UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAFAEL VICENTINI POPIN

Análise genômica e funcional da *Nodularia spumigena* CENA596 formadora de florações em tanques de produção de camarões

Piracicaba 2017

RAFAEL VICENTINI POPIN

Análise genômica e funcional da *Nodularia spumigena* CENA596 formadora de florações em tanques de produção de camarões

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente Orientador: Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore

Piracicaba

2017

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

Popin, Rafael Vicentini

Análise genômica e funcional da *Nodularia spumigena* CENA596 formadora de florações em tanques de produção de camarões / Rafael Vicentini Popin; orientadora Marli de Fátima Fiore. - Piracicaba, 2017.

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

1. Cyanophyta 2. Espectrometria de massas 3. Genomas 4. Saúde pública 5. Toxinas I. Título

CDU 575.111 (575.112 + 543.51)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela oportunidade de desenvolver este estudo e por todos os ensinamentos.

Às técnicas Ana Paula Dini Andreote e Renata Cruz, por toda a ajuda fornecida, paciência e pela organização dos ambientes de trabalho.

Aos doutores Vinicius Augusto Carvalho de Abreu e Janaina Rigonato, por toda ajuda, colaborações, conselhos e companhia.

Aos doutores Karina Heck da Silva e Danillo Oliveira de Alvarenga, pelos conselhos e por toda a ajuda oferecida.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, Bruno Costa Evangelista de Souza, Stella Thomaz de Lima, Bruno Weiss pelo companheirismo, ajuda e conversas.

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto e em especial ao Dr. Felipe Augusto Dörr pela parceria nas análises químicas.

Ao Prof. Dr. Lehmann Coutinho e sua equipe pelo sequenciamento genômico.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, Juliana Costa e Thierry Pellegrinetti pelo companheirismo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e seus funcionários, pela infraestrutura e apoio que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento deste projeto.

À todas aos professores e pessoas que de maneira direta ou indiretamente participaram deste trabalho.

RESUMO

POPIN, R. P. Análise genômica e funcional da *Nodularia spumigena* CENA596 formadora de florações em tanques de produção de camarões. 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Nodularia spumigena é uma espécie cianobacteriana conhecida como produtora da hepatotoxina nodularina. Essa cianotoxina é uma potente e irreversível inibidora de proteínas fosfatases da família serina/treonina (PP1 e PP2A) de células eucarióticas e é uma promotora tumoral e suspeita carcinogéna. Além da nodularina, a N. spumigena também é produtora de outros peptídeos não ribossômicos, tais como espumiginas, aeruginosinas e anabaenopeptinas. O primeiro relato de N. spumigena formadora de florações no Brasil ocorreu em 2011 em tanques de produção de camarões no Rio Grande, RS, e estimulou o interesse na obtenção de informações sobre o seu genoma e potencial biossíntético. Dessa forma, a objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos genômicos e funcionais da linhagem Nodularia spumigena CENA596 isolada de um tanque de produção de camarões de Rio Grande. Para isso, uma cultura da linhagem N. spumigena CENA596 foi submetida a um tratamento com hipoclorito de sódio (2%) para eliminação de contaminantes e o DNA extraído das células tratadas foi sequenciado na plataforma MiSeq e analisado com ferramentas genômicas. O sequenciamento e a montagem do seu genoma originaram 291 sequências contíguas com percentual GC de 41,19 e tamanho total de 5.189.679 pb. A análise filogenética baseada na sequência do gene que codifica o 16S rRNA agrupou a linhagem CENA596 com outras de N. spumigena da Austrália e América do Norte. Na árvore filogenômica construída com as sequências concatenadas de 31 proteínas, a linhagem brasileira CENA596 agrupou-se com valor de reamostragem de 100% com a N. spumigena CCY9414 originária do mar Báltico. As análises comparativas entre os genomas dessas duas linhagens indicaram um grande número de genes compartilhados, os quais estão relacionados principalmente ao metabolismo primário das células. Por outro lado, foram encontrados genes específicos para cada uma delas que estão envolvidos em respostas celulares a estresses oxidativos, patógenos e antibióticos. A mineração do genoma da N. spumigena CENA596 revelou 13 agrupamentos gênicos hipoteticamente relacionados à síntese de metabólitos secundários, a maioria dos quais mostrou similaridade significativa com agrupamentos conhecidos. As análises químicas confirmaram a produção de duas variantes de nodularina, espumigina, namalida, aeruginosina e aminoácidos tipo micosporina, e uma variante de geosmina. A linhagem brasileira N. spumigena CENA596 mostrou-se capaz de produzir uma variedade significante de moléculas bioativas e seu genoma revelou-se ser consideravelmente conservado em relação ao genoma da linhagem CCY9414, a qual é conhecida por causar grandes florações tóxicas no Mar Báltico.

Palavras-chave: Agrupamento gênico. Cianotoxinas. Genoma. Espectrometria de massas. Genômica comparativa.

ABSTRACT

POPIN, R. P. Genomic and functional analysis of the bloom-forming *Nodularia spumigena* **CENA596 in shrimp production ponds**. 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Nodularia spumigena is a cyanobacterial species known as a producer of the hepatotoxin nodularin. This cyanotoxin is a potent and irreversible inhibitor of eukaryotic cell serine/threonine protein phosphatases (PP1 and PP2A) and is a tumor promoter and suspected carcinogen. In addition to nodularin, N. spumigena is also produces other non-ribosomal peptides, such as spumigins, aeruginosines and anabaenopeptins. The first report of bloomforming N. spumigena in Brazil occurred in 2011 in shrimp production ponds, Rio Grande, RS, and stimulated interest in obtaining information on its genome and biosynthetic potential. Thus, the objective of this study was to evaluate the genomic and functional aspects of the strain N. spumigena CENA596 isolated from a shrimp production pond of the Rio Grande. For this, a culture of the strain N. spumigena CENA596 was submitted to a treatment with sodium hypochlorite (2%) to eliminate contaminants and the DNA extracted from treated cells was sequenced in a platform MiSeq and analyzed with genomic tools. Genome sequencing and assembly resulted in 291 contiguous sequences with GC percentage of 41.19 and total size of 5,187,679 bp. Phylogenetic analysis based on the gene sequence encoding the 16S rRNA grouped the strain CENA596 with other N. spumigena from Australia and North America. In the phylogenomic tree constructed with the concatenated sequences of 31 proteins, the Brazilian strain CENA596 grouped with a bootstrap value of 100% with the N. spumigena CCY9414 originating from the Baltic sea. Comparative analyses between the genomes of these two strains indicated a large number of shared genes, which are mainly related to the primary metabolism of the cells. Otherwise, genes specific for each of the two strains were identified as involved in cellular responses to oxidative stress, pathogens and antibiotics. Genome mining revealed 13 gene clusters hypothetically related to the synthesis of secondary metabolites, most of which showed significant similarity to known clusters. Chemical analyses confirmed the production of two variants of nodularin, spumigin, namalide, aeruginosin and mycosporine-like amino acid, and one variant of geosmin. The Brazilian strain N. spumigena CENA596 was able to produce a significant variety of bioactive molecules and its genome revealed to be considerably conserved in relation to the genome of the strain CCY9414, which is known to cause large toxic blooms in the Baltic Sea.

Keywords: Gene cluster. Cyanotoxins. Genome. Mass spectrometry. Comparative genomics.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 - Nodularia spumigena: a= esquema dos tricomas; b= Fotomicrografia em microscópio |
|---|
| eletrônico de varredura (adaptado de PÉREZ et al., 1999 e DA SILVEIRA et al., 20017, em preparação); |
| c= Fotomicrografia em microscópio óptico mostrando as células vegetativas |
| (CV), heterócitos (H) e acinetos (A)19 |
| Figura 2 – Estrutura química da nodularina e da microcistina (adaptado de MOFFITT; |
| NEILAN, 2004) |
| Figura 3 - Estrutura química de 4 das 10 isoformas conhecidos da nodularina (adaptado de |
| CHEN et al., 2013) |
| Figura 4 – Estrutura química das isoformas da nodularina que apresentam alterações nos radicais |
| (adaptado de CHEN et al., 2013) |
| Figura 5 - Comparação da estrutura do agrupamento gênico nda na linhagem N. spumigena NSOR10 e |
| da microcistina na linhagem Microcystis aeroginosa PCC7806 (mcy) (adaptado de |
| MOFFITT; NEILAN, 2004) |
| Figura 6 - Modelo da via biossintética da nodularina catalizada por proteínas codificadas pelos genes |
| ndaA-H. Os quadrados representam os domínios de adenilação (A), proteína carreadora de peptidil |
| (PCP) e condensação (C) da NRPS. Os círculos representam os domínios cetossintase (KS), |
| aciltransferase (AT), C-metiltransferase (CM), dehidratase (DH), cetoredutase (KR) e proteína |
| carreadora de acil (ACP) da PKS. A enzima NdaE, uma O-metiltransferase (OM), cataliza a |
| transferência de um grupo metil para a hidroxila do C9. A NdaG, uma racemase, cataliza a epimerização |
| do resíduo Glu. O domínio da aminotransferase (AMT) cataliza a transferência do grupo amino para o |
| Adda. As reações de condensação do peptídeo são catalizadas pela NdaA e NdaB. A NdaH, uma |
| dehidrogenase putativa, cataliza a formação do resíduo MeDhb seguindo a formação da ligação |
| peptídica. O domínio da tioesterase (TE) catalisa a ciclização e liberação do |
| peptideo (adaptado de MOFFITT; NEILAN, 2004) |
| Figura 7 - Vista aérea da Estação Marinha de Aquacultura da FURG. Nota-se a coloração verde |
| característica de florações de cianobactérias em alguns tanques (MAURENTE, 2014) |
| Figura 8 - Qualidades Phred dos pares de bases durante leituras R1(A) e R2(B) do sequenciamento |
| genômico MiSeq em relação as posições das mesmas ao longo das sequências |
| Figura 9 - Árvore filogenômica utilizando a concatenação de 31 proteínas conservadas do genoma de |
| 77 linhagens cianobacterianas. As linhagens N. spumigena CENA596 e CCY9414 estão |
| exibidas em negrito |
| Figura 10 - Árvore filogenética utilizando a estimativa de máxima verossimilhança com base |
| nas sequências dos genes de 16S rRNA de diversas cianobactérias. A origem das linhagens e os números |
| de acesso das sequências no NCBI estão indicados ao lado do nome das linhagens. |
| As linhagens <i>N. spumigena</i> CENA596 e CCY9414 estão exibidas em negrito |
| Figura 11 – Anotação automática em subsistemas das linhagens N. spumigena CENA596 e |
| CCY9414 |
| Figura 12 – Análise de agrupamentos de genes homólogos nos genomas das linhagens N. spumigena |
| CENA596 e CCY9414 |
| Figura 13 - Anotação automática em subsistemas dos genes compartilhados pelas linhagens |
| <i>N. spumigena</i> CENA596 e CCY9414. Apenas 39% dos genes foram preditos e estão representados |
| na figura |
| Figura 14 - Resultado da predição automática do programa antiSMASH de agrupamentos gênicos na |
| linhagem CENA596. O Cluster 4 é composto dos agrupamentos gênicos da espumigina e |
| anabaenopeptina |
| |

Figura 15 – Filamentos da linhagem N. spumigena CENA596. É possível observar a flutuabilidade dos Figura 16 – Representação do agrupamento gênico nda nas linhagens N. spumigena CENA596, Figura 17 – Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem N. spumigena CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 825.4571([M+H]¹) para a NOD-R (A) e 811.4363([M+H]1) para a [D-Asp1]NOD (B). Em destaque estão as diferenças entre as Figura 18 - Representação dos agrupamentos gênicos spu e apt nas linhagens N. spumigena CENA596, Figura 19 - Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem N. spumigena CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 599.3212([M+H]¹) para a espumigina D (A) e 597.2928 ([M+H]¹) para a espumigina F (B). Em destaque estão as diferenças entre as Figura 20 - Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem N. spumigena CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 576.3416 ([M+H]¹) para a namalida A (A) e 562.3248 ([M+H]¹) para a namalida B (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes Figura 21 - Representação do agrupamento gênico aer nas linhagens N. spumigena CENA596 e Figura 22- Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem N. spumigena CENA596. Os picos com valores circulado indicam o íon molecular com sinal de m/z de 569.3403 ([M+H]¹) para a aeruginosina NAL2 (A) e 589.3728 ([M+H]¹) para a aeruginosina NOL3 (B). Em destaque estão as diferenças entre Figura 23 – Representação do agrupamento gênico geo na linhagem N. spumigena CENA596 e em Figura 24 - Análise por SPME-GC-MS da linhagem CENA596 e molécula da geosmina. O pico indica Figura 25 – Representação do agrupamento gênico gvp nas linhagens N. spumigena CENA596 e Figura 26 - Representação do agrupamento mys na linhagem N. spumigena CENA596 e Figura 27 - Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem N. spumigena CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 333.1264 ([M+H]¹) para a sinorina (A) e 347.1454 ($[M+H]^1$) para a porfira 334 (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes de Figura 28 - Representação do agrupamento scy nas linhagens N. spumigena CENA596 e

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das estatísticas das montagens dos genomas e das anotações em subsistemas das linhagens N. spumigena CENA596 e CCY9414......44 Tabela 2 – Produtos naturais conhecidos encontrados na linhagem N. spumigena CENA596. [M+H]+ Tabela 3 - Função proposta das proteínas NdaA-I codificadas pelo agrupamento gênico responsável pela biossíntese da NOD na linhagem N. spumigena CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de Tabela 4 - Conservação dos quatro sítios ligantes no domínio de adenilação dos genes ndaA, ndaB e Tabela 5 - Função proposta das proteínas AptA-F e SpuA-F codificadas pelos agrupamentos gênicos spu e apt da linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Tabela 6 - Conservação dos quatro sítios ligantes no domínio de ligação dos genes spuA-B. *Amino ácido desconhecido. –Amino ácido similar......57 Tabela 7 - Conservação dos seis sítios ligantes no domínio de ligação dos genes aptA-D. *Amino ácido Tabela 8 - Função proposta das proteínas AerB-M codificadas pelo agrupamento gênico responsável pela biossíntese da aeruginosina na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas Tabela 9 - Conservação dos 4 sítios ligantes no domínio de ligação dos genes aerB-M.-Amino ácido Tabela 10 - Função proposta das proteínas GeoA e Cnb1-2 codificadas pelo agrupamento gênico responsável pela biossíntese da geosmina na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outros genes de geosmina encontradas em genomas cianobacterianos.......63 Tabela 11 – Função proposta das proteínas GvpA-W codificadas pelo agrupamento gênico responsável pela biossíntese dos aerótopos na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas Tabela 12 – Função proposta das proteínas MysA-D codificadas pelo agrupamento gênico responsável pela biossíntese de aminoácidos semelhantes a micosporina na linhagem CENA596, e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Mys encontradas em genomas Tabela 13 – Função proposta das proteínas codificadas pelo agrupamento gênico responsável pela biossíntese dos citonemina (scy) na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas

| 1. | INTRODUÇÃO | 15 | | |
|--|---|----|--|--|
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 17 | | |
| 2.1 O cultivo de camarões em cativeiro e florações de cianobactérias | | | | |
| 2.2 | A Nodularia spumigena | 18 | | |
| 2.3 | A hepatotoxina nodularina | 19 | | |
| 2.3 | 1 A molécula | 19 | | |
| 2.3 | 2 Biossíntese da nodularina | 21 | | |
| 2.3 | 3 Mecanismo de ação e toxicidade | 24 | | |
| 2.3 | 4 Nodularina no ambiente | 25 | | |
| 2.4 | Mineração de agrupamentos gênicos em genomas cianobacterianos | 27 | | |
| 2.5 dete | 2.5 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) aplicada à análise de detecção de produtos naturais | | | |
| 3. | HIPÓTESE | 30 | | |
| 4. | OBJETIVO | 31 | | |
| 4.1 | Objetivo geral | 31 | | |
| 4.2 | Objetivos específicos: | 31 | | |
| 5. | MATERIAL E MÉTODOS | 32 | | |
| 5.1 | Origem e cultivo da linhagem N. spumigena CENA596 | 32 | | |
| 5.2 | Tratamento para redução de contaminantes na cultura | 33 | | |
| 5.3 | Verificação da pureza das culturas | 33 | | |
| 5.4 | Produção de biomassa | 33 | | |
| 5.5 | Extração de DNA total | 34 | | |
| 5.6 | Preparo da biblioteca genômica e sequenciamento | 34 | | |
| 5.7 | Montagem do genoma | 34 | | |
| 5.8 | Análise filogenômica e filogenética | 35 | | |
| 5.9 nati | 5.9 Anotação do genoma da N. spumigena CENA596 e potencial para a síntese de produtos naturais | | | |
| 5.1 | 0 Análise comparativa entre os genomas das N. spumigena CENA596 e CCY9414 | 36 | | |
| 5.1 | 1 Análises cromatográficas e por espectrometria de massas | 36 | | |

SUMÁRIO

| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
|---|----|
| 6.1 Tratamento para redução de contaminantes na cultura | 38 |
| 6.2 Análise de qualidade das sequências e montagem do genoma | 39 |
| 6.3 Análise filogenômica e filogenética | 40 |
| 6.4 Análise comparativa entre os genomas das N. spumigena CENA596 e CCY9414 | 43 |
| 6.4.1 Nodularinas | 52 |
| 6.4.2 Espumiginas e Anabaenopeptinas | 55 |
| 6.4.3 Aeruginosinas | 59 |
| 6.4.4 Geosmina | 62 |
| 6.4.5 Aerótopos | 63 |
| 6.4.6 Aminoácidos tipo micosporina | 65 |
| 6.4.7 Citonemina | 66 |
| | |
| 7. CONCLUSÕES | 69 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 70 |

1. INTRODUÇÃO

As florações de cianobactérias tóxicas em ecossistemas aquáticos, caracterizada pelo grande número de células na coluna d'água, são um problema no mundo todo, com tendência para aumentar de acordo com o cenário atual de alterações climáticas (O'NEIL et al., 2012; PAERL; HUISMAN, 2008). A ocorrência de grandes florações da espécie de cianobactéria halotolerante Nodularia spumigena tem sido descrita em diversos litorais oceânicos, estuários e lagos salinos. Estudos mais aprofundados sobre essa espécie têm se concentrado nas regiões costeiras do mar Báltico no continente europeu (LAAMANEN et al., 2001; MCGREGOR et al., 2012; MAZUR-MARZEC et al., 2006; SIVONEN et al., 1989; STAL et al., 2003). Entretanto, também existem relatos de florações de N. spumigena em lago salino na Alemanha (NEHRING et al., 1993), em lago de água doce na Turquia (AKCAALAN et al., 2009), em estuários e lagos salinos da Austrália e Nova Zelândia (BLACKBURN et al., 1996; HERESZTYN; NICHOLSON, 1997). No continente americano, a presença de florações de N. spumigena foi detectada em lagos e lagoas salinas dos Estados Unidos (BEUTEL et al., 2001; GALAT et al., 1990), do México (FALCÓN et al., 2002) e do Uruguai (PÉREZ et al., 1999). No Brasil, embora exista um relato da presença de N. spumigena em 1992 (WERNER; ROSA, 1992), o diagnóstico da espécie pode ter sido equivocado, uma vez que foi observada em água doce e não foi encontrado acinetos, células diferenciadas diacríticas na espécie N. spumigena. Dessa forma, a primeira identificação e floração confirmada de N. spumigena documentada no Brasil foi a ocorrida em 2011 em tanques de produção de camarões da Estação Marinha de Aquacultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizada na praia do Cassino, Rio Grande, RS (HARAGUCHI; ODEBRECHT, 2012). Essa floração afetou o crescimento e reprodução dos camarões e causou mortandade dos mesmos (KLEIN et al., 2011). A introdução da N. spumigena nesse ambiente foi considerada desconhecida e sugeriu-se que pode ter ocorrido de forma natural por meio de aves migratórias provenientes do Uruguai (PÉREZ et al., 1999) ou de água de lastro de navios (HARAGUCHI; ODEBRECHT, 2012).

A maior preocupação em relação as florações cianobacterianas é a toxicidade das mesmas, a qual interfere severamente nas atividades humanas e regularmente provoca envenenamentos de diversos mamíferos, aves e peixes (EDLER et al., 1985; FRANCIS, 1878; HARDING et al., 1995; MAIN et al., 1977; NEHRING, 1993; SIMOLA et al., 2012; VAN HALDEREN et al., 1995). A *N. spumigena* é conhecida por sintetizar a hepatotoxina nodularina (NOD), um pentapeptídeo cíclico com estrutura química similar à microcistina

(RINEHART et al., 1988). O grupo funcional Adda, que é o principal responsável pela toxicidade da microcistina, está também presente na NOD e, portanto, o mecanismo de lesão e patologia do fígado dessas duas moléculas são similares. A NOD atua como inibidor das proteínas fosfatases da família serina/treonina, especialmente as fosfatases tipo 1 (PP1) e 2A (PP2A) de células eucarióticas (ERIKSSON et al., 1988; YOSHIZAWA et al., 1990; HONKANAN et al., 1991) e é um promotor tumoral com provável ação carcinogênica (OHTA et al., 1994). Em 2004, o agrupamento gênico da biossíntese de NOD (*nda*) da *N. spumi*gena NSOR10, isolada da lagoa salina Orielton da Tasmânia, Austrália, foi sequenciado e caracterizado. A região de 48 kb do genoma é constituído por nove genes (*ndaA-I*) transcritos de uma região promotora regulatória bidirecional (MOFFITT; NEILAN, 2004). A *N. spumigena* também é conhecida por produzir outros peptídeos não ribossomais, tais como espumiginas (SPU), aeruginosinas (AER) e anabaenopeptinas (APT) (MAZUR-MARZEC et al., 2013).

A *N. spumigena* encontrada nos tanques de camarões em Rio Grande é produtora de NOD (PACHECO et al., 2016) e provavelmente ela afetou o crescimento e reprodução dos camarões e causou sua mortandade (KLEIN et al., 2011). O aparecimento de florações de *N. spumigena* no Brasil despertou o interesse na obtenção de informação de sua genômica numa perspectiva de sua dinâmica no oceano Atlântico brasileiro. O genoma sequenciado representou uma base rica de conhecimentos para uma melhor compreensão da diversidade genômica e biossíntética da *N. spumigena*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cultivo de camarões em cativeiro e florações de cianobactérias

A carcinicultura, técnica de criação de camarões em tanques, vem crescendo mundialmente devido a demanda do mercado por proteína animal de alta qualidade e a sua alta rentabilidade (FAO, 2014). O Brasil melhorou sua posição global de forma significativa nos últimos anos e é considerado o terceiro produtor de camarão da América Latina, apresentando cativeiros distribuídos principalmente nas regiões Sul, Norte e Nordeste (BURFOR et al., 2004; TAHIM et al., 2015). A carcinicultura no Brasil é desenvolvida em tanques escavados próximos aos estuários e lagoas costeiras ao longo do litoral (PAQUOTTE et al., 1998). As fazendas de criação de camarões marinhos estão normalmente localizadas em áreas adjacentes a estuários, região onde normalmente os pectinídeos (fase juvenil) realizam grande parte do seu desenvolvimento (PAQUOTTE et al., 1998).

Diversos problemas, entre eles ambientais e sanitários, continuam a gerar preocupação e dúvidas em relação à sustentabilidade do setor (BURFOR et al., 2004). Na tentativa de solucionar esses problemas, diferentes sistemas de produção vêm sendo desenvolvidos (SCOPEL et al., 2011). Um dos sistemas que tem se mostrado menos impactante ao meio ambiente é o BFT (do inglês "*Biofloc Technology System*"), no qual micro-organismos são utilizados para mineralizar e assimilar nutrientes provenientes da alimentação e excreção dos camarões (FRÓES et al., 2013). Dessa forma, a água pode ser utilizada em vários ciclos de produção sem que haja a necessidade de troca com o ambiente aquático ao redor. Além disso, fertilizantes são utilizados para estimular a ação microbiana (KRUMMENAUER et al., 2011). A biomassa de bactérias, cianobactérias e outros micro-organismos resultante desse processo é posteriormente utilizada juntamente com detritos orgânicos na alimentação dos próprios camarões na forma de agregados (RAY et al., 2010; WASIELESKY JUNIOR et al., 2006). Essas características permitem que o sistema tenha maior biossegurança, pois diminui a quantidade de efluentes lançados no ambiente e a introdução e dispersão de patógenos (FRÓES et al., 2013; EMERENCIANO et al., 2012).

As cianobactérias naturalmente competem com algas em tanques utilizados na aquicultura, mas devido a sua maior capacidade de prosperar em condições com baixo oxigênio dissolvido na água, maior temperatura e maior turbidez, as cianobactérias muitas vezes são dominantes em situações de aquicultura em tanques eutrofizados (SUNDA et al., 2006). Dessa forma, as cianobactérias podem formar florações nesses ambientes e interferir negativamente na produção de camarões (YUSOFF et al., 2002).

2.2 A Nodularia spumigena

Na classificação atual, a espécie N. spumigena pertence ao filo Cyanobacteria, ordem Nostocales e família Aphanizomenonaceae (KOMÁREK et al., 2014). O gênero Nodularia inclui cianobactérias fixadoras de nitrogênio caracterizadas por tricomas isopolares não ramificados, com desenvolvimento de heterócito metamérico (heterócito situado em intervalos regulares), formação apoheterocítica irregular de acinetos e células curtas em forma de barril com comprimento que não excede a largura (KOMÁREK; HAUER, 2013). Esse gênero está dividido em três grupos ecológicos: (a) planctônicas, com filamentos solitários e células com aerótopos, (b) bentônicas e (c) terrestre, ambos com filamentos solitários ou formando mantos, sem aerótopos (KOMÁREK; MAREŠ, 2012). Esses três grupos ecológicos formam um único agrupamento filogenético (HAŠLER et al., 2011; ŘEHÁKOVÁ et al., 2014). Embora o gênero Nodularia seja suficientemente distinto para ser reconhecido, a maioria das morfoespécies aparecem misturadas na árvore filogenética e necessita de revisão (ŘEHÁKOVÁ et al., 2014). Segundo a classificação fenotípica, o grupo de planctônicas é composto por quatro espécies (N. baltica, N. spumigena, N. litorea, N. crassa) com várias morfologias e ecotipos, enquanto o grupo de bentônicas possui oito espécies descritas até o momento (N. harveyana, N. sphaerocarpa, N. moravica, N. major, N. rajkotii, N. quadrata, N. turicensis, N. willei) (KOMÁREK; HAUER, 2013). Além dessas, existem mais nove espécies descritas que são consideradas táxons incertos (N. aerophila, Ν. armorica, N. epiphytica, N. hawaiiensis, N. mainensis, N. paludosa, N. skujae, N. suhriana e N. tenuis (KOMÁREK; HAUER, 2013). De acordo com os conhecimentos atuais, o gênero Nodularia é o único em que morfoespécies com aerótopos não são geneticamente separadas de morfoespécies que nunca formam aerótopo e nunca crescem no plâncton (KOMÁREK, 2010).

As espécies planctônicas têm sido mais extensivamente estudadas, principalmente a *N. spumigena* (Figura 1), devido a sua capacidade de produzir NOD (CARMICHAEL et al., 1988) e formar florações altamente tóxicas em ambientes aquáticos salinos (SIVONEN et al., 1989; McGREGOR et al., 2012). A ocorrência frequente de florações nocivas de *N. spumigena* tem atraído a atenção dos cientistas (JODŁWSKA; LATAŁA, 2010; KOSKENNIEMI et al., 2007). Por outro lado, representantes de *Nodularia* bentônica e do solo têm sido bastante negligenciados, pois eles não são dominantes nos biótopos solo ou bentônico

e geralmente não produzem essa hepatotoxina (BEATTIE et al., 2000; MOFFITT et al., 2001). A única exceção conhecida é a linhagem *Nodularia sphaerocarpa* PCC7804 isolada de um manto bentônico de uma fonte termal na França que produz a variante [L-Har²]NOD (BEATTIE et al., 2000; MOFFITT et al., 2001).

Figura 1 - *Nodularia spumigena*: a= esquema dos tricomas; b= Fotomicrografia em microscópio eletrônico de varredura (adaptado de Pérez et al. (1999); c= Fotomicrografia em microscópio óptico mostrando as células vegetativas (CV), heterócitos (H) e acinetos (A) (adaptado de Da Silveira et al. (2017, em preparação)).



2.3 A hepatotoxina nodularina

2.3.1 A molécula

A estrutura da molécula foi elucidada em 1988, revelando um pentapeptídeo cíclico com estrutura química e ação tóxica semelhantes à hepatotoxina microcistina (RINEHART et al., 1988). No entanto, a NOD difere da microcistina pela falta do aminoácido variável D-Ala, além de ter o resíduo Mdhb (N-metil-deidrobutirino) no lugar de Mdha (N-metil-deidroalanina) 2) (KARJALAINEN et al., 2007). a (Figura Assim, estrutura da NOD (D-MeAsp¹-L-Arginine²-Adda³-D-Glutamic acid⁴-Mdhb⁵) apresenta massa molecular de 824 Da e é menor em comparação com a microcistina (KARJALAINEN et al., 2007). O grupo funcional Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico), principal responsável pela toxicidade da microcistina, está também presente na NOD e, portanto, o mecanismo de lesão e patologia do fígado para as duas moléculas são similares (KARJALAINEN et al., 2007).



Figura 2 – Estrutura química da nodularina e da microcistina (adaptado de Moffitt e Neilan (2004)).

Atualmente são conhecidas 10 isoformas naturais da molécula, sendo 5 delas: NOD-R (Figura 2), NOD linear-R (molécula inativa), NOD-V (apresenta a L-arginina substituída por uma L-valina e é provavelmente produzida por algum simbionte do polífero *Theonella swinhoei*), NOD-Har (apresenta uma L-homoarginina substituindo o aminoácido arginina, sendo produzida pela linhagem *Nodularia harveyana* PCC7804) e uma variante não tóxica 6Z-estereoisômero de Adda {[6(Z)-Adda³]NOD} (ligação dupla C6-C7 do aminoácido Adda na configuração cis) (Figura 3) (BEATTIE et al., 2000; CHEN et al., 2013; GEHRINGER et al., 2012).

Figura 3 – Estrutura química de 4 das 10 isoformas conhecidos da nodularina (adaptado de Chen et al. (2013)).



As outras 5 isoformas apresentam alterações nos radicais de um ou mais aminoácidos, sendo três isoformas demetiladas (D-Asp¹NOD, DMAdda³NOD e dhb⁵NOD) e duas isoformas que apresentam um grupo metila adicional aos aminoácidos Adda e Glu (MeAdda³NOD e Glu⁴(OMe)NOD, respectivamente) (Figura 4) (BEATTIE et al., 2000; CHEN et al., 2013; GEHRINGER et al., 2012).

Figura 4 – Estrutura química da nodularina e suas isoformas que apresentam alterações nos radicais (adaptado de Chen et al. (2013)).



2.3.2 Biossíntese da nodularina

A NOD é um peptídeo não ribossomal e sua biossíntese é catalisada por enzimas conhecidas como peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS, do inglês "non-ribosomal peptide synthetase") e policetídeo sintase (PKS, do inglês "polyketide synthase") (FINKING; MARAHIEL, 2004). As PKSs fabricam cadeias de policetídeos a partir de simples blocos de construção de acil-CoA e as NRPSs construem peptídeos a partir de aminoácidos. Essas enzimas biossintéticas são linhas de montagem em escala molecular, ou seja, as cadeias crescentes são passadas de um domínio catalítico especializado para o próximo, com cada sítio executando uma função específica (FINKING; MARAHIEL, 2004). Os domínios são unidos via as chamadas regiões 'linker' e agrupados em unidades funcionais denominadas módulos (FINKING; MARAHIEL, 2004). O primeiro módulo inicia a biossíntese, enquanto os outros ampliam a cadeia crescente por meio do bloco de construção e confeccionam quimicamente sua funcionalidade. Quando o processo de construção acaba, o produto é liberado da linha de montagem e, em seguida, sofre reações de processamento adicionais para atingir sua forma bioativa final. Uma única PKS ou NRPS geralmente contém vários módulos e, com poucas exceções, cada via incorpora várias subunidades (FINKING; MARAHIEL, 2004).

Em geral, um ciclo catalítico de NRPS começa com a seleção e a ativação dependente de ATP de aminoácidos pelos domínios de adenilação (A), os quais são então transferidos para o grupo prostético de fosfopanteteína (Ppant) dos domínios da proteína carreadora de peptidil (PCP) (WALSH et al., 2001). Os resíduos podem então serem modificados pela N-metiltransferase (N-MT) antes de serem unidos para formar peptídeos pelos domínios de condensação catalítica (C) (WALSH et al., 2001). Mais ajustes estruturais podem ocorrer após a extensão da cadeia, como epimerização (pelos domínios E), formação de anéis heterocíclicos de cinco membros (domínios de heterociclização - HC) e oxidação (domínios Ox). O peptídeo processado apropriadamente é então transferido para os próximos módulos em linha para adicionais ciclos de extensão e confecção antes de ser liberado da linha de montagem pelo domínio de tioesterase (TE), frequentemente em forma cíclica. As PKS executam análogos de extensão de cadeias e modificação de ciclos, com domínios em cada módulo para seleção de substrato (aciltransferase - AT), ligação dos blocos de construção (cetoredutase - (KS) e transporte dos intermediários extendidos (proteína carreadora de acil - ACP). A variabilidade da diversificação química geralmente ocorre pela redução do β-hidroxilo nos centros β-ceto se um domínio de cetoredutase (KR) estiver presente, do α , β -alqueno por uma desidratase (DH) e do metileno saturado por uma enoyl-redutase (ER) (WALSH et al., 2001). Como nos NRPSs, os ciclos da cadeia crescente e o ajuste estrutural são repetidos até o desacoplamento do produto final por uma TE (MOFFITT; NEILAN, 2004). Refletindo a semelhança inerente entre os dois processos, os módulos PKS e NRPS podem colaborar efetivamente para a construção de produtos naturais híbridos como a NOD, que combinam unidades de extensão de peptídeos e cetídeos (MOFFITT; NEILAN, 2004). Essas duas enzimas podem utilizar mais de 300 substratos gerando uma grande variedade de moléculas (FINKING; MARAHIEL, 2004; KEHR et al., 2011).

Em 1999 as primeiras sequências gênicas envolvidas com a sintese de NOD foram descritas (NEILAN et al., 1999). Os produtos de PCR foram obtidos utilizando DNA genômico da *N. spumigena* PCC73104 tóxica e oligonucleotídeos iniciadores degenerados (MRF2/MTR) construídos para NRPS, e também com o conjunto FAA/RAA, o qual foi identificado a partir de uma região do *mcyB* de *Microcystis*. Concluiu-se que essa cianobactéria continha genes de NRPS, o que era previsto, uma vez que NOD possui estrutura química semelhante à das microcistinas. Sequências de genes codificadores de NRPSs e PKSs de NOD foram obtidas posteriormente e mostraram alta similaridade com sequências dos genes *mcyC* e *mcyD*, respectivamente, de microcistinas (MOFFITT; NEILAN, 2001).

Em 2004, o agrupamento gênico *nda* da *N. spumigena* NSOR10, isolada da lagoa salina Orielton da Tasmania, Australia, foi sequenciado e caracterizado (MOFFITT; NEILAN, 2004). A região de 48 kb do genoma é constituído por nove genes (*ndaA-1*) transcritos de uma região promotora regulatória bidirecional (Figura 5) (MOFFITT; NEILAN, 2004). Enquanto que a maioria dos genes *nda* tem similaridade com genes *mcy*, a disposição do cluster gênico *nda* está mais próxima da norma de colinearidade da via NRPS que prevê que a ordem dos processos catalíticos envolvidos na biossíntese de um metabólito não-ribossomal é geralmente o mesmo que a ordem dos genes que codificam as suas enzimas catalíticas (KLEINKAUF; VON DÖHREN, 1996).





Conforme descrito por Moffitt e Neilan (2004), a biossíntese da NOD se inicia com a formação da cadeia lateral Adda pela ação de uma enzima NRPS/PKS híbrida (NdaC) a partir do substrato fenilacetato e várias extensões do malonil-CoA (NdaD e NdaF) (Figura 6). O módulo NRPS da enzima NRPS/PKS híbrida NdaF, subsequentemente adiciona D-Glu na cadeia crescente e duas enzimas NRPS, NdaA e NdaB, completam o pentapeptídeo cíclico, adicionando os resíduos de aminoácidos finais, L-Thr, D-MeAsp e L-Arg. As proteínas NRPS e PKS requerem modificação pós-traducional por uma fosfopanteteinil transferase (PPT). A PPT necessária para ativação das proteínas Nda não está agrupada com os outros genes nda e em N. spumigena NSOR10 ela foi identificada utilizando PCR com primers degenerado e caracterização funcional (COPP 2007). subsequente enzimática et al., O agrupamento nda também codifica várias supostas enzimas complementares monofuncionais que podem desempenhar papel na modificação e transporte de NOD (MOFFITT; NEILAN, 2004). O gene *ndaE* codifica uma *O*-metiltransferase, *ndaG* codifica uma suposta L-Asp/L-Glu racemase e *ndaI* codifica um transportador ABC. Ainda dentro do agrupamento *nda*, também foi encontrado um gene codificante de uma enzima similar à D-3-fosfoglicerato desidrogenase, NdaH, que compartilha 71% de identidade com McyI e consequentemente, é provável que NdaH esteja envolvida na produção de D-MeAsp (PEARSON et al., 2008).

Figura 6 - Modelo da via biossintética da nodularina catalizada por proteínas codificadas pelos genes *ndaA-H*. Os quadrados representam os domínios de adenilação (A), proteína carreadora de peptidil (PCP) e condensação (C) da NRPS. Os círculos representam os domínios cetossintase (KS), aciltransferase (AT), C-metiltransferase (CM), dehidratase (DH), cetoredutase (KR) e proteína carreadora de acil (ACP) da PKS. A enzima NdaE, uma *O*-metiltransferase (OM), cataliza a transferência de um grupo metil para a hidroxila do C9. A NdaG, uma racemase, cataliza a epimerização do resíduo Glu. O domínio da aminotransferase (AMT) cataliza a transferência do grupo amino para o Adda. As reações de condensação do peptídeo são catalizadas pela NdaA e NdaB. A NdaH, uma dehidrogenase putativa, cataliza a formação do resíduo MeDhb seguindo a formação da ligação peptídica. O domínio da tioesterase (TE) catalisa a ciclização e liberação do peptideo (adaptado de Moffitt e Neilan (2004)).



2.3.3 Mecanismo de ação e toxicidade

O grupo funcional Adda é o principal responsável pela toxicidade da NOD e a manutenção da ligação entre os aminoácidos Adda e D-Glu é essencial para a funcionalidade da molécula. (MAZUR-MARZEC et al., 2006). A formação do estereiosômero [6(Z) Adda],

metilação do D-Glu ou a linearização da molécula podem reduzir a sua toxicidade e até mesmo tornar a NOD atóxica, enquanto que a desmetilação dos aminoácidos não acarreta em nenhuma alteração na toxicidade da molécula (MAZUR-MARZEC et al., 2006). A NOD, assim como a microcistina, atua como inibidor das proteínas fosfatases da família serina/treonina, especialmente as fosfatases tipo 1 (PP1) e 2A (PP2A) de células eucarióticas (OHTA et al., 1994). Quando a NOD é consumida por mamíferos, ela é absorvida pelas células epiteliais do intestino delgado e é transportada pela corrente sanguínea até o fígado (ŽEGURA et al., 2011). Transportadores inespecíficos localizados nesse órgão são responsáveis pelo acúmulo da toxina. Como essa molécula age como um inibidor específico da enzima fosfatase, pode ocorrer hiperfosforilação do citoesqueleto dos hepatócitos, causando perda de adesão das células, e consequente desarranjo na arquitetura do fígado e hemorragia nesse órgão (ŽEGURA et al., 2011).

Sendo uma hepatotoxina potente, a absorção da NOD, dependendo da quantidade, pode causar danos severos à saúde e levar até a morte, sendo que a DL_{50} intraperitoneal em camundongos varia entre 50 a 200 µg/kg de massa corpórea (RINEHART et al., 1994). Apesar de não estarem totalmente definidos, os mecanismos de ação tóxica e carcinogênica estão relacionados com a inibição de fosfatases, formação de espécies reativas de oxigênio, inativação de genes supressores de tumores e apoptose das células hepáticas (CHEN et al., 2013; LANKOFF et al., 2006; VUORINEN et al., 2009).

2.3.4 Nodularina no ambiente

O primeiro relato na literatura científica de intoxicações em animais causados por *N. spumigena* é de 1878 e ocorreu na Austrália (FRANCIS, 1878). Entretanto, somente após mais de 100 anos a toxina NOD produzida por uma floração de *N. spumigena* da Nova Zelândia foi identificada (RINEHART et al., 1988). A produção de NOD parece ser influenciada por fatores abióticos como luz, salinidade e disponibilidade de nutrientes (LUNDGREN et al., 2012). Maiores níveis de toxina foram encontrados em condições ótimas de crescimento da cianobactéria, indicando uma relação entre divisão celular e produção da toxina. Redução na disponibilidade de fósforo também pode induzir a produção dessa toxina. Em relação à influência de fatores bióticos, diversos autores vêm investigando a suas influências, mas os resultados ainda não são conclusivos (LUNDGREN et al., 2012). A função desempenhada pela NOD nas cianobactérias produtoras ainda não foi elucidada. Entretanto,

entre algumas das hipóteses já propostas estão efeitos alelopáticos, redução de estresse e influência de outros organismos (BRUTEMARK; ENGSTÖM-ÖST, 2013).

A NOD possui duas características que são intensamente impactantes para a qualidade da água (MAZUR-MARZEC et al., 2006). Primeiramente, como a maior parte da toxina produzida permanece compartimentalizada dentro das células e somente é liberada em caso de lise das células, grandes florações de cianobactérias podem causar súbitos aumentos na concentração da toxina no local (MAZUR-MARZEC et al., 2006). Em segundo lugar, essa toxina é estável e pode persistir no ambiente por longos períodos de tempo. Métodos de degradação de cianotoxinas durante o tratamento já são conhecidos, porém existem dificuldades na implementação desses processos de maneira viável em grande escala e que sejam eficazes em casos de altas concentrações da toxina (MEGLIČ et al., 2017; PESTANA et al., 2015). Apesar da escassez de pesquisa sobre a sedimentação dessa toxina, estudos realizados no Golfo de Gdańsk, na Polônia e no Golfo da Finlândia demonstraram a degradação lenta e a adesão da molécula em sedimentos em suspensão (MAZUR-MARZEC et al., 2007).

A NOD é extremamente prejudicial a vertebrados enquanto que os organismos invertebrados são menos afetados pela presença dessa toxina (KORPINEN et al., 2006). Independentemente de não sofrerem danos imediatos relacionados à toxina, os organismos bentônicos podem sofrer alterações no seu desenvolvimento (KARLSON; MAZURAITIS, 2011; STEWART et al., 2012). Casos de mortandade de animais domésticos e silvestres que consumiram água contaminada com essa toxina já foram reportados na literatura (EDLER et al., 1985; HARDING et al., 1995; MAIN et al., 1977; NEHRING, 1993; VAN HALDEREN et al., 1995). Peixes criados em tanques com florações de cianobactérias, por exemplo, podem apresentar alterações em diversos tecidos vivos (DROBAC et al., 2016). As populações humanas próximas também podem sofrer impactos adversos se as células cianobacterianas ou as cianotoxinas ligadas a sedimentos forem arrastadas por tempestades de poeira soprando sobre áreas povoadas (METCALF et al., 2012).

Existem diversos relatos de bioacumulação de NOD em invertebrados e peixes que ocorrem em locais de florações de *N. spumigena* no mar Báltico (KANKAANPÄÄ et al., 2005; MAZUR-MARZEC et al., 2007; PERSSON et al., 2009; SIPIÄ et al., 2002; 2007). Barda et al. (2015) analisaram tecidos de organismos aquáticos coletados em locais de ocorrência de florações de *N. spumigena* entre os anos de 2002 e 2007 na Letônia e encontraram níveis alarmantes de NOD e outras hepatotoxinas produzidas por cianobactérias.

Os autores demostraram que os organismos podem agir como vetores dessas toxinas e transportar as moléculas para níveis mais elevados na cadeia trófica. Consequentemente, eles recomendam precaução e análises casos organismos aquáticos de águas contaminadas sejam usados como fontes de alimento.

2.4 Mineração de agrupamentos gênicos em genomas cianobacterianos

O rápido avanço das técnicas de sequenciamento massivo de DNA, a redução dos custos deste procedimento e a disponibilidade de softwares e novas ferramentas de bioinformática de uso público e de fácil acesso pela internet, têm propiciado um aumento substancial de informações genômica dos organismos e tem facilidado a identificação e caracterização de agrupamentos gênicos de produtos naturais (DONIA; SCHMIDT, 2011; KERSTEN et al., 2011; LEIKOSKI et al., 2010; LI et al., 2010; WANG et al., 2015; ZIEMERT et al., 2010). Dessa forma, agrupamentos que anteriormente escaparam de ser descobertos devido ao silenciamento gênico pós-transcricional ou baixa produção, tem sido associados a moléculas tanto conhecidas como novas. Estes estudos utilizam genes codificantes de precursores de peptídeos como alvo para as buscas nos genomas, resultando em análogos de substâncias conhecidas, ou utilizam genes que codificam enzimas biossintéticas chaves (CORRE; CHALLIS, 2009; MICALLEF et al., 2015; MÜLLER; WINK, 2014; NETT, 2014).

Em cianobactérias, NRPSs, PKSs ou híbridos destes dois são mais comumente encontrados e são geralmente passíveis de deduções estruturais com base na informática (MICALLEF et al., 2015). Na abordagem metabolômica baseada em espectrometria de massa, as deduções podem ser feitas sobre o número e classes de substâncias presentes no extrato de uma linhagem (KERSTEN et al., 2011; MEDEMA et al., 2014). Além disso, combinando a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), juntamente com o padrão isotópico molecular e análises de fragmentação baseada em MS², é possível obter informação estrutural de substâncias desconhecidas. Por conseguinte, combinando genômica e metabolômica, tornase possível correlacionar substâncias específicas com agrupamentos gênicos e vice-versa e a descoberta e isolamento de novos produtos naturais.

Anteriormente à realização do presente trabalho, apena uma sequência genômica de *N. spumigena* estava disponibilizada publicamente. Voß et al. (2013) sequenciaram a linhagem *N. spumigena* CCY9414 e obtiveram um genoma incompleto contendo 5,462,271 nucleotídeos, sendo que foram identificados genes que codificam para 5,294 proteínas. Os autores destacam que 4% da capacidade codificadora do genoma é direcionada à produção

de metabólitos secundários e encontraram grupamentos gênicos responsáveis pela produção da NOD, dos inibidores de protease SPU, nodulapeptina, AER e dos pigmentos aminoácidos tipo miscosporina (MAAs) e citonemina (SCY). O estudo mostra que a *N. spumigena* possui grande potencial na produção de peptídeos e policetídeos e ilustra o potencial da mineração de genomas na identificação de compostos bioativos e suas vias metabólicas.

2.5 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) aplicada à análise de detecção de produtos naturais

O desenvolvimento de métodos analíticos robustos para a detecção de toxinas e outros metabólitos secundários de cianobactérias tem sido alvo de inúmeros estudos. A maioria das toxinas e outros produtos bioativos cianobacterianos são não voláteis, são relativamente hidrofílicos e facilmente ionizáveis e, portanto, podem ser analisados com sucesso por LC-MS (CAIXACH et al., 2017; DÖRR, 2011; KAUSHIK; BALASUBRAMANIAN, 2013; LAWTON; EDWARDS, 2008; MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006).

A espectrometria de massa (MS - Mass Spectrometry) é uma ferramenta física que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Sendo assim, um espectrômetro de massas consiste em uma fonte de ionização para a obtenção de íons, um analisador de massas, o qual separa os íons formados, um detector desses íons e um sistema de aquisição dos dados (CAIXACH et al., 2017). As técnicas de ionização empregadas podem ser ESI (electrospray ionization), MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), EI (electron ionization), CI (chemical ionization), FAB (fasta tom bombardment), APCI (atmospheric pressure chemical ionization) e APPI (atmospheric pressure photoionization). Os analisadores podem ser os quadrupolos QIT (quadrupole ion trap), QqQ (triple quadrupole) Q-TOF (quadrupole time of flight), FT-ICR (fourier transform ion cyclotron ressonance), orbitrap e magnetic sector. Os detectores podem ser tipo multiplicador de elétrons, copo de Faraday, placa fotográfica, contador de cintilação, multiplicadores de canal de elétrons, detector multicanal, dinodos de conversão e detectores criogênicos. Todos estes métodos diferem notavelmente na sensibilidade, resolução, precisão de massa e possibilidade de fragmentar íons de peptídeos e/ou proteínas. Vários espectrômetros de massas com diversas combinações de fontes e analisadores são comercializados atualmente, entretanto as fontes de ionização FAB, MALDI e ESI tendo sido as mais comumente aplicado às análises de toxinas e outras moléculas cianobacterianas (CAIXACH et al., 2017). O método ESI LC-MS no modo positivo tem sido aplicado à separação e detecção de cianotoxinas e outras

moléculas como uma abordagem padrão para fins quantitativos, embora o ESI modo negativo também tenha sido usado para análise de certas cianotoxinas (DÖRR et al., 2011; GAMBARO et al., 2012; RODRIGUES; REIS; MATEUS, 2013).

A análise usando MS fornece informações de uma molécula alvo tais como: (1) relação *m/z* da substância, o que permite atribuir a massa nominal; (2) a abundância relativa do analito alvo; (3) a separação de isótopos (os quais têm massas diferentes e podem ser distinguidos por MS); (4) espectrometria de massa em tandem (MS/MS), a qual pode produzir uma fragmentação do espectro da substância alvo que auxilia na caracterização estrutural desta molécula (e de análogos correlacionados). A vantagem significativa da MS reside na sua seletividade e sensibilidade inigualáveis, o que propicia identificação confiável e quantificação em baixos níveis de concentração (ppb e/ou ppt) do analito alvo com acurácia e precisão aceitáveis (GREAVER; ROBOZ, 2014; WATSON; SPARKMAN, 2009).

3. HIPÓTESE

O genoma da linhagem *Nodularia spumigena* CENA596 encontrada no oceano Atlântico Sul do Brasil apresenta diversidade de agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de moléculas bioativas e diferenças significativas quando comparado com o único genoma disponível dessa espécie, a *Nodularia spumigena* CCY9414 originária do mar Báltico.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os aspectos genômicos e funcionais do isolado brasileiro de *Nodularia spumigena* CENA596 visando identificar os agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de substâncias naturais biologicamente ativas e a produção destes.

4.2 Objetivos específicos:

I) Caracterizar o genoma da linhagem *N. spumigena* CENA596;

II) Avaliar agrupamentos gênicos de subtâncias bioativas no genoma da linhagem N. spumigena CENA596;

III) Comparar os genomas das linhagens *N. spumigena* CENA596 e *N. spumigena* CCY9414;

IV) Analisar a produção de substâncias bioativas pela *N. spumigena* CENA596 utilizando espectrometria de massas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Origem e cultivo da linhagem N. spumigena CENA596

A linhagem *N. spumigena* CENA596 foi isolada no dia 05 de dezembro de 2013 de uma amostra de floração ocorrida em tanques de produção de camarões da Estação Marinha de Aquacultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizada na praia do Cassino, Rio Grande, RS (32°12'19" S, 52°10'42" O) (Figura 7). A produção de camarão na EMA utiliza o sistema de Bioflocos ou BFT (do inglês, "*Biofloc Technology Culture System*"). A coleta e o isolamento da *N. spumigena* CENA596 foi realizada pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Clarisse Odebrecht do Instituto de Oceanografia da FURG.

Figura 7 - Vista aérea da Estação Marinha de Aquacultura da FURG. Nota-se a coloração verde característica de florações de cianobactérias em alguns tanques (MAURENTE, 2014).



A linhagem *N. spumigena* CENA596 foi cedida pela Profa. Clarisse Odebrecht da FURG e entá mantida em cultivo no laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP em meio de cultura líquido F/2 (GUILLARD, 1975) modificado (sem adição da sílica), sob exposição à luz fluorescente (40-50 µmol fótons \cdot µm⁻²·s⁻¹), com ciclo claro/escuro de 14/10h, a 25 °C ± 1 °C.

5.2 Tratamento para redução de contaminantes na cultura

A redução de bactérias contaminantes na cultura da *N. spumigena* CENA596 foi feita conforme a metodologia apresentada por Vaz et al. (2014). Uma cultura de 20 dias foi submetida ao processo de recuperação de acinetos utilizando soluções de hipoclorito de sódio. Primeiramente, a cultura foi visualizada ao microscópio óptico para que fosse possível certificar a ocorrência de acinetos. Em seguida, uma alíquota de 20 mL dessa cultura foi homogeneizada e teve seus filamentos fragmentados com o auxílio de uma seringa. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram depositadas sobre membranas com poros de 8 µm (Millipore) acopladas a um sistema de filtro a vácuo. Posteriormente, as membranas foram lavadas durante 20 segundos com diferentes soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,25; 0,5; 1 e 2% (v/v), seguido de uma lavagem com água ultrapura esterilizada durante outros 20 segundos. As células de cada uma das lavagens foram individualmente coletadas das superfícies das membranas e inoculadas em duplicatas em *erlenmeyers* contendo 25 mL de meio de cultura F/2. Subsequentemente, os *erlenmeyers* das diferentes lavagens foram incubados durante 14 dias nas mesmas condições de luz e temperatura especificadas acima.

5.3 Verificação da pureza das culturas

Após o período de incubação, alíquotas de 100 μ L contendo meio de cultura e filamentos de cada uma das duplicatas foram utilizadas para a realização de espalhamentos em placas de Petri com meio F/2 sólido suplementado com glicose 0,2% e casamino ácido 0,2% e em placas de Petri com meio LB suplementado com glicose 1%. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias e observadas no microscópio invertido para verificar o crescimento de colônias de bactérias contaminantes. As culturas foram resubmetidas a novos tratamentos com solução de hipoclorito de sódio até que não fosse possível detectar nenhuma colônia de contaminantes crescendo nas placas de Petri.

5.4 Produção de biomassa

Após a constatação da pureza da cultura, a produção de biomassa de células da linhagem *N. spumigena* CENA596 foi realizada em frasco de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido F/2 (GUILLARD, 1975) modificado, nas mesmas condições de luz e temperatura especificadas acima, durante 20 dias.

5.5 Extração de DNA total

A extração do DNA genômico foi realizado com kit UltraClean[™] Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% (m/v). Em seguida, a quantificação foi realizada com o fluorômetro (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies[™]).

5.6 Preparo da biblioteca genômica e sequenciamento

Cerca de 1 ng de DNA foi utilizado para o preparo de bibliotecas genômicas pairedends 2x300 pb utilizando o kit Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor.

O DNA genômico foi inicialmente fragmentado por transposases e recebeu sequências adaptadoras às suas extremidades após incubação em termociclador a 55 °C por 5 minutos. As enzimas foram neutralizadas com o tampão Neutralize Tagment (Illumina) à temperatura ambiente por 5 min e, em seguida, ocorreu a amplificação do DNA com os iniciadores i7 e i5, específicos aos adaptadores adicionados, com a seguinte ciclagem térmica: 72 °C por 3 min; 95 °C por 30 s; 12 ciclos de 95 °C por 10 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s; e 72 °C por 5 min. Os produtos da amplificação foram purificados com 25 μL de microesferas magnéticas AMPure XP 0,5 X e etanol 80 %. Após a purificação, a quantificação da biblioteca foi conduzida em triplicatas em *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando o sistema de detecção *KAPA SYBRTM FAST qPCR Master Mix* (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As condições de ciclagem térmica foram: 95 °C por 5min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s e 60 °C por 45 s.

Após o produto da biblioteca ser desnaturado e diluído, o mesmo foi transferido para um cartucho de reagentes Miseq Reagent Kit v3 600 cycles. O sequenciamento foi realizado com o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina) segundo instruções do fabricante.

5.7 Montagem do genoma

A qualidade das leituras obtidas com o sequenciamento genômico da plataforma MiSeq foi verificada e gráficos de análise foram gerados com o programa FastQC (v.0.11.5) (ANDREWS, 2010). Sequências com qualidades Phred abaixo de 20 e com tamanhos menores que 150 pares de base foram filtradas com PRINSEQ (v.0.20.4) (SCHMIEDER, EDWARDS,
2011). Em seguida, foi realizada a montagem das leituras com o software Platanus (v.1.2.4) (KAJITANI et al., 2014). Após a montagem do genoma, o programa Kraken (v.0.10.5-beta) (WOOD, SALZBERG, 2014) foi utilizado para filtrar as sequências que apresentaram identidade com o filo Cyanobacteria. Por fim, os programas IMAGE2 (TSAI, OTTO e BERRIM, 2010) e Geneious (v. 9.0.2) (KEARSE et al., 2012) foram empregados para o fechamento das lacunas no genoma. As estatísticas da montagem do genoma foram obtidas pelo programa Assemblathon 2 (BRADNAM et al., 2013).

5.8 Análise filogenômica e filogenética

A árvore filogenômica foi gerada a partir da concatenação de 31 sequências de proteínas, indicadas para a geração de árvores filogenômicas bacterianas (WU; EISEN, 2008). A ferramenta BLASTP foi empregada na identificação de homólogos das proteínas nos genomas cianobacterianos. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando a configuração padrão da ferramenta Muscle Alignment no programa Geneious (v. 9.0.2) (KEARSE et al., 2012). O modelo de substituição de aminoácidos PROTGAMMAGTR foi indicado pelo programa ProtTest (ABASCAL et al., 2005). O programa RAxML v. 7.7.8 (STAMATAKIS, 2006) foi utilizado na construção da árvore e de acordo com método de máxima verossimilhança com 1000 repetições.

A árvore filogenética utilizando o gene que codifica para o 16S foi gerada no programa MrBayes v.3.2.5 com 5,000,000 gerações (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) e usando o modelo evolutivo HKY+I+G indicado pelo programa jModelTest (POSADA, 2008). A ferramenta BLASTN foi empregada na identificação de homólogos do gene nos genomas cianobacterianos.

Todas as sequências utilizadas na construção de ambas as árvores são públicas e foram obtidas no NCBI/GenBank.

5.9 Anotação do genoma da *N. spumigena* CENA596 e potencial para a síntese de produtos naturais

A anotação automática em subsistemas foi realizada no servidor RAST e com a ferramenta SEED (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2014). Por outro lado, a anotação automática de agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de moléculas bioativas foi realizada no servidor antiSMASH (v.3.0-a) (WEBER et al., 2015). Posteriormente, a anotação e a

curadoria manual foram realizadas com o programa Artemis (v. 16.0.0) (RUTHERFORD et al., 2000). A predição da especificidade do substrato dos domínios de adenilação dos genes não ribossomais foi realizada no servidor NRPSpredictor2 (RAUSCH et al., 2005; RÖTTIG et al., 2011).

5.10 Análise comparativa entre os genomas das N. spumigena CENA596 e CCY9414

A comparação entre os genomas de *N. spumigena* CENA596 e CCY9414 (disponível no banco de dados GenBank com o número de acesso GCA_000340565.3) foi realizada no servidor RAST e com a ferramenta SEED (AZIZ et al., 2008; OVERBEEK et al., 2005). Essas mesmas ferramentas foram utilizadas na anotação em subsistemas dos genes classificados como específicos e dos genes compartilhados entre as duas linhagens de acordo com a análise de genes homólogos efetuada no servidor OrthoVenn (YI et al., 2015).

5.11 Análises cromatográficas e por espectrometria de massas

As análises foram realizadas por meio da parceria com o Prof. Dr. Ernani Pinto, do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Culturas frescas de *N. spumigena* CENA596 (200 mL) foram filtradas sob vácuo em fibra de vidro (Sartorius GmbH, Alemanha) para separação das células. Os filtros foram posteriormente submetidos à extração com metanol/água 60/40 (1 mL) em sonda de ultrassom (Omni Sonic Ruptor 400, EUA) por 1 minuto, sob gelo. Após centrifugação por 10 min a 12.000 g (5804R, Eppendorf, Alemanha), o sobrenadante foi separado e a extração repetida. Os sobrenadantes foram reunidos e filtrados (Millex 0,45 µm, Millipore, EUA) para frascos apropriados.

As análises de NOD, SPU, APT, AER, MAAs e SCY foram realizadas em coluna Luna C18(2) (150 x 2.1 mm, 3 μ m; Phenomenex, EUA) utilizando-se (A) 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila como fase móvel (250 μ L.min⁻¹, 35°C). A separação foi obtida em equipamento Shimadzu Prominence (Kyoto, Japão) com o gradiente linear de 5 a 90% B em 34 min, mantendo-se em 90% B por mais 3 min. Após retorno a 5% B em 1 min, a coluna foi reequilibrada por 8 min (tempo total de 45 min).

O efluente da coluna foi diretamente conduzido para espectrômetro de massas de alta resolução (MicroTOF-QII, Bruker Daltonics, EUA) equipado com fonte de *electrospray*,

operada no modo positivo de ionização. A varredura de compostos foi realizada no intervalo de m/z de 100 a 1500 utilizando-se solução de acetato de sódio para calibração e obtenção de massa exata.

As análises de geosmina (GEO) foram realizadas empregando-se a microextração em fase sólida acoplada à cromatografia em fase gasosa e espectrometria de massas (SPME-GC/MS), segundo o método de Suurnäkki et al. (2015). Amostras de cultura fresca (10 mL) foram transferidas para frascos de *headspace* de 20 mL e analisadas em cromatógrafo 5975C Inert XL EI/CI (Agilent, EUA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Tratamento para redução de contaminantes na cultura

A linhagem *N. spumigena* CENA596 mostrou-se capaz de sobreviver aos tratamentos com hipoclorito de sódio, uma vez que os acinetos germinaram durante o período de incubação e originaram novas células vegetativas. Os tratamentos nas concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% mostraram-se menos eficazes na eliminação de bactérias cultiváveis quando comparados ao tratamento com solução de 2%, visto que os primeiros resultaram em maiores contagens de Unidades Formadoras de Colônias por microlitro (UFC.mL⁻¹) no meio de cultura do que este último tratamento. Entretanto, uma única lavagem com a solução com 2% de hipoclorito de sódio não mostrou ser suficiente para eliminação das bactérias cultiváveis presentes na cultura, dado que foi possível observar pequenas colônias de bactérias se desenvolvendo ao redor dos fragmentos de filamentos espalhados nas placas. Após um total de três tratamentos sucessivos com a solução de 2%, foi constatada a ausência de colônias de bactérias contaminantes se desenvolvendo nas placas.

As cianobactérias naturalmente estabelecem associações simbióticas com outros microrganismos que estão ao seu redor (ZHUBANOVA et al., 2013). Além disso, exopolissacarídeos envoltos nas células cianobacterianas propiciam a adesão de autótrofos e heterotróficos, o que favorece a troca de diversas substâncias (COLE et al., 2014; PAERL et al., 2000). Entretanto, nem sempre as interações são benéficas e bactérias antagônicas podem suprimir o crescimento e influenciar a regulação de diversas vias metabólicas das cianobactérias (OSMAN et al., 2017). Metodologias têm sido desenvolvidas visando a obtenção de culturas axênicas cianobactérias. antibióticos de elas utilização de entre a (CHOI et al., 2002; FERRIS; HIRSCH, 1991; VÁSQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2004; SENA et al., 2011), sistemas de filtração por membrana (HEANEY; JAWORSKI, 1997; AZMA et al., 2010) e produtos químicos com poder oxidativo (FOGG, 1942; TASSIGNY et al., 1969; VAZ et al., 2014). O emprego de produtos químicos, como por exemplo, o hipoclorito de sódio, é uma alternativa que requer pouco tempo e recursos em comparação a outros métodos descritos na literatura (VAZ et al., 2014). O hipoclorito de sódio é um agente oxidante altamente ativo e com grande ação antimicrobiana (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Entre os efeitos negativos da exposição da célula ao hipoclorito de sódio, a degradação de aminoácidos e lipídios pode levar a alteração do metabolismo, inativação de enzimas e desestabilização da membrana celular (ESTRELA et al., 2002).

Vaz et al. (2014) obtiveram culturas axênicas de três linhagens de cianobactérias do gênero *Nostoc* por meio do tratamento das mesmas com soluções de hipoclorito em concentrações de 1, 2 e 3% durante 10 segundos e apontaram a pouca agregação dos tricomas durante o desenvolvimento das linhagens e resistência dos acinetos à ação das soluções de hipoclorito como fatores responsáveis pelo sucesso do tratamento. A linhagem *N. spumigena* CENA596 apresentou alguma característica que provavelmente contribuíram com o sucesso do tratamento. Entre elas pode-se citar a baixa agregação dos tricomas, a qual diminuiu ainda mais com a formação de grande quantidade acinetos nos tricomas e subsequente quebra dos mesmos durante o envelhecimento das culturas. A grande quantidade de acinetos produzidos pela linhagem provavelmente aumentou a tolerância ao tratamento, pois é maior a probabilidade de que parte desses acinetos não sejam inviabilizados pela ação oxidante do hipoclorito de sódio e possam germinar. Ademais, a efetividade do tratamento foi favorecida pela presença de uma bainha de exopolissacarídeos aparentemente pouco espessa, visto que ela é conhecida por prover substrato e nutrientes para bactérias heterotróficas (CAIRE et al., 1997).

6.2 Análise de qualidade das sequências e montagem do genoma

O sequenciamento do genoma da *N. spumigena* CENA596 na plataforma MiSeq resultou em um total de 41.280.494 sequências com tamanho variando entre 35 e 301 pares de bases (Figura 8). As 20.640.247 sequências produzidas no R1 apresentaram um percentual G:C médio de 41%. Por outro lado, as 20.640.247 leituras do R2 apresentaram um percentual G:C médio de 43%.



Figura 8 - Qualidades Phred dos pares de bases durante leituras R1(A) e R2(B) do sequenciamento genômico MiSeq em relação as posições das mesmas ao longo das sequências.

Devido as baixas qualidades das extremidades das regiões 3' e 5' das leituras, foi realizado o corte dessas regiões em ambas as leituras. Além disso, foram selecionadas apenas as sequências com tamanho mínimo de 150 pares de bases e com qualidade Phred média de no mínimo 20. Após o tratamento das sequências, realizou-se a montagem do genoma, resultando em 377 sequências contíguas. Posteriormente, foi realizado um primeiro processo de fechamento das lacunas que diminuiu o total para 302 sequências contíguas, das quais 295 apresentaram identidade com o filo Cyanobacteria. Após um novo tratamento para fechamento das lacunas, foram obtidas 291 sequências contíguas com tamanho variando entre 526 e 109.819 pares bases, percentual G:C de 41,19% e tamanho total de 5.189.679 pb. O genoma foi depositado no banco de dados públicos DDBJ/EMBL/GenBank, recebendo o número de acesso LWAJ00000000.

A presença de sete sequências contíguas com identidade com outros filos bacterianos mostrou que a cultura da *N. spumigena* CENA596 ainda continha alguns poucos contaminantes que não apareceram nas placas de Petri e, portanto, não foram detectados. Um estudo anterior mostrou que o tratamento com hipoclorito de sódio, utilizado no presente trabalho, tende a negligenciar as bactérias não cultiváveis (HECK et al., 2016). Além disso, esses autores salientam a dificuldade de preservar uma cultura de cianobactérias em condições axênicas devido ao alto risco de contaminação durante a conservação da mesma. Dessa forma, essas sete sequências contíguas podem estar relacionadas a presença de bactérias não cultiváveis na cultura utilizada no sequenciamento ou contaminações pós tratamento.

6.3 Análise filogenômica e filogenética

Na árvore filogenômica construída com as sequências concatenadas de 31 proteínas, a linhagem brasileira *N. spumigena* CENA596 agrupou-se com valor de reamostragem de 100% com a *N. spumigena* CCY9414 (Figura 9), que foi a única linhagem desta espécie com genoma disponível no NCBI/GenBank até o momento da escrita desta dissertação. O clado formado por essas duas linhagens ficou inserido em um clado maior contendo sequências concatenadas de proteínas de outras cianobactérias pertencentes à ordem Nostocales.

Figura 9 - Árvore filogenômica utilizando a concatenação de 31 proteínas conservadas do genoma de 77 linhagens cianobacterianas. As linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414 estão exibidas em negrito.



A disponibilidade de um número maior de sequências do gene que codifica para o 16S rRNA de membros do gênero *Nodularia* permitiu reconstruir a relação evolutiva da *N. spumigena* CENA596 com mais aprofundamento, embora baseada em um único gene (Figura 10). Apesar das sequências do gene de 16S rRNA das linhagens CENA596 e CCY9414 apresentarem alta identidade (99,2%) entre si, verificou-se que a linhagem CENA596 ficou agrupada com isolados da Austrália (NSOR12, NSBL05 e NSGL02A10) e da América do Norte (GSL023), enquanto que a linhagem CCY9414 ficou agrupada com outras *N. spumigena* isoladas do mar Báltico. Além disso, o grupo irmão ao clado contendo a *N. spumigena* CENA596 foi aquele contendo diversas linhagens de *N. harveyana*.

Figura 10 - Árvore filogenética utilizando a estimativa de máxima verossimilhança com base nas sequências dos genes de 16S rRNA de diversas cianobactérias. A origem das linhagens e os números de acesso das sequências no NCBI estão indicados ao lado do nome das linhagens. As linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414 estão exibidas em negrito.



Os resultados encontrados na árvore construída utilizando sequências do gene de 16S rRNA confirmam outras análises que mostraram que as linhagens de *N. spumigena* do mar Báltico tendem a formar clado separado de outras linhagens da mesma espécie, principalmente da Austrália (LEHTIMÄKI et al., 2000). Sendo assim, é possível que a espécie *N. spumigena* seja polifilética, na qual as linhagens Europeias evoluíram de maneira independente das linhagens Americanas e Oceânicas. Futuras inclusões de linhagens de *N. spumigena* provenientes dos continentes africano e asiático, quando disponíveis, possibilitará maiores conclusões sobre a filogênia da espécie.

A filogenia do gênero *Nodularia* é problemática, uma vez que diversas espécies foram descritas com base em seus caracteres morfológicos e não apresentam posições estáveis em árvores filogenéticas (LAAMANEN et al., 2001; ŘEHÁKOVÁ et al., 2014). Além disso, ainda existem diversas espécies que permanecem incertas e das quais ainda não existem informações genéticas (KOMÁREK; HAUER, 2013). Essa instabilidade se repete em outros gêneros da ordem Nostocales e consequentemente, é provável a hipótese de que o ancestral dessa ordem tenha divergido muito cedo das outras cianobactérias, o que levou os seus descendentes a apresentarem uma alta distância evolutiva de outros táxons e menor entre os gêneros dessa ordem (CASAMATA; GOMEZ; JOHANSEN, 2006; KORELUSOVÁ, 2008).

Embora a região do gene de 16S rRNA seja amplamente utilizada em análises filogenéticas, a importância de se utilizar outras regiões do genoma nesse tipo de análise é conhecida a bastante tempo (OLSEN; WOESE, 1993). A utilização de proteínas codificadas por genes amplamente distribuídos e conservados em bactérias, por exemplo, é uma alternativa que se mostra apropriada para o estudo da ancestralidade desses organismos (CALTEAU et al., 2014; KOMÁREK et al., 2014). Entretanto, essa abordagem requer a disponibilidade de diferentes genomas, e no caso do gênero *Nodularia*, essa disponibilidade ainda é ínfima e abrange apenas uma única espécie. Considerando que a análise de genomas se mostra como uma promissora alternativa para a resolução dos problemas da sistemática não só de cianobactérias, mas de todo o domínio Bacteria (CHUN; RAINEY, 2014; VANDAMME; PEETERS, 2014), é essencial o avanço da área para que um maior entendimento desses organismos seja alcançado. Dessa forma, a taxonomia polifásica, a qual se baseia em diversas análises, como morfológica, genômica e filogenética, atualmente se mostra como a melhor forma para se estudar a diversidade e os padrões evolutivos das cianobactérias (KOMÁREK, 2010; THOMPSON et al., 2015).

6.4 Análise comparativa entre os genomas das N. spumigena CENA596 e CCY9414

Os dados dos genomas incompleto da *N. spumigena* CENA596 (5,1 Mbp) e completo da *N. spumigena* CCY9414 (5,4 Mbp) estão apresentados na Tabela 1. O conteúdo G+C das duas linhagens se mostrou muito próximo e dentro do que é normalmente encontrado em outras espécies da família Aphanizomenonaceae depositadas no NCBI (40-41,5%).

| Estatísticos do conomo | N. spur | nigena |
|--|-----------|-----------|
| Estatísticas do genoma | CENA596 | CCY9414 |
| Nº de sequências contíguas | 291 | 1 |
| Tamanho total do genoma (bp) | 5.189.679 | 5.462.271 |
| Tamanho máximo das sequências contíguas (pb) | 109.819 | 5.462.271 |
| Tamanho míninmo das sequências contíguas (pb) | 526 | 5.462.271 |
| Média do tamanho das sequências contíguas (pb) | 17.834 | 5.462.271 |
| Mediana do tamanho das sequências contíguas (pb) | 12.498 | 5.462.271 |
| Conteúdo GC (%) | 41,2 | 41,19 |
| N50 (bp) | 32.474 | 5.462.271 |
| Estatísticas da anotação em subsistemas | - | - |
| N° de subsistemas | 370 | 378 |
| N° de sequências codificantes | 4.907 | 5.277 |
| Sequências codificantes em subsistemas (%) | 33% | 33% |
| Sequências codificantes não classificadas (%) | 67% | 67% |

Tabela 1 - Comparação das estatísticas das montagens dos genomas e das anotações em subsistemas das linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414

Além da comparação das estatísticas dos dois genomas de *N. spumigena*, foi realizada a anotação automática dos dois genomas (Figura 11). A análise resultou em uma cobertura de 33% das sequências para ambos os genomas e foram encontrados, por exemplo, genes que possibilitam resistência a choque térmico, antibióticos, estresses oxidativos e osmóticos e compostos tóxicos como mercúrio, cobre e cromo. Além disso, foi possível detectar que a maior parte dos genes identificados estão relacionados ao metabolismo primário desses organismos, como respiração, metabolismo de nutrientes, fixação de nitrogênio e fotossíntese.





As cianobactérias são conhecidas por apresentaram grande diversidade morfológicas, metabólica e genéticas (LARSSON et al., 2011). A linhagem CENA596 foi isolada de tanques de criação de camarões contendo água salobra resultante da mistura de água salgada coletada do oceano e água doce. Por outro lado, a linhagem CCY9414 foi isolada de amostras de uma floração de *N. spumigena* ocorrida no mar Báltico perto de Bornholm, Dinamarca, em 1996 (HAYES; BARKER, 1997). Durante o verão, as altas concentrações de fósforo e baixas de nitrogênio dissolvidos em águas estáveis, estratificadas e quentes, favorecem a ocorrência de florações de *N. spumigena* no mar Báltico (VOß et al., 2013). Apesar

da distância geográfica e das diferentes condições ambientais entre os locais de origem dos dois isolados de *N. spumigena*, seus genomas apresentaram estatísticas semelhantes (Tabela 1, Figura 11).

As linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414 compartilham 7438 genes que compõem 3683 agrupamentos de genes homólogos (Figura 12). Além disso, 18 agrupamentos contendo 40 parálogos e 494 singletons (genes que não possuem homólogos) foram identificados como exclusivos da linhagem CENA596, enquanto que 74 agrupamentos contendo 1304 parálogos e 247 singletons são exclusivos da linhagem CCY9414.

Figura 12 – Análise de agrupamentos de genes homólogos nos genomas das linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414.



A anotação em subsistemas do conjunto de genes compartilhados entre as duas linhagens resultou em uma predição de 39% de genes conhecidos, identificados como genes relacionados principalmente ao metabolismo primário das células, como por exemplo, fotossíntese, fixação biológica de nitrogênio, respiração e metabolismo de proteínas e nutrientes (Figura 13).

Figura 13 - Anotação automática em subsistemas dos genes compartilhados pelas linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414. Apenas 39% dos genes foram preditos e estão representados na figura.



Os genes específicos de cada linhagem também foram anotados e resultaram em 5,4% de genes preditos para a linhagens CENA596 (ou seja, 29 genes) e 4,3% para a linhagens CCY9414 (ou seja, 67 genes). Na linhagem CENA596, seis genes estão envolvidos com regulação e sinalização celular, quatro com modificação de DNA, quatro com resistência a antibióticos, quatro com metabolismo de proteínas e dois com transporte em membranas. Resultados similares foram encontrados para a linhagens CCY9414, na qual 16 genes estão relacionados com regulação e sinalização celular, 12 com o metabolismo de DNA, cinco com proteínas da parede celular, seis com a modificação e processamento de proteínas, quatro com respostas a estresse e três com transporte em membranas.

A linhagem *N. spumigena* CENA596 possui mais mecanismos de defesa contra antibióticos do que a linhagem CCY9414, incluindo dois genes que podem estar relacionados a bombas de efluxo, responsáveis pela exportação ativa de antibióticos por meio de transportadores de membrana (PIDDOCK, 2006). Genes envolvidos em sistemas de restrição-modificação também foram encontrados na linhagem CENA596. Esses sistemas podem atuar como barreiras contra o DNA estrangeiro e bacteriófagos (MILLER et al., 2005). Por outro lado, a maior parte dos genes exclusivos da linhagem CCY9414 estão envolvidos na regulação e sinalização celular, especialmente na morte celular programada. Foram também encontrados genes relacionados com CRIPSs e glicosilação N-ligada. Enquanto que CRIPSs estão relacionados a respostas imunes das células a ação de vírus (RATH et al., 2015), a glicosilação N-ligada atua em respostas à estresse oxidativo e a substâncias químicas tóxicas (MECLENNAN, 2006).

Agrupamentos de genes ortólogos são compostos por genes originados devido a eventos de especiação e pela comparação dos mesmos é possível obter informações sobre as diferenças e similaridades entre genomas (GABALDÓN; KOONIN, 2013; TATUSOV et al., 1997). O conjunto de genes compartilhado entre as duas linhagens compreende quase 90% do genoma CENA596, enquanto que ele representa aproximadamente 70% do genoma CCY9414. Além disso, os genes específicos na linhagem CCY9414 são principalmente parálogos, enquanto que os da linhagem CENA596 são majoritariamente singletons. A análise de 58 genomas de cianobactérias, incluindo a linhagem N. spumigena CCY9414, relatou que a duplicação de genes é um importante mecanismo de adaptação (LARSSON et al., 2011). Por outro lado, o processo de perda de genes em bactérias é causado por seleção natural que leva à remoção de genes desnecessários ou desvantajosos, ou por derivação genética relacionada à ausência de fortes forças para a manutenção dos mesmos (BOLOTIN; HERSHBERG, 2016). Portanto, a prevalência de parálogos na linhagem CCY9414 pode ser uma indicação da ocorrência de uma pressão evolutiva mais intensa do que a sofrida pela linhagem CENA596, o que levou a primeira linhagem a passar por um processo mais intenso de duplicação gênica. Também é possível que esta última linhagem possa estar sofrendo perdas genéticas, e consequente, levando a prevalência de genes sem seus respectivos homólogos. A disponibilidade de outros genomas da mesma espécie pode no futuro contribuir para um maior entendimento do processo evolutivo desse táxon.

Ademais, as análises comparativas das linhagens CENA596 e CCY9414 revelaram a ocorrência de um conjunto de genes compartilhados entre as mesmas e que cada uma possui também seu próprio conjunto de genes específicos. Enquanto que os genes compartilhados estão relacionados principalmente ao metabolismo primários das células, os genes específicos são desconhecidos, e, consequentemente, não é possível determinar suas funções; ou estão relacionados a respostas celulares ao ambiente, como sinalização celular, apoptose, transporte de membranas, e à estresses causados por agentes oxidativos, patógenos e antibióticos. Sendo assim, enquanto os genes envolvidos no metabolismo primário desses organismos, e que são compartilhados entre diversas linhagens, são mais amplamente conhecidos, a grande diversidade de genes específicos ainda permanece predominantemente desconhecida. Resultados semelhantes foram encontrados no gênero *Cylindrospermopsis* (SINHA et al., 2014) e em estudo comparativo envolvendo cianobactérias de diversos gêneros (SIMM et al., 2015). Contudo, conforme mais genomas cianobacterianos sejam disponibilizados, esse padrão poderá ser confirmado ou não.

1.5. Potencial genético para a síntese de produtos naturais da N. spumigena CENA596

A linhagem CENA596 apresentou 13 agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários e/ou substâncias bioativas: dois peptídeos não ribossomais, dois policetídeos, três híbridos peptídeos não ribossomais e policetídeos, dois terpenos, dois aminoácidos modificados pós-tradução e dois outras moléculas (Figura 14). Entre os agrupamentos gênicos já conhecidos, foram encontrados: *nda* (*Cluster* 12), SPU (*spu*) (*Cluster* 4), APT (*apt*) (*Cluster* 4), AER (*aer*) (*Cluster* 1), GEO (*geo*) (*Cluster* 2). Além disso, os agrupamentos gênicos envolvidos na produção de aerótopos (*gvp*), MAAs (*mys*) e SCY (*scy*) foram identificados pela anotação e curadoria manual.

Figura 14 - Resultado da predição automática do programa antiSMASH de agrupamentos gênicos na linhagem CENA596. O *Cluster* 4 é composto dos agrupamentos gênicos da espumigina e anabaenopeptina.

| anti SMASH Versio | n 3.0.5 | | 9 | ••• | |
|--|--|-----------------------|-------|--|---------------|
| Select Gene Cluste Overview 122 | r: 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 | | | | |
| Identified seconda | ary metabolite clusters | | | | |
| Cluster | Туре | From | То | Most similar known cluster | MIBIG BGC-ID |
| The following clusters a Cluster 1 | re from record c00025_scaffol., (original name was: scaffold28_cov635): Nrps | 1 | 43823 | Aeruginoside_biosynthetic_gene_cluster (35% of genes show similarity) | BGC0000297_c1 |
| The following clusters a Cluster 2 | re from record c00058_scaffol (original name was: scaffold61_cov659): Terpene | 1 | 23748 | Geosmin biosynthetic gene cluster (100% of genes show similarity) | BGC0000661 c1 |
| The following clusters a Cluster 3 | re from record c00075_scaffol., (original name was: scaffold78_cov657): Terpene | 1 | 20610 | | |
| The following clusters a Cluster 4 | re from record c00085_scaffol., (original name was: scaffold88_cov603); Microviridin-Nrps | 1 | 79000 | Anabaenopeptin biosynthetic gene cluster (100% of genes show similarity) | BGC0000302 c1 |
| The following clusters a Cluster 5 | re from record c00090_scaffol., (original name was: scaffold93_cov647): Otherks | 36355 | 69232 | Heterocyst alvcolipids biosynthetic gene cluster (42% of genes show similarity) | BGC0000869 c1 |
| The following clusters a Cluster 6 | re from record c00112_scaffol (original name was: scaffold115_cov723) T1pks | 1 | 20855 | Cylindrospermopsin_biosynthetic_gene_cluster (28% of genes show similarity) | BGC0000978_c1 |
| The following clusters a Cluster 7 | re from record c00123_scaffol., (original name was: scaffold126_cov565) Cyanobactin | 1 | 26281 | Anacyclamide_biosynthetic_gene_cluster (50% of genes show similarity) | BGC0000472_c1 |
| The following clusters a Cluster 8 | re from record c00155_scaffol (original name was: scaffold159_cov655) T1pks | 1 | 51712 | Puwainaphycins_biosynthetic_gene_cluster (30% of genes show similarity) | BGC0001125_c1 |
| The following clusters a Cluster 9 | re from record c00173_scaffol (original name was: scaffold177_cov655) Otherks-T1pks | 5801 | 57728 | Heterocyst alvcolipids biosynthetic gene cluster (100% of genes show similarity) | BGC0000869 c1 |
| The following clusters a Cluster 10 | re from record c00187_scaffol. (original name was: scaffold191_cov637) Bacteriocin | 12976 | 26050 | | |
| The following clusters a Cluster 11 | re from record c00196_scaffol., (original name was: scaffold200_cov624) T1pks-Nrps | 1 | 73038 | Nostophycin_biosynthetic_gene_cluster (27% of genes show similarity) | BGC0001029_c1 |
| The following clusters a Cluster 12 | re from record c00213_scaffol (original name was: scaffold217_cov658) Nrps-T1pks | 13775 | 97704 | Microcystin_biosynthetic_gene_cluster (61% of genes show similarity) | BGC0001016_c1 |
| | yuniversityof USF university of USF was | SENING For quality | | If you have found antidMADH useful, please one | 6. |
| MANCHESTER 1804 | DZIF | | | | |

Dentre os oito agrupamentos gênicos analisados manualmente, a produção de NOD, SPU, AER, GEO, MAAs e namalidas (Tabela 2) foram comprovadas por análises químicas, enquanto que a produção de aerótopos é possível de ser determinada pela flutualidade dos filamentos (Figura 15). Não foi detectada a produção de APT e SCY pela linhagem *N. spumigena* CENA596. Com exceção da GEO e namalides, todas as quatro moléculas já haviam sido detectadas anteriormente em *N. spumigena* (FEWER et al., 2009; MAZUR-MARZEC et al., 2006; MAZUR-MARZEC et al., 2013; VOB et al., 2013).

| Némen | Due dute metuwel | $[M+H]^+$ | $[M+H]^+$ | Subunidades | | | | | Δ |
|--------|-------------------------------------|--------------|-----------|-------------|-----|---------|-------|-------|-------|
| Numero | Produto natural | Experimental | Calculado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | (ppm) |
| 1 | Nodularina-R | 825.45 | 825.4505 | MeAsp | Arg | Adda | Glu | MeDhb | -0.6 |
| 2 | [D-Asp ¹] Nodularina | 811.4331 | 811.4349 | Asp | Arg | Adda | Glu | MeDhb | -2.1 |
| 3 | Espumigina D | 599.3186 | 599.3188 | Hpla | Hty | Pro | Argol | - | -0.3 |
| 4 | Espumigina F | 597.303 | 597.3031 | Hpla | Hty | Pro | Argal | - | -0.2 |
| 5 | Namalida A | 576.3382 | 576.3392 | Ile | Lys | Ile/Leu | Hty | - | -1.7 |
| 6 | Namalide B | 562.3221 | 562.3235 | Ile | Lys | Val | Hty | - | -2.5 |
| 7 | Aeruginosina NAL2 | 587.3551 | 587.3552 | Hex | Tyr | Choi | Argal | | -0.1 |
| 8 | Aeruginosina NOL3 | 589.3703 | 589.3708 | Hex | Tyr | Choi | Argol | - | -0.9 |
| 9 | Geosmina | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | Shinorina | 333.1275 | 333.1292 | - | - | - | - | - | -5.2 |
| 11 | Porfira 334 | 347.1449 | 347.1449 | - | - | - | - | - | 0 |

Tabela 2 – Produtos naturais conhecidos encontrados na linhagem *N. spumigena* CENA596. $[M+H]^+$ representa a massa das substâncias; Δ (ppm) refer-se ao erro da medida de massa exata

MeAsp=Metil aspartato; Arg=Arginina; Adda=3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6-decadienóico; Glu=Glutamato; MeDhb=N-metil-deidrobutirino; D-MeAsp=Ácido D-eritro-beta-metil-aspártico; Hpla=Ácido 3-4 hidroxifenil lático; Hty=Homotirosina; Pro=Prolina; Argo=Argininol; Argal=Argininal; Ile=Isoleucina; Lys=Lisina; Val=Valina; Hty= Homotirosina; Hex=Ácido hexanóico; Tyr=Tirosina; Choi=2-carboxi-6-hidroxioctahidroindol.

Figura 15 – Filamentos da linhagem *N. spumigena* CENA596. É possível observar a flutuabilidade dos filamentos graças a produção de aerótopos.



6.4.1 Nodularinas

Conforme descrito anteriormente, a hepatotoxina NOD é um produto natural de grande impacto para as atividades humanas e sua biossíntese é codificada pelo agrupamento *nda*, o qual é constituído por nove genes (*ndaA-I*) (MOFFITT; NEILAN, 2004). Este agrupamento mostrou ser conservado nas três linhagens de *N. spumigena* analisadas (CENA596, CCY9414 e NSOR10), apresentando a mesma organização de genes e tamanhos muito semelhantes entre eles (Figura 16).





Dentre as nove proteínas codificadas pelos genes do agrupamento *nda* na linhagem *N. spumigena* CENA596, três apresentaram alta similaridade (99%) com proteínas da linhagem *N. spumigena* NSOR10 (NdaF, NdaG e NdaI). As outras seis proteínas apresentaram alta similaridade (99%) com os genes encontrados na linhagem *N. spumigena* CCY9414 (Tabela 3).

| Proteinas | Amino acidos | Função proposta | Função | Organismo | Identidade | Nº de acesso |
|-----------|-----------------|----------------------|----------------------|-------------------------|------------|----------------|
| NdaA | 1299 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 99% | WP_017804327.1 |
| NdaB | 2607 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 99% | WP_017804328.1 |
| NdaC | 2641 | NRPS/PKS | NRPS/PKS | N. spumigena CCY9414 | 99% | WP_006195950.1 |
| NdaD | 3873 | PKS | PKS | N. spumigena CCY9414 | 99% | WP_006195949.1 |
| NdaE | 309 | Metiltransferase | Metiltransferase | N. spumigena CCY9414 | 99% | WP_006195948.1 |
| NdaF | 3475 | NRPS/PKS | NRSP/PKS | N. spumigena NSOR10 | 99% | AAO64407.1 |
| NdaG | 235 | Racemase | Racemase | N. spumigena NSOR10 | 99% | AAO64408.1 |
| NdaH | 341 | Dehidrogenase | Dehidrogenase | N. spumigena CCY9414 | 99% | WP_006195944.1 |
| NdaI | 601 | Transportador ABC | Transportador ABC | N. spumigena NSOR10 | 99% | AAO64410.1 |

Tabela 3 - Função proposta das proteínas NdaA-I codificadas pelo agrupamento gênico *nda* na linhagem *N. spumigena* CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Nda encontradas em genomas cianobacterianos

As sequências de aminoácidos dos sítios ligantes no domínio de adenilação dos genes *ndaA*, *ndaB* e *ndaF* também foram analisados (Tabela 4). As sequências mostram total similaridade entre as três linhagens consideradas. Entretanto, em contraste com a via biossintética proposta para a nodularina, a qual propõe a incorporação dos aminoácidos MeAsp no sítio *nda*A2 e Arg no sítio *nda*B (Figura 6), a análise indicou a incorporação dos aminoácidos Tyr e Glu, respectivamente.

Tabela 4 - Conservação dos quatro sítios ligantes no domínio de adenilação dos genes *ndaA*, *ndaB* e *ndaF*. *Amino ácido desconhecido. –Amino ácido similar

| Linhagem/Sítio ligante | ndaA1 | ndaA2 | ndaB | ndaF |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|
| N. spumigena CENA596 | DFWNIGMVHK | DARHVGIFVK | DVWNFGFVDK | DPRHSGVVGK |
| | Thr 100 % | Tyr 60 % | Glu 70 % | Glu 100 % |
| N. spumigena CCY9414 | | | | |
| | Thr 100 % | Tyr 60 % | Glu 70 % | Glu 100 % |
| N. spumigena NSOR10 | | | | |
| | Thr 100 % | Tyr 60% | Glu 70 % | Glu 100 % |

Thr=Treonina; Tyr=Tirosina; Glu=Glutamina.

O domínio de adenilação dos genes é responsável pelo reconhecimento e ativação dos aminoácidos a serem ligados durante a síntese da molécula e os eventos de recombinação deste domínio pode estar relacionado com a alta diversidade de aminoácidos que podem ser incorporados. Graças a conservação da estrutura terciária do domínio de adenilação, é possível predizer a atividade do sítio ligante de aminoácido, e consequentemente, prever a especificidade do domínio pelo substrato. (CHALLIS; RAVEL; TOWNSEND, 2000; FEWER et al., 2007; GEHRINGER et al., 2012).

A análise química por espectrometria de massas confirmou os resultados da análise de bioinformática e revelou a produção de duas variantes, a NOD-R e [D-Asp¹]NOD (Figura 17) (MAZUR-MARZEC et al., 2006). Além disso, os resultados são coerentes com a via biossintética proposta para a molécula, e indicam que os aminoácidos MeAsp e Arg são de fato incorporados nos sítios A2 e B, respectivamente (Tabela 2).

Figura 17 – Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem *N. spumigena* CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 825.4571([M+H]¹) para a NOD-R (A) e 811.4363([M+H]¹) para a [D-Asp¹]NOD (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes de nodularina (adaptado de CHEN et al., 2013).



É possível que a NOD tenha um papel importante no desenvolvimento da *N. spumigena*, dado a hipótese de a molécula apresentar função protetora contra estresses oxidativos e luminosos, predação e alopático a competidores (BRUTEMARK; ENGSTÖM-ÖST, 2013; PEARSON et al., 2010). Além disso, *Nodularia* bentônicas são conhecidas por não produzirem essa molécula (LYRA et al., 2005). Dessa forma, é possível que a NOD seja uma molécula que represente uma importante vantagem adaptativa para a exploração da superfície da água, o que pode estar relacionado à alta conservação do agrupamento gênico *nda* nas linhagens planctônicas analisadas.

6.4.2 Espumiginas e Anabaenopeptinas

As SPUs e as APTs são moléculas inibidoras de proteases (FEWER et al., 2009; ROUHIAINEN et al., 2010). As proteases são enzimas responsáveis pela quebra de outras proteínas, e dessa forma, elas estão intimamente ligadas a uma ampla gama de processos biológicos, como por exemplo, replicação de DNA, respostas do sistema imune, replicação e morte celular (ZHANG et al., 2016). Sendo assim, a inativação dessas enzimas pode causar problemas cardíacos, inflamatórios, câncer e desordens neurológicas (TURK, 2006).

Recentemente, verificou-se que em alguns genomas cianobacterianos os agrupamentos gênicos spu e apt estão proximamente localizados e são separados por uma região de 12 kbp que codificam enzimas biossintéticas (uma fosfolipase semelhante a patatina, uma L-homofenilalanina e quatro proteínas hipotéticas), sendo que se acredita que a L-homofenilalanina está ligada ao agrupamento apt e fornece substratos tanto para a síntese de APT como para a de SPU (LIMA et al., 2017). A organização gênica desse conjunto biossintético na N. spumigena CENA596 foi idêntica a encontrada na N. spumigena CCY9414 muito semelhante *Sphaerospermopsis* da torques-reginae **ITEP-024** e ao (Figura 18).

Figura 18 - Representação dos agrupamentos gênicos *spu* e *apt* nas linhagens *N. spumigena* CENA596, CCY9414 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024.



As sequências das 11 proteínas relacionadas à biossíntese da SPU e da APT na linhagem *N. spumigena* CENA596 apresentaram similaridades variáveis quando comparadas com aquelas encontradas nas linhagens *N. spumigena* CCY9414, *S. torques-reginae* ITEP-024 e *Aphanizomenon flos-aquae* (Tabela 5).

Tabela 5 - Função proposta das proteínas AptA-F e SpuA-F codificadas pelos agrupamentos gênicos *spu* e *apt* da linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Apt e Spu encontradas em genomas cianobacterianos

| Proteina | Amino ácido | Função proposta | Função do gene | Organismo | Identidade | Nº de acesso |
|----------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|--|------------|----------------|
| AptA | 2183 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 96% | EAW45416.1 |
| AptB | 1081 | NRPS | NRPS | A. flos-aquae | 90% | WP_027403946.1 |
| AptC | 2606 | NRPS | NRPS | A. flos-aquae | 80% | WP_027403947.1 |
| AptD | 1410 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 79% | EAW45419.1 |
| AptE | 392 | 2- isopropilmalato sintase | 2- isopropilmalato sintase | N. spumigena CCY9414 | 91% | EAW45420.1 |
| AptF | 764 | Transportador ABC | Transportador ABC | N. spumigena CCY9414 | 83% | EAW45421.1 |
| SpuA | 1401 | NRPS | Sintase | A. flos-aquae | 82% | WP_051424408.1 |
| SpuB | 4158 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 97% | EAW43197.1 |
| SpuC | 142 | Proteínas hipotética | Proteínas hipotética | Sphaerospermopsis torques-reginae ITEP-024 | 99% | API83184.1 |
| SpuD | 352 | Dehidrogenase | Dehidrogenase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43195.1 |
| SpuE | 271 | Reductase | Pirolina 5- carboxilase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43194.1 |
| SpuF | 683 | Transportador ABC | Transportador ABC | N. spumigena CCY9414 | 96% | AHJ31211.1 |
| SpuF | 683 | Transportador ABC | Transportador ABC | N. spumigena CCY9414 | 96% | AHJ31211.1 |

As sequências de aminoácidos dos sítios ligantes no domínio de adenilação dos genes *spuA-F* (Tabela 6) *e aptA-F* (Tabela 7) também foram analisadas. As sequências mostraram similaridades variáveis entre as três linhagens. Dessa forma, pode-se prever que a especificidade dos domínios se mantêm conservadas nas linhagens analisadas.

| Linhagem/Sítio ligante | spuA | $spuB_1$ | $spuB_2$ | spuB ₃ | |
|-----------------------------|------------|------------|------------|-------------------|--|
| N. spumigena CENA596 | ALLWIAASG* | DLAFTGCVTK | DVQFIAHAVK | DVETTGAVTK | |
| | HICA 50 % | Leu 60 % | Pro 90 % | Arg 70 % | |
| N. spumigena CCY9414 | * | | | | |
| | HICA 50 % | Leu 60 % | Pro 90 % | Arg 70 % | |
| S. torques-reginae ITEP-024 | GIF-HGG* | -ASTIAA-C- | | | |
| | HICA 60 % | Tyr 100% | Pro 90 % | Arg 70 % | |

Tabela 6 - Conservação dos quatro sítios ligantes no domínio de ligação dos genes spuA-B.

*Amino ácido desconhecido. – Amino ácido similar

HICA=Ácido alfa-hidroxi-isocaproico; Leu=Leucina; Pro=Prolina; Arg=Arginina.

Tabela 7 - Conservação dos seis sítios ligantes no domínio de ligação dos genes aptA-D.

| Linhagem/Sítio ligante | $aptA_1$ | aptA ₂ | | |
|-----------------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|
| N. spumigena CENA596 | DAFFLGVTYK | DTEDIGSVVK | | |
| | Ile 90 % | Lys 70 % | | |
| N. spumigena CCY 9414 | | | | |
| | Ile 90 % | Lys-b 70 % | | |
| S. torques-reginae ITEP-024 | | | | |
| | Ile 90 % | Lys 70 % | | |
| Linhagem/Sítio de ligação | aptB | $aptC_1$ | aptC ₂ | aptD |
| N. spumigena CENA596 | DGLWLGGVFK | DLGFTGCVTK | DLFNNALTYK | DAWTIAGICK |
| | Val 80 % | Leu 60 % | Ala 100% | Phe 90 % |
| N. spumigena CCY 9414 | -MWFMI- | AII- | GFSGCVT- | -VTA |
| | Val 70 % | Asn 60 % | Leu 60% | Phe 80 % |
| S. torques-reginae ITEP-024 | | | | |
| | Val 80 % | Leu 60 % | Ala 100% | Phe 80 % |

*Amino ácido desconhecido. -Amino ácido similar

Ile= Isoleucina; Lys=Lisina; Val=Valina; Leu=Leucina; Asn=Asparagina; Phe=Fenilalanina.

A análise química mostrou a produção das variantes SPU D e F pela *N. spumigena* CENA596 (Figura 19). Em comparação com as incorporações preditas pela análise dos quatro sítios ligantes, a análise química revelou que apenas a predição da prolina estava correta, uma vez que ao invés do ácido alfa-hidroxi-isocaproico (HICA), leucina e arginina, foram incorporados a substância ácido 4-hidroxifenilacético (Hpla), homotirosina e argininal/argininol, respectivamente (Tabela 2).

Figura 19 - Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem *N. spumigena* CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 599.3212([M+H]¹) para a espumigina D (A) e 597.2928 ([M+H]¹) para a espumigina F (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes de espumigina (adaptado de FEWER et al., 2009).



Embora a produção de APTs pela linhagem *N. spumigena* CENA596 não tenha sido detectada na análise por espectrometria de massas, existia a possibilidade do seu agrupamento gênico *apt* estar envolvido com a síntese da substância denominada namalida. Estudos em andamento constataram que as linhagens *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 (SANZ, et al., 2017¹) e *Nostoc* sp. CENA543 (JOKELA et al., 2017²), em preparação) são produtoras de namalidas. Namalida é um tetrapeptídeo cíclico com um aminoácido exogênico ligado ao macrociclo por uma ligação ureídeo, que estruturalmente é relacionada a APTs, mas que carece de dois resíduos de aminoácidos, com atividade inibidora de carboxipeptidase A (CHERUKU et al., 2012). A busca do agrupamento gênico biossintético de namalidas nos genomas das cianobactérias *S. torques-reginae* ITEP-024 e *Nostoc* sp. CENA543 não teve sucesso, mas ambas apresentaram o agrupamento gênico *apt*, levando à conclusão de que tanto as namalidas como as anabaenopeptinas são sintetizadas pela mesma via de peptídeo sintetase por meio do mecanismo de "módulo transposto" (*module skipping*)

¹ SANZ, M.; SALINAS, R.K.; PINTO, E. Namalides A and B and Spumigins K-N, new peptide inhibitors from the fresh water cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae*. Em fase de preparação, 2017.

² JOKELA, J.; et al., Brazilian benthic *Nostoc* sp. CENA543 produces a high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitor peptides, pseudospumigins. Em fase de elaboração, 2017.

descrito por Haynes e Challis (2007) (SHISHIDO et al., 2017³). Assim, na análise por espectrometria de massas buscando por moléculas de namalidas, esse produto foi encontrado na linhagem *N. spumigena* CENA596 (Figura 20).

Figura 20 - Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem *N. spumigena* CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 576.3416 ([M+H]¹) para a namalida A (A) e 562.3248 ([M+H]¹) para a namalida B (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes de namalidas (adaptado de JOKELA et al., 2017², em preparação).



6.4.3 Aeruginosinas

As AERs, da mesma forma que as SPUs, têm atividade inibidora das serina proteases (ERSMARK et al., 2008). A via biossintética dessas moléculas é amplamente variável e das muitas variantes possíveis, apenas uma fracção delas são conhecidas (ISHIDA et al., 2009). O agrupamento gênico responsável pela biossíntese de AER em *N. spumigena* foi descrito pela primeira vez na linhagem CCY9414 e muitas variantes já foram encontradas na espécie (FEWER et al, 2013; MAZUR-MARZEC e tal., 2013; VOß et al, 2013).

³ SHISHIDO, T.K.; et al. Nonribossimal namalides and anabaenopeptins originate from a common gene cluster by module skipping. Em fase de elaboração, 2017.

O agrupamento gênico *aer* na linhagem *N. spumigena* CENA596 mostrou-se similar ao encontrado na *N. spumigena* CCY9414, com exceção do gene *aerI* (codificante de uma enzima transferase) que foi substituído na linhagem CENA596 por outro codificante de uma proteína hipotética (Figura 21). Com exceção da proteína codificada por esse gene, todos as outras proteínas relacionadas à biossíntese da AER na linhagem CENA596 mostraram alta identidade com genes encontrados nas linhagens CCY9414 (Tabela 8).

Figura 21 - Representação do agrupamento gênico *aer* nas linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414.



Tabela 8 - Função proposta das proteínas AerB-M codificadas pelo agrupamento gênico *aer* na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Aer encontradas em genomas cianobacterianos

| Proteina | Amino ácido | Função proposta | Função do gene | Organismo | Identidade | Nº de acesso |
|----------|----------------|---------------------|------------------------|-------------------------|------------|--------------|
| AerM | 1490 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43321.1 |
| AerB | 1518 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 97% | EAW43322.1 |
| AerD | 198 | Decarboxilase | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 100% | EAW43323.1 |
| AerE | 211 | Desconhecida | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43324.1 |
| AerF | 266 | Redutase | Redutase | N. spumigena CCY9414 | 100% | AHJ31346.1 |
| AerG | 1090 | NRPS | NRPS | N. spumigena CCY9414 | 98% | EAW43326.1 |
| AerI | 69 | Glicosiltransferase | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 94% | EAW43327.1 |

Da mesma forma que os outros agrupamentos gênicos, os genes *aer* tiveram as sequências de aminoácidos dos sítios ligantes no domínio de adenilação analisados. Foram encontrados três sítios de ligação, os quais estão localizados nos genes *aerM*, *aerV* e *aerG* (Tabela 9). A especificidade destes domínios se mostrou estar totalmente conservada entre as linhagens CENA596 e CCY9414.

| Linhagem/Sítio de ligação | aerM | aerB | aerG |
|---------------------------|------------|------------|------------|
| N. spumigena CENA596 | DVENVGAITK | DASTIAAVCK | DVHICAFLVK |
| | Arg 70 % | Tyr 100 % | Pro 50 % |
| N. spumigena CCY9414 | | | |
| | Arg 70 % | Tyr 100 % | Pro 50 % |

Tabela 9 - Conservação dos 4 sítios ligantes no domínio de ligação dos genes aerB-M

–Amino ácido similar

Arg= Arginina; Tyr=Tirosina; Pro=Prolina.

A análise química da linhagem CENA596 revelou a produção de AER NAL2 e NOL3 pela mesma (Figura 22). Ao contrário do indicado na predição dos sítios de ligação, o gene *aerG* é responsável pela incorporação do aminoácido Choi na molécula. Além disso, a modificação do gene *aerI*, cuja proteína atua como uma transferase, não causou nenhuma modificação expressiva na expressão do agrupamento *aer*.

Figura 22- Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem *N. spumigena* CENA596. Os picos com valores circulado indicam o íon molecular com sinal de m/z de 569.3403 ([M+H]¹) para a aeruginosina NAL2 (A) e 589.3728 ([M+H]¹) para a aeruginosina NOL3 (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes de aeruginosinas (adaptado de MAZUR-MARZEC et al., 2013).



Por se tratar de um genoma incompleto, não é possível determinar se ouve algum erro de sequenciamento ou se realmente o gene *aerI* sofreu alguma alteração. Entretanto, eventos de inversão, deleção, reordenamentos, fusões e fissões de genes são frequentes em genomas

bacterianos e são conhecidos por atuarem como mecanismos de evolução genética, nos quais proteínas multi-domínio evoluem (KUMMERFELD; TEICHMANN, 2005; TILLIER; COLLINS, 2000). Diversas variantes dessa molécula já foram descritas na espécie *Nodularia spumigena*, na qual os inibidores de proteases podem atuar como parte do sistema de defesa dos organismos, principalmente contra a ação de predadores (FEWER et al., 2013).

6.4.4 Geosmina

A GEO é frequentemente responsável pelo odor e sabor característico de terra molhada em água potável e produtos da pesca, uma vez que o limiar de sensibilidade pelo olfato e paladar humano é muito baixo (GIGLIO et al., 2008). Consequentemente, a GEO está frequentemente associada a perdas econômicas durante o abastecimento de água potável e na aquicultura (WATSON et al., 2008). A biossíntese dessa molécula já foi identificada em diversos microrganismos, como fungos, proteobactérias, actinobactérias e cianobactérias. As actinobactérias são conhecidas por serem as maiores produtoras dessa substância em ambientes terrestres, enquanto que as cianobactérias são tidas como as principais produtoras da GEO em corpos d'água (SUURNÄKKI et al., 2015).

O agrupamento *geo* em cianobactérias apresenta três genes, geosmina sintase (*geo*) e dois genes reguladores (*cnb1* e *cnb2*) (Figura 23) (GIGLIO et al., 2008; WANG et al., 2015). As proteínas codificadas pelo agrupamento *geo* na linhagem CENA596 mostraram maior homologia com os genes encontrados na linhagem *Cylindrospermum stagnale* PCC 71417 (Tabela 10).

Figura 23 – Representação do agrupamento gênico *geo* na linhagem *N. spumigena* CENA596 e em outras cianobactérias.



| | - | - | | - | | |
|----------|----------------|--------------------|--------------------|-------------------------|------------|----------------|
| Proteina | Amino ácido | Função proposta | Função do gene | Organismo | Identidade | Nº de acesso |
| GeoA | 756 | Terpeno sintase | Terpeno sintase | C. stagnale PCC 7417 | 88% | WP_015209723.1 |
| Cnb1 | 469 | Gene Regulador | cAMP | C. stagnale PCC 7417 | 91% | WP_015209722.1 |
| Cnb2 | 468 | Gene regulador | cAMP | C. stagnale PCC 7417 | 83% | WP_015209721.1 |

Tabela 10 – Função proposta das proteínas GeoA e Cnb1-2 codificadas pelo agrupamento gênico *geo* na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outros genes de geosmina encontradas em genomas cianobacterianos

A produção de GEO pela linhagem CENA596 foi confirmada por análise das células no aparelho SPME-GC-MS (Figura 24). A molécula parece ser parte das respostas ao estresse oxidativo em fungos e, consequentemente, pode ter a mesma função em cianobactérias (BEHR et al., 2014). Como a presença do agrupamento *geo* e a produção de GEO no gênero não haviam sidos constatadas anteriormente na espécie, a disponibilidade de outros genomas de *N*. *spumigena* pode no futuro indicar se essa molécula está amplamente distribuída na mesma.

Figura 24 - Análise por SPME-GC-MS da linhagem CENA596 e molécula da geosmina. O pico indica a detecção da molécula.





Os aerótopos (ou vesículas gasosas) são compostos por proteínas presentes no interior das células e são encontrados frequentemente em cianobactérias planctônicas, nas quais são responsáveis pela regulação da sua flutuabilidade (WALSBY, 1994). A produção dessas estruturas permite que os filamentos flutuem na superfície da água e o posicionamento dos mesmos sob condições ótimas de luz e oxigênio para o crescimento (MLOUKA et al., 2004).

No caso do gênero *Nodularia*, a produção dessas estruturas é utilizada como um marcador fenotípico para a classificação de espécies aquáticas planctônicas e bentônicas (LYRA, 2005).

O agrupamento gênico responsável pela codificação dos aerótopos na linhagem CENA596 é composto de aproximadamente 6,6 kpb e apresentou organização semelhante ao encontrado na linhagem CCY9414 (Figura 25; Tabela 11).

Figura 25 – Representação do agrupamento gênico *gvp* nas linhagens *N. spumigena* CENA596 e CCY9414.



Tabela 11 – Função proposta das proteínas GvpA-W codificadas pelo agrupamento gênico *gvp* na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Gvp encontradas em genomas cianobacterianos

| Proteina | Amino ácidos | Função proposta | Função do gene | Organismo | Identidade | Nº de acesso |
|----------|-----------------|--|--|---------------------------------------|------------|--------------|
| GvpA | 70 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | Microcystis aeruginosa NIES-843 | 99% | BAG03580.1 |
| GvpC | 223 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | N. spumigena | 96% | AAP46544.1 |
| GvpN | 326 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | N. spumigena CCY9414 | 99% | AHJ27875.1 |
| GvpJ | 78 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | N. spumigena CCY9414 | 95% | EAW43906.1 |
| GvpK | 154 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | N. spumigena CCY9414 | 100% | EAW43905.1 |
| GvpF/L | 246 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43904.1 |
| GvpG | 99 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína constituinte de aerótopos | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43903.1 |
| GvpW | 226 | Proteína constituinte de aerótopos | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW43901.1 |

6.4.6 Aminoácidos tipo micosporina

Os MAAs são metabólitos secundários produzidos por diversos organismos e que atuam principalmente na proteção à exposição da radiação solar (HÄDER et al., 2007). Esses aminoácidos são armazenados no interior das células, incolores, solúveis em água e capazes de serem absorvidos por outros organismos por meio da cadeia alimentar (HELBLING; MENCHI; VILLAFAÑE, 2002). Além de sua função fotoprotetora, as micosporinas e as MAAs parecem desempenhar papéis importantes como, solutos antioxidantes e reservatório de nitrogênio intracelular (D'AGOSTINO et al., 2016).

O agrupamento gênico *mys* encontrado na linhagem CENA596 tem tamanho aproximado de 4.8 kbp e apresentou a mesma organização em relação ao encontrado na linhagem CCY941, a qual já foi identificada como produtora desses aminoácidos (VOß et al., 2013) (Figura 26). Foram encontrados quatro genes que apresentaram funções em conformidade ao encontrado na cianobactéria *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (BALSKUS; WALSH; 2011) (Tabela 12).

Figura 26 – Representação do agrupamento *mys* na linhagem *N. spumigena* CENA596 e CCY9414.



Tabela 12 – Função proposta das proteínas MysA-D codificadas pelo agrupamento gênico *mys* na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Mys encontradas em genomas cianobacterianos

| Proteina | Amino acidos | Função proposta | Função do gene | Organismo | Identidade | Número de acesso |
|----------|-----------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|------------|---------------------|
| MysA | 409 | DHQS | 3-dehidroquinato sintase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW44170.1 |
| MysB | 277 | O-MT | O-metiltransferase | N. spumigena CCY9414 | 97% | EAW44169.1 |
| MysC | 465 | Ligação de ATP | Ligação de ATP | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW44167.1 |
| MysD | 350 | Enzima NRPS | D-alanina ligase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW44166.1 |

A análise química confirmou a produção dos MAAs denominados sinorina e porfira-334 pela linhagem CENA596 (Figura 27). Essas substâncias já haviam sido detectadas em *Nodularia* e provavelmente estão relacionadas com a proteção de componentes celulares dos impactos negativos da radiação solar (SINHA et al., 2003). Considerando que esses pigmentos são frequentemente encontrados em cianobactérias terrestres, as quais são expostas a maiores intensidades luminosas, é possível que a produção dos mesmos pelas duas linhagens planctônicas esteja relacionada a exploração da superfície da água (VOB et al., 2013).

Figura 27- Análise por LC-MS/MS do extrato da linhagem *N. spumigena* CENA596. Os picos com valores circulados indicam o íon molecular com sinal de m/z de 333.1264 ([M+H]¹) para a sinorina (A) e 347.1454 ([M+H]¹) para a porfira 334 (B). Em destaque estão as diferenças entre as duas variantes de aminoácidos tipo micosporina (adaptado de MIYAMOTO et al., 2014).



6.4.7 Citonemina

A SCY é um pigmento hidrofóbico capaz de absorver radiação UV-A e é encontrado exclusivamente nas bainhas de cianobactérias (MATSUI et al., 2012). Essas cianobactérias são normalmente encontradas nas camadas superiores de comunidades microbianas, local onde são expostas a grande incidência de radiação solar (BALSKUS; CASE; WALSH, 2011). A molécula também apresenta ação anti-inflamatória e anti-proliferativa sem toxicidade química, o que pode permitir aplicação biotecnológicas da molécula (STEVENSON et al., 2002).

O agrupamento gênico *scy* encontrado na linhagem *N. spumigena* CENA596 apresentou sintenia com o já descrito na linhagem *N. spumigena* CCY9414 (SORRELS et al., 2009) (Figura

28). Além disso, as proteínas codificadas pelos genes *scy* dessas duas linhagens apresentaram alta identidade entre si (Tabela 13). Apesar das semelhanças, a análise química não foi capaz de detectar a produção desse pigmento pela linhagem CENA596, enquanto que a CCY9414 é produtora do mesmo (VOß et al., 2013).

Figura 28- Representação do agrupamento scy nas linhagens N. spumigena CENA596 e CCY9414.



| Proteina | Amino ácidos | Função proposta | Função do gene | Organismo | Identidade | Número de acesso |
|---------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|------------|---------------------|
| Response regulator | 277 | Regulação e sinalização | Regulação e sinalização | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46885.1 |
| Sensor kinase | 658 | Regulação e sinalização | Regulação e sinalização | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46884.1 |
| ScyA | 627 | Proteína hipotética | Sintase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46883.1 |
| ScyB | 353 | Proteína hipotética | Dehidrogenase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46882.1 |
| ScyC | 323 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46881.1 |
| ScyD | 419 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46880.1 |
| ScyE | 441 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 98% | EAW46879.1 |
| ScyF | 391 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 97% | EAW46877.1 |
| ORF1 | 233 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 98% | EAW46876.1 |
| Hydrolase | 301 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 97% | AHJ31537.1 |
| UbiA | 306 | Transferase | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 96% | EAW46874.1 |
| Glycosyl | 429 | Glicosiltransferase | Glicosiltransferase | N. spumigena CCY9414 | 97% | EAW46873.1 |
| TyrA | 297 | Dehidrogenase | Dehidrogenase | N. spumigena CCY9414 | 98% | EAW46872.1 |
| DsbA | 223 | Oxidoreductase | Oxidoreductase | N. spumigena CCY9414 | 92% | EAW46871.1 |
| AroB | 402 | Sintase | Sintase | N. spumigena CCY9414 | 97% | EAW46870.1 |
| ORF2 | 413 | Proteína hipotética | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 98% | AW46869.1 |
| Phosphodiest | 460 | Fosfodiesterase | Proteína hipotética | N. spumigena CCY9414 | 96% | EAW46868.1 |
| TrpE | 732 | Sintase de antranilato | Sintase de antranilato | N. spumigena CCY9414 | 96% | EAW46867.1 |
| TrpC | 275 | Sintase | Sintase | N. spumigena CCY9414 | 96% | EAW46866.1 |
| ТгрА | 275 | Sintase | Sintase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46865.1 |
| TrpB | 408 | Sintase | Sintase | N. spumigena CCY9414 | 99% | AHJ31526.1 |
| TrpD | 368 | Transferase | Transferase | N. spumigena CCY9414 | 98% | EAW46863.1 |
| AroA | 354 | Sintase | Sintase | N. spumigena CCY9414 | 99% | EAW46862.1 |

Tabela 13 – Função proposta das proteínas codificadas pelo agrupamento gênico *scy* na linhagem CENA596 e a maior porcentagem de similaridade de suas sequências com outras Scy encontradas em genomas cianobacterianos

7. CONCLUSÕES

- Este trabalho apresenta novas perspectivas em estudos de cianobactérias relacionados à evolução e adaptação dentro de um único gênero. A comparação genômica de duas linhagens de *N. spumigena* de origens tão distintas geograficamente, CENA596 do oceano Atlântico Sul e CCY9414 do mar Báltico, contribuiu para esclarecer a relação filogenética entre elas e diferenciar os genes específicos de cada uma delas, embora a maioria deles ainda seja desconhecidos.
- A mineração do genoma da *N. spumigena* CENA596 por agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de metabólitos secundários evidenciou o vasto potencial deste gênero para produção de moléculas bioativas e alerta para a necessidade de levantamentos e monitoramentos de substâncias potencialmente nocivas, especialmente em ambientes aquáticos explorados por atividades humanas.
- As análises realizadas mostraram que o genoma da linhagem Atlântica CENA596 é consideravelmente conservado em relação ao genoma da linhagem Báltica CCY9414. Embora a maioria dos agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de moléculas bioativas identificados estavam presentes em ambos os genomas, como a função da maior parte dos genes específicos de cada uma dessas duas linhagens ainda é desconhecida, a diversidade genômica e o potencial biossintético dessa espécie ainda não pôde ser totalmente explorado.
- Futuros estudos incluindo isolados de outras regiões podem contribuir para um melhor entendimento desse gênero, ajudar na prevenção de danos causados por florações tóxicas e possibilitar a descoberta de novos produtos naturais com atividades farmacológicas e biológicas.

REFERÊNCIAS

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 9, p.2104-2105, 2005.

AKCAALAN, R. et al. Phenotypic and toxicological characterization of toxic *Nodularia spumigena* from a freshwater lake in Turkey. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 273-278, 2009.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Cambridge:BabrahamInstitute,2010.Disponível<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Acesso em: 8 abr. 2016.

AZIZ, R.K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC** Genomics, London, v .9, p. 75, 2008.

AZMA, M. et al. Improved protocol for the preparation of *Tetraselmis suecica* axenic culture and adaptation to heterotrophic cultivation. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 4, p. 36-46, 2010.

BALSKUS, E.P.; CASE, R.J.; WALSH, C.T. The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. **FEMS Microbiolgy Ecology**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 322–332, 2011.

BALSKUS, E.P.; WALSH, C.T. The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. **Science**, Washington, DC, v. 329, n. 5999, p. 1653-1656, 2010.

BARDA, I. et al. Bioaccumulation of hepatotoxins – A considerable risk in the Latvian environment. **Environmental Pollution**, Essex, v. 196, p. 313-320, 2015.

BEATTIE, K.A.; KAYA, K.; CODD, G.A. The cyanobacterium *Nodularia* PCC7804, of freshwater origin, produces [L-Har2] nodularin. **Phytochemistry**, London, v. 54, n. 1, p. 57-61, 2000.

BEHR, M. et al. Description of the mechanisms underlying geosmin production in *Penicillium expansum* using proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, n. 96, p. 13–28, 2014.

BEUTEL, M.W. et al. Limnological effects of anthropogenic desiccation of a large, saline lake, Walker lake, Nevada. **Hydrobiologia**, Deen Haag, v. 466, n. 1, p. 91-105, 2001.

BLACKBURN, S.I. et al. Effect of salinity on growth and toxin production in cultures of the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* from Australian waters. **Phycologia**, Berkeley, v. 35, n. 6, p. 511-522, 1996.

BOLOTIN, E.; HERSHBERG, R. Bacterial intra-species gene loss occurs in a largely clocklike manner mostly within a pool of less conserved and constrained genes. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 35168, 2016.

BRADNAM, K.R. et al. Assemblathon 2: Evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. **GigaScience**, London, v. 2, n. 1, p. 10, 2013.
BRUTEMARK, A.; ENGSTRÖM-ÖST, J. Does the presence of zooplankton influence growth and toxin production of *Nodularia spumigena*? **International Review of Hydrobiology**, Berlin, v. 98, n. 5, p. 1522-2632, 2013.

BURFOR, M.A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1-4, p. 232:525-537, 2004.

CAIRE, G.Z. et al. Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, n. 3, p. 249–253, 1997.

CAIXACH, J. et al. Liquid chromatography – mass spectrometry. In: MERILUOTO, J.; SPOOF, L.; CODD, G.A. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. Hoboken: John Wiley, 2017. p. 218-257.

CALTEAU, A. et al. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. **BMC Genomics**, London, v.15, p. 977, 2014.

CARMICHAEL, W.W. et al. Toxicity and partial structure of a hepatotoxic peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend. L575 from New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 54, n. 9, p. 2257–2263, 1988.

CASAMATTA, D.A.; GOMEZ, S.R.; JOHANSEN, J.R. *Rexia erecta* gen. nov. et sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 561, p. 13-26, 2006.

CHALLIS, G.L.; RAVEL, J.; TOWNSEND, C.A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. **Chemical Biology**, Cambridge, v. 7, p. 211-224, 2000.

CHEN, Y.; SHEN, D.; FANG, D. Nodularins in poisoning. Clinica Chimica Acta, Amsterdam, v. 425, p. 18-29, 2013.

CHOI, J.S. et al. Procedures for the axenic isolation of conchocelis and monospores from the red seaweed *Porphyra yezoensis*. Journal of Applied Phycology, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 115–121, 2002.

CHUN, J.; RAINEY, F.A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. International. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 64, p. 316-324, 2014.

COLE, J.K. et al. Phototrophic biofilm assembly in microbial-mat-derived unicyanobacterial consortia: model systems for the study of autotroph-heterotroph interactions. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 109, 2014.

COPP, J.N. et al. Characterization of PPTNs, a cyanobacterial phosphopantetheinyl transferase from *Nodularia spumigena* NSOR10. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 189, n. 8, p. 3133–3139, 2007.

CORRE, C.; CHALLIS, G.L. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. **Natural Products Reports**, London, v. 26, n.8, p. 977–986, 2009.

D'AGOSTINO, P.M. et al. Comparative profiling and discovery of novel glycosylated mycosporine-like amino acids in two strains of the cyanobacterium *Scytonema* cf. *crispum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 82, p. e.5951–5959, 2016.

DROBAC, D. et al. Cyanobacteria and cyanotoxins in fishponds and their effects on fish tissue. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 55, p. 66-76, 2016.

DONIA, M.S.; SCHIMIDT, E.W. Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family. **Chemistry and Biology**, London, v. 18, n. 4, p. 508-519, 2011.

DÖRR. F.A. **Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**: aplicações para o estudo de toxinas produzidas por cianobactérias. 2011. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DÖRR, F.A et al. Dissociation of deprotonated microcystin variants by collision-induced dissociation following electrospray ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 25, p. 1981–1992, 2011.

EDLER, L. et al. Mortality of dogs associated with a bloom of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. **Ophelia**, Helsingør, v. 24, n. 2, p. 103-109, 1985.

EMERENCIANO, M. et al. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). Aquaculture Research, Oxford, v. 43, n. 3, p. 447-457, 2012.

ERIKSSON, J.E. et al. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **Toxicon**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 161-166, 1988.

ERSMARK, K.; DEL VALLE, J.R.; HANESSIAN, S. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. **Angewandte Chemie**, New York, v. 47, v. 7, p. 1202–1223, 2008.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

FALCÓN, L.I.; ESCOBAR-BRIONES, E.; ROMERO, D. Nitrogen fixation patterns displayed by cyanobacterial consortia in Alchichica crater-lake, Mexico. **Hydrobiologia**, Deen Haag, v. 467, n. 1, p. 71-78, 2002.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2014. Disponível em: http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2016.

FERRIS, M.J.; HIRSCH, C.F. Method for isolation and purification of Cyanobacteria. **Applied** and Environmental Microbiology, Washington, DC, v. 57, n. 5, p. 1448–1452, 1991.

FEWER, D.P. et al. New Structural Variants of Aeruginosin Produced by the Toxic Bloom Forming Cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p.e.73618, 2013.

FEWER, D.P. et al. The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 73, p. 924–937, 2009.

FEWER, D.P. et al. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183, 2007.

FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides1. Annual Review of Microbiology, v. 58, p. 453-488, 2004.

FOGG, G.E. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemn. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 19, p. 78-87, 1942.

FRANCIS, C. Poisonous Australian lake. Nature, London, v. 18, p11-12, 1878.

FRÓES, C et al. Densidade de estocagem na engorda de camarão-branco cultivado em sistema de biofloco. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 48, n. 8, p. 878-884, 2013.

GABALDÓN, T.; KOONIN, E.V. Functional and evolutionary implications of gene orthology. **Natural Reviews Genetics**, London, v. 14, n. 5, p. 360–366, 2013.

GALAT, D.L.; VERDIN, J.P.; SIMS, L.L. Large-scale patterns of *Nodularia spumigena* blooms in Pyramid lake, Nevada, determined from Landsat imagery: 1972-1986. **Hydrobiologia**, Deen Haag, v. 197, n. 1, p. 147-164, 1990.

GAMBARO, A. et al. Simultaneous quantification of microcystins and nodularin in aerosol samples using high-performance liquid chromatography/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Londn, v. 26, p. 1497–1506, 2012.

GEHRINGER, M.M. et al. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. **The ISME Journal**, London, v. 6, n. 10, p. 1834-1847, 2012.

GIGLIO, S. et al. Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, n. 21, p. 8027-8032, 2008.

GREAVER, J.; ROBOZ, J. Mass spectrometry for the novice. Boca Raton: CRC Press, 2014.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Ed.). **Culture of marine invertebrate Animals**. New York: Plenum, 1975. p. 29-60.

HÄDER, D.-P. et al. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. **Photochemical & Photobiolical Sciences**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 267–285, 2007.

HARDING, W.R. et al. Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 66, n. 4, p. 256-259, 1995.

HARAGUCHI, L.; ODEBRECHT, C. Potentially toxic microalgae in a subtropical estuary and adjacent coast in Brazil with emphasis on the new record of *Nodularia spumigena* (32°S; 52°W). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE, 15., 2012, Gyeongnam, Coreia do Sul. **Proceedings...** Gyeongnam: ICHA, 2012. p. 37-40, 2012.

HAŠLER, P. et al. The importance of polyphasic approach in the comparative study on *Nodularia* MERTENS ex BORNET et FLAHAULT (Nostocales, Cyanobacteria). **Preslia**, Praha, v. 83, n.3, p. 167–182, 2011.

HAYES, P.K.; BARKER, G.L.A. Genetic diversity within Baltic Sea populations of *Nodularia* (Cyanobacteria). **Journal of Phycology**, Malden, v. 33, v. 6, p. 919–923, 1997.

HEANEY, S.I.; JAWORSKI, G.H.M. A simple separation technique for purifying microalgae. **British Phycologycal Journal**, Leicester, v. 12, p. 171-174, 1977.

HECK, K. et al. Evaluating methods for purifying cyanobacterial cultures by qPCR and high-throughput Illumina sequencing. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 129, p. 55–60. 2016.

HELBLING, E. W.; MENCHI, C. F.; VILLAFAÑE, V. E. Bioaccumulation and role of UVabsorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. **Photochemical & Photobiolical Sciences**, Cambridge v. 1, n. 10, p. 820–825, 2002.

HERESZTYN, T.; NICHOLSON, B.C. Nodularin concentrations in lakes Alexandrina and Albert, South Australia, during a bloom of the cyanobacterium (blue-green alga) *Nodularia spumigena* and degradation of the toxin. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, n.4, p. 273-282, 1997.

HONKANAN, R.E. et al. Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 40, n. 4, p. 577-583, 1991.

ISHIDA, K. et al. Plasticity and Evolution of Aeruginosin Biosynthesis in Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 7, p. 2017-2026, 2009.

JODŁWSKA, S.; LATAŁA, A. Photoacclimation strategies in the toxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* (Nostocales, Cyanobacteria). **Phycologia**, Berkeley, v. 49, n. 3, p.203-211, 2010.

KAJITANI, R. et al. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from wholegenome shotgun short reads. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 8, p. 1384-1395, 2014.

KANKAANPÄÄ, H. et al. Heterogeneity of nodularin bioaccumulation in northern Baltic Sea flounders in 2002. **Chemosphere**, Oxford v. 59, n. 8, p. 1091–1097, 2005.

KARJALAINEN, M. et al. Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea. **Ambio**, Stockholm, v. 36, n. 2-3, p.195-202, 2007.

KARLSON, A.M.L.; MOZURAITIES, R. Deposit-feeders accumulate the cyanobacterial toxin nodularin. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 12, p. 77–81, 2011

KAUSHIK, R.; BALASUBRAMANIAN, R. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 43, p. 1349–1383, 2013.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, *n*. 12, p. 1647-1649, 2012.

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.

KERSTEN, R.D. et al. A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. **Nature Chemical Biology**, London, v. 7, n. 11, p. 794-802, 2011.

KLEIN, A.P. et al. Efeito da redução de fósforo e da adição de *Thalassiosira weissflogii* na densidade de *Nodularia* e da associação fitoplânctônica de água de cultivo de camarão marinho. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR, 14., 2011, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú, 2011.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H.A. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 236, n. 2, p. 335-351, 1996.

KOMÁREK, J.; HAUER, T. **CyanoDB.cz** - **On-line database of cyanobacterial genera**. České Budějovice: University of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, 2013. Disponível em: http://www.cyanodb.cz. Acesso: 15 dez. 2013.

KOMÁREK, J. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). **Hydrobiologia**, Den Haag, v. 639, p. 245-259, 2010.

KOMÁREK, K. et al. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, Praha, v. 86, p. 295-335, 2014.

KOMÁREK, J.; MAREŠ, J. An update to modern taxonomy (2011) of freshwater planktic heterocytous cyanobacteria. **Hydrobiologia**, Deen Haag, v. 698, n. 1, p. 327–351, 2012.

KORELUSOVÁ, J. **Phylogeny of heterocytous cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales)**. 2008. 33 f. Dissertation (M.Sc. in Botany) - Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, 2008.

KORPINEN, S.; KARJALAINEN, M.; VIITASALO, M. Effects of cyanobacteria on survival and reproduction of the littoral crustacean *Gammarus zaddachi* (Amphipoda). **Hydrobiologia**, Deen Haag, v. 559, n. 1, p. 285-295, 2006.

76

KOSKENNIEMI, L. et al. Quantitative real-time PCR detection of toxic *Nodularia* cyanobacteria in the Baltic Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 7, p. 2173-2179, 2007.

KRUMMENAUER, D. et al. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 42, p. 726-733, 2011.

KUMMERFELD, S.K.; TEICHMANN, S.A. Relative rates of gene fusion and fission in multidomain proteins. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 21, p. 25–30, 2005.

LAAMANEN, M.J. et al. Diversity of toxic and nontoxic *Nodularia* isolates (cyanobacteria) and filaments from the Baltic Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 10, p. 4638-4647, 2001.

LANKOFF, A. et al. Nodularin-induced genotoxicity following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 164, n. 3, p. 239-248, 2006.

LARSSON, J.; NYLANDER, J.A.A.; BERGMAN, B. Genome flunctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive trais. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, p. 187, 2011.

LAWTON, L.A.; EDWARDS, C. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 619, p. 513-537, 2008. doi: 10.1007/978-0-387-75865-7_23.

LEHTIMÄKI, J et al. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish Waters, by genotypic and phenotypic methods. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 1043–53, 2000.

LEIKOSKI, N. et al. Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, DC, v. 76, n. 3, p. 701-709, 2010.

LI, B. et al. Catalytic promiscuity in the biosynthesis of cyclic peptide secondary metabolites in planktonic marine cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, n. 23, p. 10430-10435, 2010.

LIMA, S.T. et al. Genetic Organization of Anabaenopeptin and Spumigin Biosynthetic Gene Clusters in the Cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024. **ACS Chemical Biology**, Washington, DC, v. 12, n. 3, p. 769-778, 2017.

LOPES, V.R. et al. Morphological, toxicological and molecular characterization of a benthic Nodularia isolated from Atlantic estuarine environments. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, p. 9–17, 2010

LUNDGREN, V.; GRANÉLI, E.; PFLUGMACHER, S. Influence of *Acartia* cf. *bifilosa* (Copepoda) on morphology and toxicity of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae). **Harmful** Algae, Amsterdam, v. 18, p. 18:35-46, 2012.

LYRA, C. et al. Benthic cyanobacteria of the genus *Nodularia* are non-toxic, without gas vacuoles, able to glide and genetically more diverse than planktonic *Nodularia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 555–568, 2005.

MAIN, D.C. et al. Sheep mortalities associated with the blue green alga: *Nodularia spumigena*. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 53, n. 12, p. 578-581, 1977.

MATSUI, K. et al. The cyanobacterial UV-absorbing pigment scytonemin displays radicalscavenging activity. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 137–144, 2012.

MAURENTE, L.P.B. **Trabalho de Conclusão de Curso Estágio Supervisionado.** 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Aquicultura) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2014.

MAZUR-MARZEC, H. et al. Diversity of peptides produced by *Nodularia spumigena* from various geographical regions. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, n. 1, p. 1-19, 2013.

MAZUR-MARZEC, H. et al. Toxic *Nodularia spumigena* blooms in the coastal waters of the Gulf of Gdansk: a ten-year survey. **Oceanologia**, Amsterdam v. 48, n. 2, p. 255-273, 2006.

MAZUR-MARZEC, H. et al. Accumulation of nodularin in sediments, mussels, and fish from the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. **Environmental Toxicology**, New York, v. 22, n. 1, p. 101–111, 2007.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MCGREGOR, G.B. et al. First report of a toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/ Cyanobacteria) bloom in sub-tropical Australia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 9, n. 7, p. 2396-2411, 2012.

MCLENNAN, A.G. The Nudix hydrolase superfamily. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 63, n. 2, p. 123–143, 2006.

MEDEMA, M.H et al. Pep2Path: automated mass spectrometry-guided genome mining of peptidic natural products. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. e. 1003822, 2014.

MEGLIČ, A. et al. Electrochemical inactivation of cyanobacteria and microcystin degradation using a boron-doped diamond anode — A potential tool for cyanobacterial bloom control. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 53, p. 248-261, 2017.

METCALF, J.S. et al. Cyanotoxins in desert environments may present a risk to human health. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 421–422, p. 118-123, 2012.

MICALLEF, M.L. et al. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. **Marine Genomics**, Amsterdam, v. 21, p. 1–12, 2015.

MILLER, W. G. et al. Diversity within the *Campylobacter jejuni* type I restriction-modification loci. **Microbiology**, Washington DC, v. 151, p. 337-51, 2005.

MIYAMOTO, K.T.; KOMATSU, M.; IKEDA, H. Discovery of gene cluster for mycosporinelike amino acid biosynthesis from actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 80, n. 16, p. 5028–5036, 2014.

MLOUKA, A.; COMTE, K; TANDEAU DE MARSAC, N. Mobile DNA elements in the gas vesicle gene cluster of the planktonic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 237, p. 27–34, 2004.

MOFFITT, M.C.; NEILAN, B.A. On the presence of peptide synthetase and polyketide synthase genes in the cyanobacterial genus *Nodularia*. **FEMS Microbial Letters**, Amsterdam, v. 196, n. 2, p. 207-214, 2001.

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.

MSAGATI, T.A.; SIAME, B.A.; SHUSHU, D.D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 78, n. 4, p. 382–397, 2006.

MÜLLER, R.; WINK, J. Future potential for anti-infectives from bacteria - how to exploit biodiversity and genomic potential. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 304, n. 1, p. 3–13, 2014.

NEHRING, S. Mortality of dogs associated with a mass development of *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae) in a brackish lake at the German North Sea coast. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 867-872, 1993.

NEILAN, B.A. et al. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 181, n. 13, p. 4089–4097, 1999.

NETT, M. Genome mining: concept and strategies for natural product discovery. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Wien, v. 99, p. 199–245, 2014.

OHTA, T. et al. Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver. **Cancer Research**, Baltimore, v. 54, n. 24, p. 6402–6406, 1994.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribossomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB Journal**, Bethesda, v.7, n. 1, p. 113-23, 1993.

O'NEIL, J.M. et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 14, p. 313-334, 2012.

OSMAN, O.A. et al. Interactions of Freshwater Cyanobacteria with Bacterial Antagonists. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 83, n. 7, p. e.02634-16, 2017.

OVERBEEK, R. et al. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). Nucleic Acids Research, London, v. 42, p. D206-D214, 2014.

OVERBEEK, R. et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, n. 17, p. 5691-5702, 2005.

PACHECO, L.A. et al. Identification of the toxic pentapeptide nodularin in a cyanobacterial bloom in a shrimp farm in South American Atlantic Coast. **Pharmaceutica Analytica Acta**, New Haven, v. 7, p. 479-481, 2016.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Climate. Blooms like it hot. **Science**, Washington, DC, v. 320, n. 5872, p. 57-58, 2008.

PAERL, H.W. et al. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 11-26, 2000.

PAQUOTTE, P. et al. Intensive culture of shrimp Penaeus vannamei in floating cages: zootechnical, economic and environmental aspects. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 164, p. 151-166, 1998.

PEARSON, L. et al. The molecular genetics and regulation of cyanobacterial peptide hepatotoxin biosynthesis. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 38, n. 10, p. 847-856, 2008.

PERSSON, K.J.; LEGRAND, C.; OLSSON, T. Detection of nodularin in European flounder (*Platichthys flesus*) in the west coast of Sweden: evidence of nodularin mediated oxidative stress. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 8, n. 6, p. 832–838, 2009.

PÉREZ, M.C. et al. A bloom of *Nodularia baltica-spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, South America. **Algological Studies**, Stuttgard, v. 93, p. 91-101, 1999.

PESTANA, C.J. et al. Photocatalytic degradation of eleven microcystin variants and nodularin by TiO2 coated glass microspheres. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 300, p. 347-353, 2015.

PIDDOCK, L.J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 8, p. 629–636, 2006.

POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.

HAYNES, S.W.; CHALLIS, G.L. Non-linear enzymatic logic in natural product modular mega-syntheses and -synthetases. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, London, v. 10, p. 203–218, 2007.

RATH, D. et al. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, Paris, v. 117, p. 119–128, 2015.

RAUSCH, C. et al. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). Nucleic Acids Research, London, v. 33, p. 5799–5808, 2005.

RAY, A.J. et al. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 299, n. 1-4, p. 89-98, 2010.

ŘEHÁKOVÁ, K. et al. *Nodularia* (Cyanobacteria, Nostocaceae): a phylogenetically uniform genus with variable phenotypes. **Phytotaxa**, Auckland, v. 172, n. 3, p. 235-246, 2014.

RINEHART, K.L. et al. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. Journal of the American Chemical Society, Washington, DC, v. 110, n. 25, p. 8557-8558, 1988.

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, n. 2, p.159-176, 1994.

RODRIGUES, M.A.; REIS, M.P.; MATEUS, M.C. Liquid chromatography/negative electrospray ionization ion trap MS2 mass spectrometry application for the determination of microcystins occurrence in Southern Portugal water reservoirs. **Toxicon**, Oxford, n. 74, p. 8–18, 2013.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

RÖTTIG, M. et al. NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, p. 362-367, 2011.

ROUHIAINEN, L. et al. Two Alternative Starter Modules for the Non-Ribosomal Biosynthesis of Specific Anabaenopeptin Variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). **Chemitry & Biology**, London, v. 17, n. 3, p. 265–273, 2010.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 944–945, 2000.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 863-864, 2011.

SCOPEL, B.R. et al. Substituição da farinha de peixe em dietas para camarões marinhos cultivados em sistema bioflocos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 8, p. 928-934, 2011.

SENA, L. et al. A strategy to obtain axenic culture of *Arthrospira* spp. cyanobacteria. **World Journal of Microbiol & Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 1045–1053, 2011.

SIMM, S. et al. The composition of the global and feature specific cyanobacterial coregenomes. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 219, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00219.

SIMOLA, O. et al. Pathological findings and identification of the toxin in acute cyanobacterial (*Nodularia spumigena*) intoxication in a dog. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 49, n. 5, p. 755-759, 2012.

SINHA, R. et al. Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 83, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-83.

SIPIÄ, V.O. et al. Transfer of nodularin to three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.), herring (*Clupea harengus* L.), and salmon (*Salmo salar* L.) in the northern Baltic Sea. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, n. 3, p. 421–425, 2007.

SIPIÄ, V.O. et al. Bioaccumulation and detoxication of nodularin in tissues of flounder (*Platichthys flesus*), mussels (*Mytilus edulis, Dreissena polymorpha*) and clams (*Macoma balthica*) from the northern Baltic Sea. Ecotoxicology and Environmental Safety, New York, v. 53, n. 2, p. 305–311, 2002.

SIVONEN, K. et al. Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 55, n. 8, p.1990-1995, 1989.

SORRELS, C. M.; PROTEAU, P. J.; GERWICK, W. H. Organization, Evolution, and Expression Analysis of the Biosynthetic Gene Cluster for Scytonemin, a Cyanobacterial UV-Absorbing Pigment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 14, p. 4861–4869, 2009.

STAL, L.J. et al. BASIC: Baltic Sea cyanobacteria, an investigation of the structure and dynamics of water blooms of cyanobacteria in the Baltic Sea - responses to a changing environment. **Continental Shelf Research**, Oxford, v. 23, n. 17-19, p. 1695-1714, 2003.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, n. 21, p. 2688-90, 2006.

STEVENSON, C. S. et al. Scytonemin-a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. **Inflammation Research**, Basel, v. 51, n. 2, p. 112–114, fev. 2002.

STEWART, I. et al. First Report of a Toxic *Nodularia spumigena* (Nostocales/ Cyanobacteria) Bloom in Sub-Tropical Australia. II. Bioaccumulation of Nodularin in Isolated Populations of Mullet (Mugilidae). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 9, n. 7, p. 2412-2443, 2012.

SUNDA, W.G.; GRANELLI, E.; GOBLER, C.J. Positive feedback and the development and per-sistence of ecosystem disruptive algal blooms. **Journal of Phycology**, Malden, v. 42, n. 5, p. 963-974, 2006.

SUURNÄKKI, S. et al. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds. **Water Research**, Oxford, v. 68, p. 56-66, 2015.

TAHIM, E.F.; DAMACENO, M.N.; ARAÚJO JUNIOR, I.F. A influência da trajétoria tecnológica no processo de inovação na indústria de cultivo de camarão no nordeste brasileiro. In: CONGRESSO LATION-IBEROAMERICANO DE GESTÃO DA TECNOLOGIA, 16., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2015. Disponível em: http://www.altec2015.org/anais/altec/papers/66.pdf>, 2015. Acesso em: 29/02/2016.

TASSIGNY, M.; LAPORTE, G.; POURRIOT, R. Recherches sur les techniques de purification des cultures algales: e'laboration des me'thodes applicables aux Desmidiace's et Cyanophyce'es filamenteuses, Diatome'es. **Annales de l'Intitut Pasteur**, Paris, v. 117, p. 64-75, 1969.

TATUSOV, R.L.; KOONIN, E.V.; LIPMAN, D.J. A genomic perspective on protein families. **Science**, Washington, DC, v. 278, n. 5338, p. 631-637, 1997.

THOMPSON, C.C. et al. Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 197, p. 359-370, 2015.

TILLIER, E.R.M.; COLLINS, R.A. Genome rearrangement by replication-directed translocation. **Nature Genetics**, London, v. 26, p. 195–197, 2000.

TSAI, I.J.; OTTO, T.D.; BERRIMAN, M. Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 4, R41, 2010.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future propects. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, n. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VAN HALDEREN, A. et al. Cyanobacterial (blue-green algae) poisoning of livestock in the western Cape Province of South Africa. Journal of the South African Veterinary Association, Pretoria, v. 66, n. 4, p. 260-264, 1995.

VÁSQUEZ-MARTÍNEZ, G. et al. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 57, n. 1, p.115–121, 2004.

VAZ, M.G.M.V. et al. Use of sodium hypochlorite solutions to obtain axenic cultures of *Nostoc* strains (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Botany,** São Paulo, v. 37, n. 2, p. 115-120, 2014.

VOß, B. et al. Insights into the physiology and ecology of the brackish-water-adapted cyanobacterium *Nodularia spumigena* CCY9414 based on a genome-transcriptome analysis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 3, e. 60224, 2013.

VUORINEN, P.J. et al. Accumulation and effects of nodularin from a single and repeated oral doses of cyanobacterium *Nodularia spumigena* on flounder (*Platichthys flesus* L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, New York, v. 57, n. 1, p. 164-173, 2009.

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

WALSH, C.T. et al. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, p. 525–534, 2001

WANG, H.; SIVONEN, K.; FEWER, D.P. Genomic insights into the distribution, genetic diversity and evolution of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 35, p. 79-85, 2015.

WASIELESKY JUNIOR, W. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, n. 1-4, p. 396-403, 2006.

WATSON, J.T.; SPARKMAN, O.D. **Introduction to mass spectrometry**: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. 4. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.

WEBER, T. et al. antiSMASH 3.0--a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, p. 237–43, 2015.

WERNER, V.R.; ROSA, Z.M. Cyanophyceae da estação ecológica do Taim, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 52, p. 481-502, 1992.

WOOD, D.Z.; SALZBERG, S.L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 3, R46, 2014.

WU, M.; EISEN, J. A. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 10, p. 151, 2008.

YI, W; DEVIN, C.; GUOPIN, C.; YONG, Q.G. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, w78-w84, 2015.

YOSHIZAWA, S. et al. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v. 116, n. 6, p. 609-614, 1990.

YUSOFF, F.M. et al. Phytoplankton succession in intensive marine shrimp culture ponds treated with a commercial bacterial product. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 269–278, 2002.

ZHANG, Z. et al. High-level expression and characterization of two serine protease inhibitors from Trichinella spiralis. **Veterinary Parasitology**, Chischester, v. 219, p. 34–39, 2016.

ŽEGURA, B.; ŠTRASER, A.; FILIPIČ, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 727, n. 1-2, p. 16-41, 2011.

ZIEMERT, N. et al. Exploiting the natural diversity of microviridin gene clusters for discovery of novel tricyclic depsipeptides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.76, n. 11, p. 3568-3574, 2010.

ZHUBANOVA, A.A. et al. Construction of cyanobacterial-bacterial consortium on the basis of axenic cyanobacterial cultures and heterotrophic bacteria cultures for bioremediation of oil-contaminated soils and water ponds. **Russian Journal of Plant Physiology**, Birmingham, v. 60, p. 555-562, 2013.