. As cianobactérias foram observadas usando-se tanto luz branca quanto epifluorescência com filtro verde (filtro para o marcador FITC com excitação em 450-490nm e emissão 515nm LP).

### 4.3.8 Sequenciamento do DNAr 16S

#### 4.3.8.1 Extração de DNA

O DNA das duas monoculturas, *M. aeruginosa* SPC777 e a cianobactéria da família Synechococcaceae, foi extraído com base no protocolo descrito por Fiore et al. (2000). Foram utilizados 3 mL de cultura entre o meio e o final da fase exponencial de crescimento usando tubos de microcentrífuga esterilizados de 1,5 mL. As células foram concentradas por centrifugação ( $10.000 \times g$  por 5 minutos) e lavadas duas vezes com 1 mL da solução I (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl). O pélete foi então ressuspenso em 200  $\mu$ L da solução II (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA). Foram adicionados 2  $\mu$ L de Proteinase K ( $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e os tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 600  $\mu$ L do tampão de extração (3 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, 1 % sarcosil, 1 % 2-mercaptoetanol), preparado pouco antes do uso e pré-aquecido em banho-maria a 55 °C. As células foram incubadas em banho-maria a 55 °C durante 30 minutos e gentilmente homogeneizadas por inversão dos tubos a cada 5 minutos. Após a incubação, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 30 segundos para o resfriamento e foi adicionado 1 volume (800  $\mu$ L) de uma mistura de 24:1 (v/v) de clorofórmio e álcool isoamílico. O conteúdo dos tubos foi misturado gentilmente por inversão aproximadamente 30 vezes até que se formasse uma emulsão e centrifugado por 5 minutos a  $13.000 \times g$ . O sobrenadante (cerca de 500  $\mu$ L) foi transferido a um novo tubo e foram adicionados 2 volumes (1 mL) de NaCl 4 M. Foram adicionados 50  $\mu$ L de uma suspensão de sílica e a solução dentro de cada tubo foi gentilmente homogeneizada. Os tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 10 minutos e centrifugados por 1 minuto a

13.000 × g. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado duas vezes com 250 µL da solução de lavagem (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM EDTA, 50 % etanol). O pélete foi seco em bloco aquecedor (Lab Line) e reidratado com 30 µL de água ultrapura (Milli-Q) esterilizada. Os tubos foram incubados em banho-maria a 45 °C por 10 minutos e centrifugados a 13000 × g por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e a integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE 0,5 x (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). A alíquota de DNA aplicada no gel foi previamente adicionada a 3 µL de corante de carregamento [40% de sacarose (m/v), 0,25% de azul de bromofenol e água ultrapura] contendo SYBR<sup>®</sup> Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) na concentração 1 µL.mL<sup>-1</sup>. A documentação do gel foi feita através do programa “Kodak Gel Logic 212 Imaging System” – (Molecular Imaging System Carestream Health, Inc., Rochester, NY, EUA). O tamanho e a concentração do produto de PCR foram estimados através de comparação com o marcador de tamanho e massa molecular (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

#### 4.3.8.2 Amplificação do gene-alvo

Cerca de 20 ηg de cada DNA foram utilizados em reações de PCR para a detecção do gene codificante da subunidade menor do ribossomo bacteriano (16S RNAr). Para isso, foram usados os iniciadores 27F 1 e 1494 Rc (Tabela 3).

**Tabela 3**– Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do DNAr 16S e nas etapas de clonagem e sequenciamento

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' – 3')</i>	<i>Fragmento-alvo</i>	<i>Referência</i>
27F 1	AGAGTTTGATCCTGCTCAG	Subunidade 16S do RNA ribossômico de bactérias	NEILAN et al., 1997
1494 Rc	TACGGCTACCTTGTTACGAC		
M13F	GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA	Vetor pGEM	Manual do kit pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector Systems (Promega)
M13R	GAGCGGATAACAATTTACACAGG		
357F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Região interna do gene do RNA 16S bacteriano	LANE, 1991
357R	CTGCTGCCTCCCGTAGG		
704F	GTAGSGGTGAAATSCGTAGA		
704R	TCTACGSATTTACCCSCTAC		
1114F	GCAACGAGCGMRACCC		
1114R	GGGTYKCGCTCGTTGC		
T7	TAATACGACTCACTAT	Vetor pGEM	Manual do kit pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector Systems (Promega)
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA		

Cada reação continha 1 x tampão para a enzima *Taq* polimerase (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 3 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador e 1,5 U da enzima Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA polymerase (Invitrogen/Life /Technologies, cat. 10966-030). A ciclagem térmica adotada para a amplificação do gene-alvo foi realizada no termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems/Life Technology, Foster City, CA, USA) e consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 50 °C por 20 segundos e 72 °C por 1 minuto. Por fim, foi feita uma extensão a 72 °C por 7 minutos.

Uma alíquota de 5  $\mu$ L dos produtos de PCR foi adicionada a 3  $\mu$ L de corante de carregamento contendo 0,1% de SYBR<sup>®</sup> Green I (Molecular Probes) e submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito acima.

#### 4.3.8.3 Clonagem e sequenciamento

Na clonagem das sequências de DNAr 16S produzidas na PCR, foi utilizado o kit “pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems” (Promega, Madison, WI, EUA). A clonagem no vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante. A biblioteca de sequências do DNAr 16S foi feita a partir de 10  $\mu$ L do vetor ligado ao produto de PCR e 50  $\mu$ L de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para a transformação, foi feito choque térmico, conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). A PCR de colônia para confirmação da presença dos insertos foi feita usando os iniciadores M13F e M13R (Tabela 3). A reação de amplificação foi feita usando o *kit* da *Taq* DNA Polimerase (recombinante) da Fermentas (código EP0402), seguindo as mesmas concentrações descritas acima para os reagentes do kit Platinum. Os reagentes foram adicionados a 0,5  $\mu$ L da cultura de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  com 16 horas de crescimento, obtida a partir da biblioteca de sequências. O programa de ciclagem térmica consistiu em duas etapas: (1) uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos e (2) 25 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto. A reação foi feita em um termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems/Life Technologies). O resultado desta PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1 %, conforme descrito acima. Os clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  que apresentaram inserto do tamanho esperado foram selecionados para extração de plasmídeos usando hidrólise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979). A concentração de plasmídeos foi estimada por comparação com o marcador de tamanho molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen/Life Technologies) após eletroforese em gel de agarose. A PCR para

o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Para a reação, foram utilizados 200 ng de DNA plasmidial contendo o inserto, 0,2 µM de iniciador (T7, SP6, 357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R, Tabela 3), 1 µL de “DYEnamic”, 2 µL de tampão 2,5 X “Save Money” (200 mM Tris-HCl pH 9,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) e água ultrapura para volume final de 10 µL. A ciclagem térmica consistiu em 25 ciclos de: 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing”. Posteriormente, as reações precipitadas foram inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Life Technology), pertencente ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, do CENA/USP, para o sequenciamento dos fragmentos de DNA. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems/Life Technology).

#### **4.3.8.4 Processamento das leituras e construção das árvores filogenéticas**

As sequências geradas foram processadas para remoção de bases produzidas com baixa qualidade (ou seja, índice de qualidade Phred < 20) utilizando o pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998), em sistema operacional GNU/Linux. As sequências de nucleotídeo obtidas foram comparadas com outras sequências previamente depositadas no GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990).

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências de DNAr 16S obtidas neste estudo e outras selecionadas do GenBank foram alinhadas usando o pacote de programas MEGA 5.1 (TAMURA et al., 2011) e as extremidades das sequências foram ajustadas para que todas as sequências apresentassem o mesmo tamanho. A distância evolutiva entre as sequências foi estimada utilizando o algoritmo Máxima Verossimilhança (ML, *Maximum Likelihood*). O suporte para os nós internos da árvore de distância evolutiva foi obtido usando reamostragem com 1000 replicações (FELSENSTEIN, 1985).

#### 4.4 Sequenciamento do genoma da *M. aeruginosa* SPC777 na Plataforma SOLiD V3

##### 4.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico da *M. aeruginosa* SPC777 foi extraído a partir de um concentrado de células proveniente de cerca de 70 mL de cultura em ASM-1 líquido. O protocolo utilizado teve por base o descrito por Mullenbach, Lagoda e Welter (1989). Após descongelamento, o concentrado de células foi transferido a um microtubo Eppendorf esterilizado com capacidade para 1,5 mL. Foram adicionados 300 µL do tampão de homogeneização (10 mM Tris pH 8,0, 60 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8,0 e 50 gL<sup>-1</sup> de sacarose) e 300 µL do tampão de lise (300 mM Tris pH 9,0, 10 mM EDTA, 5 % sacarose e 1,25 % dodecil sulfato de sódio). Foram adicionadas Proteinase K (USB, Cleveland, OH, Estados Unidos) e RNase (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA), cada uma para uma concentração final 0,16 mgmL<sup>-1</sup>. O tubo foi incubado em bloco aquecedor para microtubos (Eppendorf) a 56 °C com agitação a 500 rpm por 1 hora. Foram adicionados 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O tubo foi invertido manualmente por cinco a dez minutos, até que a solução ficasse completamente homogeneizada com a amostra, com aparência de uma emulsão. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 15.000 ×g e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido a um novo tubo, com auxílio de uma pipeta automática. Foram adicionados 600 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A amostra foi novamente homogeneizada manualmente através de inversão do tubo por cinco a dez minutos e centrifugada por 10 minutos a 15.000 ×g. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e foram adicionados 100 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8 e 500 µL de isopropanol. O tubo foi agitado gentilmente até a visualização de DNA e centrifugado por 2 minutos a 15.000 ×g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foram adicionados 500 µL de etanol 70 %. O tubo foi centrifugado por 2 minutos a 15000 ×g e o sobrenadante foi descartado. O pélete de DNA foi seco em estufa (Labtrade, Cotia, SP, Brasil) a 37 °C por 15 minutos e então diluído em 50 µL de TE (10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0).

A qualidade do DNA obtido foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1 %. A quantificação observada no gel foi confirmada em fluorômetro Qubit com o reagente Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.4.2 Amplificação do genoma

Devido à necessidade de grande quantidade de DNA (no mínimo 20 µg) para iniciar a biblioteca de DNA pela plataforma SOLiD™ 3 Plus, o DNA genômico obtido foi amplificado usando o “GenomiPhi V2 DNA Amplification kit” (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England), seguindo as especificações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC -200 (Peltier). O DNA foi misturado com o tampão de amostra, incubado a 95 °C por 3 minutos e o tubo foi resfriado em gelo logo em seguida (tubo 1). Em outro tubo (tubo 2), no gelo, a enzima Genomiphi™ foi misturada com o tampão de reação. O conteúdo dos dois tubos foi então misturado e a reação foi levada ao termociclador. O programa de ciclagem térmica consistiu em 30 °C por 90 minutos e aquecimento a 65 °C por 10 minutos. As amostras foram então mantidas a 4 °C.

#### 4.4.3 Biblioteca e sequenciamento por SOLiD

Conforme recomendação da empresa Applied Biosystems/Life Technologies, 20 µg do DNA amplificado com o kit da enzima Genomiphi™ foram submetidos ao sequenciamento pela Plataforma SOLiD™ 3 Plus, utilizando biblioteca pareada (*mate-paired*) consistindo em dois fragmentos de 50 pb.

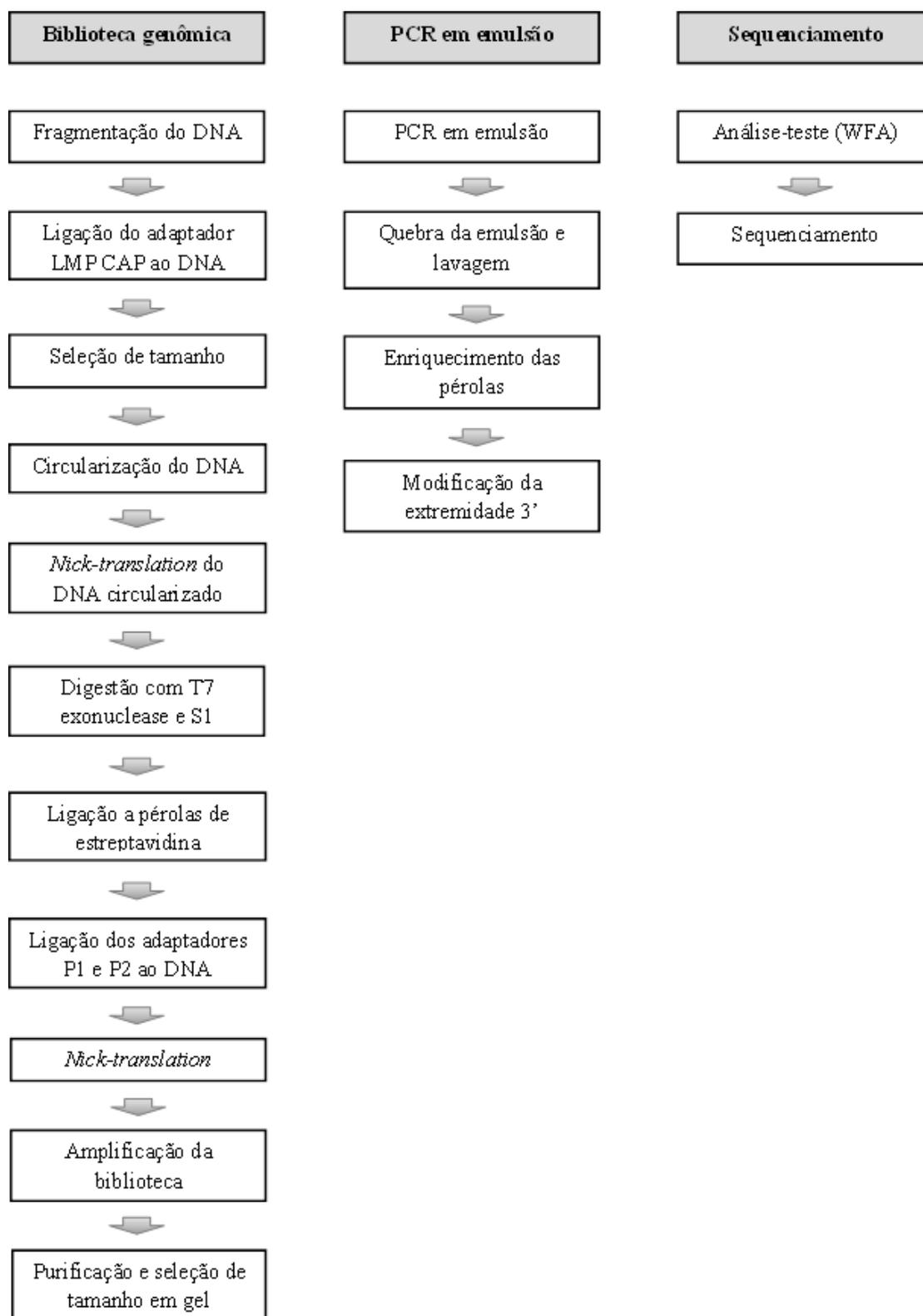
As etapas realizadas seguiram o descrito no manual da empresa Applied Biosystems/Life Technologies (SOLiD V3) e estão esquematizadas na Figura 12. Os reagentes utilizados foram fornecidos pela mesma empresa, em kit apropriado para a construção de biblioteca genômica para sequenciamento pela Plataforma SOLiD. Inicialmente, a fragmentação do DNA foi realizada no sistema HydroShear® (Gene Machines), com 20 ciclos, “speed code” 5, de forma a serem obtidos fragmentos de tamanho entre 1 e 2 kb. O DNA foi purificado passando por coluna apropriada. Em seguida, as extremidades coesivas resultantes da quebra mecânica foram removidas por tratamento com duas enzimas de restrição e incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Desta forma, foi aumentada a chance de haver uma ligação correta dos fragmentos de DNA ao adaptador LMP CAP (etapa descrita a seguir). Foi feita uma nova purificação e os fragmentos de DNA foram ligados ao adaptador LMP CAP (este adaptador é importante para a etapa de *nick-translation*, descrita mais adiante), com incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Este DNA foi novamente purificado e então o tamanho dos fragmentos foi observado à luz ultravioleta (evitando-se exposição prolongada para não danificar o DNA) após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de

usão 1% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe. A porção do gel de agarose na faixa do tamanho de fragmento desejada (1 a 2 kb) foi recortado com bisturi e o DNA foi coletado por dissolução da agarose e precipitação com isopropanol. Desta forma, todo o excesso de adaptador LMP CAP que não se ligou ao DNA foi descartado. Após a quantificação do DNA recuperado, os fragmentos foram circularizados como consequência da ligação de um adaptador interno de dupla-fita às suas extremidades. A reação de ligação ocorreu com incubação à temperatura ambiente por 30 minutos e então o DNA foi purificado em coluna apropriada. Como a ligação do adaptador ocorre de maneira aleatória, recomenda-se que a reação seja muito diluída, para se tentar aumentar as chances de que a ligação ocorra entre as extremidades da mesma molécula de DNA, ao invés de dois fragmentos de DNA distintos. Ainda assim, após esta etapa foi feito o isolamento dos fragmentos que efetivamente foram circularizados. Para isso, o DNA foi incubado a 37 °C por 40 minutos com “Plasmid-Safe<sup>™</sup> DNase”, uma enzima que digere todo o tipo de DNA que não estiver circularizado. Após a digestão, o DNA foi novamente purificado e quantificado como descrito anteriormente. A etapa seguinte, *nick-translation*, consiste na extensão de fragmentos do genoma, neste caso de 50 pb, bidirecionalmente a partir do adaptador LMP CAP. Este adaptador tem um fosfato 5' a menos em um de seus oligonucleotídeos, o que resulta em um *nick* em cada filamento quando o DNA é circularizado. A reação é feita com a enzima DNA polimerase I de *Escherichia coli*. A mistura do DNA circularizado com a enzima, no devido tampão, foi incubada a 5 °C por 10 minutos. O tempo e a temperatura de incubação são os fatores determinantes do tamanho do fragmento que será estendido. Em seguida, o DNA foi exposto à ação da enzima T7 exonuclease, com incubação a 37 °C por 30 minutos. A enzima foi inativada a 70 °C por 20 minutos e o DNA foi incubado com a enzima S1 nuclease a 37 °C por 30 minutos. Nesta etapa, a enzima T7 reconhece os *nicks* dentro do DNA circularizado e, com sua atividade exonuclease 5' – 3', digere o filamento que não se ligou, separando-o das tags. Este processo cria uma lacuna na sequência, que provoca a exposição de uma região de fita simples que é mais facilmente reconhecida pela S1 nuclease, de forma que o DNA da biblioteca genômica seja clivado e separado do molde circularizado. Em seguida, conforme descrito anteriormente, as extremidades coesivas geradas pela clivagem foram reparadas por intermédio da ação de duas enzimas fornecidas pelo kit de biblioteca genômica do SOLiD V3. Os fragmentos de DNA contendo o adaptador interno foram ligados (pelo adaptador) a pérolas de estreptavidina (Dynabeads<sup>®</sup> MyOne<sup>™</sup> Streptavidin C1) e lavados em tampão apropriado, para a remoção de resíduos indesejados. Os adaptadores P1 e P2 (dupla fita) foram ligados às extremidades dos fragmentos de DNA, por intermédio de incubação à temperatura ambiente por 15 minutos com a enzima T4 DNA Ligase. Após

lavagem para remoção de resíduos indesejados remanescentes da ligação, foi feita novamente *nick-translation* com a enzima DNA polimerase I à temperatura ambiente por 15 minutos, para completar as lacunas dos fragmentos de 50 pb. Prosseguiu-se, então, com uma amplificação-teste da biblioteca utilizando apenas uma alíquota do DNA com adaptadores, para se observar a eficiência da reação, além de se poder certificar se a quantidade de DNA e reagentes utilizada seria a mais apropriada. Em seguida, todo o restante da biblioteca foi utilizado para a amplificação final. O produto de amplificação foi purificado e observado após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão. Após a eletroforese, os fragmentos amplificados que apresentavam tamanho entre 250 e 350 pb foram excisados e removidos do gel utilizando um tampão comercial para solubilização do gel, seguindo precipitação do DNA com isopropanol. O DNA recuperado foi quantificado no aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos).

Tendo a biblioteca genômica pronta, prosseguiu-se com a PCR em emulsão (ePCR), primeiramente em escala menor, para uma corrida-teste (WFA, *WorkFlow Analysis*), e em seguida com o restante do volume para a corrida definitiva no sequenciador. Para isso, a fase aquosa e a oleosa foram preparadas separadamente, sempre seguindo as especificações da Applied Biosystems/Life Technologies. Foram adicionadas à emulsão 800 milhões de pérolas “SOLiD™ P1 DNA Beads” e a solução foi transferida a uma placa de 96 poços para a reação em termociclador. Após a amplificação, a emulsão foi quebrada com 2-butanol para purificar as pérolas, que ficaram na fase oleosa. As pérolas foram então lavadas para a remoção de 2-butanol residual, bem como óleo e a fase aquosa contendo os reagentes de PCR. Em seguida, a solução foi transferida a um tubo de 50 mL e foi feito um enriquecimento com o objetivo de isolar as pérolas portadoras dos produtos de PCR completamente estendidos. Tal isolamento é feito por hibridização com a sequência do iniciador P2. Assim, tanto as pérolas monoclonais quanto as policlonais foram enriquecidas. Ao final, a extremidade 3' das pérolas com o P2 enriquecido foram estendidas com por Transferase Terminal, usando um produto apropriado (“Bead Linker”).

Ao se programar o sequenciador, o genoma referência indicado para o sequenciamento da linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777 foi o de *M. aeruginosa* NIES-843 (RefSeq NC\_010296.1).



**Figura 12**– Fluxograma das etapas de construção de biblioteca pareada 2 x 50 pb para sequenciamento por SOLiD 3 Plus

#### 4.4.4 Aquisição e processamento das leituras obtidas após o sequenciamento

Após o sequenciamento, foram gerados pelo programa BioScopegráficos de avaliação dos dados da cobertura genômica em relação ao genoma de referência *Microcystis aeruginosa* NIES-843e do tamanho de inserto da biblioteca pareada. Além disso, foi calculado o número de leituras obtidas (dados brutos), somando os valores obtidos para as duas *tags*. Com esse número, foi calculada a cobertura genômica esperada, utilizando a fórmula:

$$\frac{\text{Número total de leituras x tamanho da leitura (em pb)}}{\text{Tamanho esperado do genoma (em pb)}}$$

Em seguida, foi aplicado filtro de qualidade sobre as leituras obtidas e os erros de sequenciamento foram corrigidos, antes de se prosseguir com a montagem do genoma. Dessa forma, somente as leituras de qualidade confiável foram usadas para as etapas subsequentes.

Primeiramente, as sequências foram filtradas. Seguindo parâmetros rotineiramente utilizados em análises de sequências, foram removidas todas as leituras que apresentaram valor de qualidade Phred abaixo de 20. O número de leituras restantes foi usado para um novo cálculo da cobertura genômica esperada.

Foi realizada, então, a correção dos erros de sequenciamento, utilizando o programa SAET (SOLiD™ Accuracy Enhancement Tool, Applied Biosystems/Life Technologies, 2011).

A partir desta etapa, foram realizados diversos testes, com dois objetivos principais: (1) a montagem do genoma de *M. aeruginosa* SPC777 e (2) a detecção dos genes envolvidos na síntese de microcistina e saxitoxina.

### 4.5 Montagem do genoma de *Microcystis aeruginosa* SPC777

#### 4.5.1 Montagem por referência

Os testes de montagem por referência foram feitos usando o programa CLC Genomics Workbench, do pacote CLC Bio Workbench 4.0.2 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). Para uma estimativa do genoma completo e detecção dos genes envolvidos na biossíntese da microcistina, foi feito um teste de montagem por referência pelo alinhamento entre as sequências curtas obtidas para a linhagem SPC777 e o genoma completo de *M.*

*aeruginosa* NIES-843, encontrado na ferramenta virtual RefSeq, sob o código de acesso PRJNA59101, ID 59101. Para a detecção dos genes envolvidos na biossíntese da saxitoxina, foi testado o alinhamento da sequência do agrupamento gênico *sxt* de *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (acesso no NCBI: DQ787200.1) com as leituras do genoma de *M. aeruginosa* SPC777.

#### 4.5.2 Montagem *ab initio*

Para a montagem *ab initio* das leituras, foram empregadas duas abordagens frequentemente usadas após sequenciamento usando a plataforma SOLiD: Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008) e Edena (HERNANDEZ et al, 2008). Além disso, foi utilizado também o *pipeline* da Applied Biosystems/Life Technologies.

##### 4.5.2.1 Montagem utilizando Velvet

Para o uso do programa Velvet, foram testados diferentes valores dos parâmetros *k*-mer (tamanho dos fragmentos das leituras), *coverage cutoff* (valor mínimo de cobertura) e *expected coverage* (cobertura esperada), sendo os dois primeiros utilizados para a construção do grafo de *k*-mer e cobertura mínima para geração de cada *contig*, respectivamente. Inicialmente, foram realizadas rodadas sem parâmetros para selecionar a faixa de variação de *k*-mer, *cov\_cut* (*coverage cutoff*) e *exp\_cov* (*expected coverage*) que gerariam o melhor resultado. O conjunto de parâmetros que gerou *contigs* mais longos e em menor quantidade foi adotado para a montagem do genoma.

Os valores de *k*-mer testados foram entre 27 e 33 nucleotídeos. Para *coverage cutoff*, foram testados 11, 13 e 15. E os valores de cobertura esperada variaram de 30 a 190 (variando de 20 em 20).

##### 4.5.2.2 Montagem utilizando Edena

No Edena, foram testadas variações de *MinOverlap* (tamanho mínimo de sobreposição entre as leituras), utilizado para a construção do grafo de sobreposição, e *OverlapCutoff* (quantidade mínima de sobreposições), que está diretamente ligado ao valor de cobertura

obtido no sequenciamento. Foram realizadas rodadas com variações de ambos os parâmetros nas faixas de 27-33. O conjunto de parâmetros que gerou melhor resultado foi adotado para análises posteriores.

#### **4.5.2.3 Montagem utilizando o pipeline da Applied Biosystems/Life Technologies**

Para a montagem por este *pipeline*, dentre outros programas, é utilizado o Velvet. Portanto, selecionou-se apenas o valor de k-mer que gerou melhor resultado nos testes com o Velvet e os outros parâmetros foram colocados em modo padrão.

#### **4.5.3 Alinhamento dos contigs gerados por montagem ab initio contra um genoma de referência**

Para possibilitar a geração de um *scaffold* preliminar, a melhor montagem do programa Edena e a montagem realizada pelo *pipeline* da Applied Biosystems/Life Technologies foram selecionadas para gerar um único arquivo multifasta. Estas duas estratégias foram as escolhidas por geralmente ocorrer complementariedade entre os resultados de montagem por Edena e Velvet. Para o alinhamento, foi utilizado o programa CLC Genomics Workbench. Assim como descrito anteriormente, o genoma de *M. aeruginosa* NIES-843 (acesso PRJNA59101, ID 59101) foi usado como referência para o alinhamento do genoma completo e do agrupamento gênico de microcistina, enquanto o agrupamento gênico *sxt* de *C. raciborskii* T3 (DQ787200.1) foi usado como referência na tentativa de se encontrar os genes de saxitoxina na linhagem estudada.

Após o alinhamento, as regiões de lacuna em relação ao genoma-referência (bases marcadas com a letra “N”) foram removidas para se verificar a cobertura genômica do *scaffold* de *M. aeruginosa* SPC777 em relação ao genoma de referência de *M. aeruginosa* NIES-843.

#### **4.6 Análises por Blast**

Para se identificar o gene que codifica para o RNAr 16S e verificar a homologia entre o *scaffold* (“arcabouço”) do genoma da linhagem SPC777 e outras sequências de *Microcystis aeruginosa* encontradas no banco de dados de nucleotídeos do NCBI, foi feito alinhamento por

BlastN dos *contigs* gerados pelo *pipeline* da Applied Biosystems/Life Technologies. Os resultados de BlastN foram verificados no programa G4ALL(<http://g4all.sourceforge.net/>).

Além disso, foi utilizada a ferramenta BlastX para estes mesmos *contigs*, para identificar, comparando com o banco de dados do NCBI, os produtos gênicos existentes na linhagem estudada, inclusive os agrupamentos gênicos da microcistina e da saxitoxina.

O programa CLC Genomics Workbench foi utilizado para testes adicionais, visando a ajudar na localização do agrupamento gênico da saxitoxina no genoma de *M. aeruginosa* SPC777. Assim, as sequências obtidas previamente pela tecnologia de sequenciamento Sanger foram alinhadas contra as leituras (dados brutos do sequenciamento) e os *contigs* gerados. Foram também alinhadas contra o genoma de *M. aeruginosa* NIES-843 para verificar se foi amplificada alguma região conservada existente no genoma de linhagens do gênero *Microcystis*.

#### 4.7 Identificação de plasmídeos

Para a identificação de plasmídeos, os dados brutos gerados no sequenciamento e os *contigs* gerados na montagem *ab initio* foram alinhados contra as sequências dos plasmídeos de *Microcystis aeruginosa* pMA1 (acesso no NCBI: NC\_002060) e pMa025 (acesso no NCBI: NC\_004984.1). Além disso, os resultados de BlastN e BlastX foram analisados.

#### 4.8 Caracterização do agrupamento gênico da microcistina

##### 4.8.1 Seleção e montagem dos contigs de interesse

Após análise do resultado de BlastX, os *contigs* que apresentavam fragmentos do agrupamento gênico da microcistina e os genes flanqueadores *dnaN* e *umaI* foram selecionados. Foi feita nova montagem somente desses *contigs*, usando Velvet, de forma a gerar uma sequência consenso para o agrupamento gênico *mcy*. Os limites deste agrupamento gênico foram definidos por alinhamento de sequências dos genes *umaI* e *dnaN* no programa MEGA 5.1 (TAMURA et al., 2011). Os nucleotídeos que se encontravam ao lado 5' do início do gene *umaI* e ao lado 3' da sequência de *dnaN* foram descartados. A grande maioria das lacunas remanescentes foi preenchida no programa CLC Bio, por intermédio de alinhamentos recursivos das leituras contra a sequência consenso *mcy*. As lacunas que permaneceram no

meio de regiões codificantes foram elucidadas por intermédio de PCR e sequenciamento pela tecnologia Sanger, conforme descrito a seguir.

#### 4.8.2 Preenchimento de lacunas dentro do agrupamento gênico *mcy*

Para a obtenção da sequência completa do gene *mcyC*, os nucleotídeos do próprio agrupamento gênico *mcy* da linhagem SPC777 foram utilizados como base para o desenho de iniciadores (Tabela 4). Os iniciadores foram desenhados de forma a gerar sobreposição de pelo menos 40 nucleotídeos com a sequência obtida a partir dos contigs do sequenciamento por SOLiD. A possibilidade de formação de estruturas secundárias, tais como alças e dímeros, foi avaliada pela ferramenta virtual NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>), sendo escolhidos aqueles iniciadores que apresentassem temperatura de anelamento semelhante e menor probabilidade de formação de estruturas secundárias.

**Tabela 4** – Iniciadores desenhados para a elucidação das lacunas na sequência do gene *mcyC* em *M. aeruginosa* SPC777

Primer	Sequência (5'-3')	Posição de anelamento na sequência-alvo*	Tamanho de sequência esperado (pb)
mcyC-F1b	GGAATAAACAACACTGCGAG	Nucleotídeos 967 a 984	165
mcyC-R1b	TGAGAGACATAGATGAGCAGTA	Nucleotídeos 1110 a 1131	
mcyC-F2b	TCTGACAACATCACAAAGGCA	Nucleotídeos 2187 a 2207	974
mcyC-R2b	ACTTCGGGTTCAACGGGA	Nucleotídeos 3140 a 3157	
mcyC-F3b	CGTCCTCCTCTGTAAAGTATCCA	Nucleotídeos 1533 a 1554	671
mcyC-R3b	TTTGTGATGTTGTCAGATTTTC	Nucleotídeos 2182 a 2203	

\* Sequência de nucleotídeos do agrupamento gênico *mcy*.

Para a PCR, foram utilizados 1x tampão para a *Taq* polimerase, 3 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador e 1,5 unidade da enzima Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA polymerase (Invitrogen/Life Technologies, cat. 10966-030). O programa de ciclagem térmica utilizado para cada par de iniciadores, realizado em termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems/Life Technologies), é descrito na Tabela 5.

**Tabela 5**– Programas de PCR empregados para a elucidação de lacunas no agrupamento gênico da microcistina

Conjunto de iniciadores	Desnaturação inicial	Ciclos	Extensão final
mcyC-F1b + mcyC-R1b	95 °C por 5 minutos	35 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 52 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos	72 °C por 10 minutos
mcyC-F2b + mcyC-R2b	95 °C por 5 minutos	35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto	72 °C por 10 minutos
mcyC-F3b + mcyC-R3b			

Os produtos de PCR foram ligados ao plasmídeo pGEM (“pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems”, Promega) e as etapas de clonagem e sequenciamento seguiram o sugerido pelo fabricante, conforme descrito no item 4.4.3.

Para a elucidação das lacunas, as sequências obtidas foram alinhadas àquela previamente obtida para o agrupamento gênico da microcistina utilizando o programa MEGA 5.1 (TAMURA et al., 2011), para a confirmação de que as regiões desejadas haviam sido de fato amplificadas.

#### 4.8.3 Anotação automática e curadoria manual do agrupamento gênico da microcistina

De posse da sequência completa do agrupamento gênico da microcistina, procedeu-se à anotação do mesmo.

Primeiramente, foi feita anotação automática por intermédio da ferramenta online RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*, AZIZ et al., 2008). Esta ferramenta possibilita a identificação de genes de RNAr, RNAt e os codificadores de proteínas e atribui funções aos genes, entre outros atributos.

Em seguida, o arquivo em formato “.embl” resultante da anotação pelo RAST foi analisado no programa Artemis (RUTHERFORD et al., 2000). A curadoria manual dos genes *mcy* e flanqueadores encontrados foi realizada por intermédio de análise das sequências codificantes (CDSs) inferidas por RAST. Essa análise consistiu na verificação de que as CDSs tivessem início com uma metionina, além da comparação de similaridade e posição de início e término da sequência de aminoácidos de cada CDS em relação a outras sequências do banco de proteínas do NCBI, usando BlastX.

#### 4.8.4 Análise de similaridade e construção de árvores filogenéticas

Uma vez que se obteve a sequência completa de cada gene que compõe o agrupamento gênico da microcistina em *M. aeruginosa* SPC777, estes puderam ser comparados com outros genes *mcy* depositados no NCBI. Além disso, a sequência do agrupamento gênico como um todo foi comparada com as outras sequências completas já conhecidas.

O alinhamento das sequências e a construção das árvores filogenéticas foram feitos conforme descrito no item 4.3.8.4.

#### 4.9 Amplificação por PCR e sequenciamento de genes *sxt*

##### 4.9.1 Desenho de iniciadores

Para a detecção de fragmentos dos genes *sxtA*, *sxtG*, *sxtH* e *sxtI*, sequências de nucleotídeos de diferentes linhagens de cianobactérias (Tabela 6) foram recuperadas do GenBank e alinhadas utilizando as ferramentas BioEdit (HALL, 1999) e Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

**Tabela 6**– Sequências utilizadas para o desenho de iniciadores específicos para genes *sxt*

Número de acesso no NCBI	Organismo	Tamanho da sequência (pb)	Referência
<b>Gene <i>sxtA</i></b>			
NZ_ACYB01000035	<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	3738 (completa)	STUCKEN et al., 2010
EU629174	<i>Lyngbya wollei</i> str. Carmichael/Alabama	1054 (parcial)	Kellman et al., 2008a
EU629175	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NH-5	1055 (parcial)	
EU629176	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC150E	708 (parcial)	
EU629177	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC118C	1536 (parcial)	
EU629179	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC131C	1242 (parcial)	
EU629178	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3	1281 (parcial)	
<b>continua</b>			

			continuação
<b>Gene <i>sxtG</i></b>			
EU629190	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC131C	719 (parcial)	
EU629188	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC173A	705 (parcial)	
EU629187	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC150E	706 (parcial)	
EU629186	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC134C	709 (parcial)	
EU629183	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC118C	706 (parcial)	
EU629182	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i> T3	1134 (completa)	Kellman et al., 2008a
EU629181	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NH-5	1134 (completa)	
EU629180	<i>Lyngbya wollei</i> str. Carmichael/Alabama	1134 (completa)	
EU629189	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC283A	709 (parcial)	
EU629185	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC150A	709 (parcial)	
EU629184	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC323A	703 (parcial)	
ACYB01000035	<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	1134 (completa)	Stucken et al., 2010
<b>Gene <i>sxtH</i></b>			
NZ_ACYB01000035	<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	1005 (completa)	Stucken et al., 2010
EU629199	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC150E	706 (parcial)	
EU629198	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC173A	860 (parcial)	
EU629197	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC118C	841 (parcial)	
EU629195	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC134C	750 (parcial)	
EU629194	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC131C	1020 (completa)	Kellman et al., 2008a
EU629193	<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i> T3	1005 (completa)	
EU629192	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> NH-5	1020 (completa)	
EU629191	<i>Lyngbya wollei</i> str. Carmichael/Alabama	1029 (completa)	
EU629196	<i>Anabaena circinalis</i> AWQC323A	811 (parcial)	

continua

			<b>conclusão</b>
<b>Gene <i>sxtI</i></b>			
EU439556	Cylindrospermopsis raciborskii T3	1839 (completa)	
EU439560	Anabaena circinalis AWQC118C	1571 (parcial)	
EU439557	Anabaena circinalis AWQC131C	1839 (completa)	
EU439561	Anabaena circinalis AWQC134C	1541 (parcial)	Kellman et al., 2008a
EU439563	Anabaena circinalis AWQC150E	1538 (parcial)	
EU439564	Anabaena circinalis AWQC173A	1542 (parcial)	
EU439559	Aphanizomenon flos-aquae NH-5	1839 (completa)	
EU439558	Lyngbya wollei str. Carmichael/Alabama	1071 (completa)	

Uma sequência consenso foi gerada e usada como base para a sugestão de iniciadores pela ferramenta virtual Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). As sequências de iniciadores sugeridas foram testadas em NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) em relação à formação de estruturas secundárias (alças e dímeros), presença de sequências palindrômicas e nucleotídeos repetidosconsecutivamente. A especificidade dos iniciadores escolhidos (Tabela 7)foi testada usando a ferramenta BLAST no banco de dados de nucleotídeos do NCBI e o tamanho esperado para cada produto de amplificação foi estimado pelo alinhamento (em Clustal W) dos iniciadores com a sequência consenso.

**Tabela 7** - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes envolvidos na biossíntese de saxitoxinas

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Fragmento-alvo</b>	<b>Referência</b>
sxtA-F	GGACTCGGCTTGTTGCTTC	Gene <i>sxtA</i> , sequência parcial da AONS (201 pb)	Este trabalho (publicado em Hoff-Rissetti, 2012)
sxtA-R	CCAGACAGCACGCTTCATAA		
SXTAF-SL	CTCCTCTTCGGTATTGGCGG	Gene <i>sxtA</i> (3600 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTAR-SL	GCGTTCCC GTTATTCTTGC		
sxtB-F	TTTGTAGGRCAGGCACTT	Gene <i>sxtB</i> (~400 pb)	Hoff-Rissetti, 2012
sxtB-R	ATCATCGGTATCATCGGTAG		
SXTDcontF-SL	ATACCTCCAGAGCGAGGACA	ORF1 ( <i>upstream</i> ao gene <i>sxtD</i> ) (853 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTDR-SL	ATGGAAGGGAGAGCGAATTT		
sxtG-F	CAGATCGCAACCGCTATT	Gene <i>sxtG</i> (446pb)	Este trabalho
sxtG-R	CAACCAAATGTCCCAGC		
sxtH-F	CTATCATTGCCAGGARCG	Gene <i>sxtH</i> (431 pb)	Este trabalho
sxtH-R	TGTCTTCATCAATCGGTGT		
OCT-F	TGCCGTTTTGTGCTTAGATG	Gene <i>sxtI</i> (923 pb)	Este trabalho (publicado em Hoff-Hissetti, 2012)
OCT-R	GGACGGAAGGACTCACGATA		
SxtI-F	GCTTACTACCACGATAGTGCTGCCG	Gene <i>sxtI</i> (1669 pb)	Kellmann; Mihali; Neilan, 2008b
SxtI-R	GGTTCGCCGCGGACATTA AAA		
SXTNF-SL	CTGCTAGTTTGCGGCTGGTG	Gene <i>sxtN</i> (1045 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTNR-SL	CCCCCTCTGAACGGTTACGA		
SXTOF-SL	TCCTGACTCCGCAAAGAGTT	Sequência de inserção IS4 ( <i>upstream</i> ao gene <i>sxtO</i> ) (1240 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTOcontR-SL	CGGGGTTGGATATGTTTTTTG		
SXTVF-SL	CCTGCTACA ACTTTAATACT	Gene <i>sxtV</i> (1829 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTVR-SL	AGCTTAGTAAAGAACA ACT		
SXTWF-SL	ACTTAGGTAAAGCGGCTTTG	Gene <i>sxtW</i> (430 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTWR-SL	GCGCTACACCAGTATTA		
SXTXF-SL	AAAAAGTGCAAGTTAAGAGG	Gene <i>sxtX</i> (921 pb)	Soto-Liebe et al., 2010
SXTXR-SL	TAAAACACGGGGACTACATC		

**Nota:** Os iniciadores descritos por Soto-Liebe et al. (2010) tiveram seu nome modificado nesta tese, com a adição de “-SL” após o nome original.

#### 4.9.2 Amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtG*, *sxtH* e *sxtI*

Na amplificação de parte dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtG*, *sxtH* e *sxtI*, foram utilizados, respectivamente, os iniciadores: *sxtA*-F e *sxtA*-R; *sxtB*-F e *sxtB*-R; *sxtG*-F e *sxtG*-R; *sxtH*-F e *sxtH*-R; e OCT-F e OCT-R(Tabela 7). Além disso, foram também feitos testes de amplificação usando os iniciadores da Tabela 7 descritos em literatura para a detecção de genes *sxt*.

Em todos os casos, foram usados cerca de 30 ng de DNA, 0,4 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x tampão de PCR, 1,5 U de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Invitrogen/Life Technologies) e água para um volume final de 25 µL. Como controle positivo de amplificação, e também para verificar a especificidade dos iniciadores desenhados, foi utilizado DNA da linhagem *C. raciborskii* T3, que foi a primeira linhagem de cianobactéria a ter o agrupamento gênico *sxt* descrito (KELLMANN et al., 2008a).

O programa de ciclagem térmica empregado para cada conjunto de iniciadores encontra-se descrito na Tabela 8.

**Tabela 8** – Programas de PCR empregados para a detecção de genes sxt

<b>Conjunto de iniciadores</b>	<b>Desnaturação inicial</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Extensão final</b>
<b>sxtA-F + sxtA-R</b>	94 °C por 5 minutos	35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos	72 °C por 7 minutos
<b>sxtB-F + sxtB-R</b>	94 °C por 3 minutos	35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos	72 °C por 7 minutos
<b>sxtG-F + sxtG-R</b>	a 95 °C por 5 minutos	35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos	72 °C por 10 minutos
<b>sxtH-F + sxtH-R</b>	95 °C por 5 minutos	35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos	72 °C por 20 minutos
<b>OCT-F + OCT-R</b>	94 °C por 5 minutos	35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 61 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos	72 °C por 7 minutos
<b>Sxt1-F + Sxt1-R</b>	94 °C por 3 minutos	30 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 57 °C por 20 segundos e 72 °C por 1 minuto	72 °C por 7 minutos
<b>sxtAF-SL + sxtAR-SL</b> <b>sxtNF-SL + sxtNR-SL</b> <b>sxtXF-SL + sxtXR-SL</b> <b>sxtWF-SL + sxtWR-SL</b> <b>sxtVF-SL + sxtVR-SL</b> <b>sxtDcontF-SL + sxtDR-SL</b> <b>sxtOF-SL + sxtOcontR-SL</b>	99 °C por 1 minuto	30 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos	72 °C por 7 minutos

Além do descrito na tabela acima, para os iniciadores descritos por Soto-Liebe et al. (2010) foram também testadas as temperaturas 51 °C e 55 °C para o anelamento dos oligonucleotídeos.

Para os casos de resultado positivo de amplificação, as etapas de clonagem, extração de plasmídeos, sequenciamento e construção de árvores filogenéticas foram realizadas conforme descrito anteriormente (itens 4.3.8.3e 4.3.8.4).

### **4.9.3 Extensão dos fragmentos de genes *sxt* pela técnica “pan-handle”**

Esta etapa do projeto foi realizada na Universidade de Western Sydney (UWS) em Sydney (NSW, Austrália) sob a co-orientação da Dra. Michelle C. Moffitt, com colaboração do Dr. Brett A. Neilan (Universidade de New South Wales – UNSW). A técnica “pan-handle” consistiu no desenho e uso de oligonucleotídeos usando como base as extremidades de fragmentos gênicos já conhecidos, para que se pudesse obter a sequência completa do gene de interesse, estendendo-a até os genes adjacentes.

#### **4.9.3.1 Desenho de iniciadores**

Os novos iniciadores (Tabela 9) foram desenhados com base nas extremidades dos fragmentos gênicos *sxt* previamente obtidos por sequenciamento Sanger, de forma que o iniciador senso localizava-se sempre próximo à extremidade 3' e o anti-senso, próximo à 5'.

Para cada sequência, procedeu-se da seguinte forma: foi escolhida uma região situada à extremidade 3', pelo menos 40 nucleotídeos antes do final da sequência. Foram observadas regiões nas quais não havia muita repetição de nucleotídeos próximos. Foram escolhidos 18 a 25 nucleotídeos consecutivos e avaliados *in silico* usando a ferramenta online NetPrimer. Com esta ferramenta, foi avaliada a qualidade do iniciador desenhado, estimativa da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) e possibilidade de formação de estruturas secundárias e dímeros. Com base nos resultados desta análise, as melhores possibilidades de sequências foram escolhidas para uso como iniciadores. Além do NetPrimer, a ferramenta OligoAnalyzer, da IDT (Integrated DNA Technologies, <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) foi utilizada para uma segunda confirmação da qualidade dos iniciadores a serem sintetizados. O mesmo procedimento foi feito com a extremidade 5' da sequência de cada gene.

**Tabela 9**– Iniciadores desenhados para a técnica de “pan-handle”

Iniciador	Sequência (5'-3')	Sentido	T <sub>m</sub> (°C)**	Gene-alvo	Nucleotídeos para sobreposição*
ECsxtA-F1	AACTGGGAATAATGGTGTCA	Senso	52,46	<i>sxtA</i>	71
ECsxtA-R1	TGTCCAAACTTTTAGGCGTA	Anti-senso	53,87	<i>sxtA</i>	71
ECsxtB-F1	CATTATGGTGGCGGATTG	Senso	56,99	<i>sxtB</i>	76
ECsxtB-R1	CAAATGGCTCGGGTAGAA	Anti-senso	53,98	<i>sxtB</i>	91
ECsxtG-F1	TGAAGTCATACTGTGCGTCCG	Senso	54,92	<i>sxtG</i>	99
ECsxtG-R1	CGGACAATGCGATTCAATAA	Anti-senso	57,1	<i>sxtG</i>	141
ECsxtH-F1	CAAAGATGGCATTAGCATAGGT	Senso	56,83	<i>sxtH</i>	182
ECsxtH-R1	GTATGGGTGTGCTTAGGTGA	Anti-senso	53,04	<i>sxtH</i>	48
ECsxtI-F1	CGAATCTTTCCGTCCTT	Senso	54,7	<i>sxtI</i>	278
ECsxtI-R1	CTTATCTCGCCTACGCACC	Anti-senso	55,86	<i>sxtI</i>	157

**Legenda:** \*Nucleotídeos na extremidade da sequência, que formarão sobreposição na montagem dos novos contigs para a extensão da sequência de cada gene.

\*\*T<sub>m</sub> = temperatura de *melting*, conforme estimado pelo NetPrimer.

#### 4.9.3.2 Testes de amplificação

Cada tubo de PCR continha os seguintes produtos (Bioline, Alexandria, NSW, Austrália): 1x tampão para a *Taq*, 1,25 mM cloreto de magnésio, 1 μM dNTPs, 0,4 μM de cada iniciador (IDT Technologies), 1 U de *Taq* DNA polimerase. Cerca de 20 a 30 ηg de DNA eram adicionados (exceto nos tubos usados como controle negativo). O volume foi completado para 25 μL com água ultrapura (Milli-Q) previamente autoclavada. Foram sempre utilizados quatro iniciadores por reação, sendo dois para cada gene-alvo. Todas as possibilidades foram testadas e os testes de amplificação visaram à otimização do protocolo de PCR para cada possibilidade.

O primeiro teste de amplificação foi feito utilizando os iniciadores para o gene *sxtA* em combinação com os demais. O programa de ciclagem térmica teve início com uma desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores por 30 segundos em diferentes temperaturas e extensão a 72 °C por 4 minutos. Após os 35 ciclos, foi feita uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. As temperaturas de anelamento testadas foram escolhidas com base nos valores de T<sub>m</sub> gerados pelo programa NetPrimer, além da estimativa de 2 °C para cada T ou A e 3 °C para

cada G ou C na sequência dos iniciadores. Foram testados, em programa de PCR com gradiente de temperaturas: 40,0 °C, 43,8 °C, 47,3 °C, 52,1 °C, 55,9 °C, 58,1 °C e 60,0 °C.

Os outros testes de amplificação foram feitos para os genes *sxB*, *sxtG*, *sxtH* e *sxtI* em combinação com as possibilidades restantes, seguindo as mesmas concentrações de reagentes descritas acima para o teste com os iniciadores para o gene *sxtA*. O programa de ciclagem térmica também foi similar ao descrito acima, com a diferença das temperaturas de anelamento testadas, a saber: 40,0 °C, 45,5 °C, 51,9 °C e 55 °C.

Em todos os testes, um controle positivo de amplificação foi feito nas temperaturas de anelamento mais baixa e mais alta. Este controle consistiu em tubos contendo o DNA utilizado e iniciadores genéricos para o gene que codifica para a subunidade menor do RNAr cianobacteriano (27F1 e 1494Rc, Tabela 3), seguindo as mesmas concentrações de reagentes descritas acima.

A otimização das condições de amplificação também foi composta por testes de PCR “touch-down”, ou seja, a cada ciclo, a temperatura de anelamento dos iniciadores diminuía. Os iniciadores utilizados para este teste foram os desenhados para o gene *sxtA* em conjunto com aqueles para o gene *sxB* e para o gene *sxtB* em conjunto com os iniciadores para o gene *sxtG*. A concentração dos reagentes utilizados permaneceu a mesma, com exceção da diminuição na concentração de cloreto de magnésio (1 mM por reação) e um aumento na quantidade de *Taq* DNA polimerase (1,2 unidades por reação). O programa de ciclagem térmica consistiu em uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 7 ciclos de “touch-down”: desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 45-40 °C por 1 minuto (diminuindo 0,7 °C por ciclo) e extensão a 72 °C por 4,5 minutos. Em seguida, foram feitos 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 40 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 4,5 minutos. O programa de ciclagem térmica terminou com uma extensão a 72 °C por 20 minutos. Tais condições de amplificação foram escolhidas com o objetivo de se diminuir a estringência da reação, de forma que algum produto de PCR pudesse ser visualizado.

Para se obter uma maior quantidade de DNA que pudesse ser sequenciada, os produtos desta PCR foram re-amplificados utilizando a mesma concentração dos reagentes adotada para a primeira PCR. O programa de ciclagem térmica teve início com uma desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguindo 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 40 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Em seguida, foi feita uma extensão final a 72 °C por 20 minutos.

O resultado de todas as PCRs foi observado por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com solução de brometo de etídio. O tamanho e a concentração dos sinais de amplificação obtidos foram estimados por comparação com o marcador molecular 2-logDNA ladder (New England Biolabs, Arundel, Queensland, Austrália). Os géis corados foram visualizados em transiluminador por intermédio do programa “Quantity One” (Bio-Rad).

#### **4.9.3.3 Testes de amplificação para a confirmação da presença dos fragmentos gênicos previamente obtidos**

Além das PCRs realizadas para a técnica “pan-handle”, foram feitos testes de amplificação do gene *sxtI* utilizando os mesmos iniciadores empregados no Brasil (Sxt1-F/Sxt1-R e OCT-F/OCR-R, Tabela 7), com o objetivo de confirmar que este gene ainda estaria presente no genoma do inóculo levado ao exterior. Na maioria dos casos, amplificação com os iniciadores 27F1 e 1494Rc, para a detecção do gene que codifica para o RNAr 16S, foi realizada concomitantemente como controle positivo de amplificação. Outro controle positivo de amplificação para os genes *sxt* foi feito com o DNA da cianobactéria filamentosa *C. raciborskii* T3.

Para a primeira PCR com os iniciadores Sxt1-F/Sxt1-R, cada reação continha 1 x tampão para a *Taq*, 2,5 mM cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Bioline). Cerca de 30  $\eta$ g de DNA foram adicionados (exceto nos tubos usados como controle negativo). O volume foi completado para 25  $\mu$ L com água ultrapura (Milli-Q) previamente autoclavada. Testes adicionais envolveram: diferentes concentrações de DNA (15, 45 e 60  $\eta$ g); redução da concentração de cloreto de magnésio (2 mM); adição de BSA 1 x (albumina de soro bovino); e o uso de DNA proveniente de diferentes inóculos da mesma cianobactéria (de forma a evitar a possibilidade de um resultado negativo por uma eventual seleção para células que por algum motivo tivessem perdido genes *sxt*).

O programa de ciclagem térmica utilizado primeiramente consistiu em: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 10 segundos, anelamento a 55 °C por 20 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Após a primeira PCR, o mesmo programa de PCR foi repetido, desta vez testando diferentes temperaturas para o anelamento dos iniciadores, a saber: 50,0 °C, 51 °C, 52,9 °C, 53,7 °C, 54,7 °C, 56,1 °C, 57,1 °C, 58,0 °C, 59,0 °C, 60,0 °C e 61,0 °C. O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1 % corado com solução de brometo de etídio.

Com relação aos iniciadores OCT-F/OCT-R, a PCR foi feita utilizando os mesmos reagentes e concentrações descritos para a PCR com os iniciadores Sxt1-F/Sxt1-R. A quantidade de DNA testada variou de 15 a 45 ng e o programa de ciclagem térmica consistiu em: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 61 °C por 1 minuto e 72 °C por 90 segundos; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

#### 4.10 Análises químicas de microcistinas e saxitoxinas

##### 4.10.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises utilizando HPLC consistiram na avaliação da produção exclusivamente de saxitoxinas pela cianobactéria *M. aeruginosa* SPC777. Este procedimento foi realizado na Universidade de New South Wales (UNSW), sob a supervisão do Dr. Brett A. Neilan.

###### 4.10.1.1 Cultivo

O cultivo de *M. aeruginosa* SPC777 foi realizado nos meios de cultura ASM-1, JM (Jaworski) e BG-11 (Anexo 1). A cultura foi mantida em câmara de cultivo a  $25 \pm 1$  °C por 14 dias, com fotoperíodo de 12 horas claro:12 horas escuro e intensidade luminosa de  $40 \pm 5 \mu\text{mol fotons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

###### 4.10.1.2 Extração de saxitoxinas

Dois protocolos de extração foram utilizados. O primeiro protocolo foi descrito por Sant'Anna et al. (2011) utilizando células liofilizadas de biomassa seca de aproximadamente 0,2 mg.

Inicialmente, foram feitas duas extrações com 4 mL de ácido acético 0,5 M usando sonicação (por 1 minuto com meio ciclo e 30 segundos com ciclo contínuo, na amplitude máxima) e centrifugação a  $3.000 \times g$  por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e o pélete foi novamente extraído com 8 mL de clorofórmio:metanol (1:1, v/v). Os dois extratos

(ácido acético e clorofórmio) foram combinados e centrifugados a  $3.000 \times g$  por 3 minutos. A fase aquosa foi coletada e armazenada em tubo plástico (Falcon) e a fase orgânica foi lavada 3 vezes com 4 mL de ácido acético 0,5 M. Todas as fases aquosas obtidas foram combinadas. Esta solução foi armazenada em congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

O segundo método de extração de saxitoxinas teve como base o descrito por Ravn et al. (1995). Este é direcionado à extração de diferentes tipos de saxitoxinas, inclusive descrevendo a diferença na eficácia de extração de cada análogo em diferentes concentrações de ácido acético e HCl. Portanto, os dois reagentes foram empregados nos testes de extração seguindo tal protocolo, conforme descrito a seguir.

Inicialmente, em tubo plástico (Falcon), uma alíquota de 50 mL de cultura em fase exponencial de crescimento foi concentrada por centrifugação ( $4.000 \times g$  por 3 minutos) e o pélete foi ressuspenso em 10 mL de NaCl 0,25%. As células foram então centrifugadas novamente e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado.

Foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido acético 0,1 N ou 500  $\mu\text{L}$  de HCl 0,01 N e a extração foi realizada por três ciclos de congelamento-descongelamento, tendo o congelamento sido feito a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e o descongelamento, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas a sonicação por 5 minutos. O volume foi transferido a um microtubo e centrifugado a  $3.000 \times g$  por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um frasco âmbar e armazenado em congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Ao final das duas extrações, os extratos em ácido acético obtidos pelos diferentes protocolos foram combinados (1:1), enquanto aqueles em HCl permaneceram como testes separados.

#### **4.10.1.3 Derivatização das amostras**

Foram feitos dois tipos de derivatização, para que tanto os picos das saxitoxinas hidroxiladas quanto os das não-hidroxiladas pudessem ser visualizados no cromatograma.

##### **4.10.1.3.1 Oxidação com periodato**

Em 100  $\mu\text{L}$  da amostra, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de oxidante periodato e a solução foi homogeneizada em vortex. A mistura permaneceu à temperatura ambiente por 1 minuto e foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos anteriormente à injeção no cromatógrafo.

#### 4.10.1.3.2 Oxidação com peróxido

Inicialmente, 25 µL de solução de 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p/v) foram adicionados a 250 µL de NaOH 1 M em um microtubo plástico com capacidade para 1,5 mL. A solução foi homogeneizada. Em seguida, 100 µL da amostra foram adicionados e o conteúdo foi novamente homogeneizado. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 2 minutos. Foram adicionados 20 µL de ácido acético glacial e a solução foi homogeneizada.

#### 4.13.1.4 Análise por HPLC

Para a análise por HPLC foi utilizado o conjunto Hewlett-Packard 1100 Series, consistindo em seis partes: (1) ALS auto-injetor HP1100; (2) compartimento para Coluna HP1100; (3) *Diode Array Detector* HP1100; (4) HP1100 *Degasser*; (5) bomba binária HP1100; e (6) detector programável de fluorescência HP1046A.

A análise foi realizada em fase móvel 100% formato de amônio. Foram injetados na coluna 50 µL de cada amostra, sempre passando anteriormente a cada amostra o respectivo controle negativo (somente o solvente, obtido em todas as etapas da extração e derivatização, porém sem conter material biológico). O valor de excitação foi 340, com 395 para emissão. A temperatura foi mantida a cerca de 28 °C.

Os ensaios foram realizados em três dias consecutivos, sempre com o uso de padrões de saxitoxinas (obtidos do Conselho Nacional de Pesquisas, *National Research Council*, Canadá) como controles.

#### 4.10.2 Análise por HPLC-MS

##### 4.10.2.1 Cultivo

Três condições de cultura foram empregadas visando a gerar condições de estresse para as células de *M. aeruginosa* SPC777, a saber: (1) para o estímulo da produção de microcistinas (ALEXOVA et al., 2011), o meio de cultura ASM-1 foi preparado sem a presença de Fe; (2) para o estímulo da produção de saxitoxinas (conforme proposto para espécies do dinoflagelado *Alexandrium*; JOHN; FLYNN, 2000; LIPPEMEIER et al., 2003; FRANGÓPULOS et al., 2004) foi preparado ASM-1 com ausência de fosfato; e (3) cultivo em ASM-1 normal, porém com adição de 50 mM NaCl treze dias após o inóculo

(Melissa Rapadas, UNSW, comunicação pessoal). Além disso, um controle de cultivo foi feito em ASM-1 normal. As células foram cultivadas por 15 dias em 600 ml de ASM-1 em sala de cultivo com fotoperíodo de 14 horas claro:10 horas escuro, com intensidade luminosa  $40 \pm 5 \mu\text{mol fons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e temperatura  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.10.2.2 Extração de substâncias**

As células foram concentradas por centrifugação a  $9.000 \times g$  por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 5 mL de metanol ao pélete, juntamente com pérolas de vidro (3 mm de diâmetro). Os tubos foram agitados por 1 minuto e novamente centrifugados a  $9.000 \times g$  por 5 minutos. A extração com metanol foi repetida e os sobrenadantes, combinados e secos em estufa a  $55^\circ\text{C}$ .

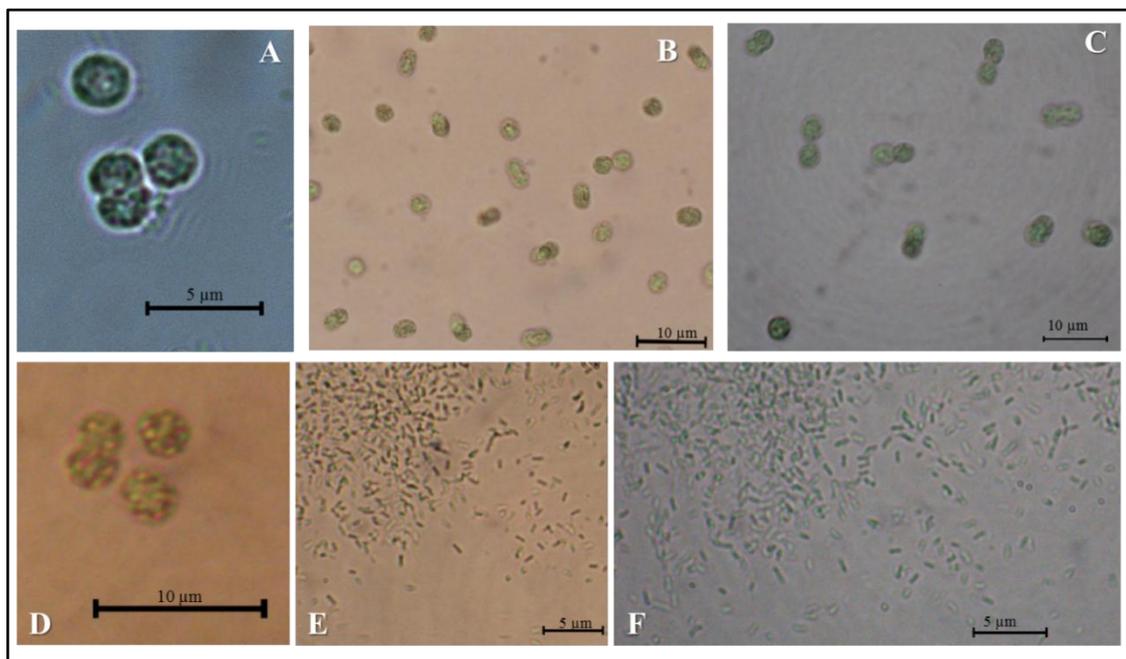
#### **4.10.2.3 Análise por HPLC-MS/MS**

O espectrômetro de massas utilizado foi um triploquadrupolo (Xevo TQ-S, Waters), sendo que a fonte de ionização também era por electrospray. AESI (ionização por electrospray) foi feita em modo positivo, nas seguintes condições: o gás utilizado para a dessolvatação foi o nitrogênio, aquecido a  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , voltagem do capilar de 3,5 kV e a do cone de 45 V. A mistura de metanol:água (50:50) com 0,1% de ácido fórmico (50:50) foi adotada para a diluição das frações contendo os metabólitos. Com uma bomba de seringa, as amostras foram introduzidas na fonte a  $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Esta etapa foi realizada com a colaboração do Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes (Universidade de São Paulo - USP, Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais, Ribeirão Preto, SP).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise microscópica

A análise morfológica da cultura da linhagem *M. aeruginosa* SPC777 revelou células esféricas com aerótopos, de coloração verde escura (Figura 13, A, B, C e D). O diâmetro celular observado variou de 3,18 a 4,77  $\mu\text{m}$ , sendo essa faixa de variação inferior aos 4 a 6,5  $\mu\text{m}$  descritos para essa espécie de cianobactéria (SANT'ANNA et al., 2004), mas que são compatíveis com os dados anteriormente obtidos para essa linhagem (SANT'ANNA et al., 2011). Foram observadas muitas células em fissão binária, porém sem a formação colonial, característica normalmente encontrada na natureza para essa espécie, o que já havia sido constatado desde o segundo ano (2001) de cultivo dessa linhagem (SANT'ANNA et al., 2011). A perda de formação de colônia por *Microcystis* é um fato comum observado após várias gerações de cultivo em laboratório (OTSUKA et al., 2000). Essa formação colonial nas condições naturais pode ser devido ao efeito sinérgico dos fatores abióticos, tais como temperatura, luz, nutrientes e turbulência induzida pelo vento, além de reação a secreções químicas liberadas pelo zooplâncton (RIPPKA et al., 1979; PARKER, 1982; YANG et al., 2006).



**Figura 13**– Cianobactérias estudadas neste trabalho: *M. aeruginosa* SPC777 (A, B, C e D) e cianobactéria da família Synechococcaceae (E e F)

A análise da outra cianobactéria unicelular identificou células com características morfológicas de representantes da família Synechococcaceae, ou seja, células em forma de bastonete, ausência de aerótopos, dimensões variando de 1,0 x 1,5 µm a 3,0 X 1 µm (n = 20), sem formação de colônias mucilaginosas e ausência de motilidade (Figura 13, E e F).

## 5.2 Obtenção de monocultura cianobacteriana

A lavagem das células com extran 0,1 % reduziu a carga bacteriana observada ao microscópio óptico. Ainda assim, não foi efetiva para a eliminação por completo das bactérias heterotróficas e da outra cianobactéria contaminante.

Com relação ao cultivo em meio de cultura sólido, a técnica de *pour-plate* permitiu a separação das colônias dos diferentes micro-organismos; no entanto, resultado igualmente eficiente foi obtido espalhando-se 100 µL de inóculo por *spread-plate*, que foi escolhida para os inóculos subsequentes devido à facilidade de recuperação das colônias isoladas. Essa quantidade de células mostrou-se ideal para a formação de colônias isoladas após um mês de crescimento. O método de estrias de esgotamento não foi eficiente porque as células da outra cianobactéria unicelular continuaram acompanhando as da *M. aeruginosa* SPC777.

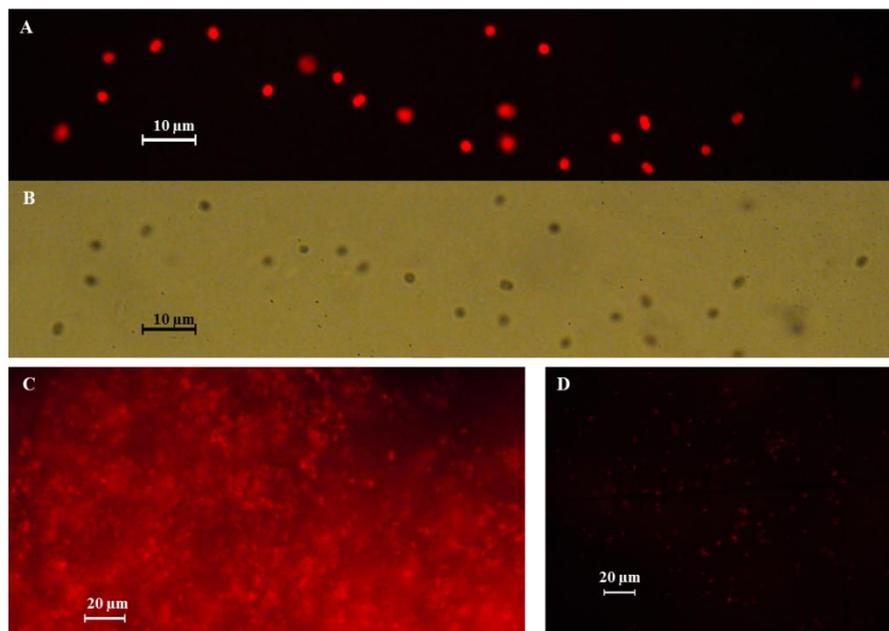
A micropipetagem em meio líquido foi repetida diversas vezes, porém por se tratar de cianobactéria unicelular, não foi possível a obtenção de célula única. Em todas as tentativas, pelo menos uma célula da cianobactéria contaminante era também pipetada.

O teste de centrifugação com gradiente diferencial de sacarose foi idealizado no presente estudo, pensando-se na diferença entre as dimensões e a capacidade de flutuação das duas cianobactérias que se desejava separar, uma vez que a cianobactéria Synechococcaceae não apresentava aerótopos, ao contrário da *M. aeruginosa* SPC777. Desta forma, a centrifugação direcionaria as células para o fundo do tubo, enquanto a maior concentração de sacarose que ali se encontraria direcionaria as células de volta para a superfície. O uso desse procedimento de gradientes de sacarose já foi relatado com sucesso em literatura para a separação de mitocôndrias e plastídeos (LANG; BURGER, 2007). Nos testes de centrifugação da cultura de *M. aeruginosa* SPC777 com gradiente diferencial de sacarose, os melhores resultados após a primeira centrifugação foram observados para os tubos com as seguintes concentrações de sacarose: (0,5 M + 1 M), (0,2 M + 0,5 M) e (0,2 M + 0,5 M + 1 M). Nestes tubos, observou-se a formação de uma camada de cor esverdeada superior à das demais soluções de sacarose, composta por uma grande quantidade de células de *Microcystis*, embora

ainda se observassem poucas células da outra cianobactéria. Estas ainda se encontravam no tubo com gradiente de concentração (0,2 M + 0,5 M) após a segunda centrifugação. Já no tubo com gradiente de concentração (0,5 M + 1 M) não foi observada a cianobactéria contaminante, porém a maioria das células de *Microcystis* parecia estar lisada. Ainda assim, algumas células permaneceram viáveis. Em teste anterior utilizando azul de bromofenol para corar uma das soluções de sacarose nos tubos, foi confirmado que as soluções de diferentes concentrações de fato não se misturavam dentro do tubo, portanto a diferença de concentração se manteria durante os testes.

O crescimento das células coletadas após a filtragem se evidenciou em meios líquido e sólido após 20 e 30 dias de cultivo, respectivamente. A estratégia de filtração mostrou-se bastante eficiente, limpando consideravelmente as culturas. No entanto, algumas células apresentaram aerótopos com aspecto demasiadamente volumoso, indicando alteração na estrutura celular, portanto, esse procedimento para obtenção de células purificadas foi descartado.

Nos inóculos tratados com o antibiótico ampicilina, foram observadas colônias isoladas de cianobactérias na placa de Petri após um mês de cultivo. A análise microscópica revelou células de *M. aeruginosa* SPC777, ainda com algumas bactérias, porém não foram vistas células da outra cianobactéria unicelular. Sucessivos repiques de uma destas colônias foram cuidadosamente analisados ao microscópio óptico, indicando monocultura de *M. aeruginosa* SPC777. A análise dessa cultura em microscopia de epifluorescência confirmou que, apesar de ainda haver algumas bactérias heterotróficas na cultura de *M. aeruginosa* SPC777, a cianobactéria contaminante não estava mais presente. Portanto, esta cultura foi a escolhida para o cultivo e realização das etapas posteriores deste estudo. Além disso, a análise em epifluorescência também revelou monocultura da outra cianobactéria unicelular (Figura 14).



**Figura 14**– Microscopia óptica de células da *Microcystis aeruginosa* SPC777. **A**, epifluorescência com filtro verde; **B**, visualização com luz branca; **C** e **D**, epifluorescência com filtro verde de células do contaminante cianobacteriano da cultura de *M. aeruginosa* SPC777

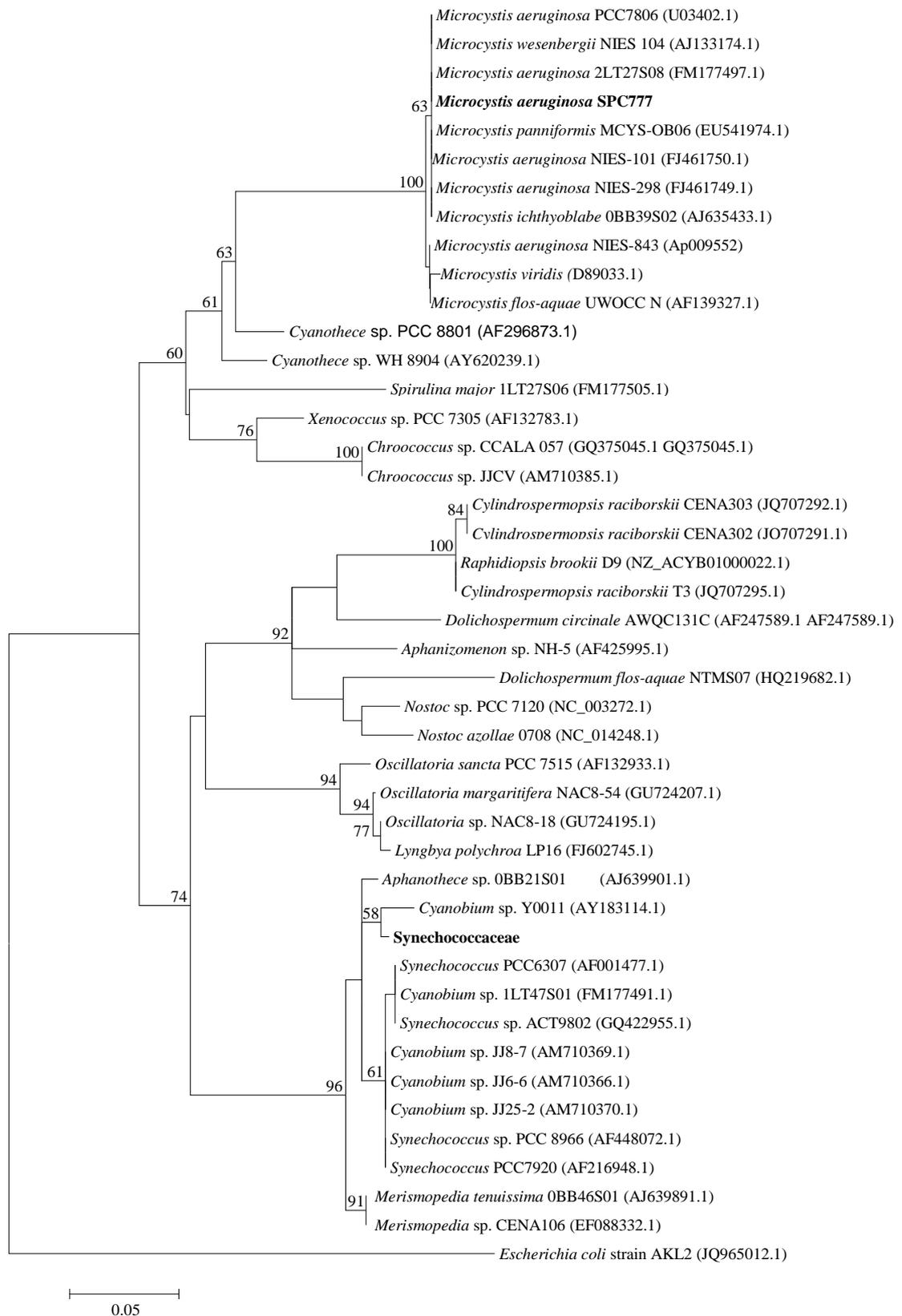
### 5.2.1 Sequenciamento do DNAr 16S

O sequenciamento do gene que codifica para a subunidade menor do ribossomo (“DNAr 16S”) da *M. aeruginosa* SPC777 resultou em uma sequência parcial de 1246 pb. O alinhamento desta sequência com a ferramenta BlastN revelou alta identidade (99 e 100 %) com outras linhagens de *Microcystis aeruginosa* depositadas no banco de dados do NCBI. A linhagem-tipo NIES-843 da *Microcystis aeruginosa*, cujo genoma foi sequenciado e finalizado (número de acesso no GenBank: AP009552.1– KANEKO et al., 2007), possui duas cópias do gene que codifica para o RNAr 16S, *rrn1* e *rrn2*, os quais mostraram identidade de 99,6% e 99,5%, respectivamente, com a sequência parcial desse gene da *M. aeruginosa* SPC777. A sequência do gene de RNAr 16S dessa mesma linhagem (*M. aeruginosa* SPC777), depositada no GenBank em 15 de novembro de 2006 (número de acesso EF121241 – SANT’ANNA et al., 2011), apresentou identidade de 99,8% com esse novo sequenciamento. Essa pequena diferença (dois nucleotídeos) pode ser devida à presença de mais de uma cópia desse gene no genoma da *M. aeruginosa* SPC777.

O sequenciamento do DNAr 16S da outra cianobactéria unicelular que se encontrava na cultura de *M. aeruginosa* estudada gerou uma sequência de 1409 pb com alta identidade (97 a 99 %, com 96 a 100 % de cobertura e *e-value* 0.0) com os gêneros *Synechococcus* e *Cyanobium*. Sabendo da proximidade destes dois gêneros, pertencentes à mesma família (Synechococcaceae), além das características morfológicas observadas para essa cianobactéria, no presente estudo ela foi tratada somente pelo nome da família. A árvore filogenética (Figura 15) confirma a proximidade entre os dois gêneros em questão, agrupando linhagens de *Synechococcus* e *Cyanobium* em um mesmo clado. A taxonomia do gênero *Synechococcus* ainda é controversa. Em um estudo conduzido em 1989 por Waterbury e Rippka, linhagens de *Synechococcus* foram subdivididas em seis grupos com base no conteúdo de GC do gene e no habitat em que se encontram (ambiente marinho ou de água doce), sendo que um dos grupos foi caracterizado como *Cyanobium*. Estes grupos podem representar gêneros provisórios (URBACH et al., 1998); no entanto, na Coleção de Culturas do Instituto Pasteur (PCC), as linhagens de *Synechococcus* são divididas em outros cinco agrupamentos que não se correlacionam diretamente com os seis agrupamentos citados acima. Assim, dados filogenéticos sugerem que a classificação desses dois gêneros ainda precisa ser revisada ou avaliada com cautela quando consultada.

Na árvore filogenética (Figura 15), quatro diferentes ordens de cianobactérias são evidenciadas: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Synechococcales (de acordo com a classificação sugerida por HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKÝ, 2005). Próximas ao clado dos gêneros *Synechococcus* e *Cyanobium* encontram-se *Aphanothece* e *Merismopedia*, caracterizando um agrupamento bem definido de membros da ordem Synechococcales. A cianobactéria de interesse no presente estudo, *M. aeruginosa* SPC777 (Família Microcystaceae), aparece formando um único clado com outras linhagens do mesmo gênero. O gênero *Microcystis* pertence à ordem Chroococcales, que também inclui *Cyanothece*, *Xenococcus*, *Chroococcus* e *Spirulina* (HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKÝ, 2005). De fato, tais gêneros se apresentaram próximos ao clado de *Microcystis* spp. Ao centro da árvore, a ordem Oscillatoriales é representada pelos gêneros *Lyngbya* e *Oscillatoria*. Nota-se que as linhagens pertencentes a esta ordem, composta por cianobactérias filamentosas, formaram um clado isolado situado entre dois grandes grupos de cianobactérias unicelulares.

Este fato pode ser justificado pela origem comum entre as ordens Oscillatoriales e Chroococcales (sub-classe Oscilatoriophycidae). Também ao centro da árvore, próximas às cianobactérias da ordem Oscillatoriales, estão cianobactérias filamentosas dos gêneros *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon* e *Nostoc* representando a ordem Nostocales.



**Figura 15**– Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) baseada no gene que codifica para o RNAr 16S, situando as cianobactérias *M. aeruginosa* SPC777 e Synechococcaceae (destacadas em negrito). Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados. A bactéria *Escherichia coli* foi usada como grupo externo.

### 5.3 Sequenciamento do genoma da *M. aeruginosa* SPC777 na Plataforma SOLiD V3

A quantidade de DNA genômico obtida após a extração foi cerca de 5 µg, o que foi insuficiente para realizar o sequenciamento genômico na plataforma SOLiD V3. Portanto, foi usada a enzima Genomiphi™, que possibilitou a obtenção de DNA genômico suficiente para as etapas subsequentes (cerca de 24 µg). Durante a construção da biblioteca genômica, após a primeira excisão dos fragmentos de DNA do gel de agarose (anteriormente à circularização), recuperou-se 2,4 µg de DNA. Após a amplificação da biblioteca e recuperação dos fragmentos com tamanho entre 250 e 350 pb, a concentração do DNA foi estimada em 14,3 ng.µL<sup>-1</sup>.

A corrida-teste (WFA) teve duração de 3 horas. A qualidade observada (isto é, porcentagem de pérolas de estreptavidina no eixo do gráfico plotado pelo sequenciador) foi de 80 %. Sabendo que um valor a partir de 65 % representa qualidade suficiente para que seja feita a corrida com toda a biblioteca no SOLiD, foi possível prosseguir para a corrida definitiva.

O sequenciamento gerou um total de 33.657.680 leituras. Por ser necessário o conhecimento do tamanho do genoma estudado para a realização do cálculo de cobertura obtido após o sequenciamento, dados de literatura foram utilizados como base. De acordo com o banco de dados GOLD (*Genomes Online Database*), há atualmente 20 genomas de *Microcystis* spp. sequenciados, sendo 19 destes pertencentes à espécie *M. aeruginosa* e a espécie restante sendo classificada como *Microcystis* sp. Destas linhagens, somente a japonesa *M. aeruginosa* NIES-843 possui o genoma completamente finalizado. O tamanho deste genoma é 5,8 Mb (KANEKO et al., 2007). Portanto, para o cálculo de cobertura do genoma da linhagem brasileira *M. aeruginosa* SPC777, estimou-se que o genoma tenha cerca de 6 Mb. Desta forma, o cálculo feito foi o seguinte:

$$\frac{\text{Número total de leituras x tamanho da leitura (em pb)}}{\text{Tamanho esperado do genoma (em pb)}}$$

$$\frac{(33.657.680) \times (50)}{6.000.000} = 280,48 \times$$

Sendo assim, a cobertura genômica esperada para os dados brutos foi calculada em 280,48 x. Após o filtro de qualidade, restaram 24.150.297 leituras. Com esse valor, a cobertura genômica esperada foi calculada em **201,25 x**.

$$\frac{(24.150.297) \times (50)}{6.000.000} = \mathbf{201,25 \text{ x}}$$

### 5.3.1 Montagem do genoma da *M. aeruginosa* SPC777

#### 5.3.1.1 Montagem por referência

Primeiramente, quando os dados brutos (não filtrados) foram alinhados com o genoma da *M. aeruginosa* NIES-843, foram mapeados 43,38% das leituras. Já no caso dos dados filtrados, ou seja, aquelas leituras que passaram pelo filtro de qualidade Phred 20 e correção de erros, 70,3 % das leituras (16.993.448 leituras) foram mapeados.

Quando as leituras foram alinhadas com o agrupamento gênico da saxitoxina de *C. raciborskii* T3, foimapeado apenas 0,06% das mesmas, de forma que não foi possível gerar uma sequência consenso. Por isso, esses alinhamentos foram considerados inespecíficos. Este mesmo resultado foi obtido tanto para os dados brutos quanto para os filtrados.

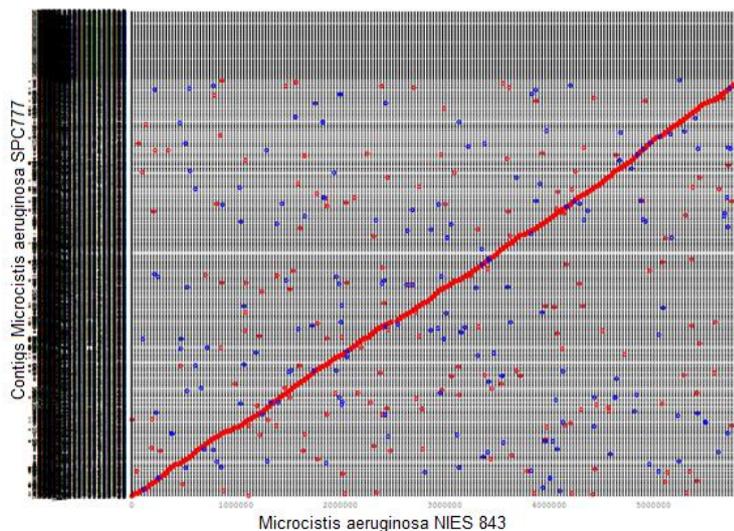
#### 5.3.1.2 Montagem *ab initio*

Comparando o conjunto de parâmetros que gerou o melhor resultado (isto é, *contigs* mais extensos e em menor número) utilizando cada algoritmo de montagem, os melhores resultados de montagem *ab initio* foram obtidos com o *pipeline* da Applied Biosystems/Life Technologies, sempre usando valor de *k*-mer 29. Foram gerados 4.304 *contigs*, de tamanho médio (N50) 2.311 pb, sendo que o maior *contig* apresentou 13.702 pb. A soma dos tamanhos dos *contigs* resultou em 4.701.183 pb para o *scaffold* do genoma.

Em relação aos outros algoritmos de montagem *ab initio*, utilizando o algoritmo Velvet, o conjunto de parâmetros que gerou melhor resultado foi: *k*-mer 29, *cov\_cut* 11 e *exp\_cov* 110. Com esses parâmetros, foram gerados 5.468 *contigs*, tendo em média (valor de N50) 1420 pb, sendo que o maior *contig* obtido teve 9093 pb. A soma dos tamanhos dos *contigs* gerados foi 4.658.274 pb. Para os testes de montagem com Edena, o melhor conjunto de parâmetros foi *MinOverlap* 31 e *OverlapCutoff* 33. Foram obtidos 9.450 *contigs*, de

tamanho médio (N50) 742 pb, sendo que o maior contig tinha 4.900 pb. Somando os tamanhos dos contigs obtidos por essa estratégia, foram obtidos 4.322.603 pb.

Foi gerado um gráfico de sintonia entre os *contigs* referentes ao genoma da *M. aeruginosa* SPC777 e o genoma da linhagem-referência (Figura 16). Como observado nessa figura, o resultado obtido foi bastante satisfatório, havendo uma nítida relação do genoma recém-sequenciado com a linhagem-referência.



**Figura 16**– Sintonia em nível de nucleotídeos dos contigs gerados e o genoma de referência

### 5.3.1.3 Alinhamento dos contigs gerados por montagem ab initio contra o genoma de referência

O arquivo multifasta gerado pela melhor montagem do Edena e do *pipeline* da Applied Biosystems/Life Technologies totalizou 13.754 *contigs*.

Só foi verificado alinhamento significativo quando se utilizou como referência o genoma da linhagem *M. aeruginosa* NIES-843. Neste caso, foram alinhados 8.734 *contigs*, representando 63,5 % do total do arquivo multifasta.

Após a remoção das regiões de lacunas, a cobertura genômica do *scaffold* de *M. aeruginosa* SPC777 em relação ao genoma de referência de *M. aeruginosa* NIES-843 foi calculada em 3.004.111 bases (51,41%).

#### 5.3.1.4 Identificação de plasmídeos

Previamente ao sequenciamento por SOLiD, havia sido realizada uma análise do DNA genômico de *M. aeruginosa* por eletroforese em gel de campo pulsado, de forma a possibilitar a detecção de plasmídeos nesta linhagem. Nessa análise preliminar, foi observada a presença de um plasmídeo de cerca de 5 kb. No entanto, após o sequenciamento não foi possível localizar nenhuma leitura/contig referente a esse plasmídeo, tanto pelo resultado de Blast quanto na busca utilizando os dados brutos. Lembrando que, com base em comparação com dados de literatura, ainda estaria faltando pouco mais de 1 Mb para a elucidação deste genoma, existe a possibilidade de este plasmídeo não ter sido sequenciado. Alternativamente, uma quantidade significativa de DNA plasmidial pode ter sido perdida durante as etapas de construção da biblioteca genômica, visto que a concentração de DNA diminuiu drasticamente no decorrer das etapas de purificação.

Atualmente, três plasmídeos de linhagens de *Microcystis aeruginosa* são conhecidos e listados em bancos de dados virtuais, como NCBI e PATRIC (GILLESPIE et al., 2011). Os plasmídeos pMA1 (acesso no NCBI: NC\_002060) e pMA2 (acesso no NCBI: NC\_001597.1), encontrados em *M. aeruginosa* Kützing proveniente do lago Kasumigaura (Ibaraki, Japão), possuem 2287 pb (TOMINAGA et al., 1993) e 4993 pb (TOMINAGA et al., 1995), respectivamente; já o plasmídeo pMa025 (acesso no NCBI: NC\_004984.1), encontrado em *M. aeruginosa* UV025, obtida do Laboratório Nacional de Brookhaven (Estados Unidos), possui 8018 pb (WALLACE; MILLER; RAPS, 2002). No caso do plasmídeo encontrado no presente trabalho em *M. aeruginosa* SPC777, a sequência do DNA plasmidial, bem como a sua similaridade com relação a pMA1, pMA2 e pMa025, poderão ser revelados por análises do sequenciamento do genoma completo desta linhagem.

#### 5.3.1.5 Análise dos contigs por Blast

Nesta primeira análise, não foi possível encontrar no programa G4ALL nenhum *contig* com similaridade ao gene que codifica para a subunidade menor do ribossomo de linhagens de *Microcystis*. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de não ter sido possível a obtenção da sequência completa do genoma.

Em relação ao BlastX, foram encontrados os genes envolvidos na biossíntese de microcistina (Tabela 10), bem como as sequências dos genes flanqueadores deste agrupamento gênico (*umal* e *dnaN*). Já para a saxitoxina, não foi identificado nenhum

alinhamento com genes *sxt*. No entanto, foi encontrada similaridade com algumas das enzimas codificadas por tais genes (Tabela 11).

**Tabela 10** - Resultado da análise de BlastX. Detecção das enzimas envolvidas na biossíntese de microcistina e enzimas codificadas por genes flanqueadores do agrupamento gênico *mcy* em *M. aeruginosa* SPC777

Similaridade com	Nº de contigs	Tamanho (pb)	% de cobertura	Organismo
Uma1	1	897 - 971	40-55	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>Chroocosphaera watsonii</i> WH 8501
McyC	3	504 - 569	11 - 14	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806 / PCC 7813) / <i>Anabaena</i> sp. 90 / <i>Planktothrix aghardii</i> NIVACYA 126/8 / <i>P. rubescens</i> (NIVA-CYA 98 / No80)
McyB	1	5212	57	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806 / PCC 7813) / <i>Anabaena</i> sp. 90 / <i>Planktothrix aghardii</i> NIVACYA 126/8 / <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98
McyA	1	13149	100	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>Anabaena</i> sp. 90 / <i>Planktothrix aghardii</i> NIVACYA 126/8 / <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98
McyD	1	3878	33-32	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>P. aghardii</i> NIVA-CYA 126/8 / <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98 / <i>Anabaena</i> sp. 90 / <i>N. spumigena</i> CCY9414
McyE	1	10802	56	<i>Microcystis</i> sp. (CYN 10 / CYN 06) / <i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98 / <i>P. agardhii</i> NIVA-CYA 126/8 / (NdaF) <i>N. spumigena</i> CCY9414
McyF	1	806	84	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>Anabaena</i> sp. 90
McyG	1	6307	79	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806 / PCC 7820) / <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98 / <i>P. agardhii</i> NIVA-CYA 126/8
McyH	1	3634	67 - 73	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>P. rubescens</i> NIVA-CYA 98 / <i>P. agardhii</i> NIVA-CYA 126/8
McyI	1	3634	100	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806)
McyJ	-	-	-	-
DnaN	1	1239	100	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424

**Tabela 11** - Resultado da análise de BlastX. Detecção de enzimas necessárias à biossíntese de saxitoxinas e possíveis genes flanqueadores do agrupamento gênico sxt em *M. aeruginosa* SPC777

Similaridade com	Número de contigs	Tamanho (pb)	% cobertura	Organismo
OmpR	3	2785 - 4337	100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / transposase da família IS605 OrfB de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7424
GlmU	1	13334	100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843)
Transposase <i>insA</i>	1	760	58	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 / <i>R. brookii</i> D9
Transposase <i>insAB</i>	2	317 - 760	28 - 36	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 ( <i>insAB</i> putativa) / <i>N. punctiforme</i> PCC 73102 (transposase IS1)
Transposase <i>insB</i>	1	317	83	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806
Transposase IS4	3	628 - 1011	51 - 99	Gama-proteobactérias / <i>Cyanothece</i> spp. / beta-proteobactéria
Metil-transferase dependente de SAM	2	2260 - 3391	97 - 100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>C. watsonii</i> WH 8501 / <i>Rhizobium</i> spp.
N-acetil-transferase relacionada a GCN5 (GNAT)	3	618 - 2731	53 - 86	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 / <i>M. aeruginosa</i> PCC 7806 / <i>M. cthonoplastes</i> PCC 7420 / Nostocaceae / Gama-proteobacteria
Proteína carreadora de acil (ACP)	1	819	89 - 90	<i>M. aeruginosa</i> (NIES-843 / PCC 7806) / <i>D. circinale</i> 90
8-amino-7-oxononanoato sintase (AONS)	1	4025	98 - 100	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843 / <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 / <i>N. punctiforme</i> PCC 73102 / <i>M. cthonoplastes</i> PCC 7420 / <i>N. spumigena</i> CCY9414
Citidina deaminase	2	2155	100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>Arthrospira</i> spp. / <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801
Esterol desaturase	-	-	-	-
MATE, família NorM	-	-	-	-
Amidinotransferase	-	-	-	-
Dioxigenase fenilpropionato	-	-	-	-
Dioxigenase envolvida na hidroxilação de anéis	1	1572	100	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843 (Rieske 2Fe-2S) / Cianobactéria UCYN-A
Ornitina-carbamoiltransferase	1	1218	100 - 98	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 / <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 / <i>C. watsonii</i> WH8501
Lipase da família GDSL	1	1183	46	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 / <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8801
Sulfotransferase dependente de PAPS	2	1541 - 2356	73 - 91	Alfa-proteobacteria / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
Adenililsulfato quinase	-	-	-	-
Toxina RTX (proteína de ligação de PSPs a Ca <sup>2+</sup> )	3	2055 - 4043	67 - 87	Beta-proteobactéria / Gama-proteobactéria / <i>N. punctiforme</i> PCC 73102 / Chlorobiales
Acil-transferase	1	4819	100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>Cyanothece</i> spp. / Nostocales / <i>M. cthonoplastes</i> PCC 7420
Fitanoil-CoA dioxigenase	-	-	-	-

continua

				<b>continuação</b>
<b>Álcool desidrogenase</b>	3	1205 - 5295	84 - 100	<i>Cyanothece</i> spp. / <i>N. punctiforme</i> PCC 73102 / <i>T. erythraeum</i> IMS101 / <i>C. watsonii</i> WH 8501 / <i>M. cthonoplastes</i> PCC 7420 / <i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106
<b>Succinato desidrogenase</b>	1	1751	97 - 100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506 / <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 / <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<b>Fumarato-redutase/succinato desidrogenase</b>	2	1751 - 6031	53 - 98	<i>Cyanothece</i> spp. / <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 / <i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>C. watsonii</i> WH 8501 / <i>Nostoc</i> sp. 7120
<b>Ferredoxina</b>	3	706 - 1677	100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>Cyanothece</i> spp. / <i>N. spumigena</i> CCY9414 / <i>Nostoc</i> spp.
<b>Cefalosporina-hidrolase</b>	-	-	-	-
<b>Histidina quinase</b>	3	5011 - 5272	100	<i>M. aeruginosa</i> (PCC 7806 / NIES-843) / <i>N. punctiforme</i> PCC 73102
<b>hisA / PROFAR isomerase</b>	-	-	-	-
<b>PhoU</b>	-	-	-	-

Como se observa na Tabela 10, para a maioria dos genes *mcy*, foi encontrado pelo menos um *contig* com similaridade acima de 50 % com as enzimas *Mcy* de outras linhagens de cianobactérias que possuem o agrupamento gênico da microcistina. No caso de *McyE*, foi encontrada também similaridade com a enzima *NdaF*, que está envolvida na biossíntese da toxina nodularina. Assim como a microcistina, a nodularina é uma hepatotóxina de natureza peptídica, que apresenta o aminoácido Adda (DITTMANN; WIEGAND, 2006). As sequências dos genes homólogos envolvidos na biossíntese das duas toxinas também apresentam similaridade entre si.

Nesta busca realizada após a primeira tentativa de montagem do genoma alguns dos genes foram encontrados em diversos *contigs*, sendo que os valores de cobertura encontrados para os genes *mcyC* e *mcyE* foram baixos, além da impossibilidade de detecção do gene *mcyJ*. Ainda assim, esta análise foi efetiva para se encontrar quais *contigs* continham de fato os genes de interesse, de forma que estes pudessem ser selecionados para a montagem somente do agrupamento gênico *mcy* e subsequente caracterização do mesmo.

Algumas das enzimas de mesma natureza daquelas codificadas pelos genes propostos como envolvidos diretamente na via biossintética de saxitoxinas foram encontradas como resultado de BlastX (Tabela 11). Pelo que foi proposto em literatura (KELLMANN et al., 2008a), o gene *sxtA* codifica, em cianobactérias, uma enzima com quatro domínios. *SxtA1* é uma metiltransferase dependente de SAM. Dois *contigs* apresentaram alta cobertura

(97 e 100 %) com enzimas dessa natureza, sendo que a maior similaridade foi com enzimas de cianobactérias. Dois *contigs* apresentaram identidade acima de 50 % com GNAT, a função enzimática exercida por SxtA2. Os domínios SxtA3 (ACP) e SxtA4 (AONS) também foram representados, com identidade entre 89 e 100 % com enzimas cianobacterianas. Prosseguindo a análise, sequências de citidina desaminase (SxtB), álcool desidrogenase (SxtU), ornitina-carbamoiltransferase (SxtI), ferredoxina (SxtW) e succinato-desidrogenase (SxtV) foram também encontradas no genoma. Apesar de outras enzimas importantes não terem sido encontradas por BlastX, a sequência parcial de *sxtG* (amidinotransferase) e *sxtH/T* (fenilpropionato dioxigenase) foi amplificada por PCR, conforme discutido mais adiante.

Nota-se, no entanto, que a similaridade da sequência das enzimas listadas na Tabela 11 foi em geral relacionada a organismos para os quais não há relato de produção de saxitoxinas. Essas enzimas provavelmente estão envolvidas em outros processos celulares. Entretanto, a amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos de sequências parciais dos genes *sxtA*, *sxtB*, *sxtG*, *sxtH* e *sxtI*, discutida mais adiante neste estudo, e a alta similaridade dessas sequências com aquelas de genes que de fato estão envolvidos na biossíntese de saxitoxinas em linhagens produtoras de saxitoxinas, é um indicativo de que em algum momento da sua história evolutiva, a linhagem *M. aeruginosa* SPC777 continha o agrupamento *sxt* e produzia saxitoxinas. Neste caso, a necessidade de produção de toxinas PSP e a vantagem adaptativa que seria conferida ao organismo produtor seriam os principais fatores norteadores da produção de tais toxinas na natureza. Atualmente, só foram completamente caracterizados os agrupamentos gênicos *sxt* em cinco linhagens de cianobactérias filamentosas, sendo que cada caso apresenta suas particularidades. Por exemplo, o número de genes envolvidos pode variar de 21 (*R. brookii* D9, STUCKEN et al., 2010) a 36 (*L. wollei* str. Carmichael/Alabama, MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011). Além disso, diferentemente do observado no caso da microcistina, os genes flanqueadores do agrupamento gênico *sxt* não são os mesmos para todos os poucos casos já descritos. Ainda assim, similaridade com alguns dos genes flanqueadores descritos para outras linhagens (*ompR*, *glmU*, as transposases *insA*, *insAB*, *insB* e a família conservada de transposases IS4) foi observada para a linhagem *M. aeruginosa* SPC777.

É importante ressaltar que duas cianobactérias filamentosas produtoras de saxitoxinas, *C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9, cujos agrupamentos *sxt* já são conhecidos, foram isoladas da mesma represa que a *M. aeruginosa* SPC777 (Billings, SP, Brasil), ainda que de locais diferentes. A linhagem SPC777 foi isolada do braço Riacho Grande (SANT'ANNA et al., 2011), enquanto as outras duas cianobactérias produtoras de saxitoxinas foram isoladas do

braço Taquacetuba (LAGOS et al., 1999; STUCKEN et al., 2009). Esses três gêneros de cianobactérias são planctônicos e se locomovem nos ambientes aquáticos, principalmente pela influência dos ventos e das correntezas; assim, a proximidade geográfica pode ter possibilitado a transferência lateral de genes e talvez isso possa explicar a origem de genes *sxt* na *M. aeruginosa* SPC777.

#### 5.4 Caracterização do agrupamento gênico da microcistina

A montagem e anotação do agrupamento gênico envolvido na biossíntese de microcistinas produziu uma sequência consenso, tendo na extremidade 3' o gene *umaI* e na 5' o gene *dnaN*. Flanqueados por esses dois genes estão outros dez, *mcyA* – *mcyJ*. Com os genes flanqueadores, a sequência do agrupamento gênico tem o tamanho 58.565 pb. Porém, se forem analisados somente os genes *mcy*, o tamanho fica sendo 54.421 pb. A porcentagem GC do agrupamento gênico *mcy* foi calculada em 39,1 %. No caso de cada gene individualmente, o conteúdo GC é apresentado na Tabela 12.

**Tabela 12** – Porcentagem GC de cada gene do agrupamento gênico *mcy* da *M. aeruginosa* SPC777 e dos seus dois genes flanqueadores

Gene	Conteúdo GC (%)
<i>umaI</i>	45,7
<i>mcyA</i>	40,7
<i>mcyB</i>	38,9
<i>mcyC</i>	37
<i>mcyD</i>	39,7
<i>mcyE</i>	39,5
<i>mcyF</i>	37,2
<i>mcyG</i>	38,3
<i>mcyH</i>	35,7
<i>mcyI</i>	39,4
<i>mcyJ</i>	39
<i>dnaN</i>	45,1

Após os alinhamentos recursivos utilizando o programa CLC Bio, quase todas as lacunas foram preenchidas, restando somente duas dentro da sequência do gene *mcyC* e uma

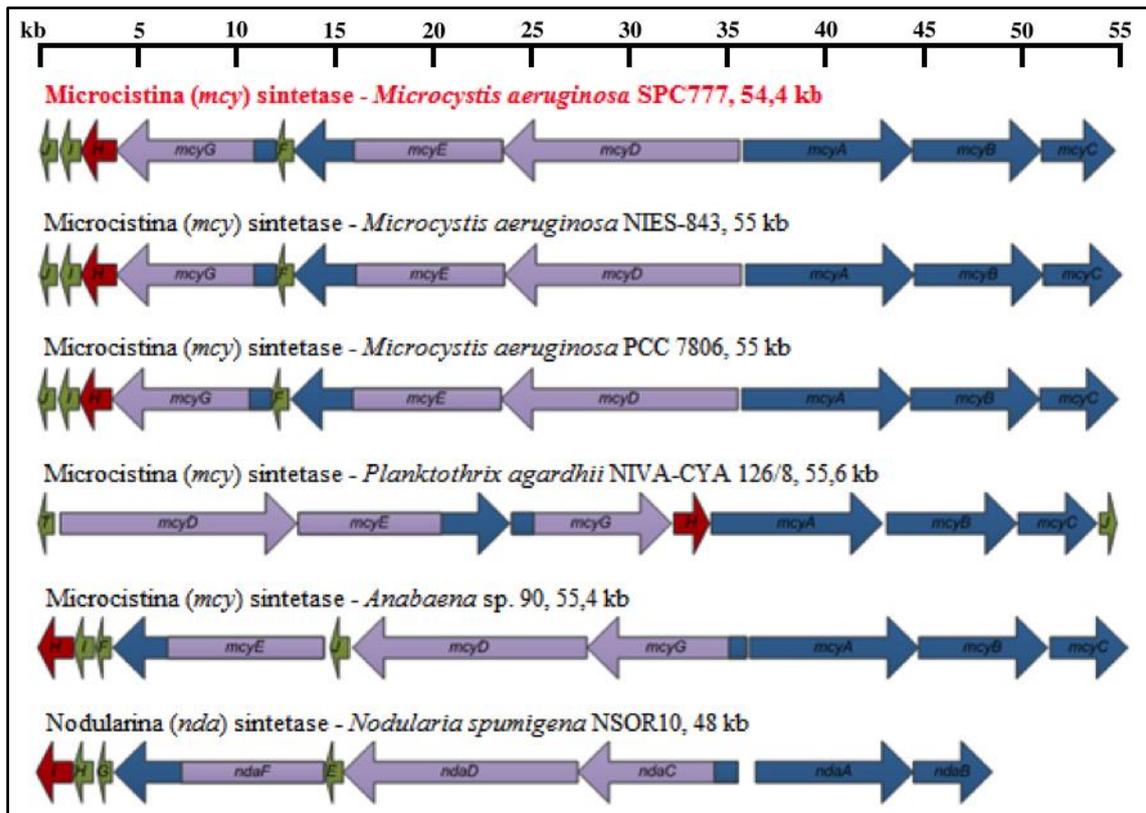
entre o gene flanqueador *dnaN* e a sequência do gene *mcyJ*. Esta última lacuna não foi elucidada, enquanto aquelas do gene *mcyC* foram resolvidas com construção de iniciadores e amplificação por PCR.

#### 5.4.1 Organização dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina

A análise da estrutura organizacional dos dez genes (*mcyA* – *mcyJ*) envolvidos na biossíntese de microcistinas na linhagem brasileira *M. aeruginosa* SPC777 mostrou o mesmo padrão descrito para as linhagens *M. aeruginosa* NIES-843 (KANeko et al., 2007) e *M. aeruginosa* PCC7806 (TILLETt et al., 2000). Esses genes estão organizados em dois *operons*, que se encontram separados por uma região promotora bidirecional (Figura 17). Um *operon* é composto pelos genes *mcyA*, *mcyB* e *mcyC*. O gene *mcyA* tem 8.364 pb e se localiza a 116 pb de uma das extremidades da região promotora. O gene *mcyB* se localiza 15 pb após *mcyA* e tem 6.381 pb. Os 4 últimos nucleotídeos da sequência de *mcyB* se sobrepõem aos 4 primeiros nucleotídeos (ATGA) do gene *mcyC*, que tem 3.876 pb.

Em sentido oposto ao *operon mcyA-C*, encontra-se o *operon mcyD-J*, com início no gene *mcyD* (11.706 pb) a 103 nucleotídeos de distância da região promotora. Em seguida, 166 nucleotídeos após o gene *mcyD* está o gene *mcyE*, com 10.350 pb. O *operon* continua com o gene *mcyF* (756 pb) situado 130 pb após o gene *mcyE*. Seguindo praticamente a mesma distância entre genes (131 pb), está localizada a sequência do gene *mcyG*, com 7.899 pb. A sequência continua com os genes *mcyH* (1.758 pb), *mcyI* (1.014 pb) e *mcyJ* (846 pb), com as distâncias 82 pb entre *mcyG* e *mcyH*, 38 pb entre *mcyH* e *mcyI* e 166 pb entre *mcyI* e *mcyJ*.

Nas extremidades do agrupamento gênico *mcy* de *M. aeruginosa* SPC777 encontram-se os genes *umal* (2.052 pb) e *dnaN* (1.149 pb). O gene *umal* se encontra a 312 pb de distância do gene *mcyC*. Apesar de ainda existir uma região de lacuna não elucidada entre os genes *mcyJ* e *dnaN*, a distância estimada entre estes genes, de acordo com alinhamento com o agrupamento gênico de *M. aeruginosa* NIES-843, é de 558 pb.



**Figura 17**– Organização estrutural do agrupamento gênico *mcy* no genoma da *M. aeruginosa* SPC777 em comparação com outras linhagens produtoras de microcistina e nodularina. Os módulos de NRPS e PKS são representados em azul escuro e azul claro, respectivamente. Em vermelho, estão representados os genes responsáveis pelo transporte da microcistina e em verde, as enzimas finalizadoras

Como se observa na Figura 17, a ordem dos genes *mcy* na linhagem *M. aeruginosa* SPC777 segue o observado para as demais linhagens do gênero *Microcystis* que têm seu agrupamento gênico completamente descrito. Os demais gêneros representados nesta figura diferem com relação à organização e ao sentido de transcrição dos genes, sendo que a ordem observada para os genes *mcyG* a *mcyI* e *mcyA* a *mcyC* em *Anabaena* sp. 90 é colinear com a estrutura da molécula de microcistina, segundo Rouhiainen et al. (2004). O agrupamento gênico de *P. agardhii* NIVA-CYA 126/8 apresenta diferenças significativas, como a ausência dos genes *mcyF* e *mcyI*, observados para as demais cianobactérias produtoras de microcistinas.

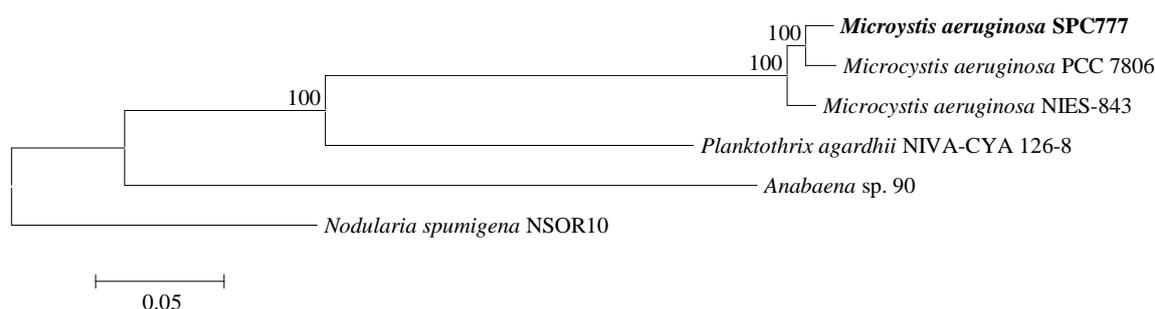
#### 5.4.2 Análise de similaridade e árvores filogenéticas

As enzimas codificadas pelos genes *mcy* da linhagem *M. aeruginosa* SPC777 apresentam maior similaridade (91-99 %) com aquelas das outras linhagens de *M. aeruginosa* (Tabela 13). Consequentemente, a árvore filogenética concatenada das enzimas McyA-J (Figura 18) e as árvores filogenéticas das enzimas individuais (Anexo B) agrupam todas as sequências do gênero *Microcystis* próximas umas das outras. A origem dos genes das toxinas conhecidas produzidas por cianobactérias tem sido discutida em literatura, porém para a microcistina é cada vez mais aceita a hipótese de que o agrupamento gênico tenha origem ancestral e que as linhagens não-tóxicas tenham se originado por deleção de genes ou fragmentos dos mesmos, ou pela inativação destes decorrente de inserção de elementos em sua sequência (RANTALA et al., 2004; MOFFITT; NEILAN, 2004; DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2012; CHRISTIANSEN et al., 2008). A ampla distribuição das linhagens tóxicas, isoladas de reservatórios de diversos países, o fato de serem conhecidas linhagens de diversos gêneros cianobacterianos produtores de microcistinas, o grande número de variantes estruturais desta toxina que podem ser produzidos e o fato de a filogenia dos genes *mcy* estar geralmente de acordo com a dos genes constitutivos corroboram a hipótese da origem ancestral do agrupamento gênico *mcy* como alternativa à hipótese de distribuição dos genes *mcy* por transferência horizontal de genes. Ainda assim, existem estudos relatando a possibilidade de recombinação (TANABE et al., 2009) no agrupamento gênico *mcy* e até mesmo a transferência desses genes por conjugação (NAKASUGI et al., 2007).

**Tabela 13**– Comparação da similaridade (%) das sequências de aminoácidos das enzimas envolvidas na biossíntese de microcistina na linhagem *M. aeruginosa* SPC777 com as sequências de outras cianobactérias produtoras de microcistinas e a linhagem *N.spumigena* NSOR10, produtora de nodularina

Enzimas	<i>M. aeruginosa</i> PCC 7806	<i>M. aeruginosa</i> NIES-843	<i>Anabaena</i> sp. 90	<i>P.agardhii</i> NIVA-CYA 126/8	<i>N. spumigena</i> NSOR10
McyA	96	98	68	64	50 (NdaA)
McyB	91	98	71	68	-
McyC	97	97	74	77	75 (NdaB)
McyD	98	97	69	74	67 (NdaD)
McyE	98	98	75	80	75 (NdaF)
McyF	97	95	70	-	77 (NdaG)
McyG	98	96	71	76	71 (NdaC)
McyH	98	95	71	79	72 (NdaI)
McyI	98	98	74	-	72 (NdaH)
McyJ	99	98	82	87	82 (NdaE)

(-)Gene ausente. Entre parênteses, após os valores de similaridade obtidos com relação à linhagem de *N. spumigena*, encontram-se os nomes dos produtos gênicos cuja função na biossíntese da nodularina é correspondente à de cada produto gênico Mcy.



**Figura 18**– Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) concatenada da sequência de aminoácidos dos produtos gênicos McyA-McyJ. Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados.

## 5.5 Amplificação por PCR e sequenciamento de genes *sxt*

### 5.5.1 Gene *sxtA*

O conjunto de iniciadores *sxtA-F* e *sxtA-R*, desenhado neste estudo e tendo como alvo uma região do gene *sxtA*, amplificou com sucesso um fragmento gênico de 201 pb da linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 (controle positivo de amplificação), o qual apresentou 100 % de identidade com os nucleotídeos na posição 843 a 1044 da sequência completa desse gene publicada por Kellmann et al. (2008b). Desta forma, foi confirmada a eficácia dos iniciadores desenhados.

A sequência completa do gene *sxtA* nas linhagens que já têm o agrupamento gênico *sxt* caracterizado varia de 3705 em *D. circinale* AWQC131C (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009) a 3.738 pb em *R. brooki* D9 (STUCKEN et al., 2010) e *C. raciborskii* T3 (KELLMANN et al., 2008a). Em *M. aeruginosa* SPC777, foi amplificada uma sequência de 201 pb que apresentou 100% de identidade com regiões homólogas das cianobactérias produtoras de saxitoxinas *C. raciborskii* T3 e *R. brooki* D9 que, assim como *M. aeruginosa* SPC777, como citado anteriormente, também foram isoladas da represa Billings (Tabela 14).

A região amplificada com os iniciadores *sxtA-F* e *sxtA-R* é parte de uma sequência correspondente ao domínio AONS (8-amino-7-oxononanoatosintase amidinotransferase) do complexo enzimático SxtA, conhecido como SxtA4, sugerido como sendo uma enzima com atividade de uma aminotransferase classe II (KELLMANN et al., 2008a). Em cianobactérias, o gene *sxtA* codifica uma policetídeo sintase, composta por quatro domínios (SxtA1, SxtA2, SxtA3 e SxtA4) e realiza a primeira etapa da síntese de saxitoxinas (KELLMANN et al., 2008a). A sequência de reações previstas da SxtA, baseada na sua estrutura primária, é catalisar o carregamento da proteína carreadora de acila (ACP) com o acetato da acetil-CoA, seguida pela metilação da acetil-ACP, convertendo-a em propionil-ACP. O domínio da aminotransferase (SxtA4) executa então uma condensação de Claisen entre o propionil-ACP e a arginina. Moustafa et al. (2009) observaram que o *sxtA* é composto por duas regiões protéicas de origens distintas. Na região N-terminal, os primeiros cerca de 800 aminoácidos apresentam similaridade com uma PKS da deltaproteobactéria *Myxococcus xanthus*, contendo um domínio de acil-CoA N-aciltransferase e um de ligação a fosfopanteteína (PP). Já no C-terminal, os cerca de 390 aminoácidos são similares a uma aminotransferase classe I ou II de actinobactérias como *Frankia* sp. Em cianobactérias, esses dois grupos protéicos de origem diferente se fundiram, formando um só complexo enzimático (SxtA). Em dinoflagelados,

esses domínios também aparecem fundidos (STÜKEN et al., 2011; HACKETT et al., 2013). Em seu estudo sobre a origem de genes *sxt* em dinoflagelados, Hackett et al. (2013) observaram que o grupo C-terminal, correspondente à aminotransferase, só foi encontrado nas espécies tóxicas do dinoflagelado *A. tamarense*. Nesse contexto, partindo do princípio que isso também seja válido para cianobactérias, a região identificada e sequenciada no genoma de *M. aeruginosa* SPC777, embora corresponda a apenas cerca de 5 % do tamanho inteiro do gene *sxtA*, indica a presença da aminotransferase específica para síntese de saxitoxinas.

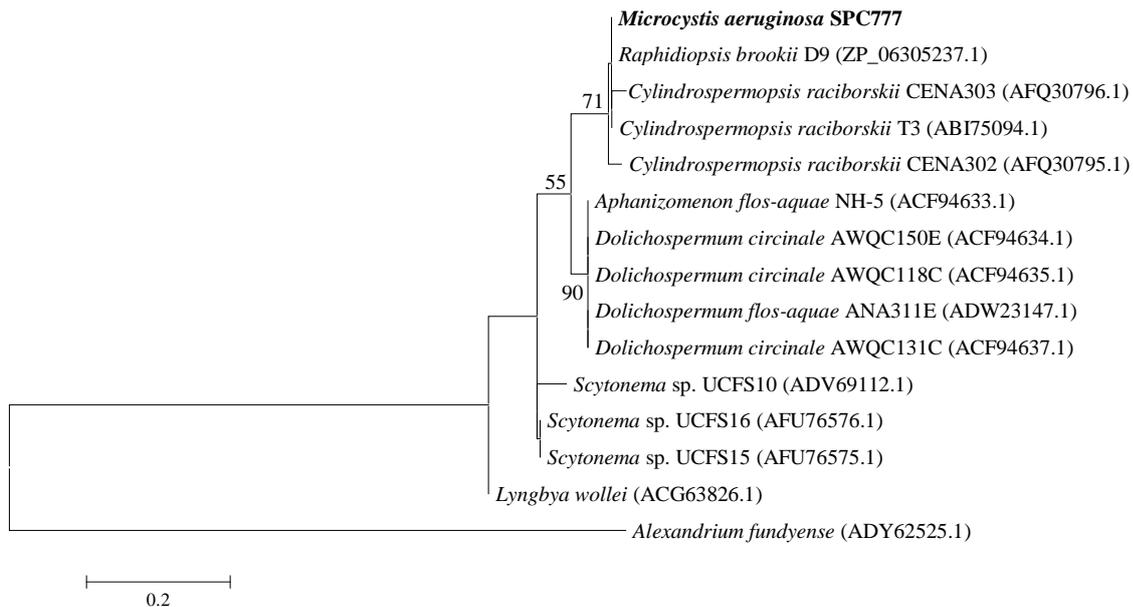
**Tabela 14**– Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene *sxtA* da linhagem SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI

Linagem (acesso no NCBI)	Sequência completa (pb)	% Identidade (cobertura) (nt)	% Similaridade (cobertura) (aa)
<i>C. raciborskii</i> CENA 302 (JX175236.1)	–	99 (100)	98 (98)
<i>C. raciborskii</i> CENA 303 (JX175237.1)	–	99 (99)	98 (98)
<i>R. brookii</i> D9 (NZ_ACYB01000035.1)	3738	100 (100)	100 (100)
<i>C. raciborskii</i> T3 (DQ787200.1)	3738	100 (100)	100 (100)
<i>Scytonema</i> sp. UCFS16 (JQ182303.1)	–	92 (100)	95 (100)
<i>Scytonema</i> sp. UCFS15 (JQ182302.1)	–	93 (100)	95 (100)
<i>Scytonema</i> sp. UCFS10 (HM629429.1)	–	95 (73)	91 (84)
<i>D. circinale</i> AWQC150E (HQ338477.1)	–	93 (100)	92 (100)
<i>D. flos-aquae</i> ANA311E (HQ157701.1)	–	93 (100)	92 (100)
<i>D. circinale</i> AWQC131C (DQ787201.1)	3705	93 (100)	92 (100)
<i>D. circinale</i> AWQC118C (HQ338474.1)	–	93 (100)	92 (100)
<i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5 (EU603710.1)	3705	93 (100)	92 (100)
<i>L. wollei</i> (EU603711.1)	3732	91 (100)	89 (100)
<i>L. wollei</i> str. Carmichael/Alabama (HQ682082.1)	3732	91 (100)	89 (100)
<i>A. fundyense</i> CCMP1719 (JF343239.1)	3846	*	39 (100)

\*O alinhamento não foi possível.

(-) Ausência da informação no GenBank.

A filogenia da sequência parcial de aminoácidos SxtA obtida para a cianobactéria estudada em relação a outras sequências dessa enzima encontradas no banco de dados de aminoácidos do NCBI é ilustrada na Figura 19.



**Figura 19**– Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtA (1000 reamostragens). Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados

A sequência parcial SxtA obtida da *M. aeruginosa* SPC777 se agrupou com sequências de aminoácidos das linhagens *C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9, o que era esperado, uma vez que a similaridade entre elas foi de 100%. Além disso, outras duas sequências de isolados brasileiros de *Cylandrospermopsis* (CENA302 e CENA303) também se posicionaram nesse clado com 71% de reamostragem. A filogenia observada para a região da aminotransferase (SxtA4), principalmente o clado contendo *M. aeruginosa* SPC777 com representantes de três gêneros de cianobactérias, sendo inclusive pertencentes a duas diferentes ordens (Chroococcales e Nostocales), além de todas serem provenientes de reservatórios de água brasileiros, sugere a possibilidade do gene *sxtA* ter sido adquirido por transferência lateral. No entanto, a porcentagem de bases GC na sequência obtida para o gene *sxtA* foi 41,8 % e a porcentagem de GC da sequência obtida até o momento para o genoma de *M. aeruginosa* SPC777 é 43,7 %, portanto um valor próximo ao observado na sequência parcial do gene *sxtA* e que não possibilita a comprovação de transferência lateral de genes. A linhagem *R. brookii* D9, entretanto, possivelmente é uma *Cylandrospermopsis raciborskii* que foi classificada erroneamente devido aos diferentes estágios de desenvolvimento desse gênero (RISSETI, 2012). Já no caso de dois representantes da ordem Nostocales, *Aphanizomenon* sp. NH-5 e *Dolichospermum circinale* AWQC131C, os agrupamentos gênicos completos envolvidos na biossíntese de saxitoxinas desses organismos são altamente similares.

### 5.5.2 Gene *sxtB*

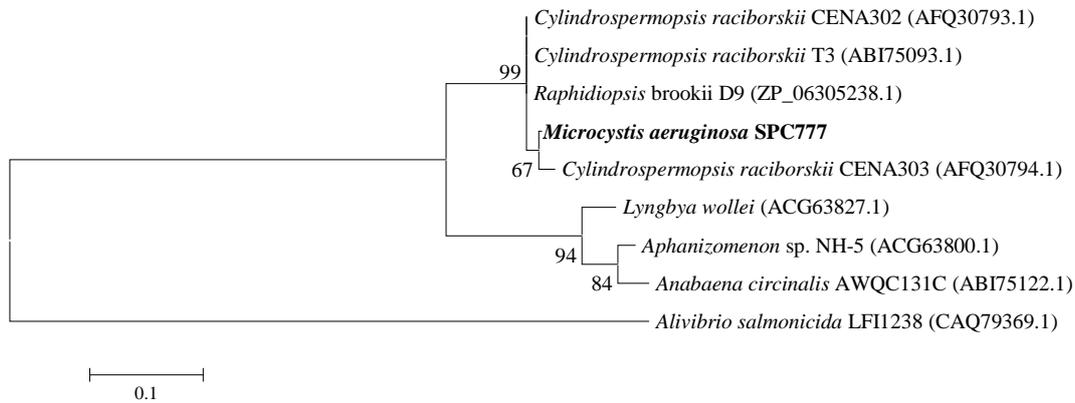
A amplificação por PCR usando os iniciadores *sxtB*-F e *sxtB*-R gerou um fragmento gênico de 341 pb, com conteúdo GC 44,3 %. Nas linhagens de cianobactérias que já tiveram seu agrupamento gênico *sxt* descrito, o tamanho da sequência completa do gene *sxtB* varia em até 21 pares de bases, sendo 957 para *C. raciborskii* T3 (KELLMANN et al., 2008a) e *R. brookii* D9 (STUCKEN et al., 2010); 969 pb para *A. flos-aquae* NH-5 (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009) e *L. wollei* (MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011); e 978 pb para *D. circinale* AWQC131C (MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009). A similaridade observada para a sequência de nucleotídeos e aminoácidos na linhagem *M. aeruginosa* SPC777 é exibida na Tabela 15. O domínio sequenciado tem similaridade com sequências de citidina desaminase, o que está de acordo com a função proposta para a enzima SxtB por Kellmann et al. (2008b).

**Tabela 15**– Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene *sxtB* da linhagem *M. aeruginosa* SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI

Linhagem (acesso no NCBI)	Sequência completa (pb)	% Similaridade (cobertura) (nt)	% Similaridade (cobertura) (aa)
<i>C. raciborskii</i> CENA302 (JX175234.1)	–	99 (94)	99 (94)
<i>C. raciborskii</i> T3 (DQ787200.1)	957	99 (94)	99 (94)
<i>C. raciborskii</i> CENA303 (JX175235.1)	–	98 (75)	98 (74)
<i>R. brookii</i> D9 (NZ_ACYB01000035.1)	957	99 (94)	99 (94)
<i>L. wollei</i> (EU603711.1)	969	87 (94)	84 (94)
<i>D. circinale</i> AWQC131C (DQ787201.1)	978	86 (94)	84 (94)
<i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5 (EU603710.1)	969	85 (94)	83 (94)

(-) Ausência de informação no GenBank.

Assim como observado para o gene *sxtA*, a filogenia da sequência obtida para *sxtB* agrupa a linhagem *M. aeruginosa* SPC777 com a sequência de *R. brookii* D9 e das linhagens de *Cylindrospermopsis* (Figura 20). Neste caso, no entanto, a similaridade entre a sequência de aminoácidos da *M. aeruginosa* SPC777 e as demais linhagens apresenta valores menores do que o observado para o gene *sxtA*.



**Figura 20**– Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtB (1000 reamostragens). Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados

### 5.5.3 Gene sxtG

Os iniciadores sxtG-F e sxtG-R permitiram a amplificação e o posterior sequenciamento de um fragmento gênico de 423 pb, com 44 % de GC. Com exceção da linhagem *R. brookii* D9, a sequência completa do gene *sxtG* nas linhagens produtoras de saxitoxinas apresenta 1134 pb (KELLMANN et al., 2008a; MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009; MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011). A identidade de nucleotídeos e a similaridade de aminoácidos obtidas para a sequência parcial do genesxtGda *M. aeruginosa* SPC777 são apresentadas na Tabela 16.

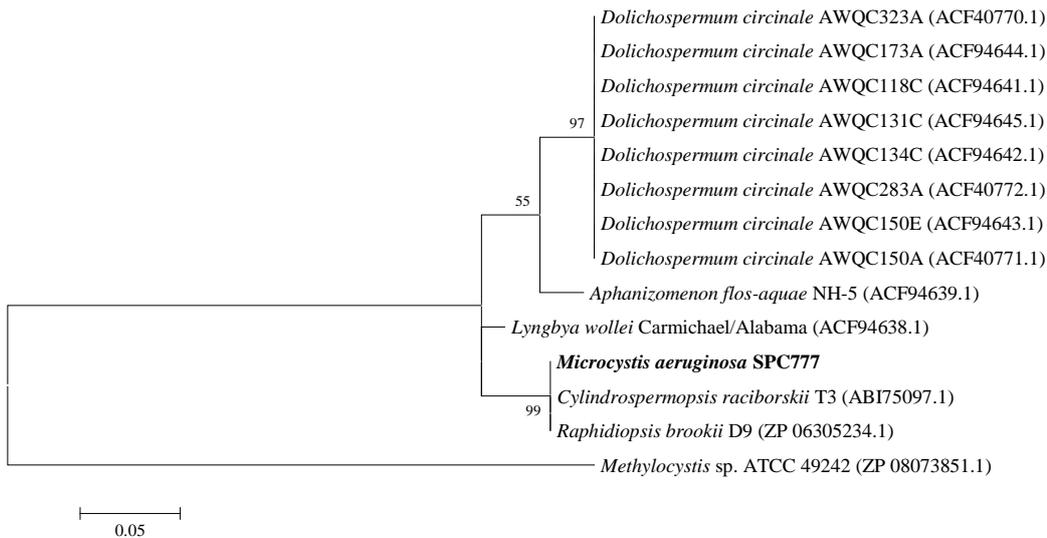
**Tabela 16**– Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene *sxtG* da linhagem *M. aeruginosa* SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI

<b>Linhagem (acesso no NCBI)</b>	<b>Sequência completa (pb)</b>	<b>% Similaridade (cobertura) (nt)</b>	<b>% Similaridade (cobertura) (aa)</b>
<i>C. raciborskii</i> T3 (EU629182.1)	1134	100 (100)	100 (99)
<i>R. brookii</i> D9 (ZP_06305234.1)	1005	100 (100)	100 (99)
<i>L. wollei</i> (EU603711.1)	1134	93 (100)	96 (99)
<i>L. wollei</i> str. Carmichael/Alabama (EU629180.1)	1134	93 (100)	96 (99)
<i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5 (EU603710.1)	1134	93 (99)	94 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC131C (EU629190.1)	1134	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC173A (EU629188.1)	–	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC150E (EU629187.1)	–	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC134C (EU629186.1)	–	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC118C (EU629183.1)	–	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC150A (EU629185.1)	–	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC283A (EU629189.1)	–	92 (100)	93 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC323A (EU629184.1)	–	92 (100)	93 (99)

(-) Ausência de informação no GenBank.

A sequência de aminoácidos StxG apresentou similaridade com amidinotransferases de cianobactérias produtoras de saxitoxinas (Tabela 16), o que está de acordo com a função proposta por Kellmann et al. (2008a) para a enzima SxtG: uma amidinotransferase responsável pela transferência de um grupo amidino de uma molécula de arginina para o primeiro intermediário formado na biossíntese de saxitoxinas por cianobactérias.

A filogenia obtida para a sequência parcial de aminoácidos do gene *sxtG* da *M. aeruginosa* SPC777, assim como as dos genes *sxtA* e *sxtB*, ficou proximamente relacionada com as sequências homólogas de SxtG de *C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9 (Figura 21).



**Figura 21**– Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de SxtG (1000 reamostragens). Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados

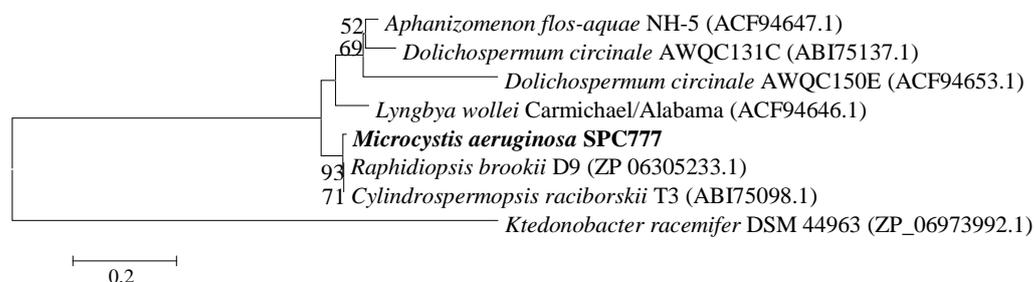
#### 5.5.4 Gene *sxtH*

O fragmento amplificado com os iniciadores *sxtH*-F e *sxtH*-R gerou uma sequência de 431 pb (39,4 % GC), correspondente à subunidade terminal maior de uma dioxigenase fenilpropionato e outras dioxigenases relacionadas, que catalisam a hidroxilação de estruturas químicas em anel. A sequência completa do gene *sxtH*, de acordo com a literatura, tem entre 1005 pb (*C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9 - KELLMANN et al., 2008a; STUCKEN et al., 2010) e 1029 pb (*Lyngbya wollei* str. Carmichael/Alabama - MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011). A comparação com o banco de dados de proteínas do NCBI e COG indica que a função da enzima está relacionada ao transporte e metabolismo de íons inorgânicos. Esta mesma função foi proposta por Kellmann et al. (2008a) para as enzimas SxtH e SxtT. Observa-se que os genes *sxtH* e *sxtT* não somente codificam enzimas com função semelhante entre si como apresentam uma considerável similaridade em suas sequências de nucleotídeos e, conseqüentemente, aminoácidos. Tal semelhança foi notada no presente trabalho desde o alinhamento de sequências para o desenho de iniciadores para o gene *sxtH*, não tendo sido possível o desenho de iniciadores para a detecção do gene *sxtT* isoladamente. Resultados de similaridade da sequência parcial de aminoácidos do gene *sxtH* na linhagem *M. aeruginosa* SPC777 (Tabela 17) também revelaram similaridade com sequências da enzima SxtT (e o correspondente SxtDIOX em *Lyngbya wollei*), embora a similaridade seja menor do que para SxtH.

**Tabela 17**– Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para um fragmento do gene *sxtH* da linhagem SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI. O sinal “-” indica ausência da informação no GenBank

Linagem (acesso no NCBI)	Sequência completa (pb)	% Similaridade (cobertura) (nt)	% Similaridade (cobertura) (aa)
Genes <i>sxtH</i>			
<i>C.s raciborskii</i> T3 (EU629193.1)	1005	99 (100)	99 (99)
<i>R. brookii</i> D9 (ZP_06305233.1)	1005	79 (42)	99 (99)
<i>L. wollei</i> (EU603711.1)	1029	90 (100)	88 (99)
<i>L. wollei</i> str. Carmichael/Alabama (EU629191.1)	1029	90 (100)	88 (99)
<i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5 (EU629192.1)	1020	88 (100)	87 (99)
<i>A. circinalis</i> AWQC131C (EU629194.1)	1020	88 (100)	83 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC150E (ACF94653.1)	-	-	69 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC118C (ACF94651.1)	-	-	69 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC323A (ACF40773.1)	-	-	69 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC134C (ACF94650.1)	-	-	69 (99)
<i>D. circinale</i> AWQC173A (ACF94652.1)	-	-	69 (99)
Genes <i>sxtDIOX</i> e <i>sxtT</i>			
<i>Lyngbya wollei</i> – SxtDIOX (ACG63835.1)		-	71 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC131C (ABI75133.1)		-	69 (99)
<i>Lyngbya wollei</i> (ACG63840.1)	-	-	70 (99)
<i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5 (ACG63810.1)	-	-	69 (99)
<i>Raphidiopsis brookii</i> D9 (ZP_06305225.1)	1005	-	69 (99)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3 (ABI75109.1)		-	69 (99)

(-) Ausência de informação no GenBank.



**Figura 22**– Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) de *SxtH* (1000 reamostragens). Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados

### 5.5.5 Gene *sxtI*

A presença de um fragmento do gene *sxtI* na linhagem *M. aeruginosa* SPC777 foi detectada utilizando os iniciadores OCT-F e OCT-R desenhado neste estudo, cujo produto da PCR foi sequenciado. Foi obtido um fragmento de 884 pb, com conteúdo GC de 46,3 %. O gene *sxtI* foi designado como bom candidato para se investigar o potencial para produção de saxitoxinas em cianobactérias (KELLMANN et al., 2008b). Esse gene codifica uma ornitina-carbamoiltransferase (OCTASE), cuja ação seria imprescindível para a formação dos análogos carbamoilados de saxitoxina, como as variantes de goniatoxinas encontradas na *M. aeruginosa* SPC777 (SANT'ANNA et al., 2011). Esses mesmos iniciadores foram utilizados em tentativas sem sucesso de amplificação por PCR do gene *sxtI* na cianobactéria contaminante da família Synechococcaceae. Assim, foi excluída a possibilidade desse contaminante ter sido a cianobactéria produtora das variantes de goniatoxinas.

Os iniciadores Sxt1-F e Sxt1-R (KELLMANN; MIHALI; NEILAN, 2008b, Tabela 7) amplificaram um fragmento de 1.536 pb (com 45,4 % de GC) do DNA genômico da *M. aeruginosa* SPC777, correspondendo à sequência quase completa do gene *sxtI*. Esse gene, já caracterizado em outras cianobactérias (*R. brookii* D9, *C. raciborskii* T3, *Aphanizomenon* sp. NH-5 e *D. circinale* AWQC131C), possui tamanho de 1839 pb (STUCKEN et al., 2010; KELLMANN et al., 2008a; MIHALI; KELLMANN; NEILAN, 2009), com exceção da *Lyngbya wollei*, cuja sequência do gene *sxtI* é menor (1071 bp), por ser truncada (MIHALI; CARMICHAEL; NEILAN, 2011).

A identidade obtida para as sequências amplificadas com os iniciadores OCT-F/OCT-R e Sxt1-F/Sxt1-R é apresentada na Tabela 18.

**Tabela 18**– Similaridade da sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) obtida para a sequência parcial do gene *sxtI* da linhagem SPC777 em relação a outras encontradas no banco de dados do NCBI

Linhagem (acesso no NCBI)	Sequência completa (pb)	% Similaridade (nt) (% cobertura)		% Similaridade (aa) (% cobertura)	
		OCT-F + OCT-R (884 pb)	Sxt1-F + Sxt1-R (1536 pb)	OCT-F + OCT-R (294 aa)	Sxt1-F + Sxt1-R (511 aa)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> T3 (EU439556.1)	1839	98 (100)	74 (83)	100 (99)	81 (99)
<i>Raphidiopsis brookii</i> D9 (ZP_06305232.1)	1839	97 (48)	75 (99)*	100 (99)	81 (99)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> CENA302 (JX175232.1)	–	98 (100)	75 (58)*	100 (99)	81 (58)
<i>Aphanizomenon</i> sp. NH-5 (EU603710.1)	1839	87 (100)	76 (98)	94 (99)	82 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC283A (EU439565.1)	–	87 (100)	76 (99)*	94 (99)	81 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC173A (EU439564.1)	–	87 (100)	76 (99)*	94 (99)	81 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC150E (EU439563.1)	–	87 (100)	76 (99)*	94 (99)	81 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC134C (EU439561.1)	–	87 (100)	76 (98)*	94 (99)	81 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC118C (EU439560.1)	–	87 (100)	76 (99)*	94 (99)	81 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC131C (EU439557.1)	1839	87 (100)	76 (99)*	94 (99)	81 (99)
<i>Dolichospermum circinale</i> AWQC323A (EU439562.1)	–	86 (100)	76 (99)*	94 (99)	81 (99)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> CENA303 (JX175233.1)	–	97 (64)	73 (36)*	97 (64)	75 (42)
<i>Lyngbya wollei</i> (EU603711.1)	1071 (truncada)	92 (62)	79 (49)	96 (82)	68 (77)

\*Alinhamento possível somente diminuindo a especificidade (*discontiguous megablast*).

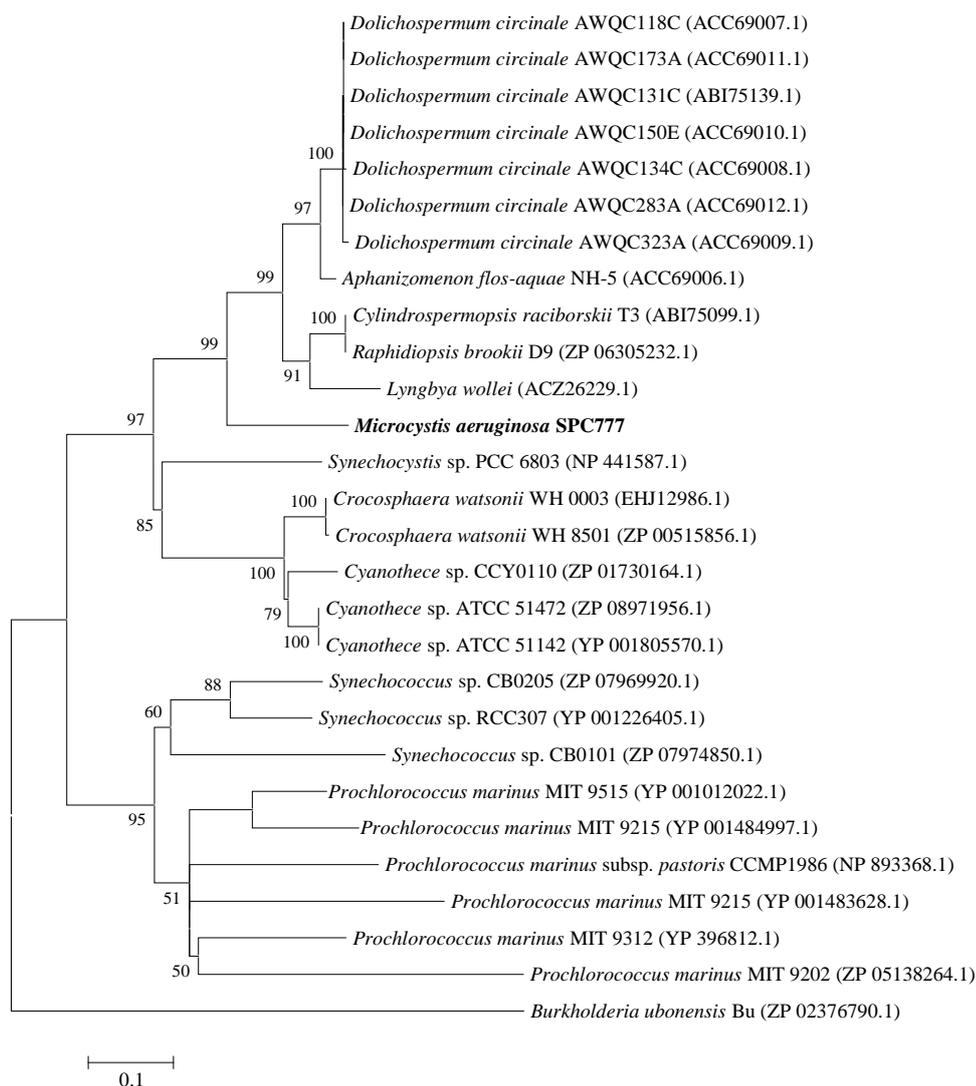
(-) Ausência de informação no GenBank.

Na tabela acima, pode-se verificar a diferença de similaridade obtida de acordo com a utilização dos diferentes conjuntos de iniciadores. Os iniciadores OCT-F/OCT-R amplificaram uma região interna do gene *sxtI* que se mostrou conservada quando a sequência de aminoácidos da *M. aeruginosa* SPC777 foi comparada à das cianobactérias filamentosas produtoras de saxitoxinas, com valores de identidade entre 94 e 100 %. Por outro lado,

quando se analisou a sequência de aminoácidos quase completa desse mesmo gene (amplificada com os iniciadores Sxt1-F/Sxt1-R) no mesmo isolado de *Microcystis*, os valores de similaridade mudaram expressivamente em relação às linhagens utilizadas para comparação, sendo que o valor máximo de similaridade foi reduzido a 82 %. Esse valor de similaridade foi observado para a sequência SxtI da cianobactéria *Aphanizomenon* sp. NH-5, a qual foi isolada da represa Guntersville nos Estados Unidos (CARMICHEL et al., 1997). Isso mostra a importância de se realizar comparações usando sequências as mais completas possíveis. Além disso, esses resultados sugerem que a OCTASE da *M. aeruginosa* SPC777 tem uma história evolutiva diferente das outras até agora conhecidas que estão envolvidas com a síntese de saxitoxinas.

Estudos recentes sugerem que o agrupamento gênico envolvido na biossíntese de saxitoxinas em cianobactérias tenha se originado por intermédio de uma série de eventos de transferência lateral de genes, sendo que dos 26 genes, 17 apresentem origem cianobacteriana e os demais tenham sido obtidos de outros organismos ou bactérias (MOUSTAFA et al., 2009). Assim, após a formação do agrupamento gênico *sxt*, este teria sido transferido verticalmente às gerações seguintes das cianobactérias produtoras, de forma que as linhagens não-tóxicas tenham perdido genes *sxt* (MOUSTAFA et al., 2009; MURRAY; MIHALI; NEILAN, 2011). Essa hipótese é corroborada pelos autores e no presente estudo pela congruência observada para as análises filogenéticas de genes constitutivos e daqueles envolvidos na biossíntese de saxitoxinas.

A filogenia da sequência de aminoácidos obtida para a linhagem *M. aeruginosa* SPC777 como produto da amplificação com os iniciadores Sxt1-F/Sxt1-R é ilustrada na Figura 23. A topologia gerada agrupa as sequências em três clados bem definidos. Ao topo da árvore filogenética, o primeiro clado agrupa as linhagens produtoras de saxitoxinas. A sequência obtida para a linhagem *M. aeruginosa* SPC777 formou um ramo independente dentro deste primeiro clado, próximo às linhagens *L. wollei*, *C. raciborskii* T3 e *R. brookii* D9. O segundo e o terceiro clados da árvore são compostos por sequências de enzimas do grupo das OCTASEs, NodU e CmcH, de cianobactérias dos gêneros: *Synechocystis*, *Crocospaera* e *Cyanothece* (clado 2) e *Synechococcus* e *Prochlorococcus* (clado 3). Até o momento, não há relato de produção de neurotoxinas por esses gêneros de cianobactérias. A sequência da bactéria Gram-negativa *Burkholderia ubonensis* foi usada como grupo externo.



**Figura 23**– Árvore filogenética da sequência de aminoácidos de SxtI (Máxima Verossimilhança, 1000 reamostragens). Os valores de reamostragem maiores que 50 % são apresentados

### 5.5.6 PCR para a detecção de *sxtN*, *sxtX*, *sxtW*, *sxtV* e “*sxtO*context”

Não houve sinal de amplificação em nenhuma das condições de PCR testadas para a detecção dos genes *sxtN*, *sxtX*, *sxtW*, *sxtV* e a sequência de inserção da família IS4, situada ao lado (*upstream*) do gene *sxtO* (“*sxtO*context”). O gene *sxtN* corresponde a uma sulfotransferase e, portanto, é necessário para a biossíntese de goniautoxinas, que são os análogos de saxitoxinas produzidos pela linhagem *M. aeruginosa* SPC777, de acordo com Sant’Anna et al. (2011). O gene *sxtX* é necessário para a biossíntese de análogos hidroxilados

de saxitoxinas, portanto seria necessário à biossíntese de goniautoxinas 1/4. Os genes *sxtW* e *sxtV* estão envolvidos no transporte de elétrons e acredita-se que auxiliem na regeneração das enzimas SxtH e SxtT a cada ciclo catalítico.

### 5.5.7 Extensão dos fragmentos de genes *sxt* pela técnica “pan-handle”

Os testes de amplificação do DNA genômico da *M. aeruginosa* SPC777 utilizando os iniciadores desenhados para a técnica “pan-handle” não geraram sinal de amplificação para os genes *sxt*. Em todas as tentativas, somente foi amplificado o DNAr 16S.

Duas hipóteses foram levantadas para a ausência de sinal de amplificação: (1) a disposição dos genes *sxt* na cianobactéria *M. aeruginosa* SPC777 seria tão diferente daquela observada para as outras linhagens produtoras de saxitoxinas que a distância entre os genes buscados seria demasiadamente grande, o que inviabilizaria as tentativas de amplificação por PCR; ou (2) em condições de cultivo, em meio de cultura contendo fósforo (ASM-1), ocorreu a proliferação de células que não apresentavam o agrupamento gênico *sxt* e, depois de inúmeras gerações, as células que não continham o agrupamento gênico *sxt* predominaram. Assumindo-se a possibilidade da hipótese 1, foram utilizados programas de ciclagem térmica com temperatura de anelamento dos iniciadores tão baixas quanto 40 °C (mais de 10 °C abaixo da  $T_m$  estimada pela ferramenta NetPrimer) e um longo período (4 a 4,5 minutos) de extensão dos fragmentos amplificados a cada ciclo de PCR. Ainda assim, não foi observado nenhum sinal de amplificação após estes testes. Portanto, a segunda hipótese foi testada por intermédio das reações de PCR utilizando os iniciadores OCT-F/OCT-R e Sxt1-F/Sxt1-R, que haviam sido previamente utilizados no Brasil em diferentes inóculos de *M. aeruginosa* SPC777, tendo gerado resultado positivo de amplificação em todos os casos. Neste caso, porém, não foi mais verificado nenhum sinal de amplificação. Apesar de haver a possibilidade de a ausência de amplificação dos genes *sxt* ter se devido a algum inibidor nas reações de PCR, existe também a possibilidade de que as células cianobacterianas não continham o gene *sxtI* e, possivelmente, os outros genes *sxt*. Nesse sentido, o que já foi relatado para microcistinas talvez também seja válido para saxitoxinas, conforme exposto a seguir. A presença de linhagens de *Microcystis* produtoras e não produtoras de microcistina geralmente co-existe em muitos corpos d'água (JOUNG et al., 2010; DAVIS et al., 2009; WELKER et al., 2003; YOSHIDA et al., 2007). Algumas linhagens não tóxicas isoladas não apresentam os genes *mcy* (TILLET et al., 2001; BAKER et al., 2002; DE RÓS et al., 2012) ou são incapazes de expressá-los (KAEBERNICK et al., 2001). Kurmayer e Kutzenberger (2003) estimaram que a proporção de genótipos tóxicos

dentro de colônias de *Microcystis* foi de 1 % - 38% numa amostra coletada no lago Wannsee (Alemanha), enquanto que no lago Mikata (Japão) genótipos potencialmente tóxicos formavam 0,5 % - 35% do total da população de *Microcystis*, o que foi positivamente relacionado com a concentração de nitrato (YOSHIDA et al., 2007). Em um estudo conduzido em laboratório, foi relatado o aparecimento de duas subculturas não-tóxicas de *Microcystis* que surgiram a partir de dois isolados independentes de culturas tóxicas (SCHATZ et al., 2005). Análises de *Southern blot* mostraram que nas duas linhagens não tóxicas faltava pelo menos 34kb do agrupamento gênico *mcy*. Além disso, Kardinaal et al. (2007) realizaram um experimento de competição por luminosidade utilizando quatro linhagens de *Microcystis*, sendo duas produtoras de microcistina e duas não produtoras. Os resultados de seus experimentos demonstraram que as linhagens não-tóxicas sempre prevaleciam em relação às tóxicas, mesmo quando os experimentos ofereciam uma grande vantagem inicial às linhagens tóxicas. Esses dados estão de acordo com alguns estudos que verificaram uma maior produção de microcistinas no início de florações de *Microcystis*, em relação à fase de maior multiplicação das células (JANSE et al., 2004; WELKER et al., 2003). Um estudo realizado por Welker et al. (2003) mostrou que o isolamento de *M. aeruginosa* em meio de cultura sólido selecionou para linhagens não tóxicas, enquanto que o meio líquido favoreceu as linhagens produtoras de toxina. Assim, as diferentes técnicas de isolamento e de cultivo podem selecionar para linhagens tóxicas ou não tóxicas de *M. aeruginosa*.

Diversas outras possibilidades foram cogitadas para se tentar compreender uma possível perda dos genes *sxt*, dentre elas a hipótese de que os genes tenham sido perdidos após ataque por vírus cianófago. Nesse sentido, uma busca com a ferramenta virtual CRISPR Finder (<http://crispr.u-psud.fr/Server/>) revelou a presença de pelo menos dois locos de CRISPR, com seqüências de repetições tendo 36 a 37 pb e (intercaladas com as repetições) 4 seqüências de “espaçadores” (referentes à seqüência do DNA exógeno) de tamanho entre 34 e 40 pb. Além disso, com a análise do relatório de BlastX após o sequenciamento do genoma por SOLiD, foi possível a detecção de *contigs* referentes a proteínas associadas ao sistema de CRISPR, a saber: Cas1, Cas2, proteína do grupo das DEAD/DEAH helicases (família das Cas3), Cas5e, Cas6, Csc1, RAMP Crm2, Csc2, Cmr3, RAMP Cmr4 e Cmr6. Ainda assim, sem o conhecimento de qual região do genoma era ocupada pelos genes *sxt* encontrados no início deste projeto, não é possível afirmar que a perda destes genes tenha sido causada de fato por infecção de cianófagos.

A produção de saxitoxinas pela *M. aeruginosa* SPC777 foi descrita em 2011 (SANT'ANNA et al., 2011) e alguns genes envolvidos na biossíntese dessa toxina foram

detectados e sequenciados neste estudo. Entretanto, na análise química não foi verificada a produção dessa toxina, conforme mencionado abaixo. A necessidade de produção dessa toxina pela célula cianobacteriana, ou seja, sua função, não está esclarecida. Talvez os resultados contraditórios referentes a essa linhagem quanto à produção de saxitoxinas possam ser explicados quando a função dessa molécula for desvendada. Alguns estímulos ambientais existentes na represa Billings podem ter favorecido a proliferação de células de *M. aeruginosa* SPC777 produtoras de saxitoxinas, garantindo uma maior vantagem competitiva decorrente da produção de outro tipo de toxina além das microcistinas, cuja produção também foi detectada nesta linhagem. Em 2004, Frangópulos e colaboradores verificaram que algumas linhagens de dinoflagelados do gênero *Alexandrium* apresentavam menor capacidade competitiva em condições de cultivo com limitação de fósforo e que tais linhagens eram justamente as que produziam saxitoxinas em alta quantidade. Os resultados desse estudo sugerem que a produção de saxitoxinas por estes dinoflagelados provavelmente não representava uma demanda energética grande por parte das linhagens tóxicas e que, desta forma, poderia compensar a sua desvantagem competitiva por prejudicar a alimentação das linhagens não-tóxicas. De acordo com esta hipótese, Castro et al. (2004) verificaram um aumento na produção de saxitoxinas pela cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* C10 em condições de baixa temperatura (19 °C), sendo que a taxa de crescimento diminuiu nessas condições. Por outro lado, em *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31, a produção se mostrou mais elevada em temperatura de cultivo relativamente alta (28 °C) (DIAS; PEREIRA; FRANCA, 2002).

Além da possibilidade de oferecer uma vantagem competitiva, Pomati et al. (2004) sugeriram um papel na homeostase celular das cianobactérias produtoras de saxitoxinas, uma vez que estas atuam sobre canais de sódio. Estes autores verificaram uma correlação positiva entre a produção de saxitoxinas e a concentração de NaCl do meio. Ainda outros fatores ambientais, como intensidade luminosa (CARNEIRO et al., 2009) e disponibilidade de nitrogênio (YUNES et al., 2009) já foram relatados como influenciando a produção de saxitoxinas.

## 5.6 Análises químicas de microcistinas e saxitoxinas

Em publicação anterior (SANT'ANNA et al., 2011) foi detectada a produção de [L-ser<sup>7</sup>] microcistina-RR e goniautoxinas 1, 2, 3 e 4 em extratos de *M. aeruginosa* SPC777. As análises realizadas envolveram HPLC-FLD (“HPLC-Fluorescent Detection on Line”) e HPLC-MS. No presente trabalho, foram repetidas análises de HPLC e HPLC-MS/MS com o objetivo de confirmar se a linhagem em questão continuava a produzir tais toxinas.

### 5.6.1 HPLC

As saxitoxinas geram picos visíveis no HPLC quando são derivatizadas, o que pode ser feito por dois tipos de oxidação: utilizando peróxido ou periodato (LAWRENCE; NIEDZWIADK; MENARD, 2005). Segundo os autores, as saxitoxinas hidroxiladas (neosaxitoxina, toxina B2, goniautoxinas 1 e 4, toxinas C3 e C4) só podem ser visualizadas mediante oxidação utilizando periodato; já as não-hidroxiladas (saxitoxinas, goniautoxinas 2 e 3, toxina B1, toxinas C1 e C2, descarbamolsaxitoxina, descarbamoilgoniautoxinas 2 e 3) em alguns casos podem até gerar picos após a oxidação com periodato, porém são mais claramente visualizadas se a oxidação for feita com peróxido. Portanto, os dois tipos de oxidação foram testados para as amostras em análise.

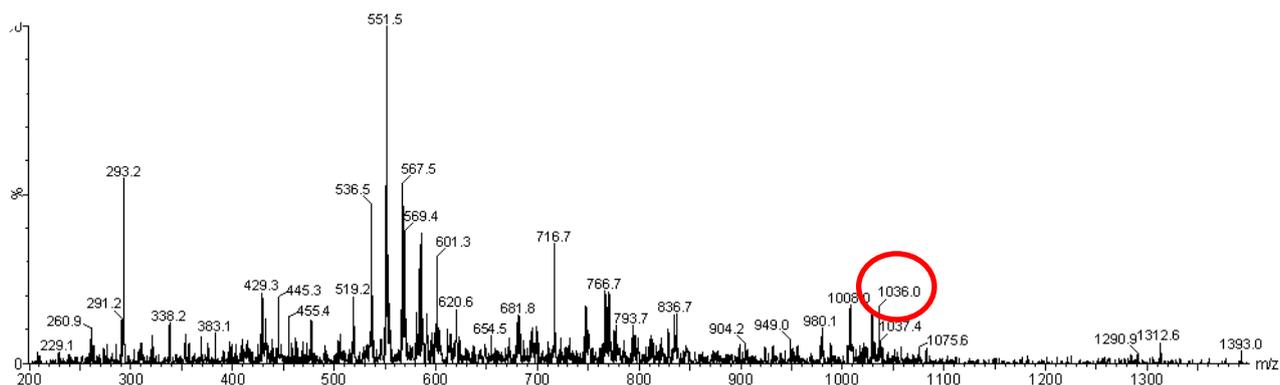
Algumas amostras analisadas por HPLC apresentaram picos aproximados aos dos padrões testados; entretanto, nenhuma apresentou exatamente o mesmo perfil cromatográfico (Tabela 19). Portanto, não foi possível confirmar a produção de saxitoxinas pela cianobactéria *M. aeruginosa* SPC777. Uma limitação da técnica de HPLC está no fato de haver a necessidade do uso de padrões para a comparação com os picos obtidos para as amostras. Assim, caso a linhagem estudada estivesse produzindo algum análogo de saxitoxina para o qual não houvesse padrão, esse fato não seria conhecido. Portanto, a análise em HPLC-MS, cujos resultados são descritos adiante, foi necessária.

**Tabela 19**– Tempos de retenção obtidos para as amostras analisadas por HPLC

<b>Ensaio 1</b>		
<b>Amostra (cultivo / extração)</b>	<b>Picos (tempos de retenção)</b>	<b>Oxidação</b>
Padrão STX	12.659 / 13.866 / 20.393	Peróxido
Padrão GTX 2	8.690 / 22.407 / 23.319	Peróxido
ASM-1 / ácido acético	28.361	Peróxido
ASM-1 / HCl	26.449 / 28.368	Peróxido
JM / HCl	15.782 / 26.468 / 28.385	Peróxido
<b>Ensaio 2</b>		
<b>Amostra (cultivo / extração)</b>	<b>Picos (tempos de retenção)</b>	<b>Oxidação</b>
Padrão GTX3	15.980	Periodato
Padrão GTX1/4	5.537 / 8.643 / 22.957	Periodato
JM / HCl	26.241 / 28.169	Periodato
JM / ácido acético	5.773 / 28.176	Periodato
BG / HCl	15.578 / 16.588 / 28.203	Periodato
BG / ácido acético	28.195	Periodato
ASM-1/ HCl	26.277 / 28.184	Periodato
<b>Ensaio 3</b>		
<b>Amostra (cultivo / extração)</b>	<b>Picos (tempos de retenção)</b>	<b>Oxidação</b>
Padrão GTX 1/4	5.597 / 8.250 / 16.033	Periodato
Padrão GTX 3	23.171	Peróxido
BG / ácido acético	28.352 / 33.371	Peróxido
BG / HCl	15.773 / 16.860 / 28.402	Peróxido
JM / ácido acético	28.387	Peróxido
ASM-1 / ácido acético	5.834 / 28.385	Periodato

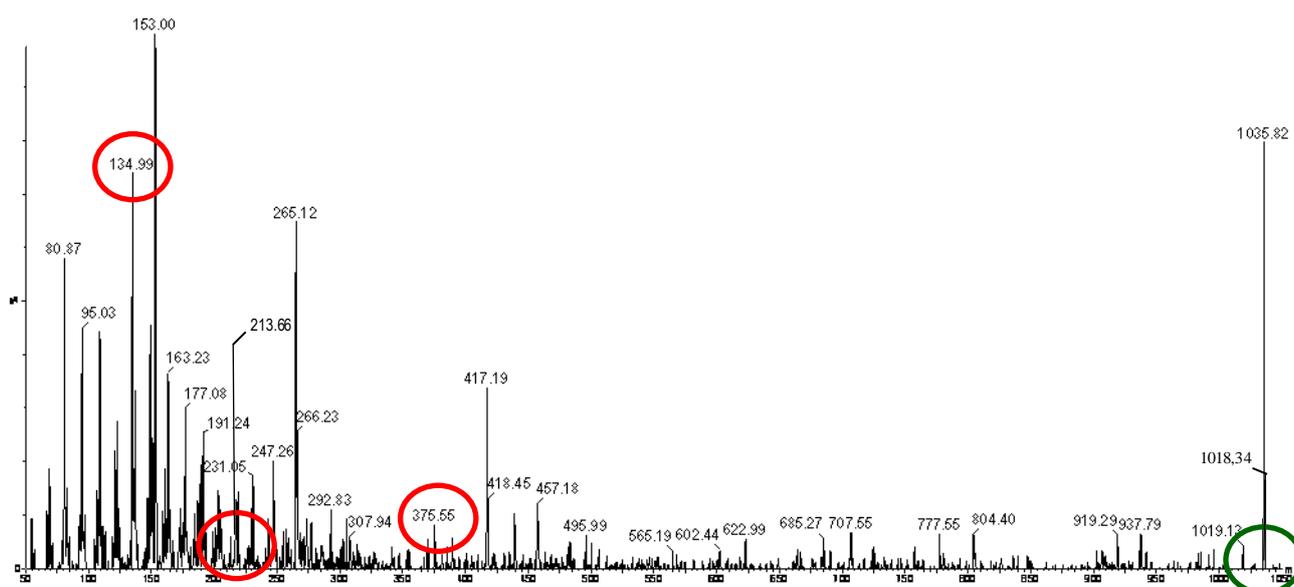
### 5.6.2 Análise por HPLC-MS/MS

Na análise por HPLC-MS/MS, assim como observado por HPLC, não foi detectada a produção de nenhum análogo de saxitoxina. Em relação às variantes de microcistina, a análise por HPLC-MS revelou o íon  $m/z$ 1036 (Figura 24), que corresponde à microcistina-YM (BOTES, 1985).



**Figura 24**– Espectro de massas em modo *full scando* extrato referente ao cultivo em ASM-1, com destaque para o íon  $m/z$  1036

A fragmentação do íon  $m/z$  1036 foi realizada para a confirmação de que tal molécula se tratava de uma microcistina. A análise da fragmentação do íon  $m/z$  1036 sugere que este realmente se trata de uma variante de microcistina, uma vez que foram identificados os íons  $m/z$  135, 213 e 375 (Figura 25). O íon  $m/z$  135 corresponde a um fragmento da cadeia lateral do aminoácido Adda. Este é o íon característico da fragmentação demicrocistinas (FRIAS et al., 2006). O íon  $m/z$  375 corresponde ao fragmento Adda'-Glu-MeDha + H e, por fim, o íon  $m/z$  213 corresponde a Glu-MeDha + H, sendo Adda' referente à parte central do Adda e Me uma amino-metilação (WELKER et al., 2006). Além disso, é indicado na Figura 25 o íon  $m/z$  1018, que corresponde à perda de água pela molécula de  $m/z$  1036.



**Figura 25**– Fragmentação do íon  $m/z$  1036 encontrado em cultivo em meio ASM-1. Os íons característicos da fragmentação de moléculas de microcistina são destacados com círculos vermelhos. A região correspondente ao íon de  $m/z$  1018 é destacada com círculo verde

O espectro obtido nesta primeira análise e a constatação de que o agrupamento gênico *mcy* se encontra completo em *M. aeruginosa* SPC777 indicam que esta linhagem não perdeu a capacidade de produção de microcistinas, apesar de vários anos de manutenção em laboratório. Experimentos adicionais, como análise por espectroscopia de RMN (ressonância magnética nuclear), poderão caracterizar com maior precisão qual é a variante de microcistina que está sendo produzida.

Existem aproximadamente 90 variantes estruturais de microcistina descritas, as quais possuem em comum a estrutura cíclica D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-Adda-D-Glu-Mdha, onde Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico, D-MeAsp é o ácido 3-metil-aspártico, Mdha é *N*-metildeidroalanina e L-X e L-Z são posições de aminoácidos variáveis que contribuem para as diferentes isoformas (HONKANEN et al., 1990; RINEHART; NAMIKOSHI; CHOI, 1994). A produção de várias isoformas de microcistinas por uma única linhagem de *Microcystis* é comum (WELKER et al., 2006). Neste estudo, somente a produção da variante microcistina-YM foi detectada, embora no estudo anterior (SANT'ANNA et al., 2011) a variante encontrada tenha sido [L-ser<sup>7</sup>] microcistina-RR. Este fato pode ter sido decorrente da quantidade de toxinas produzidas e passíveis de serem detectadas, ou seja, essa linhagem pode estar produzindo essas duas variantes, mas as concentrações variaram de acordo com as condições de cultivo. Além disso, as diferenças nas condições de cultivo podem ter selecionado para a produção específica de outra variante. Fato semelhante já foi descrito para a linhagem *M. aeruginosa* NPLJ-4, cujo cultivo em diferentes meios resultou na produção de diferentes variantes de microcistinas (ALVES, 2011).

## 6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram caracterizados pela primeira vez alguns genes envolvidos na biossíntese de saxitoxinas em uma cianobactéria unicelular. A detecção de cinco genes *sxt* apresentando alta proximidade filogenética com outros genes *sxt* de linhagens produtoras de saxitoxinas é um indicativo de que em algum momento de sua história evolutiva, a linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777 produziu esta toxina e corrobora com os dados publicados anteriormente com relação à produção de análogos de saxitoxinas nesta linhagem. Além disso, os dados obtidos neste estudo permitem realizar inferências sobre a evolução dos genes *sxt* nesta linhagem, sugerindo mais fortemente uma origem ancestral do que a possibilidade de transferência horizontal. A produção de saxitoxinas, entretanto, não foi detectada, o que era esperado, uma vez que somente cinco genes *sxt* foram encontrados e, diante do que se conhece atualmente, são necessários no mínimo 21 genes *sxt* (como em *Raphidiopsis brookii* D9) para ocorrer a produção da toxina.

A alta proximidade filogenética e a similaridade da organização estrutural do agrupamento gênico *mcy* observados para a linhagem brasileira *M. aeruginosa* SPC777 em relação às outras linhagens de *M. aeruginosa* indicam também uma origem ancestral deste agrupamento gênico, sendo este o primeiro agrupamento gênico *mcy* completamente caracterizado em uma linhagem de *M. aeruginosa* da América do Sul. A detecção da produção de microcistina por esta linhagem confirmou sua toxicidade.

Perspectivas futuras incluem novo sequenciamento do genoma da *M. aeruginosa* SPC777 e nova tentativa de localização dos genes *sxt* na sequência do genoma completo.

## 7 REFERÊNCIAS

ALEXOVA, R.; FUJII, M.; BIRCH, D.; CHENG, J.; WAITE, T. D.; FERRARI, B. C.; NEILAN, B. A. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 13, n. 4, p. 1064-1077, 2011.

ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates, **Journal of Phycology**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1968.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, M. G. **Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água**. 2011. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ARÁOZ, R.; MOLGÓ, J.; MARSAC, N. T. Neurotoxic cyanobacterial toxins. **Toxicon**, Kidlington, v. 56, p. 813-828, 2010.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystin during renal dialysis treatment in Caruaru. **Toxicology**, Clare, v. 181-182, p. 441-446, 2002.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 75, 2008.

BAKER, J. A.; ENTSCH, B.; NEILAN, B. A.; MCKAY, D. B. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 12, p. 6070–6076, 2002.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1513-1518, 1979.

BOTES, D. P.; WESSELS, P. L.; KRUGER, H. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA e -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, p. 2747-2748, 1985. DOI: 10.1039/P19850002747

BROCKS, J. J.; LOGAN, G. A.; BUICK, R.; SUMMONS, R. E. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. **Science**, Washington, DC, v. 285, p. 1033-1036, 1999.

BRUNSON, M. W.; LUTZ, C. G.; DURBOROW, R. M. **Algae blooms in commercial fish production ponds**. Stoneville, MS: Southern Regional Aquaculture Center, 1994. (SRAC Publication, 466).

BUICK, R. The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. **Science**, Washington, DC, v. 255, n. 5040, p. 74-77, 1992.

BURJA, A. M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J. G.; WRIGHT, P. C. Marine cyanobacteria: a prolific source of natural products. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 57, p. 9347-9377, 2001.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: RiMa, 2006. 109 p.

CANCHAYA, C.; PROUX, C.; FORNOUS, G.; BRUTTIN, A.; BRÜSSOW, H. Prophage genomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, n. 2, p. 238-276, 2003.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 270, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W. W.; EVANS, W. R.; YIN, Q. Q.; BELL, P.; MOCZYDLOWSKI, E. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 5, p. 3104-3110, 1997.

CARNEIRO, R. L.; SANTOS, M. E. V.; PACHECO, A. B. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 481-488, 2009.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CASTENHOLZ, R. W. General characteristics of the cyanobacteria. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. chap. 10, p. 474-487.

CASTRO, D.; VERA, D.; LAGOS, N.; GARCÍA, C.; VÁSQUEZ, M. The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. **Toxicon**, Kidlington, v. 44, n. 5, p. 483-489, 2004.

CEMBELLA, A. D. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: ANDERSON, D. M., CEMBELLA, A. D., HALLEGRAEFF, G. M. **Physiological ecology of harmful algal blooms**. Heidelberg: Springer, 1998. p. 381-403. (NATO ASI Series G: Ecological Sciences, 41).

CHEN, I.; DUBNAU, D. DNA uptake during bacterial transformation. **Nature Reviews – Microbiology**, London, v. 2, p. 241-249, 2004.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health, consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. 416 p.

CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 185, n. 2, p. 564-572, 2003.

CHRISTIANSEN, G.; MOLITOR, C.; PHILMUS, B.; KURMAYER, R. Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1695-1704, 2008.

DAVIS, T. W.; BERRY, D. L.; BOYER, G. L.; GOBLER, C. J. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 715-725, 2009.

DE RÓS, P. C. M. D.; SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F., CASTRO, H. F. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 84, p. 177-182, 2012.

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. **Annual Review on Microbiology**, Palo Alto, v. 64, p. 475-493, 2010.

DIAS, E.; PEREIRA, P.; FRANCA, S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, Malden, v. 38, p. 705-712, 2002.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis, and impact on human affairs. **Molecular Nutrition & Food Research**, Malden, v. 50, p. 7-17, 2006.

DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, 2012. DOI: 10.1111/1574-6976.12000.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, 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**, New York, v. 8, p. 175-185, 1998.

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

FIORE, M. F.; HONDA, R. Y. Fixação do N<sub>2</sub> por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, 2008. v. 1, p. 69-96.

FIORE, M. F.; ALVARENGA, D. O.; SILVA-STENICO, M. E. Genética de cianotoxinas. **Microbiologia in Foco**, São Paulo, v. 12, p. 24-35, 2011.

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.

FIORE, M. F.; GENUÁRIO, D. B.; DA SILVA, C. S. P.; SHISHIDO, T. K.; MORAES, L. A. B.; NETO, R. C.; SILVA-STENICO, M. E. Microcystin production by a freshwater spring cyanobacterium of the genus *Fischerella*. **Toxicon**, Kidlington, v. 53, n. 7-8, p. 754-761, 2009.

FRANGÓPULOS, M.; GUISANDE, C.; DEBLAS, E.; MANEIRO, I. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 3, p. 131-139, 2004.

FRIAS, H. V.; MENDES, M. A.; CARDOZO, K. H.; CARVALHO, V. M.; TOMAZELA, D.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Use of electrospray tandem mass spectrometry for identification of microcystins during a cyanobacterial bloom event. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 344, n. 3, p. 741-746, 2006.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 38, p. 97-125, 2008.

GARCÍA, C.; LAGOS, M.; TRUAN, D.; LATTES, K.; VÉJAR, O.; CHAMORRO, B.; IGLESIAS, V.; ANDRINOLO, D.; LAGOS, N. Human intoxication with paralytic shellfish toxins: Clinical parameters and toxin analysis in plasma and urine. **Biological Research**, Santiago, v. 38, p. 197-205, 2005.

GARRIDO, R.; LAGOS, N.; LATTES, K.; ABEDRAPO, M.; BOCIC, G.; CUNEO, A.; CHIONG, H.; JENSEN, C.; AZOLAS, R.; HENRIQUEZ, A.; GARCIA, C. Gonyatoxin: new treatment for healing acute and chronic anal fissures. **Diseases of the Colon & Rectum**, Philadelphia, v. 48, p. 335-343, 2005.

GILLESPIE, J. J.; WATTAM, A. R.; CAMMER, S. A.; GABBARD, J.; SHUKLA, M. P.; DALAY, O.; DRISCOLL, T.; HIX, D.; MANE, S. P.; MAO, C.; NORDBERG, E. K.; SCOTT, M.; SCHULMAN, J. R.; SNYDER, E. E.; SULLIVAN, D. E.; WANG, C.; WARREN, A.; WILLIAMS, K. P.; XUE, T.; YOO, H. S.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; WILL, R.; KENYON, R. W.; SOBRAL, B. W. PATRIC: The comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 79, n. 11, p. 4286-4298, 2011.

GOLD. Genomes Online Database. *Microcystis*. Disponível em: <http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/Search.cgi>.

GOLDBERG, J.; HUANG, H.; KWON, Y.; GREENGARD, P.; NAIM, A. C.; KURIYAN, J. Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. **Nature**, London, v. 376, p. 745-753, 1995.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, Berlin, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRAY, Y. H. M. It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 461-468, 2000.

GROMOV, B. V.; VEPRITSKIY, A. A.; TITOVA, N. N.; MAMKAYEVA, K. A.; ALEXANDROVA, O. V. Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium). **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 3, p. 55-59, 1991.

HACKETT, J. D.; WISECAVER, J. H.; BROSNAHAN, M. L.; KULIS, D. K.; ANDERSON, D. M.; BHATTACHARYA, D.; PLUMLEY, F. G.; ERDNER, D. L. Evolution of saxitoxin synthesis in cyanobacteria and dinoflagellates. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 70-78, 2013.

HALL, T. **Bioedit** – Versão 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, 2001.

HARDOIM, C. C. P.; COSTA, R.; ARAÚJO, F. V.; HAJDU, E.; PEIXOTO, R.; LINS, U.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D. Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 10, p. 3331-3343, 2009.

HERNANDEZ, D.; FRANCOIS, P.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; SCHRENZEL, J. De Novo bacterial genome sequencing: millions of very short reads assembled on a desktop computer. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 802-809, 2008.

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

HONDA, R. Y. **Estudos taxonômicos e de desenvolvimento in vitro de Microcystis spp. (Cyanobacteria/Cyanophyceae) isoladas de corpos d'água do Estado de São Paulo**. 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, São Paulo, 2005. 82 p.

HONKANEN, R. E.; ZWILLER, J.; MOORE, R. E.; DAILY, S. L.; KHATRA, B. S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A. L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 265, n. 32, p. 19401-19404, 1990.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, Washington, DC, v. 327, p. 167-170, 2010.

HÜGLER, M.; SIEVERT, S. M. Beyond the calvin cycle: autotrophic carbon fixation in the ocean. **Annual Review of Marine Science**, Palo Alto, v. 3, p. 261-289, 2011.

JANSE, I.; KARDINAAL, W. E. A.; MEIMA, M.; FASTNER, J.; VISSER, P. M.; ZWART, G. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 7, p. 3979–3987, 2004.

JOHN, E. H.; FLYNN, K. J. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N[*ratio*]P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. **European Journal of Phycology**, Abingdon, v. 35, n. 1, p. 11-23, 2000.

JORE, M. M.; BROUNS, S. T.; OOST, J. RNA in defense: CRISPRs protect prokaryotes against mobile genetic elements. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 4, n. 6, p. a003657. DOI: 10.1101/cshperspect.a003657, 2012.

JOUNG, S. H.; OH, H. M.; KO, S. R.; AHN, C. Y. Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 188–193, 2010.

KAEBERNICK, M.; NEILAN, B. A. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 1-9, 2001.

KAEBERNICK, M.; ROHRLACK, T.; CHRISTOFFERSEN, K.; NEILAN, B. A. A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 3, n. 11, p. 669–679, 2001.

KANEKO, T.; NAKAJIMA, N.; OKAMOTO, S.; SUZUKI, I.; TANABE, Y.; TAMAOKI, M.; NAKAMURA, Y.; KASAI, F.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; KISHIDA, Y., ONO, A.; SHIMIZU, Y.; TAKAHASHI, C.; MINAMI, C.; FUJISHIRO, T.; KOHARA, M.; KATOH, M.; NAKAZAKI, N.; NAKAYAMA, S.; YAMADA, M.; TABATA, S.; WATANABE, M. M. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. **DNA Research**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 247-256, 2007.

KAPLAN, A.; HAREL, M.; KAPLAN-LEVY, R. N.; HADAS, O.; SUKENIK, A.; DITTMAN, E. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 138, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00138.

KARDINAAL, W. E. A.; TONK, L.; JANSE, I.; HOL, S.; SLOT, P.; HUISMAN, J.; VISSER, P. M. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 9, p. 2939-2946, 2007.

KEHR, J.-C.; PICCHI, D. G.; DITTMANN, E. Natural product biosynthesis in cyanobacteria: a treasure trove of unique enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Frankfurt, v. 7, p. 1622-1635, 2011.

KELLMANN, R.; NEILAN, B.A. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis in vitro. **Journal of Phycology**, Malden, v. 43, p. 497-508, 2007.

KELLMANN, R.; MIHALI, T. K.; JEON, Y. J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B. A. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 13, p. 4044-4053, 2008a.

KELLMANN, R.; MIHALI, T. K.; NEILAN, B. A. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 67, p. 526-538, 2008b.

KOMÁREK, J. Coccoid and colonial Cyanobacteria. In: WEHR, J.D., SHEATH, R.G. (Ed.). **Freshwater algae of North America: ecology and classification**. San Diego: Academic Press, 2003. p. 59-116.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa** 19/1, Jena: Gustav Fischer, 1998.

KOMÁREK, J.; HAUER, T. CyanoDB.cz: The on-line database of cyanobacterial genera. České Budějovice, República Tcheca: University of South Bohemia, 2012. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz/>>.

KOMÁREK, J.; NEDBALOVÁ, L.; HAUER, T. Phylogenetic position and taxonomy of three heterocytous cyanobacteria dominating the littoral of deglaciated lakes, James Ross Island, Antarctica. **Polar Biology**, New York, v. 35, n. 5, p. 759-774, 2012.

KURMAYER, R.; KUTZENBERGER, T. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 11, p. 6723-6730, 2003.

LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P. A.; ANDRINOLO, D.; AZEVEDO, S. M. F. Q.; OSHIMA, Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, Kidlington, v. 37, p. 1359-1373, 1999.

LANE, D. J. 16S/23 rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LANG, A. S.; BEATTY, J. T. Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 97, n. 2, p. 859-864, 2000.

LANG, B. F.; BURGER, G. Purification of mitochondrial and plastid DNA. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 3, p. 652-660, 2007.

- LAWRENCE, J. F.; NIEDZWIADK, B.; MENARD, C. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 88, n. 6, p. 1714-1732, 2005.
- LEÃO, P. N.; ENGENE, N.; ANTUNES, A.; GERWICK, W. H.; VASCONCELOS, V. The chemical ecology of cyanobacteria. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 29, p. 372-391, 2012.
- LIN, S.; HAAS, S.; ZEMOJTEL, T.; XIAO, P.; VINGRON, M.; LI, R. Genome-wide comparison of cyanobacterial transposable elements, potential genetic diversity indicators. **Gene**, Amsterdam, v. 473, p. 139-149, 2011.
- LIPPEMEIER, S.; FRAMPTON, D. M. F.; BLACKBURN, S. I.; GEIER, S. C.; NEGRI, A. P. Influence of phosphorus limitation on toxicity and photosynthesis of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) monitored by in-line detection of variable chlorophyll fluorescence. **Journal of Phycology**, Malden, v. 38, p. 320–331, 2003.
- LLEWELLYN, L. E. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, p. 200-222, 2006.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K. A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G. A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 264, p. 187-192, 1990.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 9, p. 387-402, 2008.
- MAZODIER, P.; DAVIES, J. Gene transfer between distantly related bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 25, p. 147-171, 1991.
- MCDANIEL, L. D.; YOUNG, E.; DELANEY, J.; RUHNAU, F.; RITCHIE, K. B.; PAUL, J. H. High frequency of horizontal gene transfer in the oceans. **Science**, Washington, DC, v. 330, p. 50, 2010.
- MIHALI, T. K.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. A. Characterization of the paralytic shellfish toxin biosynthesis gene clusters in *Anabaena circinalis* AWQC131C and *Aphanizomenon* sp. NH-5. **BMC Biochemistry**, London, v. 10, n. 8, 2009. DOI: 10.1186/1471-2091-10-8.
- MIHALI, T. K.; CARMICHAEL, W. W.; NEILAN, B. A. A putative gene cluster from a *Lyngbya wollei* bloom that encodes paralytic shellfish toxin biosynthesis. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 2, e14657, 2011.
- MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. Evolutionary affiliations with the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 56, p. 446-457, 2003.

MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 11, p. 6353-6362, 2004.

MOUSTAFA, A.; LORAM, J. E.; HACKETT, J. D.; ANDERSON, D. M.; PLUMLEY, F. G.; BHATTACHARYA, D. Origin of saxitoxin biosynthetic genes in cyanobacteria. **PLoS One**, São Francisco, v. 4, n. 6, e.5758, 2009.

MULLENBACH, J. P.; LAGODA, L.; WELTER, C. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 5, p. 391, 1989.

MURRAY, S. A.; MIHALI, T. K.; NEILAN, B. A. Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 1173-1182, 2011.

NAKASUGI, K.; ALEXOVA, R.; SVENSON, C. J.; NEILAN, B. A. Functional analysis of PilT from the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 189, n. 5, p. 1689-1697, 2007.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K. L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 373-384, 1996.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. **On line database**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

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

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGANUMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W. W.; FUJIKI, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, New York, v. 118, p. 420-424, 1992.

ODEBRECHT, C.; GARCIA, V. M. T.; AZEVEDO, S. M. F. O.; HUSZAR, V. L. M.; MAGALHAES, V. F.; MENEZES, M.; PROENÇA, L. A. O.; RÖRIG, L. R.; TENENBAUM, D. R.; VILLAC, M. C.; YUNES, J. S. Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: estado del arte y proyectos en curso. In: SAR, E. A.; FERRARIO, M. E.; REGUERRA, B. **Floraciones algales nocivas en el cono sur Americano**. Madrid: Instituto Español de Oceanografía, 2002. p. 219-233.

OTSUKA, S.; SHOICHIRO, S.; LI, R.; MATSUMOTO, S.; WATANABE, M. M. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 46, n. 1, p. 39-50, 2000.

PARK, H.-D.; WATANABE, M. F.; HARADA, K.-I.; NAGAI, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.; HAYASHI, H. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. **Natural Toxins**, New York, v. 1, n. 6, p. 353-360, 1993.

PARKER, D. L. Improved procedures for the cloning and purification of *Microcystis* cultures (Cyanophyta). **Journal of Phycology**, New York, v. 18, n. 4, p. 471–477, 1982.

PEARSON, L. A.; NEILAN, B. A. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, p. 281-288, 2008.

PEARSON, L. A.; BARROW, K. D.; NEILAN, B. A. Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, n. 7, p. 4681-4692, 2007.

PEARSON, L. A.; HISBERGUES, M.; BÖRNER, T.; DITTMANN, E.; NEILAN, B. A. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 11, p. 6370-6378, 2004.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, p. 1650-1680, 2010.

POMATI, F.; ROSSETTI, C.; MANAROLLA, G.; BURNS, B. P.; NEILAN, B. A. Interactions between intracellular Na<sup>+</sup> levels and saxitoxin production in *Cylindrospermopsis raciborskii* T3. **Microbiology**, New York, v. 150, p. 455-461, 2004.

RANTALA, A.; FEWER, D. P.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VAITOMAA, J.; BÖRNER, T.; SIVONEN, K. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 101, n. 2, p. 568-573, 2004.

RAVN, H.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; NIELSEN, P.H.; OSHIMA, Y. Standardized extraction method for paralytic shellfish toxins in phytoplankton. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 7, p. 589-594, 1995.

REFSEQ: NCBI Reference Sequence Database. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>.

RIGONATO, J.; ALVARENGA, D. O.; ANDREOTE, F. D.; DIAS, A. C. F.; MELO, I. S.; KENT, A.; FIORE, M. F. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 312-322, 2012.

RINEHART, K. L.; NAMIKOSHI, M.; CHOI, B. M. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 6, p. 159-176, 1994.

RIPPKA, R. Isolation and purification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology. Cyanobacteria**, New York, v. 167, p. 3-27, 1988.

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

RISSETTI, C. H. **Moléculas bioativas e filogenia de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Dolichospermum*, *Sphaerospermopsis*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis***. 2012. 143 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2000. p. 365-386.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, p. 944-945, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1626 p.

SANT'ANNA, C.; AZEVEDO, M. T. P.; SENNA, P. A. C.; KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Planktic cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 213-227, 2004.

SANT'ANNA, C. L.; CARVALHO, L. R.; FIORE, M. F.; SILVA-STENICO, M. E.; LORENZI, A. S.; RIOS, F. R.; KONNO, K.; GARCIA, C.; LAGOS, N. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain, isolated from São Paulo-Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. **Neurotoxicity Research**, New York, v. 19, n. 3, p. 389-402, 2011.

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

SCHATZ, D.; KEREN, Y.; HADAS, O.; CARMELI, S.; SUKENIK, A.; KAPLAN, A. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 7, n. 6, p. 798-805, 2005.

SEVRIN-REYSSAC, J.; PLETIKOSIC, M. Cyanobacteria in fish ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 1-20, 1990.

SIELAFF, H.; DITTMANN, E.; TANDEAU DE MARSAC, N.; BOUCHIER, C.; DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; SCHWECKE, T. The *mcyF* gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 373, p. 909-916, 2003.

SILVA-STENICO, M. E.; LORENZI, A. S.; SILVA, C. S. P.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F. Inibidores de proteases produzidos por cianobactérias: uma revisão. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 183-209, 2012.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water**. 1. ed. London: E&FN Spon, 1999. p. 41–111.

SOTO-LIEBE, K.; MURILLO, A. A.; KROCK, B.; STUCKEN, K.; FUENTES-VALDÉS, J. J.; TREFAULT, N.; CEMBELLA, A.; VÁSQUEZ, M. Reassessment of the toxin profile of *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 and function of putative sulfotransferases in synthesis of sulfated and sulfonated PSP toxins. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 8, p. 1350-1361, 2010.

STRIEKER, M.; TANOVIC', A.; MARAHIEL, M. M. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 20, p. 234–240, 2010.

STUCKEN, K.; MURILLO, A. A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDÉS, J. J.; MÉNDEZ, M. A.; VÁSQUEZ, M. Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 32, p. 37-48, 2009.

STUCKEN, K.; JOHN, U.; CEMBELLA, A.; MURILLO, A. A.; SOTO-LIEBE, K.; FUENTES-VALDES, J. J.; FRIEDEL, M.; PLOMINSKY, A. M.; VASQUEZ, M.; GLOCKNER, G. The smallest known genomes of multicellular and toxic cyanobacteria: comparison, minimal gene sets for linked traits and the evolutionary implications. **PLoS One**, São Francisco, v. 5, n. 2, E9235, 2010.

STÜKEN, A.; ORR, R. J. S.; KELLMANN, R.; MURRAY, S. A.; NEILAN, B. A.; JAKOBSEN, K. S. Discovery of nuclear-encoded genes for the neurotoxin saxitoxin in dinoflagellates. **PLoS One**, São Francisco, v. 6, n. 5, e20096, 2011.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TANABE, Y.; SANO, T.; KASAI, F.; WATANABE, M. M. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, n. 115, 2009. DOI:10.1186/1471-2148-9-115.

TEIXEIRA, M. G. L. C.; COSTA, M. C.; DE CARVALHO, V. L.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of Pan American Health Organization**, Washington, DC, v. 27, n. 3, p. 244-253, 1993.

TILLET, D.; PARKER, D. L.; NEILAN, B. A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, Dc, v. 67, n. 6, p. 2810-2818, 2001.

TILLETT, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; DÖHREN, H.; BÖRNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 7, n. 10, p. 753-764, 2000.

TOMINAGA, H.; KAWAGISHI, S.; ASHIDA, H.; SAWA, Y.; OCHIAI, H. Structure and replication of cryptic plasmids, pMA1 and pMA2, from a unicellular cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 7, p. 1217-1220, 1995.

TOMINAGA, H.; SOEJIMA, K.; KAWAGISHI, S.; ASHIDA, H.; SAWA, Y.; OCHIAI, H. Structural organization of a cryptic plasmid, pMA1, from *Microcystis aeruginosa* Kutz. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 57, n. 9, p. 1503-1507, 1993.

TOMITANI, A.; KNOLL, A. H.; CAVANAUGH, C. M.; OHNO, T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 14, p. 5442-5447, 2006.

THOMPSON, A. S.; RHODES, J. C.; PETTMAN, I. **Culture collection of algae and protozoa, catalogue of strains**. Swindon, UK: National Environment Research Council, 1988.

URBACH, E.; SCANLAN, D. J.; DISTEL, D. L.; WATERBURY, J. B.; CHISHOLM, S. W. Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 46, p. 188-201, 1998.

WALLACE, M. M.; MILLER, D. W.; RAPS, S. Characterization of pMa025, a plasmid from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* UV025. **Archive of Microbiology**, New York, v. 177, n. 4, p. 332-338, 2002.

WALSBY, A. E. Gas vesicles. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 58, n. 1, p. 94-144, 1994.

WATERBURY, J. B.; RIPPKA, R. Subsection I. Order Chroococcales Wettstein 1924, emend. Rippka et al., 1979. In: STALEY, J. T.; BRYANT, M. P.; PFENNIG, N.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 1728-1746.

WELKER, M.; MARSÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L.; VON DÖHREN, H. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: Toward an understanding of metabolic diversity. **Peptides**. New York, v. 27, 2090-2103, 2006.

WELKER, M.; VON DÖHREN, H.; TAUSCHER, H.; STEINBERG, C. E. W.; ERHARD, M. Toxic *Microcystis* in shallow Lake Müggelsee (Germany): dynamics, distribution, diversity. **Archiv für Hydrobiologie**, Stuttgart, v. 157, n. 2, p. 227-248, 2003.

WHITTON, B. A. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: MANN N. H.; CARR N. G. **Photosynthetic prokaryotes**. New York: Plenum Press, 1992. p. 1-51.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of Cyanobacteria**: Their diversity in time and space. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 649 p.

WILSON, A. E.; SARNELLE, O.; NEILAN, B. A.; SALMON, T. P.; GEHRINGER, M. M.; HAY, M. E. Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 10, p. 6126-6133, 2005.

YANG, Z.; KONG, F.; SHI, X.; CAO, H. Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 563, n. 1, p. 225–230, 2006.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; HOSODA, N.; HIROISHI, S. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, Oxford, v. 266, n. 1, p. 49–53, 2007.

YUNES, J. S.; DE LA ROCHA, S.; GIROLDO, D.; SILVEIRA, S. B.; COMIN, R.; BICHO, M. S.; MELCHER, S. S.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Release of carbohydrates and proteins by a subtropical strain of *Raphidiopsis brookii* (Cyanobacteria) able to produce saxitoxin at three nitrate concentrations. **Journal of Phycology**, Malden, v. 45, p. 585-591, 2009.

ZAGATTO, P. A.; ARAGAO, M. A.; CARVALHO, M. C. **Manual de orientação em casos de florações de algas tóxicas**: um problema ambiental e de saúde pública. São Paulo: CETESB, 1997. (Série Manuais, 14).

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 821-829, 2008.

ZHU, J.; DU, S.; LI, X.; LI, M. Phylogenetic analyses of *Microcystis* based on *mcyJ* gene sequence. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON REMOTE SENSING, ENVIRONMENT AND TRANSPORTATION ENGINEERING, 2011, Nanjing, China. **Proceedings...** Nanjing, China: IEEE, 2011.

**ANEXOS**

**ANEXO A - Meios de cultura utilizados****Meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração Final no meio (g.L<sup>-1</sup>)</b>
NaNO <sub>3</sub>	1,7. 10 <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,1.10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,9.10 <sup>-2</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,9.10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,74.10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,66.10 <sup>-2</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48.10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39.10 <sup>-3</sup>
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,08.10 <sup>-3</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	3,35.10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,9.10 <sup>-5</sup>
CuCl <sub>2</sub>	1,4.10 <sup>-6</sup>
EDTA.Na <sub>2</sub>	7,44.10 <sup>-3</sup>

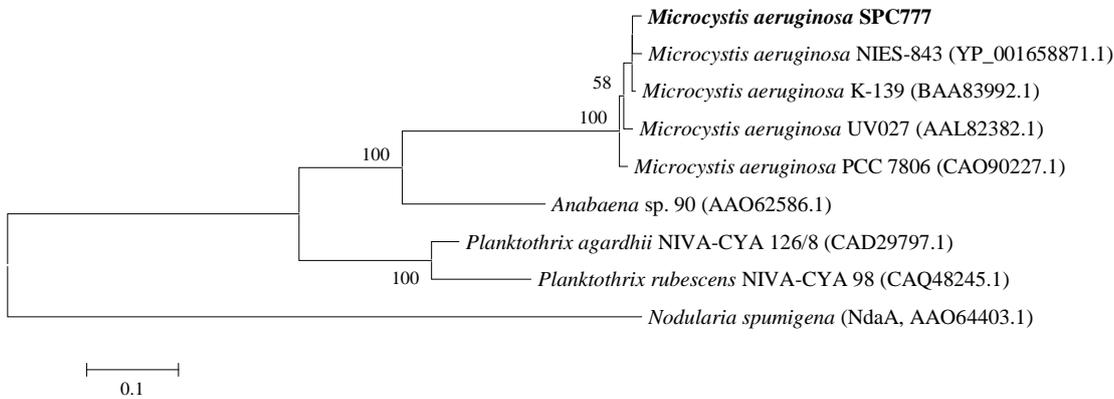
**Meio de cultura BG-11 (ALLEN, 1968)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração Final no meio (g.L<sup>-1</sup>)</b>
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5.10 <sup>-2</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,6.10 <sup>-2</sup>
Ácido cítrico	6.10 <sup>-3</sup>
Citrato de amônio férrico	6.10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA	1.10 <sup>-3</sup>
Carbonato de sódio	2.10 <sup>-2</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86.10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81.10 <sup>-3</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,22.10 <sup>-4</sup>
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,9.10 <sup>-4</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	7,9.10 <sup>-5</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	4,9.10 <sup>-5</sup>

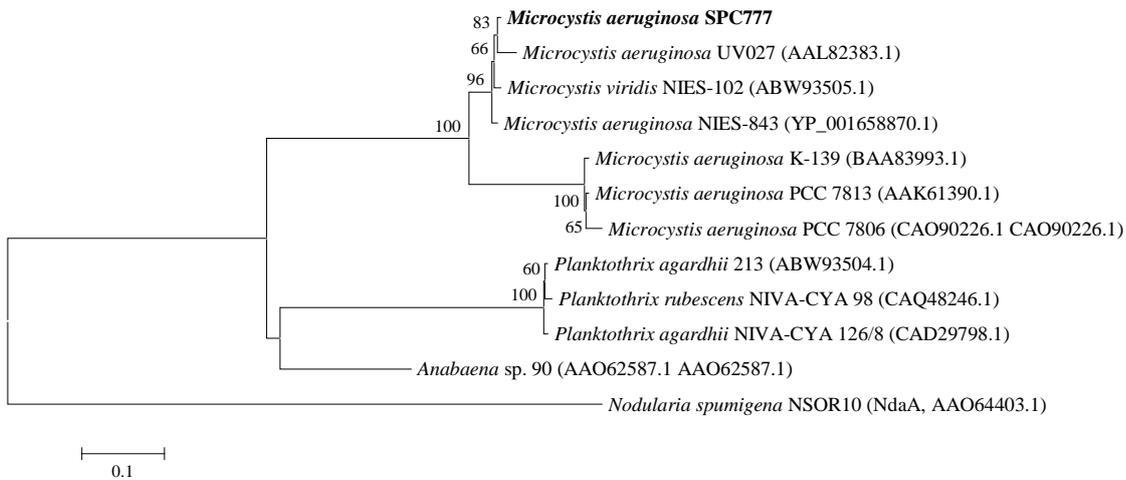
**Meio de cultura JM ("Jaworski Medium", THOMPSON; RHODES; PETTMAN, 1988)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentração Final no meio (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2.10 <sup>-2</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,24.10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub>	5.10 <sup>-2</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	1,59.10 <sup>-2</sup>
EDTA FeNa	2,25.10 <sup>-3</sup>
EDTA Na <sub>2</sub>	2,25.10 <sup>-3</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,48.10 <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,39.10 <sup>-3</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.10 <sup>-3</sup>
Cianocobalamina (Vitamina B <sub>12</sub> )	4.10 <sup>-6</sup>
Tiamina HCl (Vitamina B <sub>1</sub> )	2,2.10 <sup>-7</sup>
Biotina	2,2.10 <sup>-7</sup>
NaNO <sub>3</sub>	8.10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3,6.10 <sup>-2</sup>

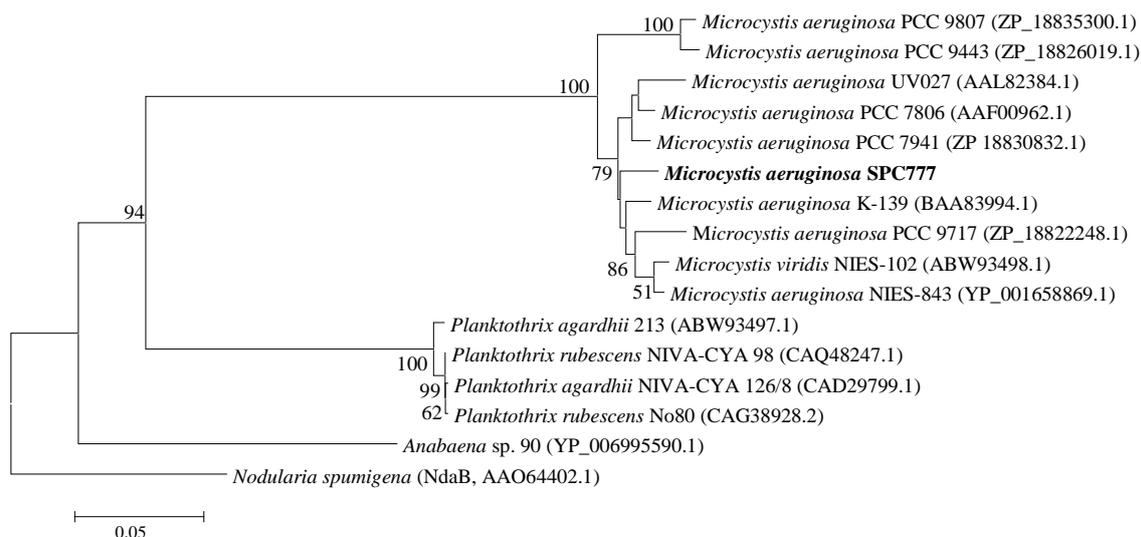
**ANEXO B -** Árvores filogenéticas das sequências de aminoácidos das enzimas envolvidas na biossíntese de microcistinas em *M. aeruginosa* SPC777: McyA, McyB, McyC, McyD, McyE, McyF, McyG, McyH, McyI e McyJ



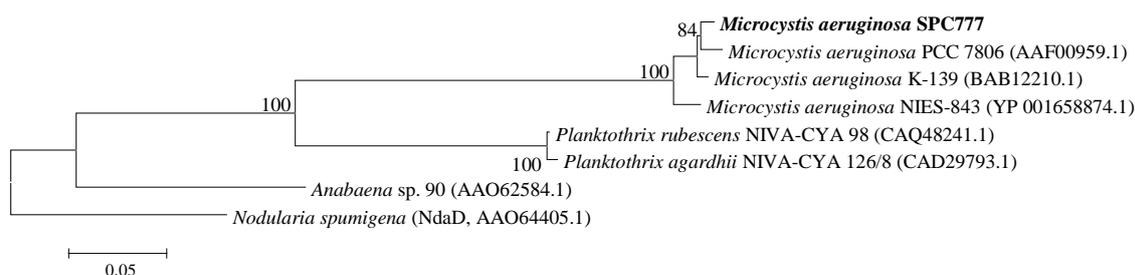
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyA de *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



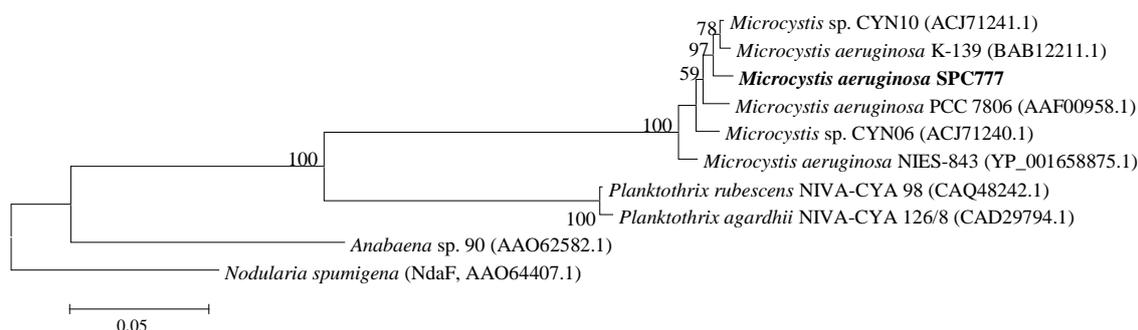
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyB de *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



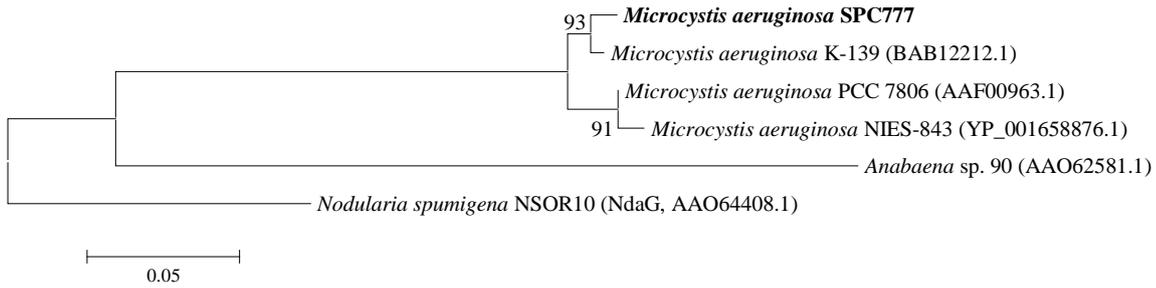
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyCde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



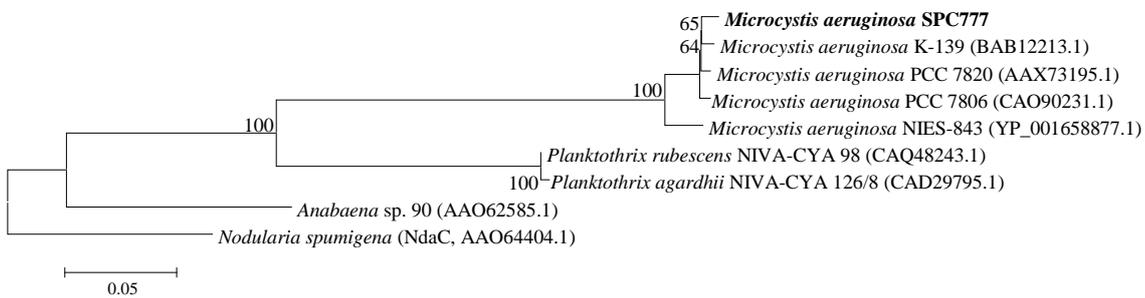
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyDde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



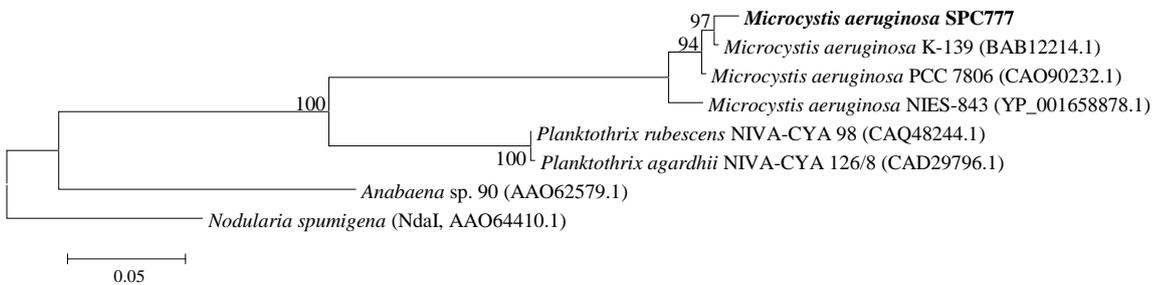
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyEde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



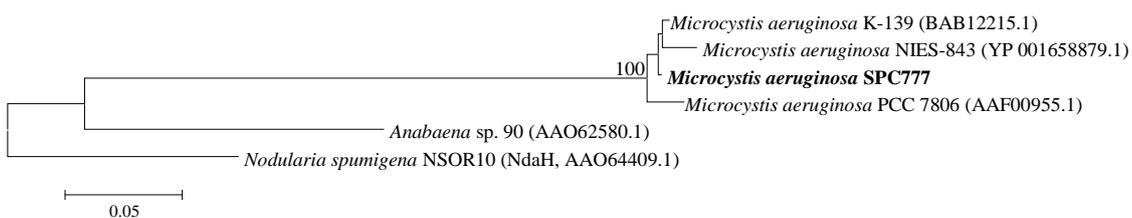
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyFde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



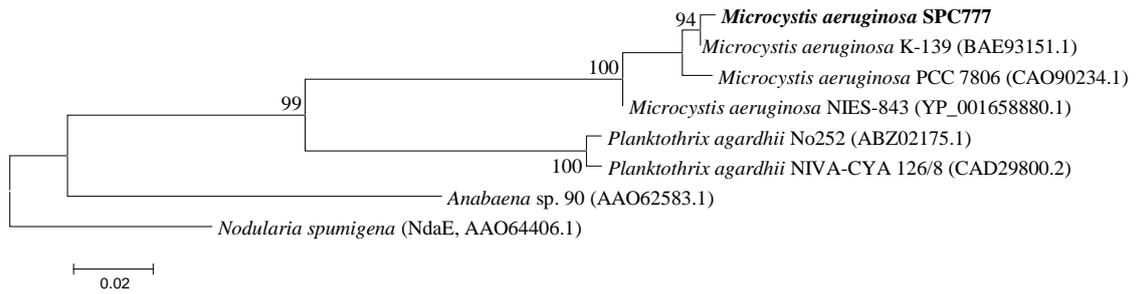
Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyGde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyHde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyIde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.



Árvore filogenética (Máxima Verossimilhança) da sequência de aminoácidos de McyJde *M. aeruginosa* SPC777. Valores de reamostragem acima de 50 % estão apresentados em cada nó.