**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Distribuição de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de
substâncias bioativas no genoma da *Fischerella* sp. CENA161**

Karina Heck da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Karina Heck da Silva
Licenciada em Ciências Biológicas

**Distribuição de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas
no genoma da *Fischerella* sp. CENA161**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARLI DE FÁTIMA FIORE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Silva, Karina Heck da

Distribuição de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas no genoma da *Fischerella* sp. CENA161 / Karina Heck da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
135 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cianobactéria 2. Microcistina 3. Ambiguina 4. Nostopeptolida 5. Peptídeo sintetase não ribossomal 6. Policetídeo sintase I. Título

CDD 589.46
S586d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico este trabalho ao meu amigo e companheiro, Émerson, aos meus pais, Teodoro e Maria, e aos meus irmãos, Liege e Lucas.

AGRADECIMENTOS

A esses “dez anos vívidos em três”... somente tenho a agradecer pelas oportunidades que me foram dadas e pelas pessoas que por minha vida passaram, já que todos que passam por nós deixam importantes aprendizados.

Agradeço à professora Dra. Marli de Fátima Fiore, pela oportunidade e confiança ao me delegar este projeto.

À CAPES, pelas bolsas concedidas (CAPES/PROF e PDSE) e pelo auxílio financeiro (PROAP) durante o curso de Doutorado.

Ao Dr. Alessandro Varani, pela colaboração e pela simplicidade ao interagir com o nosso grupo.

Ao professor Dr. Ernani Pinto e ao Dr. Felipe Dörr pela parceria de análises químicas.

Aos professores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e do Centro de Energia Nuclear na Agricultura que contribuíram com a minha formação ao longo do curso de Doutorado.

Ao Danillo Alvarenga, pelo companheirismo, paciência e parceria nestes três anos, e a quem serei sempre grata pelo aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias: Ana Paula Andreote, Bruno Evangelista, Bruno Weiss, Janaína Rigonato e Stella Lima.

Aos colegas Gabriela Machineski e Marcelo Vaz pela colaboração de análises.

Aos colegas “ex-cianos” que por mim passaram e deixaram grandes lições.

Aos funcionários da ESAQ, em especial à Maria Fernanda Prado, e do CENA, especialmente ao Fábio Oliveira e Gilson Costa. Aos funcionários do Serviço de Pós Graduação, em especial ao Lucas Zanoní, pelo apoio durante esses anos.

Aos colegas de pós-graduação Mylenne Pinheiro e Flávio Rocha, pelo apoio recebido em momentos importantes.

À equipe colaboradora do projeto “Brasil-Finlândia” - Kaarina Sivonen, Leo Rouhiainen, Lyudmila Sassi, Matti Wahlsten, Jouni Jokella, Hao Wang e David Fewer - pelo acolhimento na Universidade de HelsinKI. Thanks a lot!!!

À Tânia Shishido, pelas sugestões para o trabalho e pelo curto, mas agradável período de convívio em HelsinKI.

Ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) pela oportunidade de exercer a atividade docente e pela bolsa concedida. À professora Dra. Regina Rosim Monteiro pela cumplicidade e pela bela parceria ao longo do período de estágio.

Aos meus Grandes Amigos de Porto Alegre, que sempre estiveram presente através do apoio: Julie Zanin, Daniel Meyer, Gabriela Vergara, Mariana Duarte e Marcela Baptista.

À Grande Amiga e meu verdadeiro anjo, Kátia Silva.

Aos amigos e compadres Aline e Paulo Maier, pelo imenso apoio durante o período no exterior.

À Família Heck, pelo constante apoio e incentivo nessa fase à longa distância. Aos meus pais, pelos valores morais e humanos que me transmitiram, e pela compreensão do investimento que eu iniciara na minha partida. Aos meus irmãos, Liege e Lucas, de presença constante na minha rotina.

Por fim, e não menos importante, a meu Companheiro Emerson Martos, por estar sempre ao meu lado, me apoiando durante o período de Doutorado.

Muito Obrigada!

*“Hoje me sinto mais forte
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei ..*

*.. Todo mundo ama um dia
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
E no outro vai embora*

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz.”*

(Tocando em Frente, Almir Sater & Renato Teixeira)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Aspectos Gerais das Cianobactérias	23
2.2 O gênero <i>Fischerella</i>	24
2.3 Produção de moléculas bioativas	26
2.4 Agrupamentos gênicos de biossíntese de microcistina	32
2.5 Agrupamento gênico de biossíntese de alcaloides hapalindoís	36
2.6 Agrupamento gênico de biossíntese de nostopeptolida	38
2.7 Sequenciamento genômico	39
2.8 Culturas axênicas de cianobactérias	41
HIPÓTESE	43
OBJETIVOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Coleta e cultivo da linhagem	45
3.2 Redução de bactérias heterotróficas da cultura de cianobactéria	45
3.2.1 Tratamento 1: Recuperação dos acinetos com lavagem de solução de hipoclorito de sódio	45
3.2.2 Tratamento 2: Lavagem das células	46
3.3 Extração de DNA	47
3.4 Verificação da Pureza das Culturas	47
3.4.1 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis	47
3.4.2 PCR Quantitativo – Tempo Real (<i>real time</i> PCR)	47
3.5 Isolamento da linhagem	48
3.6 Investigação dos genes ribossomal e <i>mcy</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
3.7 Clonagem e transformação	50
3.8 Sequenciamento Sanger	50
3.9 Sequenciamento genômico e montagem das leituras	51
3.10 Anotação dos genes	52

3.11 Análises filogenéticas	52
3.12 Bioensaios	53
3.13 Análises químicas - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Recuperação dos acinetos e isolamento da linhagem	57
4.1.1 Quantificação de Bactéria na cultura	58
4.2 Amplificação dos fragmentos de genes da biossíntese da microcistina.....	62
4.3 Análise de qualidade das leituras de sequenciamento genômico e da montagem das leituras.....	63
4.4 Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas.....	64
4.4.1 Microcistina	64
4.4.2 Ambiguína.....	73
4.4.3 Nostopeptolida	80
4.5 Bioensaios	84
4.6 Análises químicas – microcistina.....	88
4.7 Análises químicas das outras substâncias bioativas.....	98
5 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
REFERÊNCIAS.....	107
APÊNDICES.....	123

RESUMO

Distribuição de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas no genoma da *Fischerella* sp. CENA161

Fischerella é um gênero cianobacteriano de ocorrência em diversos ambientes subaerofíticos que apresenta importância ecológica, evolutiva, biogeoquímica, biotecnológica e ecotoxicológica. O estudo de seu genoma pode levar a uma melhor compreensão de seu metabolismo secundário e de sua capacidade de produção de cianotoxinas e outras moléculas bioativas. A linhagem *Fischerella* CENA161, isolada de uma nascente de água na região de Piracicaba, foi identificada como produtora do peptídeo hepatotóxico microcistina. Este foi o primeiro relato da produção dessa toxina por esse gênero de cianobactéria. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo sequenciar o genoma da cianobactéria *Fischerella* CENA161 e realizar sua montagem e a anotação de genes envolvidos com seu metabolismo secundário. Para isso, a linhagem foi tratada com hipoclorito de sódio para remover as bactérias heterotróficas, com posterior esgotamento de pequenos fragmentos em placa de cultura sólida, de forma a isolar a linhagem. Foi realizada a extração de ácido desoxirribonucleico das células tratadas da CENA161 cultivadas em Erlenmeyers contendo meio de cultura líquido BG-11₀. Uma biblioteca genômica foi construída para o sequenciamento MiSeq e, então, foi realizada a montagem *ab initio* do genoma com as leituras obtidas. A anotação de genes foi realizada utilizando a ferramenta antiSMASH, para a predição de metabólitos secundários, e também foi realizado o alinhamento de sequências nucleotídicas já conhecidas de outras linhagens contra o genoma da CENA161, utilizando a ferramenta BLASTN. As moléculas bioativas produzidas pela linhagem foram investigadas através de bioensaios contra bactérias e fungo, e utilizando cromatografia líquida de alta pressão e espectrometria de massas. Os resultados mostraram que a linhagem CENA161 possui, em seu genoma, o agrupamento gênico de biossíntese da microcistina, apresentando os 10 genes descritos primeiramente (*mcyA-mcyJ*), e alta identidade de suas sequências com as sequências da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339, embora sua sentença gênica esteja mais próxima à da linhagem *Nostoc* sp. 152. Ainda, foram anotados os agrupamentos gênicos de biossíntese de ambigua (*amb*), apresentando 25 genes do total de 32 genes descritos para a linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903, com identidade mínima de 98 % entre as sequências nucleotídicas. Foram encontrados, também, seis genes do total de oito que formam o agrupamento de biossíntese de nostopeptolida (*nos*), descrito para *Nostoc* sp. GSV224, e com sentença diferenciada para a linhagem CENA161. As análises químicas de espectrometria de massas mostraram a produção de sete variantes de microcistina (MC-LR, MC-LL, MC-LA, MC-LM, MC-FR, MC-LAb e [D-Asp³]Mc-LL), essas duas últimas raramente descritas pela literatura. Os bioensaios mostraram bioatividade dos extratos intracelular polar e apolar contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas campestris* e *Candida albicans*. A coleta das frações do extrato apolar por cromatografia líquida revelou bioatividade em três diferentes tempos de aquisição. As frações coletadas do extrato polar evidenciaram o pico de microcistina, constatada a partir da linhagem CENA161 axênica, inclusive. Nossos resultados revelaram a presença de agrupamentos gênicos de síntese de moléculas bioativas e a habilidade da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 em produzir diferentes substâncias bioativas, sintetizadas pela via ribossomal e não ribossomal, em condições axênicas.

Palavras-chave: Cianobactéria; Microcistina; Ambigua; Nostopeptolida; Peptídeo sintetase não ribossomal; Policetídeo sintase

ABSTRACT

Distribution of gene clusters involved in the bioactive compounds biosynthesis in the genome of the *Fischerella* sp. strain CENA161

Fischerella is a cyanobacterial genus that occurs in several subaerophytic environments and presents ecological, evolutive, biogeochemical, biotechnologic and ecotoxicologic importance. The study of the genome can lead to the better comprehension about its metabolism and its ability to produce cyanotoxins and other bioactive molecules. The *Fischerella* sp. strain CENA161 was isolated from a spring water in Piracicaba, and it was identified microcystin peptide hepatotoxic producer. That was the first report about the production of the toxin by this cyanobacterial genus. The aim of this study was to sequence the genome of the cyanobacteria *Fischerella* sp. strain CENA161 and perform the assembly and annotation of the genes involved in its secondary metabolism. For this, the strain was previously treated with 0,5 % sodium hypochlorite to remove the heterotrophic bacteria, followed with exhaustion from the short filaments in Petri plates, searching isolate the strain. The deoxyribonucleic acid was extracted from the CENA161 cells cultivated in Erlenmeyers with BG-11₀ liquid media. The genomic library was performed by MiSeq sequencing, and the *ab initio* assembly was performed with the reads obtained from the sequencing. The gene annotation and prediction were performed with the antiSMASH tool, for the secondary metabolites screening, and the nucleotide sequences alignment was performed using known genes present in other cyanobacteria producers and the CENA161 genome, using the BLASTN tool. The bioactive compounds produced by the strain were investigated with bioassays against bacteria and fungi, and also using high performance liquid chromatography with mass spectrometry. The results revealed the *Fischerella* sp. strain CENA161 presents the microcystins gene cluster in its genome, with the ten genes that were described in the first time (*mcyA-mcyJ*), and showed high identity in your sequences with the *Fischerella* sp. PCC 9339 sequences, although the synteny is very close to *Nostoc* sp. strain 152 microcystin gene cluster. We also found the ambiguanine gene cluster (*amb*), that showed 25 genes out of 32 genes of total from the *Fischerella* sp. strain UTEX 1903, with high identity (98 %) among the nucleotide sequences. We found six genes out of eight that compose the nostopeptolide gene cluster (*nos*) described for *Nostoc* sp. strain GSV224, but presenting differentiated synteny for the CENA161. The chemical analyses by mass spectrometry showed the production of seven microcystin variants (MC-LR, MC-LL, MC-LA, MC-LM, MC-FR, MC-LAba and [D-Asp³]Mc-LL), the last two ones being rarely described by literature. The bioassays showed bioactivity from the polar and nonpolar intracellular extracts against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas campestris* and *Candida albicans*. The collect of the peaks from the nonpolar extract in HPLC revealed bioactivity in three different acquisition times. The peaks collected from the polar extract did not show bioactivity, but the running in HPLC showed the peak corresponding to microcystin, produced by axenic CENA161 strain. Our results revealed the presence of some gene clusters involved in the bioactive molecules synthesis and the ability for the *Fischerella* sp. strain CENA161 to produce different bioactive compounds, synthesized by ribosomal and nonribosomal pathway, in non-axenic and axenic conditions.

Keywords: Cyanobacteria; Microcystin; Ambiguanine; Nostopeptolide; Nonribosomal peptide synthetase; Poliketide synthase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura molecular de derivados de alcaloides do grupo hapalindol produzidos por cianobactérias (RICHTER et al., 2008).....29
- Figura 2 - Estrutura molecular da microcistina (Tillett et al., 2000)31
- Figura 3 - Montagem da molécula de microcistina e os domínios gênicos envolvidos na biossíntese. Adaptado de DITTMANN; WIEGAND (2006).....33
- Figura 4 - Comparação da organização dos genes de biossíntese de microcistina e nodularina entre diferentes gêneros produtores das toxinas. Sentas em preto: PKS; branco: NRPS; preto e branco: PS/PKS; cinza: enzimas de montagem, acabamento (tailoring enzymes) e exportação35
- Figura 5 - Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de alcaloides do grupo hapalindol. A- *Fischerella* sp. ATCC 43239 (hapalindol); B- *Fischerella* sp. PCC 9339 (hapalindol); C e D- *Fischerella* ambigua UTEX 1903 (ambiguina); E- *Hapalosiphon welwitschii* UTEXB 1830 (welwitindolinona); F- *Hapalosiphon welwitschii* IC-52-3 (welwitindolinona); G- *Westiella intricata* UH HT-29-1 (welwitindolinona); H- *Fischerella* sp. PCC 9431 (welwitindolinona); I- *Fischerella muscicola* SAG 1427-1(welwitindolinona) (MICALLEF et al., 2014).....30
- Figura 6 – Estrutura de organização do agrupamento gênico envolvido na biossíntese de nostopeptolida para a linhagem *Nostoc* sp. GSV224. A organização dos módulos e domínios enzimáticos é mostrada. A- adenilação; C- condensação; ACP- proteína carreadora de acil; AT- acil transferase; KS- cetoacil sintase; PCP- proteína carreadora de peptidil; Te- tioesterase. Adaptado de HOFFMANN et al. (2003)39
- Figura 7 – Estrutura dos filamentos na linhagem *Fischerella* sp. CENA161. HE – heterócitos; AC- acinetos. Aumento de 100 X. Escala da barra: 50 µm46
- Figura 8 - Perfil de abundância de cópias do gene do 16S rRNA de Cyanobacteria versus Bacteria Total entre as amostras analisadas. SHW- tratamento com hipoclorito de sódio e posterior lavagem com detergente; SH- tratamento com hipoclorito de sódio; C- controle (sem tratamento).....58
- Figura 9 – Perfil de abundância de filos representados por sequências nucleotídicas anotadas a partir do genoma da *Fischerella* sp. CENA161. Os 50 grupos de maior abundância são mostrados na figura.....60
- Figura 10 - Visualização de um talo da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 em recuperação e multiplicação em placa de cultura sólida. Aumento 40 X.....61
- Figura 11 – Qualidade Phred das leituras produzidas pelo sequenciamento genômico MiSeq, comparadas ao seu comprimento, em pares de bases. Panorama à esquerda corresponde ao sequenciamento R1 e, à direita, ao R2.64
- Figura 12 - Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese da microcistina, descritos para os gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Fischerella*66
- Figura 13– Análise filogenética dos agrupamentos gênicos *mcy* e *nda* das linhagens potencialmente produtoras de microcistina e nodularina. Sequências de aminoácidos das enzimas *Mcy* e *Nda* foram concatenadas, e foi utilizada a inferência bayesiana. Valores de reamostragem por gerações acima de 50 % estão representados nos nós 70

- Figura 14- Resultado da predição de genes / agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários presentes no genoma da linhagem CENA161. 73
- Figura 15- Agrupamento gênico envolvido na biossíntese de ambiguaína para: *Fischerella* sp. UTEX 1903 e *Fischerella* sp. CENA161 74
- Figura 16 – Dendrograma realizado com as sequências do gene do 16S rRNA utilizando a inferência bayesiana. Valores de reamostragem de gerações acima de 50 % estão representados em cada nó. Linhagem em negrito é o objeto do presente trabalho. ○ Agrupamento de microcistina; ▲ Agrupamento de ambiguaína; △ Agrupamento de hapalindol; ● Agrupamento de nostopeptolida; ■ Agrupamento de welwitindolinona; 79
- Figura 17- Agrupamento gênico envolvido na biossíntese de nostopeptolida para as linhagens *Nostoc* sp. GSV224 e *Fischerella* sp. CENA161. Genes em cor cinza correspondem a NRPS..... 81
- Figura 18- Bioensaios realizados com o extrato bruto intracelular da linhagem CENA161 não axênica. Disco de nistatina (N) – controle positivo 85
- Figura 19- Bioensaios realizados com a fração polar- MeOH (à esquerda nas placas) e apolar - DCM (à direita nas placas) separadas do extrato intracelular da linhagem CENA161 não axênica. Disco de nistatina (N) – controle positivo. A- *Staphylococcus aureus*; B- *Salmonella typhimurium*; C- *Candida albicans*..... 85
- Figura 20 - Bioensaios realizados com o extrato bruto intracelular da linhagem CENA161 axênica. A- *Salmonella typhimurium*; B- *Bacillus cereus*; C- *Staphylococcus aureus*; D- *Candida albicans* 86
- Figura 21 - Bioensaios realizados com a fração polar (à direita nas placas) e apolar (à esquerda nas placas) separadas do extrato intracelular da linhagem CENA161 axênica. A- *Staphylococcus aureus*; B- *Candida albicans* 86
- Figura 22 - Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 para padrões analíticos de MC-LYR, LR e LA. (A) Varredura entre m/z 450-900, região onde aparecem íons duplamente carregados $(M+2H)^{2+}$; (B) Varredura entre m/z 800-1250, região onde aparecem íons protonados $(M+H)^+$. A fração em 13 min no painel B não corresponde a uma microcistina 88
- Figura 23- Espectros de massas (íons precursores) correspondentes às frações cromatográficas identificados no painel B da Figura 20. (A) MC-YR, m/z 1045 $(M+H)^+$; (B) MC-LR, m/z 995 $(M+H)^+$; (C) MC-LA, m/z 910 $(M+H)^+$ e 927 $(M+NH_4)^+$ 89
- Figura 24- Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 para amostra *M. aeruginosa* LTPNA08, sabidamente produtora de MC-RR e MC-LR. (A) Varredura entre m/z 450-900, região onde aparecem íons duplamente carregados $(M+2H)^{2+}$; (B) Varredura entre m/z 800-1250, região onde aparecem íons protonados $(M+H)^+$ 89
- Figura 25- Espectros de massas (íons precursores) correspondentes às frações cromatográficas identificadas. (A) MC-RR, m/z 519,8 $(M+2H)^{2+}$; (B) MC-LR, m/z 995 $(M+H)^+$ 89
- Figura 26 - Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 para amostra CENA161. (A) Varredura entre m/z 450-900, região onde aparecem íons duplamente carregados $(M+2H)^{2+}$; (B) Varredura entre m/z 800-1250, região onde aparecem íons

protonados (M+H) ⁺ . As frações numeradas apresentaram valores de <i>m/z</i> no intervalo característico de microcistinas.....	91
Figura 27- Espectros de massas (íons precursores) correspondentes às frações cromatográficas identificadas na Figura 24 B. (A) MC-LR, <i>m/z</i> 995 (M+H) ⁺ ; (B) possível MC, <i>m/z</i> 1029 (M+H) ⁺ ; (C) possível MC, <i>m/z</i> 968 (M+H) ⁺ e 985 (M+NH ₄) ⁺ ; (D) MC-LA, <i>m/z</i> 910 (M+H) ⁺ e 927 (M+NH ₄) ⁺ ; (E) possível MC, <i>m/z</i> 924 (M+H) ⁺ e 941 (M+NH ₄) ⁺ ; (F) possível MC, <i>m/z</i> 970 (M+H) ⁺ e 987 (M+NH ₄) ⁺ ; (G) possível MC, <i>m/z</i> 938 (M+H) ⁺ e 955 (M+NH ₄) ⁺ ; (H) possível MC, <i>m/z</i> 952 (M+H) ⁺ e 969 (M+NH ₄) ⁺ ; (I) composto suspeito, <i>m/z</i> 873 (M+H) ⁺ e 890 (M+NH ₄) ⁺	91
Figura 28- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 995. A fragmentação característica e o tempo de retenção semelhante ao do padrão analítico confirmam a identificação como MC-LR.....	92
Figura 29 - Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 1029. A fragmentação característica indica a presença de MC-FR	92
Figura 30- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 968. A fragmentação é característica para microcistinas, mas a variante é desconhecida	92
Figura 31- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 910. A fragmentação característica e o tempo de retenção semelhante ao do padrão analítico confirmam a identificação como MC-LA.....	93
Figura 32- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 924. A fragmentação característica indica a presença de MC-LAba.....	93
Figura 33 - Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 970. A fragmentação característica indica a presença de MC-LM	93
Figura 34- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 938. A fragmentação característica indica a presença de [D-Asp ³]MC-LL	94
Figura 35- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 952. A fragmentação característica indica a presença de MC-LL	94
Figura 36- Espectro de fragmentação para composto de <i>m/z</i> 873. A fragmentação não é característica de microcistinas.....	95
Figura 37- Comparação entre espectros de fragmentação das diferentes microcistinas. O perfil de fragmentação é o mesmo para todas variantes apolares	95
Figura 38- Cromatograma em modo negativo de ionização para as microcistinas presentes na amostra CENA161	96
Figura 39- Corrida em HPLC de 100 µL da fração apolar (DCM) do extrato intracelular da linhagem CENA161. Gradiente de acetonitrila 50 - 75 %, tempo de 40 minutos	98
Figura 40- Bioensaio realizado com as frações isoladas em corrida de HPLC com a fração apolar (DCM) do extrato intracelular da linhagem CENA161	99
Figura 41- Corrida em HPLC de 100 µL da fração polar (MeOH + H ₂ O) do extrato intracelular da linhagem CENA161. Gradiente de acetonitrila 5 - 50 %, tempo de 40 minutos	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequenciamento genômico em realização para linhagens do gênero <i>Fischerella</i> ..	41
Tabela 2 - Programas de ciclagem térmica utilizados para amplificar os fragmentos dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina.....	49
Tabela 3 - Percentuais de similaridade entre sequências de aminoácidos das enzimas Mcy para a linhagem <i>Fischerella</i> sp CENA161 e outras linhagens com o agrupamento gênico já descrito	68
Tabela 4 - Sequências do sítio ligante do domínio de adenilação mostradas para o módulo 2 das enzimas McyB e McyA, e para a enzima McyE.....	71
Tabela 5 - Percentuais de similaridade entre sequências de aminoácidos das enzimas Amb do agrupamento gênico da linhagem <i>Fischerella</i> sp CENA161 alinhadas com as sequências das outras linhagens produtoras de hapalindois.....	76
Tabela 6 - Percentuais de similaridade entre sequências de aminoácidos das enzimas Nos do agrupamento gênico da linhagem <i>Fischerella</i> sp CENA161 alinhadas com as sequências das outras linhagens produtoras de PS/PKS	83
Tabela 7 – Análise de sequências do domínio de adenilação para as enzimas NosA e NosE e as predições dos substratos de ligação	83
Tabela 8 – Comprimento dos halos de inibição, em milímetros, obtidos após os bioensaios realizados com o extrato bruto intracelular da linhagem <i>Fischerella</i> sp. CENA161. Experimento realizado em condições não axênicas e axênicas.....	87
Tabela 9 – Comprimento dos halos de inibição, em milímetros, obtidos após os bioensaios realizados com as frações apolares e polares do extrato intracelular da linhagem <i>Fischerella</i> sp. CENA161. Experimento realizado em condições não axênicas e axênicas	87
Tabela 10 - Variantes identificadas durante as análises de espectros de fragmentação (SIVONEN et al., 1999; DIEHNELT et al., 2006)	96

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias são micro-organismos pertencentes ao domínio Bacteria, que possuem a capacidade de realizar a fotossíntese oxigênica e, em alguns casos, promover a fixação de nitrogênio atmosférico. Assim, esses micro-organismos apresentam grande importância na manutenção de oxigênio na biosfera, e na entrada de carbono e nitrogênio para os ciclos biogeoquímicos (CASTENHOLZ, 2001). Estão presentes em todos os biomas, apresentando uma grande capacidade de adaptação às diferentes condições físico-químicas nos ambientes, exercendo, em especial, papel como espécies pioneiras na colonização de novos ambientes.

As cianobactérias possuem a habilidade de produzir uma gama de substâncias bioativas de diferentes classes, como toxinas, antimicrobianos, antifúngicos, antitumorais, antimaláricos, algicidas, inibidores de apoptose, entre outros de importância farmacêutica (LEÃO et al., 2012). As toxinas apresentam riscos à saúde humana e de outros animais, principalmente se produzidas por linhagens que vivem em água doce e fontes de abastecimento para consumo e recreação, devendo-se realizar periodicamente o monitoramento da presença de cianotoxinas nas águas superficiais. A microcistina é um heptapeptídeo hepatotóxico, sintetizado pela via não ribossomal, produzida por linhagens de gêneros unicelulares e filamentosos de cianobactérias, como *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (SIVONEN et al., 1999), *Nostoc* (SIVONEN et al., 1990; GENUARIO et al., 2010; KAASALAINEN et al., 2012, FEWER et al., 2013), *Fischerella* (FIORE et al., 2009; SHIH et al., 2013; CIRÉS et al., 2014), *Hapalosiphon* (PRINSEP et al., 1992), *Oscillatoria* (LUUKKAINEN et al., 1993) e *Phormidium* (IZAGUIRRE; JUNGBLUT; NEILAN, 2007). Os agrupamentos gênicos de biossíntese de microcistina já foram descritos para cinco gêneros: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Fischerella* (TILLET et al., 2000; CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004; FEWER et al., 2013; SHIH et al., 2013). No entanto, o agrupamento gênico descrito para a linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339 apresenta sintenia diferente das linhagens filogeneticamente próximas a ela.

A crescente preocupação pela busca de novas classes de antimicrobianos tem encontrado respaldo nas cianobactérias, que são utilizadas como fontes de bioprospecção de moléculas bioativas com mecanismo de ação contra fungos e bactérias patogênicas, em especial os alcaloides do grupo hapalindol (MOORE et al., 1987). Aliado às identificações por robustas tecnologias de análises químicas, o sequenciamento genômico tem-se tornado uma ferramenta cada vez mais reveladora do potencial biossintético para as linhagens

cianobacterianas de estudo, fazendo com que a quantidade de informações geradas pelo sequenciamento torne-se disponível para análises exploratórias e comparativas na elucidação de novas rotas biossintéticas (SHIH et al., 2013; CALTEAU et al., 2014).

A linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foi isolada de uma nascente de água, no interior do estado de São Paulo, Brasil, e foi identificada como produtora de microcistina (FIORE et al., 2009), sendo o primeiro registro de produção dessa toxina pelo gênero. Além disso, bioensaios realizados em estudo anterior sugeriram a produção de outras substâncias bioativas com atividade antimicrobiana e antifúngica (SHISHIDO, 2009). Assim, considera-se que a linhagem presente, em seu genoma, os agrupamentos gênicos de biossíntese de microcistina, bem como de outras substâncias bioativas que, porventura, estejam sendo produzidas pela linhagem. O objetivo deste trabalho foi identificar os agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de substâncias bioativas, bem como avaliar a expressão dos genes através da identificação de moléculas bioativas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Gerais das Cianobactérias

As cianobactérias são micro-organismos fotoautotróficos, pertencentes ao domínio Bacteria, podendo também alguns deles fixar nitrogênio atmosférico. Desse modo, as cianobactérias podem ser consideradas importantes produtoras primárias de matéria orgânica e entrada de nitrogênio nos ecossistemas (CASTENHOLZ, 2001), e podem ser encontradas em diversos biomas dos ambientes terrestre e aquático. Globalmente, a fixação de nitrogênio é o segundo processo biológico de maior relevância, que vem após a fixação de carbono, sendo esse elemento um componente da maioria das biomoléculas – e de todas as moléculas formadas por aminoácidos - e essencial para todos os organismos vivos. O nitrogênio encontra-se predominantemente na sua maior reserva, na forma indisponível (N_2) na atmosfera. Os organismos heterotróficos adquirem nitrogênio orgânico através da nutrição, outros têm como fonte o nitrogênio inorgânico na forma de amônio e nitrato, presentes no solo e na água.

As cianobactérias também estão relacionadas a uma problemática ambiental acentuada por influências primeiramente de causa antrópica, mas também em virtude das modificações climáticas de altas temperaturas e pela eutrofização natural - a floração dos corpos d'água - que pode ocasionar riscos de contaminação em mananciais de água doce, especialmente se for diagnosticada a produção de substâncias que são prejudiciais a humanos e outros animais. Dentre essas substâncias, algumas apresentam propriedades terapêuticas e biotecnológicas (NAMIKOSHI; RINEHART, 1996) e tóxicas (CARMICHAEL, 1994), sendo as cianobactérias capazes de produzir uma grande variedade de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais são peptídeos (BURJA et al., 2001) que não são utilizados no metabolismo primário (divisão celular ou produção de energia), portanto, classificados como metabólitos secundários, os quais são elaborados por um mecanismo enzimático paralelo à síntese proteica.

Apesar de ainda serem pouco exploradas, uma vasta lista de substâncias bioativas pertencentes a diversas classes, incluindo inibidores enzimáticos, inibidores de fotossíntese, antimicrobianos, inibidores de apetite, antimaláricos, imunossupressores e antitumorais já foram isoladas de cianobactérias (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984; NAMIKOSHI; RINEHART, 1996; BURJA et al., 2001; ETCHEGARAY et al., 2004; SILVA-STENICO et al., 2011; LEÃO et al., 2012; LIAIMER et al., 2015). As toxinas produzidas variam desde

peptídeos cíclicos hepatotóxicos (microcistinas, nodularinas) até alcaloides neurotóxicos (saxitoxina, anatoxina-a, anatoxina-a(S), etc.) e citotóxicos (cilindrospermopsina) (CHORUS; BARTRAM, 1999; SIVONEN; JONES, 1999). A geosmina é um terpeno que pode ser produzido por cianobactérias e outras bactérias, com actinobactérias e proteobactérias, que compromete a qualidade da água para consumo, através da produção de odor e sabor desagradável (MEDSKER; JENKINS; THOMAS, 1968; IZAGUIRRE et al., 1982; SUURNÄKKI et al., 2015).

O Brasil possui muitos mananciais de água doce, tornando-se uma atraente fonte de pesquisas bioprospectivas, cujas substâncias podem diferir drasticamente daquelas encontradas em outras regiões do planeta, em função de suas dimensões continentais e necessidade de adaptação dos organismos às diferentes condições ambientais. Também, as represas de água no Brasil constituem um dos ecossistemas mais favoráveis à proliferação de algas e cianobactérias, bem como a liberação de suas toxinas, pois são comumente rasas e facilmente eutrofizadas, e a comunidade fitoplanctônica responde rapidamente às alterações ambientais decorrentes da interferência antrópica ou natural, alterando sua estrutura complexa (SANT'ANNA et al. 2007).

Países como Austrália, África do Sul, Brasil, China, Inglaterra e Índia já foram reportados para intoxicações humanas causadas por toxinas produzidas por cianobactérias (KAEBERNICK; NEILAN, 2001). Entretanto, o primeiro registro mundial catastrófico confirmado de mortes humanas causadas por cianotoxinas foi o episódio ocorrido em uma unidade de hemodiálise na cidade de Caruaru (Pernambuco, Brasil), em cuja ocasião aproximadamente 50 pacientes foram a óbito com sintomas de intoxicação por neurotoxinas e hepatotoxinas, após exposição à água contaminada que foi obtida de reservatório de abastecimento para consumo (JOCHIMSEN et al., 1998; AZEVEDO et al., 2002). Esses relatos contribuíram para um aumento substancial nas pesquisas sobre cianobactérias e suas toxinas e, como resultado, muitas informações sobre toxicidade, estruturas das cianotoxinas e métodos analíticos para sua determinação e quantificação estão disponíveis atualmente.

2.2 O gênero *Fischerella*

O gênero foi classificado taxonomicamente, até o ano de 2004, como pertencente à ordem Stigonematales, baseado em compartilhamentos de caracteres morfológicos, como células organizadas em colônias filamentosas, presença/posição de heterócitos no filamento e ramificações verdadeiras (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1989; ANAGNOSTIDIS;

KOMÁREK, 1990). Atualmente, o gênero está organizado de acordo com uma modificação sistemática embasada em análises filogenéticas do gene do 16S rRNA, as quais não sustentaram os parentescos propostos por ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK (1985) – segundo sistema botânico - e CASTENHOLZ (2001) – segundo sistema bacteriológico, uma vez que caracteres morfológicos semelhantes entre duas espécies não necessariamente evidenciam um ancestral comum – podendo ser, nesse caso, polifilético - tendo respaldo nos avanços de técnicas moleculares ocorridos nas últimas três décadas, que proporcionaram o apanhado de evidências filogenéticas (GUGGER; HOFFMANN, 2004; HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005).

Assim, foi elucidado que os gêneros pertencentes tanto à ordem Stigonematales (com ramificações verdadeiras) como à ordem Nostocales (representantes filamentosos ou com falsas ramificações) constituem um grupo monofilético, ou seja, considerando que todas as cianobactérias heterocitadas possuem um ancestral comum. A partir de então, foram agrupados na ordem Nostocales, e o gênero *Fischerella* classificado dentro da família Hapalosiphonaceae (GUGGER; HOFFMANN, 2004; HOFFMANN; KOMÁREK; KASTOVSKY, 2005). Outro alicerce para os rearranjos sistemáticos, segundo os mesmos autores da proposta filogenética apresentada, foi a confirmação dos grupos monofiléticos, tendo como referência a observação dos arranjos e disposição dos tilacoides no interior das células que, juntamente com as análises de genes marcadores, aspectos morfofisiológicos e ecológicos, constitui o que se chama de taxonomia polifásica (KOMÁREK, 2010).

Representantes da família apresentam o filamento principal multisseriado e com presença de heterócitos (células especializadas na fixação de nitrogênio), diferente das ramificações, que são unisseriadas e sem heterócitos, e a reprodução pode ocorrer por fragmentação do tricoma, formação de hormogônios (filamentos curtos emitidos pelas extremidades das ramificações) ou acinetos (estruturas de resistência produzidas em condições adversas). Linhagens do gênero *Fischerella* apresentam filamentos ramificados, considerando, para este gênero, a ramificação em “T”, em que a célula que dará origem à ramificação sofre alteração do plano de divisão em um ângulo de 90°, tendo, assim, três células vizinhas adjacentes. (Rippka, 1979), e a espécie-tipo do gênero refere-se à *Fischerella thermalis* (KOMÁREK; HAUER, 2004). A linhagem *Fischerella* sp. CENA161 teve seu fenótipo e genótipo avaliados por Shishido (2009), que verificou os tricomas organizados em um ramo principal multisseriado e ramificações unisseriadas, presença de heterócito intercalar, esférico, retangular a cilíndrico, com as células vegetativas quadráticas a retangulares, presença de heterotríquia, acineto e formação de hormogônio, enquadrando a linhagem,

portanto, dentro das características que descrevem o gênero. Em 2013, o sistema de classificação foi revisado para a ordem Nostocales, retornando o gênero *Fischerella* para a família Fischerellaceae (KOMÁREK, 2013).

Linhagens do gênero podem ser encontradas em ambientes atípicos em relação a outras espécies de cianobactérias relacionadas a florações oriundas de eutrofização de águas. Estão presentes na forma de vida livre bentônicas e em simbioses com plantas, fungos, algas e bactérias (STAL, 1995; OLIVER; GANF, 2000; STENROSS et al., 2006). Podem ser encontradas em solos e ambientes aerofíticos, tais como troncos e folhas de árvores e rochas, e em ambientes subaerofíticos em nascentes de água (WHITTON, 2000; AGUIAR et al., 2008; BRANCO et al., 2009; FIORE et al., 2009), e também foram isoladas de superfícies de construções em áreas urbanas pouco ou não poluídas, formando estruturas de biofilmes com produção de pigmentação (GAYLARDE; ORTEGA-MORALES; BARTOLO-PEREZ, 2007). Ainda, Wright, Papendorf e König (2005) investigaram a produção de substâncias bioativas com diversas propriedades antibióticas de linhagens do gênero oriundas de ambiente terrestre. Isso indica que cianobactérias do gênero *Fischerella* têm a capacidade de colonizar ambientes sem disponibilidade e fartura de nutrientes, contrariamente ao que ocorre no caso de florações aquáticas ocasionadas por eutrofizações.

2.3 Produção de moléculas bioativas

O aumento crescente da resistência a antimicrobianos em bactérias de importância clínica e ambiental tem despertado a preocupação das autoridades em saúde pública e da academia pela busca de novas drogas de última geração. Conhecidas pela capacidade de produzir uma vasta diversidade de moléculas bioativas, as cianobactérias têm sido alvo de estudos na busca de produtos com potencial farmacêutico, nutricional e agrícola (BARRIOS-LLERENA; BURJA; WRIGHT, 2007). Levantamentos baseados em estudos químicos com linhagens cianobacterianas tornam propícias as bioprospecções em busca de genes e produtos bioativos com propriedades terapêuticas e antibióticas.

As substâncias bioativas, muitas delas formadas por peptídeos, podem ser sintetizadas pela via ribossomal, regida pelo dogma central, sendo o gene transcrito e traduzido em uma proteína que será modificada, formando um peptídeo biologicamente ativo. De forma alternativa, os peptídeos podem ser sintetizados pela via não ribossomal, e apresentam uma estrutura modular, utilizando uma diversidade de substratos, na sua maioria grupos não-proteicos, ácidos graxos e substâncias policetônicas. Assim, a produção não

ribossomal em bactérias é relacionada à atividade de enzimas chamadas peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e policetídeo sintase do tipo I (PKS) (FIORE; ALVARENGA; SILVA-STENICO, 2011). Cada módulo de NRPS é composto por um domínio de adenilação, responsável pela seleção do aminoácido que será incorporado na molécula, domínio da proteína carreadora de peptídeo, responsável pela adição do aminoácido ao complexo enzimático, e o domínio de condensação, responsável pela formação da ligação peptídica (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). As muitas substâncias produzidas por cianobactérias apresentam precursores de ácidos graxos ou cadeias laterais de policetídeos, produzidor por precursores de Acil-CoA. Os policetídeos são montados por policetídeo sintases (PKS) multifuncionais e modulares, e cada módulo de uma PKS consiste de um domínio aciltransferase, proteína carreadora de acil, e domínio cetossintase. Em adição, domínios de montagem e acabamento podem estar presentes no módulo, promovendo diversidade na estrutura da molécula (DONADIO; MONCIARDINI; SOSIO, 2007). Cada unidade de PKS catalisa as etapas de reações enzimáticas envolvidas na elongação da biomolécula em síntese. Existem três tipos de PKS na biossíntese de policetídeos: a PKS tipo I corresponde aos complexos enzimáticos multifuncionais, com domínios que atuam de forma independente, a PKS tipo II apresenta enzimas pequenas que atuam de forma interativa, e a PKS tipo III corresponde às enzimas homodímeros com domínios atuando de forma interativa (BODE; MÜLLER, 2005). A PKS do tipo I é a comum entre as cianobactérias.

Uma variedade na produção de substâncias bioativas, contendo aminoácidos ou até terpenos, muitos dos quais alcaloides, foi descrita para o gênero *Fischerella*, sendo as moléculas classificadas nos seguintes grupos: hapalindol (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984), ambigua (SMITKA et al., 1992), fischerindol (PARK et al., 1992), fischerelina (ETCHEGARAY et al., 2004), que são tipicamente produzidos por cianobactérias da ordem Nostocales, além da aeruginosina (ERSMARK; DEL VALLE; HANESSIAN, 2008; SILVA-STENICO et al., 2012), que foi descrita para o gênero *Fischerella*, e a hepatotoxina microcistina (FIORE et al., 2009). Em função da complexidade estrutural e alta diversidade de variantes de produtos naturais do grupo hapalindol, a exploração tem sido intensificada desde 1984, e desde então culminou em dezenas de moléculas dentro das classes de hapalindois (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984; MOORE et al., 1987; SMITKA et al., 1992; PARK et al., 1992; STRATMANN et al., 1994; RAVEH; CARMELI, 2007; BECHER et al., 2007; MO et al., 2009).

Esses alcaloides primeiramente apresentam em comum um esqueleto de carbono policíclico derivado da condensação de um triptofano e um geranil pirofosfato, que dá início à

formação da cadeia da molécula, formando um indol contendo isonitrila (ou isocianato), e, então, uma unidade de isopreno ciclizado (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984; RICHTER et al., 2008; STRATMANN et al., 1994). Todas as moléculas são derivativas, ou seja, uma variante de um mesmo grupo pode servir como precursor para a biossíntese de outra (podendo ser enantiômeros), por meio de modificações da molécula, seja por oxidação, sulfatação, hidrogenação ou cloração, bem como variantes de um mesmo grupo podem sofrer alterações químicas e serem convertidas em compostos de outro grupo alcaloide, como a reação de hapalindol a ambigua (MOORE et al., 1994) (Figura 1).

Mais de 50 compostos do grupo hapalindol já foram descritos (RICHTER et al., 2008). O hapalindol apresentou a propriedade de inibição da síntese de RNA, através do bloqueio da RNA polimerase pela variante 12-*epi*-hapalindol E isonitrila, comprometendo a síntese proteica sobre *Escherichia coli* (DOAN et al., 2000). Hapalindol também foi relatado como inibidor de fotossíntese de algas verdes (*Chlamydomonas* sp.), confirmando o efeito alelopático e sugerindo sua aplicação como agente herbicida com potencial de controle biológico (ETCHEGARAY et al., 2004; GANTAR et al., 2008). Ainda, Becher et al. (2007) extraíram e purificaram quatro variantes de hapalindol de uma estrutura de biofilme formada pela linhagem *Fischerella* sp. ATCC 43239, as quais foram testadas quanto ao potencial larvicida contra o díptero *Chironomus riparius*, resultando em uma eficiência de 100 %. As moléculas de hapalindol em questão correspondem à variante 12-*epi*- Hapalindol J isonitrila.

A ambigua [2-(1,1-dimetilalil) hapalindol] é produzida a partir de uma molécula de hapalindol pela inserção de uma unidade adicional de isopreno, derivada de dimetilalil pirofosfato condensada ao carbono 2 do indol (SMITKA, 1992). Foi extraída primeiramente de linhagens de *Fischerella ambigua*, *Hapalosiphon hibernicus* e *Westiellopsis prolifica*, isoladas de ambiente terrestre (SMITKA et al., 1992). Raveh e Carmeli (2007) avaliaram os extratos polares derivados de ambigua, os quais apresentaram propriedades antibacteriana, antifúngica e antimalárica, sendo descritos, para o gênero *Fischerella*, variantes de ambigua (H, I, J) isonitrila, e identificação de seis alcaloides já conhecidos: 12-*epi*-hapalindol H e ambigua (A, B, D, E e F) isonitrila. Estudos de interesse farmacêutico foram realizados com extrato isolado da linhagem *Fischerella ambigua* UTEX 1903, que apresentaram propriedades antibacterianas contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus anthracis* (cinco ambiguinas descritas pela primeira vez para o gênero, e identificação de nove alcaloides indoís já conhecidos), e novos ensaios foram realizados posteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa, descrevendo mais quatro compostos com potencial antibiótico, previamente designados

fischambiguina A e B, ambigua P, ambigua Q, e o isolamento da variante de ambigua G. Essas investigações contribuíram, portanto, para o detalhamento de variantes de alcaloides produzidos por cianobactérias (MO et al., 2009; 2010).

Figura 1 - Estrutura molecular de derivados de alcaloides do grupo hapalindol produzidos por cianobactérias (RICHTER et al., 2008)

A nostopeptolida e a nostociclamida pertencem ao grupo dos peptídios cíclicos sintetizados a partir da via não ribossomal, descritos para as linhagens *Nostoc* sp. GSV224, isolada de solo na Índia, e *Nostoc* sp. ATCC 53789, isolada de líquen na Escócia (GOLAKOTI et al., 2000; 2001). Esses dois peptídeos apresentam estruturas muito similares; enquanto a nostopeptolida é constituída por nove resíduos de aminoácidos, sendo sete aminoácidos proteinogênicos e dois não proteinogênicos - L-4-metilprolina (mePro) e L-leucilacetato (LeuAc), a molécula de nostociclopeptídeo é sintetizada a partir de sete resíduos de aminoácidos, com um grupo E-imina ($R'R=N-R''$) ligado ao resíduo de L-tirosina, além do resíduo de L-4-metilprolina em comum com a molécula de nostopeptolida (GOLAKOTI et al., 2000; LUESCH et al., 2003). A nostopeptolida apresenta atividade antitoxina, através da captação da microcistina pelo bloqueio de transportadores aniônicos, inibindo a apoptose dos hepatócitos (LIU et al., 2014). Esse peptídeo também apresenta papel importante na regulação da produção de hormogônios nas linhagens produtoras, inibindo o processo de divisão celular durante o estágio simbiote em linhagens de *Nostoc punctiforme* (LIAIMER et al., 2015).

A microcistina, por fim, é um heptapeptídeo cíclico hepatotóxico, conhecida pela toxicidade causada para humanos, biota aquática e outros animais (CARMICHAEL, 1996; JOCHIMSEN et al., 1998). As microcistinas apresentam atividade inibidora de fosfatases eucarióticas tipos 1 e 2A, realizando uma ligação covalente altamente estável e irreversível com uma cisteína, no domínio catalítico da enzima (GEHRINGER, 2004), o que leva à superfosforilação dentro das células hepáticas e, posteriormente, seu rompimento e hemorragia no fígado. A estrutura geral da microcistina é representada pelo ciclo D-Ala-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-Glu-Mdha (Figura 2), no qual X e Z representam L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp corresponde à estrutura D-eritro-B-metil-ácido aspártico, Mdha corresponde à N-metildesidroalanina, e Adda corresponde à (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-ácido dienoico, aminoácido exclusivo das hepatotoxinas e que confere a toxicidade da molécula (BOTES et al., 1985). Mais de 100 variantes estão descritas atualmente pela literatura (SIVONEN, 2009; PEARSON et al., 2010; KAASALAINEN et al., 2012).

Figura 2 - Estrutura molecular da microcistina (TILLET et al., 2000)

A microcistina é produzida por linhagens planctônicas, bentônicas e terrestres, tendo registros de produção para os gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Planktothrix* (SIVONEN et al., 1999), *Nostoc* (SIVONEN et al., 1990; GENUARIO et al., 2010; KAASALAINEN et al., 2012, FEWER et al., 2013), *Fischerella* (FIORE et al., 2009; SHIH et al., 2013; CIRÉS et al., 2014), *Hapalosiphon* (PRINSEP et al., 1992), *Oscillatoria* (LUUKKAINEN et al., 1993) e *Phormidium* (IZAGUIRRE; JUNGBLUT; NEILAN, 2007).

Para finalidades de manejo e tratamento de água potável e controle de saúde pública, informações sobre as concentrações de toxinas presentes por litro de água coletada para amostragem são extremamente relevantes. No ambiente, geralmente microcistinas são estocadas no meio intracelular, e somente baixos níveis ou nenhuma quantidade encontra-se diluída em água. Valores de microcistina dissolvida tipicamente não excedem $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo, portanto, abaixo dos valores permitidos pela Organização Mundial da Saúde para fins de consumo (WHO, 1998), ou de forma a não oferecer riscos à saúde pública. No Brasil, o valor máximo permitido de microcistina em água potável é de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, de acordo com a Portaria número 2914 do Ministério da Saúde/ANVISA. Contudo, já foram relatados, em diversos países, níveis de microcistinas superiores a $25.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ em escumas e densas concentrações de cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1999; ANVISA, 2012), e surtos de intoxicações provenientes de florações que apresentaram concentrações acima de $18.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ou valores maiores já foram relatados (JONES; ORR, 1994). Também foram descritos casos de bioacumulações de microcistinas em tecidos de animais aquáticos, que podem acarretar efeitos significativos para as cadeias tróficas aquáticas, principalmente quando a taxa de biodegradação dessas toxinas é baixa em determinado ambiente, tendendo ao acúmulo dessas moléculas no local (VAN APELDOORN et al., 2007).

A influência dos fatores ambientais na produção de microcistina ainda não está suficientemente compreendida. Algumas investigações sugerem que variações de parâmetros como a intensidade de luz, regulação da fotossíntese, idade da cultura, variação de temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, e sistema *quorum sensing* podem influenciar a produção da toxina (UTKILEN; GJOLME, 1995; SIVONEN; JONES, 1999; ROHRLACK et al., 1999; YOUNG et al., 2005; SCHATZ et al., 2007; NEILAN et al., 2013). Há evidência da existência de um sítio ligante da enzima NtcA, envolvida na regulação de nitrogênio, na região promotora do agrupamento gênico da microcistina na linhagem *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, o que sugere que a expressão dos genes *mcy* e o balanço de nitrogênio intracelular estejam relacionados (GINN; NEILAN, 2010). Ainda, foi observada a correlação entre a transcrição dos genes *mcyD* e *ntcA*, em linhagens de *Microcystis* sp., em resposta à privação de fontes de nitrogênio e fósforo em condições de cultivo, sugerindo que a depleção dessas fontes pode levar ao aumento da produção de microcistina (PIMENTEL; GIANI, 2014).

2.4 Agrupamentos gênicos de biossíntese de microcistina

O agrupamento gênico de biossíntese de microcistina foi primeiramente descrito por Tillett et al. (2000) para a linhagem *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, estando localizado no cromossomo e contendo um tamanho de aproximadamente 55 Kpb, sendo capaz de codificar 10 ORFs, correspondentes ao gene *mcyA* ao gene *mcyJ*. Foram identificados dois *operons* transcritos em direções opostas: *mcyD-J* (*operon maior*), que contém sete ORFs, e *mcyA-C* (*operon menor*), com três ORFs. O *operon maior* (*mcyD-J*), codifica uma PKS (McyD), dois híbridos PS/PKS (McyE e McyG), e enzimas envolvidas no acabamento e finalização (*tailoring enzymes*) (McyJ, F e I) e transporte da toxina (McyH). O *operon menor* (*mcyA-C*) codifica três NRPSs (McyA, McyB e McyC) (Figura 3). O início da biossíntese da molécula é dado pela ação da enzima híbrida (PS/PKS) McyG, com a ativação de um fenil propionato derivado de fenilalanina, a ser convertida no futuro aminoácido Adda (HICKS et al., 2006). A formação do Adda envolve a atividade de quatro módulos de PKS das enzimas McyG, McyD e McyE, por meio da elongação, pelo domínio de adenilação, na molécula com o malonil-CoA, formação de ligações peptídicas, pelo domínio de condensação, e posterior redução e desidratação, e as modificações do Adda ocorrem pela atividade de O-metiltransferase pela enzima McyJ e pela atividade do domínio aminotransferase da enzima McyE, que converte o policetídeo a um β -aminoácido no último passo da síntese do Adda (TILLET et al., 2000;

CHRISTIANSEN et al., 2003). Os outros seis aminoácidos da molécula de microcistina são incorporados pela atividade dos domínios de adenilação nos módulos NRPS das enzimas McyG; McyA, pela incorporação de L-ser para elongar a cadeia, na posição 1, seguida pela incorporação de resíduos de D-ala; McyB, pela incorporação de L-Leu na posição 2 através do domínio de adenilação do primeiro módulo; e McyC pela incorporação da L-Arg na posição 4 através do domínio de adenilação e ciclização da molécula, por essa mesma enzima, com posterior liberação pelo domínio tioesterase (TILLET et al., 2000). A atividade dessas duas últimas enzimas define a variante da toxina. Ainda, o acabamento da molécula é realizado pela incorporação de D-eritro- β -metil ácido aspártico, catalisada pela atividade de 2-hidroxiácido desidrogenase da enzima McyI através da incorporação de D-metilaspartato, na posição 3 da molécula, pela conversão de 3-metilmalato a 3-metiloxalacetato (PEARSON; BARROW; NEILAN, 2007) e pela atividade de aspartato racemase pela enzima McyF (SIELAFF et al., 2003). A enzima McyH está envolvida na atividade de transportador ABC, que apresenta um domínio de membrana e um domínio ligante de ATP citosólico, além de apresentar papel na regulação da produção de microcistina (PEARSON et al., 2004). A montagem sequencial da molécula, bem como os domínios enzimáticos envolvidos no processo, são mostrados na Figura 3.

Figura 3 - Montagem da molécula de microcistina e os domínios gênicos envolvidos na biossíntese. Adaptado de DITTMANN; WIEGAND (2006)

Domínios PKS:	Domínios NRPS:
KS - cetoacil sintase	A - adenilação
AT - aciltransferase	C - ondensação
DH - desidratase	E - epimerização
KR - cetorredutase	NMT - N-metiltransferase
ACP - proteína carreadora de acila	PCP - proteína carreadora de peptidil
CM - C-metiltransferase	TE - tioesterase
AMT-glutamato-semialdeído aminotransferase	

O agrupamento de genes envolvidos na síntese de microcistina foi sequenciado e caracterizado posteriormente para os gêneros *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Fischerella* (CHRISTIANSEN et al., 2003; ROUHIAINEN et al., 2004; FEWER et al., 2013; SHIH et al., 2013). Os agrupamentos gênicos de *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* sp. e *Fischerella* sp. apresentam todos os 10 genes envolvidos na biossíntese, e estão arranjados em dois *operons* em direções opostas, mas as sequências de genes estão organizadas em sequências diferentes entre esses três gêneros. Em *Planktothrix* sp., o agrupamento gênico está arranjado em apenas um sentido, e estão ausentes os genes *mcyF* e *mcyI*, mas apresenta um gene adicional, o *mcyT*, que está situado antes da região promotora central e codifica uma tioesterase com atividade de correção durante o processo de montagem da molécula (CHRISTIANSEN et al., 2008) (Figura 4). A linhagem *Nostoc* sp. 152 apresenta nove dos 10 genes envolvidos na biossíntese de microcistina, pois o gene *mcyJ* está ausente e, em substituição, o gene *mcyL* foi descrito para a atividade de o-acetilase, realizando a incorporação de um grupo acetil, em substituição ao metil, incorporado pelo gene *mcyJ*, na hidroxila sobre a molécula do Adda, produzindo análogos de microcistina – ADMAdda - na posição 5 da molécula (FEWER et al., 2013).

A nodularina é uma outra hepatotoxina produzida por linhagens de *Nodularia spumigena* e também descrita para uma linhagem simbiótica de *Nostoc* sp. (MOFFITT; NEILAN, 2004; GEHRINGER et al., 2012). A molécula de nodularina teria possivelmente derivado da microcistina, sofrendo alterações na sua estrutura, uma vez que a microcistina apresenta a incorporação de sete aminoácidos na sua composição, e a nodularina, apenas cinco, tendo perdido os aminoácidos D-Ala, incorporado na posição 1 da molécula, e a substituição do resíduo de metil-dehidroxialanina (Mdha) da microcistina, por metil-dehidroxibutirato (Mdhb) na nodularina, na mesma posição, além de que o aminoácido da

posição 2, que dá origem as diversas variantes da microcistina, foi eliminado durante o processo. Ainda, o agrupamento gênico de biossíntese da nodularina, descrito para a linhagem *Nodularia spumigena* NSOR10 (MOFFITT; NEILAN, 2004), apresenta nove genes, em contraste com o primeiro agrupamento gênico descrito para a microcistina, que apresenta 10. No agrupamento gênico de biossíntese de nodularina, as sequências gênicas apresentam alta identidade com os genes biossintéticos de microcistina, com exceção da *orf ndaB*, que apresenta homologia e alta identidade com o gene *mcyC*. Foi observado, no *operon* menor do agrupamento gênico de biossíntese da nodularina, o processo de deleção do segundo módulo do gene *mcyA* e do primeiro módulo do gene *mcyB*, com posterior fusão dos módulos remanescentes, originando uma *orf* com homologia com partes dos genes *mcyA* e *mcyB*, o gene *ndaA*. (MOFFITT; NEILAN, 2004).

Figura 4 - Comparação da organização dos genes de biossíntese de microcistina e nodularina entre diferentes gêneros produtores das toxinas. Sentas em preto: PKS; branco: NRPS; preto e branco: PS/PKS; cinza: enzimas de montagem, acabamento (tailoring enzymes) e exportação

2.5 Agrupamento gênico de biossíntese de alcaloides hapalindoís

O agrupamento gênico de biossíntese da ambigua foi proposto para a linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903, através da caracterização *in vitro* das enzimas responsáveis pela produção de indol isocianoetenil e geranil pirofosfato, e a dimetilaliltransferase, responsável pela conversão de hapalindol G a ambigua A (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014). Juntamente a esse experimento, foi realizado o sequenciamento genômico com anotação gênica baseada em comparação com sequências homólogas encontradas em outras bactérias codificadoras de substâncias bioativas. Foram descritos 32 genes envolvidos no processo biossintético de via ribossomal envolvendo processos de prenilação, formando um agrupamento gênico com comprimento de 42 Kpb, estando esses genes relacionados à síntese de DMAPP (quatro *orfs*, *ambD1-D4*), oxigenase (cinco *orfs*, *ambO1-O5*), síntese de triptofano (cinco *orfs*, *ambT1-T5*), síntese de isonitrila (três *orfs*, *ambI1-I3*) e prenil transferase (três *orfs*, *ambP1-P3*), além de genes relacionados à atividade de efluxo (*ambE1-E3*), enzimas essenciais (*ambC1-C3*), domínios de função desconhecida (*ambU1-U4*) e dois genes regulatórios (*R1* e *R2*) que se encontram centralmente ao agrupamento, e apresentando regiões promotoras que os flanqueiam, organizando os outros genes em dois principais *operons*. A descrição dos agrupamentos gênicos para a biossíntese de ambigua e hapalindol, seu precursor de biossíntese, foi realizada para as linhagens *Fischerella* sp. UTEX 1903, *Fischerella* sp. PCC 9339 e *Fischerella* sp. ATCC 43239, sugerindo regiões dos agrupamentos com sequências gênicas em comum para as rotas biossintéticas, e a presença do gene *ambP3* em *Fischerella* sp. UTEX 1903, responsável pela conversão do hapalindol G à ambigua A.

Posteriormente, uma análise comparativa entre genomas cianobacterianos de linhagens filamentosas verificou sequências com atividade ainda desconhecida (*orfs*) flanqueando o agrupamento gênico de produção de ambigua para a linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903. Ainda, foram propostos os agrupamentos gênicos de biossíntese de welwitindolinona para duas linhagens da espécie *Hapalosiphon welwitschii* (UTEXB 1830 e UH IC-52-3), e para as linhagens *Westiella intricata* UH HT-29-1, *Fischerella* sp. PCC 9431 e *Fischerella muscicola* SAG 1427-1, constatando uma conservação na organização dos genes para as linhagens produtoras de welwitindolinona e para as linhagens produtoras de hapalindol. (MICALLEF et al., 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de alcaloides do grupo hapalindol. A- Fischerella sp. ATCC 43239 (hapalindol); B- Fischerella sp. PCC 9339 (hapalindol); C e D- Fischerella ambigua UTEX 1903 (ambiguina); E- Hapalosiphon welwitschii UTEXB 1830 (welwitindolinona); F- Hapalosiphon welwitschii IC-52-3 (welwitindolinona); G- Westiella intricata UH HT-29-1 (welwitindolinona); H- Fischerella sp. PCC 9431 (welwitindolinona); I- Fischerella muscicola SAG 1427-1(welwitindolinona) (MICALLEF et al., 2014)

2.6 Agrupamento gênico de biossíntese de nostopeptolida

O agrupamento gênico envolvido na biossíntese de nostopeptolida foi descrito para a linhagem *Nostoc* sp. GSV224 (HOFFMANN et al., 2003), apresentando um comprimento de 40 Kpb, preenchido com oito sequências gênicas que sintetizam peptídeos sintetases não ribossomais, policetídeo sintases e enzimas híbridas NRPS/PKS, distribuídas em dois *operons*. O *operon* maior apresenta os genes de maior comprimento, *nosA*, *nosB*, *nosC* e *nosD*, e o *operon* menor apresenta as sequências de *orf5*, *nosE*, *nosF* e *nosG*. Os genes *nosA-nosD* codificam enzimas PS/PKS na molécula de nostopeptolídeo em síntese. Os outros genes – *orf5*, *nosE*, *nosF* e *nosG* - codificam enzimas relacionadas à biossíntese dos aminoácidos mePro e à atividade de efluxo. Sendo assim, a atividade da nostopeptolida sintetase é constituída por quatro enzimas modulares: NodA, com quatro módulos, NodC, com três módulos, e NosD, com dois módulos, que desempenham função de peptídeo sintetase; e a enzima NosB, que apresenta apenas um módulo tipo I, e é uma PKS. Os módulos das enzimas NosA, NosC e NosD apresentam a série de domínios relacionados à atividade de adenilação, condensação e proteína carreadora de peptidil. O segundo módulo da enzima NosD apresenta adicionalmente o domínio tioesterase, com atividade de liberação da estrutura linear da molécula em formação e catalisação da sua ciclização. A enzima NosB apresenta os domínios de cetoacil-ACP sintase, acil transferase e proteína carreadora de acil, o que sugere atividade de incorporação de acil-CoA na extensão da molécula. A enzima NosE mostra alta similaridade com as enzimas álcool desidrogenase ligantes de zinco. A enzima NosF mostra homologia com enzimas de atividade de redução sobre o aminoácido mePro, catalisando a reação terminal na biossíntese de prolina. A enzima NosG é homóloga a transportadores ABC, apresentando alta similaridade com a enzima McyH, envolvida no transporte de microcistina para o exterior da célula (PEARSON et al., 2004). Assim, é sugestiva a atividade de efluxo de nostopeptolida para o meio extracelular por essa enzima (HOFFMANN et al., 2003). O esquema do agrupamento gênico de nostopeptolida é apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura de organização do agrupamento gênico envolvido na biossíntese de nostopeptolida para a linhagem *Nostoc* sp. GSV224. A organização dos módulos e domínios enzimáticos é mostrada. A- adenilação; C- condensação; ACP- proteína carreadora de acil; AT- acil transferase; KS- cetoacil sintase; PCP- proteína carreadora de peptidil; Te- tioesterase. Adaptado de HOFFMANN et al. (2003)

2.7 Sequenciamento genômico

O aprimoramento das tecnologias de sequenciamento genômico e a facilidade ao alcance têm possibilitado um aumento no número de sequenciamentos de genomas cianobacterianos, que são depositados em banco de dados públicos como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Genomes Online Database* (GOLD) e Instituto Pasteur. O primeiro sequenciamento realizado com genoma de cianobactérias data de 1996, quando Kaneko e colaboradores selecionaram a linhagem *Synechocystis* sp. PCC 6803, isolada de água doce em 1968. A iniciativa pelo sequenciamento partiu da observação, em 1980, de que essa linhagem sofrera transformação por DNA exógeno com uma alta frequência, além de sua habilidade de crescer em diversas condições ambientais como alternativa à atividade fotossintética, utilizando fonte de carbono em glicose. Em 2013, Shih e colaboradores publicaram 29 genomas concluídos, dentre 54 genomas de cianobactérias cujo sequenciamento foi proposto pelo projeto “CyanoGEBA”, baseado em informações do *Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea* – GEB. O sequenciamento foi realizado em plataformas Illumina e Roche 454, gerando 332 Mpb de informações em montagem e anotações gênicas, o que possibilitou a comparação, em nível de funcionalidade gênica, de linhagens cianobacterianas ainda não exploradas. Foi evidenciado, neste trabalho, para a linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339, um grande potencial para a produção de microcistinas e outras substâncias, como shinorinas, e para a produção de glicolipídios dos heterócitos, sugerindo que cerca de 5 % do genoma da linhagem são voltados a uma diversidade de substâncias codificadas por genes envolvidos em síntese de NRPS/PKS.

Os genomas cianobacterianos que são alvo de estudo pertencem a linhagens que apresentam uma gama de morfologias, ambientes naturais de isolamento, metabolismos e comportamento ecológico que as tornam alvo para estudos comparativos no campo da genética. Assim, a diversidade de cianobactérias pode ser observada em nível genômico, já que o tamanho do genoma pode variar em Mpb (1,4 a 12,07), índice GC (31 a 63 %), número

de ORFs que codificam proteínas (1.214 a 12.356), número de cromossomos e plasmídeos, etc. Essa diferença de tamanho, inclusive, pode ser um resultado da expansão ou redução do genoma, conforme a adaptação da espécie em seu ambiente natural, por aquisição de genes por transferência horizontal, em interação simbiótica, que podem ser elucidados pela presença de pseudogenes que evidenciam a perda de funções fisiológicas em decorrência dessas relações ecológicas (LARSEN et al., 2011; DAGAN et al., 2013).

O sequenciamento genômico permite também o acesso mais rápido e facilidade no desenho de iniciadores utilizados na amplificação de genes alvo. Por mais, o aumento no número de genomas sequenciados proporciona maior suporte para as análises filogenéticas, em detrimento das ferramentas convencionais de amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase, o que facilita as comparações de sequências completas de proteínas sintetizadas por grupos restritos de organismos e as identificações de clados entre os grupos de cianobactérias, além de facilitar a descoberta de novas substâncias bioativas através de referências de sequências com homologia (LARSEN et al., 2011, CALTEAU et al., 2014). Ainda, a busca por genes envolvidos em rotas de biossíntese de moléculas relacionadas ao metabolismo secundário pode ser complementada por análises de cromatografia e espectrometria de massas e, também, por expressão heteróloga, o que revela o perfil da molécula ou de seus precursores, e a caracterização das enzimas envolvidas nas etapas de sua conversão e montagem (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014; KLEIGREWE et al., 2015).

Atualmente, existem oito linhagens do gênero *Fischerella* relacionadas a projetos que abordam o sequenciamento genômico dessas linhagens obtidas de ambientes aquáticos e terrestres, cujas informações sobre *status* do sequenciamento, tamanho estimado do genoma, número de *scaffolds/contigs*, índice GC, entre outras informações, estão disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* e do *Joint Genome Institute/Genome On Line Database* (Tabela 1). O tamanho do genoma entre as linhagens do gênero costuma variar de 5 a 8 Mpb, e o índice GC, de 40 a 42 % (até o momento, todos os sequenciamentos encontram-se em *status* de *contigs* ou *scaffolds*). A partir do genoma sequenciado, a análise de genes ou de agrupamentos gênicos em questão é facilitada por meio de comparação da sequência alvo, com sequências de genomas concluídos/em andamento e depositados em bancos de dados, o que permite tomar como base a identidade entre elas para a inferência de genes metabólicos, para a bioprospecção de genes de interesse e para fins de inferências filogenéticas. O sequenciamento genômico em larga escala possibilitou a descrição de agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de alcaloides do grupo

hapalindol para quatro linhagens produtoras dessas substâncias (PCC 9339, UTEX 1903, PCC 9431 e SAG 1427-1) (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014; MICALLEF et al., 2014).

Tabela 1 – Sequenciamento genômico em realização para linhagens do gênero *Fischerella*

Linhagem	Número de ORFs	Tamanho (Mpb)	Índice GC (%)
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339	6.515	8	40,2
<i>Fischerella</i> sp. UTEX 1903	--	6,93	40,1
<i>Fischerella thermalis</i> PCC 7521	4.506	5,44	41
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9431	5.942	7,1	40,2
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9605	6.757	8	42,6
<i>Fischerella</i> sp. JSC-11	4.475	5,38	41
<i>Fischerella muscicola</i> SAG 1427-1 (PCC 73103)	6.146	7,36	40,3
<i>Fischerella muscicola</i> PCC 7414	5.807	6,9	41,3

2.8 Culturas axênicas de cianobactérias

As linhagens cianobacterianas coexistem com outras bactérias heterotróficas em condições de cultivo, estabelecendo uma comunidade microbiana que convive e interage. Assim, a extração de DNA a partir de uma cultura axênica de cianobactéria é sugerida para alcançar o sucesso do sequenciamento genômico. A condição de um DNA livre de contaminantes permite um alto percentual de cobertura e facilita a montagem das leituras da biblioteca produzida pelo sequenciamento genômico da linhagem cianobacteriana. Contudo, conservar uma cultura de linhagem em condições axênicas torna-se uma missão bastante difícil, desde a coleta e isolamento da amostra do ambiente, até a manutenção da cultura em condições controladas, visto que o risco de contaminação em todas as etapas é alto e provável. Ainda, a camada de exopolissacarídeos produzida pela maioria das linhagens e que envolve as células/colônias ou filamentos pode abrigar bactérias que convivem e se nutrem dessa camada (HOICZYK; BAUMEISTER, 1995; VÁZQUEZ-MARTÍNEZ et al., 2004). Existe uma grande diversidade de bactérias heterotróficas coexistindo e degradando moléculas sintetizadas e secretadas pelas linhagens cianobacterianas, como toxinas e outros compostos,

utilizando-os como fonte de carbono (ISHII; NISHIJIMA; ABE, 2004; HO et al., 2012; YANG et al., 2014). Portanto, há fatores ecológicos envolvendo relações mutualísticas entre cianobactérias e bactérias heterotróficas que dificultam ou impossibilitam o isolamento de muitas linhagens de cianobactérias (RIPPKA, 1988; EILER; BERTILSSON, 2004).

Algumas metodologias vêm sendo desenvolvidas visando à obtenção de culturas axênicas de cianobactérias, como o emprego de antimicrobianos de amplo espectro, como o carbapenêmico imipenem (FERRIS; HIRSCH, 1991), utilização de sistemas de filtração por membrana (HEANEY; JAWORSKI, 1977; AZMA et al., 2010), emprego de produtos químicos com poder oxidativo, como o hipoclorito de sódio (FOGG, 1942; TASSIGNY et al., 1969; VAZ et al., 2014) e micromanipulação e sucessivas técnicas de esgotamento em placa (BOWYER; SKERMAN, 1968), essa última gastando bastante tempo de manipulação e cuidados durante o monitoramento. O uso de produtos químicos é talvez o tratamento mais adequado para obter culturas puras de cianobactérias em curto tempo (VAZ et al., 2014). Ainda, o processo de lavagem de células e filamentos de cianobactérias com o uso de produtos químicos como detergentes (McDANILE; MIDDLEBROOK; BOWMAN, 1962) é um tratamento alternativo que permite a remoção de bactérias heterotróficas que estão suspensas no meio de cultura ou aderidas na camada polissacarídica da linhagem. Esse procedimento pode ser aplicado a cada repique de culturas e, especialmente, antes da extração de DNA.

Rippka et al. (1979) propuseram uma metodologia para verificar a eliminação de bactérias heterotróficas da cultura de linhagem cianobacteriana através do espalhamento de uma alíquota de cultura em placa de Petri com o próprio meio de cultura utilizado no cultivo da linhagem, em suplementação com glicose 0,2 % e ácido casamino 0,2 %, com subsequente incubação em ausência de luz durante 72 horas, buscando a ausência de crescimento de bactérias heterotróficas. Contudo, essa metodologia não permite estimar a presença de bactérias não cultiváveis na cultura. Assim, o sucesso do espalhamento em placa pode ser confirmado pela técnica de PCR em tempo real para avaliar a pureza da cultura de cianobactéria que passou por tratamento, através da detecção e quantificação de bactérias não cultiváveis. Nessa abordagem, a ferramenta pode ser utilizada para estimar a razão de genes marcadores presentes em todo o domínio Bacteria, como o gene que codifica a subunidade ribossomal 16S, que permite inferir número de cópias gênicas de Cyanobacteria e de outros grupos de Bacteria que estão presentes no DNA total extraído de amostra da cultura,

utilizando iniciadores específicos para diferentes grupos bacterianos (GIGLIO; MONIS; SAINT, 2003; PEARSON; NEILAN, 2008; ZHANG et al., 2014). Em adição a essa técnica, o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e o gel de eletroforese por gradiente de desnaturação (DGGE) são ferramentas comumente utilizadas para separar e classificar os fragmentos amplificados durante a PCR, de acordo com o índice GC de cada grupo de bactéria (LERMAN et al., 1984). Isso é realizado em ordem de avaliar a diversidade da comunidade de Bactéria presente na cultura cianobacteriana (KOLMONEN et al., 2004; GIOVANNONI; STINGL, 2005). A exploração de genes marcadores dentro do domínio Bactéria permite a avaliação da diversidade bacteriana presente na amostra. O gene do 16S rRNA é um ótimo marcador molecular para inferências taxonômicas e filogenéticas, pois sua taxa de mutação é baixa, comparada a outros genes, estando presentes regiões de sequências nucleotídicas conservadas e não tão conservadas, que facilitam a identificação taxonômica (WOESE et al., 1987; ZHANG et al., 2014).

HIPÓTESE

O genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 apresenta o agrupamento gênico de biossíntese da microcistina e outros genes envolvidos na biossíntese de diferentes substâncias bioativas, bem como o potencial de produzir mais de um tipo de molécula bioativa.

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo sequenciar o genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 mantida na Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP, anotar os agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de substâncias bioativas e avaliar a sua expressão utilizando espectrometria de massas. Dessa forma, os objetivos específicos trataram de:

- Investigar por PCR os genes do agrupamento gênico de biossíntese de microcistina;
- Extrair e caracterizar a toxina microcistina por espectrometria de massas, bem como as outras moléculas bioativas encontradas;
- Sequenciar o genoma da *Fischerella* sp. CENA161 usando plataformas de nova geração;
- Anotar os agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de microcistina, bem como de outras moléculas bioativas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e cultivo da linhagem

A linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foi coletada no ano de 2004 em uma superfície de concreto encontrada em uma nascente de água na Fazenda Capuava, Piracicaba, São Paulo (22°39'25"S, 47°37'24"W) (SHISHIDO, 2009). Desde então, ela tem sido mantida em meio BG11 (ALLEN, 1968) sem adição de nitrogênio inorgânico e incubada a uma temperatura constante de 25 ± 1 °C, com ciclo de 14 horas claro: 10 horas escuro e irradiância de $40 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, realizando repiques sucessivos a cada 60 dias.

3.2 Redução de bactérias heterotróficas da cultura de cianobactéria

3.2.1 Tratamento 1: Recuperação dos acinetos com lavagem de solução de hipoclorito de sódio

Uma cultura de 120 dias foi visualizada ao microscópio óptico para verificar a presença de acinetos (Figura 7). Após a confirmação, a linhagem foi submetida a um processo de recuperação dos acinetos através de lavagem com hipoclorito de sódio, conforme sugerido por Vaz et al. (2014). Essa técnica visa à busca de uma cultura de linhagem livre de contaminantes, como bactérias heterotróficas, ou ao menos com a sua contagem reduzida. Uma alíquota de 20 mL foi homogeneizada com o auxílio de uma seringa para realizar a fragmentação dos talos e filamentos, e expor o máximo da superfície de contato dos acinetos e células vegetativas ao tratamento. Um volume de 500 μL dessa suspensão foi depositado na superfície de um sistema de filtro a vácuo, utilizando uma membrana com poros de 8 μm (Millipore). As células foram lavadas com 3 mL de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,25 , 0,5 , 1 e 2 % durante 20 segundos, seguindo com lavagem com 3 mL de água ultrapura esterilizada durante 20 segundos. Após o processo, as células tratadas foram coletadas da superfície do filtro de membrana e colocadas em *erlenmeyer* com 20 mL de meio de cultura BG11 sem adição de nitrogênio inorgânico, e foram incubados por 60 dias a uma temperatura de 25 ± 1 °C, sob ciclo de 14 horas claro: 10 horas escuro e irradiância de $40 \mu\text{mol.foton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 7 – Estrutura dos filamentos na linhagem *Fischerella* sp. CENA161. HE – heterócitos; AC- acinetos. Aumento de 100 X. Escala da barra: 50 μ m

3.2.2 Tratamento 2: Lavagem das células

A extração de DNA total da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foi realizada de acordo com três diferentes tratamentos em replicata: SHW (células submetidas a tratamento com hipoclorito de sódio 0,5 % e lavadas com solução detergente); SH (células submetidas a tratamento com hipoclorito de sódio e sem lavagem) e C (células não foram submetidas a tratamento e nem lavagem – controle). O preparo para a extração de DNA das células do tratamento "SHW" envolveu uma etapa prévia com lavagem das células utilizando solução de detergente Extran® (Merck). Uma alíquota de 1 mL da cultura tratada foi adicionada a microtubos, realizando a concentração das células por centrifugação a 9000 rpm durante 10 minutos, repetindo mais duas vezes a etapa. Após o descarte do sobrenadante, um volume de 2 mL Extran® 0,05 % foi adicionado ao *pellet*, misturados e centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, um volume de 2 mL de solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCL 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM pH 8, etanol 50 %) foi adicionado ao *pellet*, misturados e centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos, repetindo essa etapa mais duas vezes. Por fim, um volume de 2 mL de NaCl 0,85 % foi adicionado ao *pellet*, misturados e centrifugados a 9000 rpm durante 10 minutos. O *pellet* foi armazenado a -20 °C até o momento da extração de DNA.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o kit DNA Extration KIT AxyPrepTM Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen), seguindo as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi verificada com corrida em gel de eletroforese com agarose 1 % e, após, o DNA foi purificado utilizando o kit AxyPreTM PCR Clean-up (Axygen), seguindo as instruções do fabricante.

3.4 Verificação da Pureza das Culturas

3.4.1 Contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis

Após o período de incubação das células tratadas, uma alíquota de 100 µL de meio de cultura de cada Erlenmeyer foi coletada e, a partir dessa, foi realizado o espalhamento em placas com meio BG11 sem nitrogênio e suplementado com glicose 0,2 % e ácido casamino 0,2 % e em placas com meio Agar Triptona de Soja (HiMedia) suplementado com glicose 1 %. As placas foram incubadas a 25 °C por, no mínimo, 96 horas, para verificar o crescimento de colônias de bactérias heterotróficas cultiváveis.

3.4.2 PCR Quantitativo – Tempo Real (*real time* PCR)

A eficiência do tratamento de recuperação dos acinetos e do processo de lavagem das células antes da extração de DNA foi avaliada por quantificação do gene ribossomal de Bacteria Total presente na amostra, para estimar a abundância de Cyanobacteria e Bacteria Total nos tratamentos. As reações foram conduzidas em triplicatas em *StepOnePlus Real Time PCR System* (Life Technologies, Calrsbad, CA, EUA), utilizando o sistema de detecção *SYBR GreenI* (Corbett Life Science, Australia) com o DNA extraído. Iniciadores específicos para Cyanobacteria CYA359F, 781R-a e 781R-b (NÜBEL; GARCIA-PICHEL; MUYZER, 1997) foram utilizados, e para Bacteria Total, os iniciadores P1-F e P2-R (MUYZER; WAAL; UITTERLINDER, 1993) foram utilizados. As condições de ciclagem térmica para amplificar a região 16S rRNA em Cyanobacteria foram: 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 47 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e, pra acessar Bacteria Total, as condições foram de 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Em todas as reações, uma curva de desnaturalização foi construída com variação de temperatura de 72 a 94 °C para verificar a especificidade da reação (BUSTIN et al., 2009). As curvas padrão foram obtidas

utilizando diluições seriadas dos fragmentos amplificados a partir da região alvo com os iniciadores específicos, a partir do DNA extraído da linhagem controle positivo; para Bacteria total, foi utilizado um *pool* de amostras de todos os grupos e, para Cyanobacteria, fragmentos de 16S rRNA do genoma do gênero *Fischerella*. Valores limiares obtidos da amplificação das amostras foram interpolados na curva padrão, determinando o número de genes de 16S rRNA encontrados por volume (μL) de amostra. A razão de Cyanobacteria: Bacteria total foi calculado como a razão entre o número de cópias mensurado para o grupo específico (*Fischerella*) e Bacteria total, para visualizar diferenças na proporção entre as amostras. Os dados foram submetidos à análise de variância e as comparações foram realizadas com o teste de Tukey, $P < 0,05$.

3.5 Isolamento da linhagem

Após o tratamento e lavagem dos filamentos, a linhagem foi submetida ao processo de esgotamento em placa no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Helsinki. O procedimento foi realizado em placa de Petri com o meio de cultura sólido com agarose ultrapura 0,55 % (Invitrogen), buscando isolar filamentos curtos e distantes entre si de, no máximo, oito células, favorecendo o crescimento de novos talos na ausência de bactérias heterotróficas contaminantes. O monitoramento foi acompanhado através de visualização da placa de Petri em microscópio invertido, aparelho Olympus CK2 ULWCD 0.30, com a objetiva de 4 X.

3.6 Investigação dos genes ribossomal e *mcy* por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O gene que codifica a subunidade 16S rRNA do ribossomo de bactérias foi acessado por amplificação através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 27F1 e 23S30R (NEILAN et al., 1997; TATON et al., 2003). A reação foi preparada utilizando *buffer* 1X (20 mM Tris HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM MgCl_2 , 1,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 20-50 ng de DNA e 5 μM de cada iniciador. Os reagentes foram misturados para um volume final de 25 μL . A ciclagem térmica da reação foi realizada com desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos; 10 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 45 segundos e 68 °C por 2 minutos; 25 ciclos de 92 °C por 45 segundos, 54 °C por 45 segundos, 68 °C por 2 minutos; e extensão final de 68 °C por 7 minutos. Foram utilizados iniciadores internos para sequenciamento do

gene do 16S rRNA (357F e R; 704F e R; 1114F e R) (modificado de Lane, 1991). Os genes codificadores do complexo microcistina sintetase, *mcy*, foram amplificados com as mesmas condições de reação previamente citadas, utilizando os programas descritos pela literatura e também desenhados durante os experimentos (Tabela 2). A especificidade das reações, bem como a quantificação de cópias amplificadas, foi avaliada por corrida eletroforética com agarose 1 %, utilizando marcador de massas *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen).

Tabela 2 - Programas de ciclagem térmica utilizados para amplificar os fragmentos dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina

Gene	Programa	Iniciadores	Referência
	94 °C/4 min; 30x 94 °C/20 s; 55 °C/30 s;	OMET-F, OMET-R	LORENZI (com. pessoal);
<i>mcyA</i>	72 °C/1 min; 72 °C/7 min.	MSF, MSR	TILLET et al., 2001
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 52 °C/30s;	pB3F pB9R	FEWER et al., 2007
<i>mcyB</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 52 °C/30 s;	pC1F pC13R	FEWER et al., 2007
<i>mcyC</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 56 °C/30 s;	<i>mcyDF mcyDR</i>	RANTALA et al., 2004
<i>mcyD</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 56 °C/30 s;	<i>mcyEF2 mcyER4</i>	RANTALA et al., 2004
<i>mcyE</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 50 °C/30 s;	<i>mcyFKF mcyFKR</i>	Este trabalho
<i>mcyF</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 56 °C/30 s;	<i>mcyGF mcyGR</i>	FEWER et al., 2007
<i>mcyG</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 56 °C/30 s;	<i>mcyHKF mcyHKR</i>	Este trabalho
<i>mcyH</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 56 °C/30 s;	<i>mcyIdgenF mcyIdgenR</i>	PEARSON et al., 2007
<i>mcyI</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		
	95 °C/3 min; 30x 94 °C/30 s; 56 °C/30 s;	<i>mcyJKF mcyJKR</i>	Este trabalho
<i>mcyJ</i>	72 °C/1 min; 72 °C/10 min.		

3.7 Clonagem e transformação

Com a amplificação dos fragmentos gênicos, foi realizada a clonagem utilizando o kit de clonagem *pGEM[®]-T Easy Vector Systems* (Promega), seguindo instruções do fabricante. Um volume de 10 µL de ligação foi misturado a 50 µL de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α. A transformação foi realizada por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Posteriormente, 250 µL de meio de cultivo líquido LB (Luria-Bertold, USB Corporation) foram adicionados à mistura e incubado a 37 °C por 60 min, sob agitação constante de 250 rpm. As células transformadas foram espalhadas em placas de meio de cultivo sólido LB acrescido de ampicilina e X-Gal, ambos nas concentrações finais de 100 µg mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37 °C por até 18 h. Os clones transformados foram selecionados a partir da seleção de colônias com coloração branca, as quais foram cultivadas em meio LB líquido a 37 °C durante 12 h, sob agitação constante de 250 rpm. A presença dos insertos nos clones transformados foi confirmada por meio de PCR de colônia utilizando os iniciadores correspondentes à amplificação de cada fragmento, ou com os iniciadores do vetor de clonagem (M13F e M13R), conforme instruções do fabricante. Plasmídeos contendo o inserto de interesse foram extraídos pelo método de hidrólise alcalina, com pequenas modificações (BIRNBOIM; DOLY, 1979), e foram quantificados em gel de agarose 1 % utilizando marcador de massas *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) e armazenados a -20 °C até o preparo para sequenciamento.

3.8 Sequenciamento Sanger

Os plasmídeos extraídos foram amplificados, em sua região de ligação do fragmento, por PCR utilizando o kit *BIG DYE[®]namic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare). Para a reação, foram utilizados 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol de cada iniciador utilizado durante as reações de amplificação, 1 µL de *Big Dye*, 2 µL de *Big Dye Buffer* 2,5 X (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura esterilizada para volume final de 10 µL. A ciclagem térmica usada para amplificação foi: 96 °C por 1 minuto; 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos; 10 °C por tempo indefinido.

O DNA foi precipitado em tubos utilizando 2 µL de tampão acetato de sódio/EDTA (acetato de sódio 1,5 M pH 9,0, EDTA 250 mM) e 600 µL de etanol 100 %, com

centrifugação de 13 000 x g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 150 µL de etanol 70 %, com centrifugação de 13 000 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras mantidas à temperatura ambiente ao abrigo da luz por no mínimo 2 horas. Para o sequenciamento, as amostras foram ressuspensas com 10 µL de formamida Hi-Di (Life Technologies) e inseridas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). Os dados gerados foram coletados e processados pelo programa ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software (versão 3.7) (Life Technologies) no Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

A qualidade das sequências nucleotídicas foi avaliada, e a sequência consenso foi obtida com edição pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON et al., 1998) em sistema operacional GNU/Linux. As regiões que apresentaram bases de qualidade Phred inferior a 20 foram submetidas a novo sequenciamento. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997).

3.9 Sequenciamento genômico e montagem das leituras

O DNA genômico extraído, conforme descrito anteriormente, foi quantificado com o kit Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay (Life Technologies) através do equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer, e foi utilizado 1 ng de DNA para a realização do sequenciamento. O sequenciamento foi realizado pela plataforma SOLiD 4, no Laboratório de Polimorfismo de DNA da Universidade Federal do Pará, e também pela plataforma Illumina, em aparelho MiSeq, utilizando o kit *MiSeq Reagent*, de acordo com as instruções do fabricante, com a construção de uma biblioteca pareada (*paired-end*) que produz leituras de extensão nucleotídica de aproximadamente 300 pb. Após o sequenciamento genômico, a qualidade das leituras obtidas foi avaliada com o programa FASTQC 0.10.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Foi realizado o alinhamento das leituras pareadas, com filtragem e trimagem das leituras com qualidade Phred inferior a 20. O programa SeqyClean (v.1.8.10) (<https://github.com/ibest/seqyclean>) foi utilizado para filtrar as leituras com identidade com sequências de genomas de Cyanobacteria. O alinhamento das leituras pareadas foi realizada por sobreposição utilizando o programa PEAR (ZHANG et al., 2014), e a montagem do genoma foi realizada utilizando o programa SPAdes (BANKEVICH

et al., 2012). Após a montagem, foi realizada nova filtragem de sequências com identidade com cianobactérias, utilizando o programa Kraken (WOOD; SALZBERG, 2014), e as informações sobre a montagem *ab initio* do genoma foram obtidas pelo programa Quast (GUREVICH et al., 2013).

3.10 Anotação dos genes

O agrupamento gênico de biossíntese de microcistina foi montado através da orientação pelo alinhamento dos eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento Sanger dos 10 fragmentos gênicos *mcy* por PCR, com as leituras obtidas do sequenciamento genômico da linhagem CENA161. Posteriormente, foi realizada a identificação das sequências através do alinhamento das 10 sequências nucleotídicas obtidas pelo sequenciamento Sanger contra o arquivo gerado após a montagem das leituras do genoma (.fasta), utilizando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). A anotação manual e curadoria das sequências foram realizadas utilizando o programa Artemis (v.15.1.10) (RUTHERFORD et al., 2000). A anotação automática do genoma foi realizada após a submissão das leituras sequenciadas e montadas no servidor MG-RAST (MEYER et al., 2008). Para a predição de agrupamentos gênicos de outras substâncias bioativas, foi utilizado o servidor antiSMASH (v 3.0.0) (WEBER et al., 2015). Para a predição da especificidade do substrato dos domínios de adenilação dos genes não ribossomais, foi utilizado o programa NRPSpredictor2 (RAUSH et al., 2005; RÖTTIG et al., 2011).

3.11 Análises filogenéticas

As sequências obtidas por amplificação de fragmento gênico (16S rRNA) e por sequenciamento genômico (Mcy) foram alinhadas com outras sequências disponíveis no GenBank do NCBI, com as ferramentas BLASTN e BLASTP, que realizam o alinhamento de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, respectivamente, contra o banco de dados público. Foi realizado um alinhamento múltiplo com as sequências utilizando o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e, após, o arquivo foi convertido a um formato .nexus com o uso do programa ALTER (GLEZ-PEÑA et al., 2010). O melhor modelo evolutivo para a construção das árvores filogenéticas foi definido pelo programa jModelTest (POSADA, 2008), através dos menores valores de BIC fornecidos pela análise. As 10 sequências Mcy foram concatenadas, e as árvores filogenéticas foram construídas com o uso

do programa Mr.Bayes (v.3.2.5) (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). A confiabilidade dos nós foi acessada por reamostragem com 5×10^6 gerações.

3.12 Bioensaios

Bioensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Helsinki para avaliar a bioatividade da linhagem de estudo contra fungo e bactérias, em condições não axênicas e axênicas de cultivo. Para a avaliação nas condições axênicas, a linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foi cultivada em meio de cultura líquido Z8 (KOTAI, 1972) sem adição de nitrogênio inorgânico, sob condições controladas de iluminação de $3-8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. O conteúdo intracelular de 400 mg de células liofilizadas foi extraído utilizando metanol 100 % e um volume correspondente a aproximadamente 200 μL de pérolas de vidro de 0,5 mm, com agitação a 65 rpm durante 20 segundos em aparelho FastPrep[®]-24 Instrument (MP Biomedicals), seguindo com centrifugação a 20 000 rcf durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e aplicado três vezes em discos de bioensaios, totalizando 600 μL de extrato que foi evaporado em microplacas sob fluxo de exaustão utilizando a técnica de difusão de disco (BAUER et al., 1966). As placas com meio de cultura sólido LB e PDA (agar batata e dextrose) foram preparadas com linhagens de bactérias e fungos, respectivamente, através de espalhamento utilizando haste de algodão embebida em suspensão de aproximadamente 10^6 células.mL⁻¹ (escala 0,5 Mac Farland). Os discos foram depositados sobre a superfície das placas com o espalhamento de bactérias, e as placas foram incubadas a 37°C durante 16 h. As placas com espalhamento de fungo foram incubadas a 35°C durante 24 h. Após o período, o halo de inibição foi medido. As linhagens testadas foram: 1306- *Salmonella typhimurium*, 395- *Staphylococcus aureus*, 1881- *Bacillus cereus*, 2487- *Burkholderia cepacia*, 104- *Xanthomonas campestris* e 484- *Candida albicans*. As linhagens fazem parte do acervo HAMBI – *The Culture Collection*, da Universidade de Helsinki. Após a confirmação da bioatividade, o extrato intracelular foi completamente evaporado e, então, foram adicionados, para o mesmo volume inicial do extrato, o volume de água MilliQ esterilizada, metanol e diclorometano, obtendo uma solução com volume 4 vezes superior ao inicial. A solução foi centrifugada a 6 000 rcf durante 5 min a 25°C . Foram separadas a fase superior, que corresponde à fração polar (metanol/água – MeOH + H₂O), e a fase inferior, que corresponde à fração apolar (diclorometano - DCM), sendo posteriormente evaporadas, ressuspensas em

1 mL de metanol e depositadas para um volume de 300 μ L de cada fração em discos de bioensaio, evaporadas novamente e submetidas a novo teste de bioatividade em placas. As frações que apresentaram resposta contra bactérias e/ou fungo foram novamente evaporadas e ressuspensas em 1 mL de acetonitrila 50 %, homogeneizadas em agitador durante 20 segundos, sonicadas por 20 segundos e centrifugadas a 20 000 rcf por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e encaminhado para as análises químicas.

3.13 Análises químicas - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

As variantes da microcistina foram identificadas por cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um espectrômetro de massas no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O conteúdo intracelular de 60 mg de células liofilizadas da linhagem foi extraído com metanol 70 % em *probe* de ultrassom durante 1 minuto, em gelo, para romper as células. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 10 000 x g por 10 minutos, repetindo o procedimento mais duas vezes, diluindo o sobrenadante em metanol 10 %. A amostra foi aplicada em aparelho SPE Sep-Pak 500 mg (Waters), previamente condicionado por passagem sequencial de 5 mL de metanol 100 % e 5 mL de metanol 10 %. Após a lavagem da coluna com 5 mL de metanol 10 %, as microcistinas foram eluídas em metanol 90 %. O solvente foi evaporado em fluxo de nitrogênio, e a amostra foi reconstituída em 500 mL de metanol 50 %. A amostra foi transferida para frascos de HPLC após filtração (0,45 μ m, PVDF, Millex, Millipore). A cromatografia foi realizada em aparelho Fusion-RP 150 x 2 mm, 4 μ m, com coluna de fase móvel de: (A) 2 mM formiato de amônio + 0,1 % ácido fórmico; e (B) acetonitrila 90 %. A vazão foi correspondente a 0,2 mL.min⁻¹ com o seguinte gradiente:

Tempo (min)	B (%)
0	35
10	60
16	100
18	100
18,5	35
25	35

As mesmas condições foram utilizadas em diferentes equipamentos para caracterizar a microcistina. Os experimentos em precursor *ion scan* foram realizados em Agilent Infinity 1260 acoplado a espectrômetro de massas triplo-quadrupolo (6460 TripleQuad LC/MS, Agilent), com fonte de ionização eletrospray. Os experimentos de dissociação induzida por

colisão foram realizados em cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massas íon trap (Shimadzu Prominence, Esquire HCT, Bruker Daltonics), com fonte de ionização eletrospray. As variantes encontradas foram comparadas com o banco de dados de microcistinas.

As análises químicas das outras substâncias bioativas foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas/Microbiologia da Universidade de Helsinki, e foi utilizada biomassa da linhagem liofilizada, cultivada em condições axênicas e não axênicas. As frações que mostraram atividade durante os bioensaios foram submetidas à corrida em HPLC para a obtenção das frações. Para isso, as frações foram evaporadas completamente e ressuspensas em 1 mL de acetonitrila 50 %, com sonicação durante 20 s e vortexação por 10 s. Essa etapa foi realizada duas vezes e, então, as frações suspensas em acetonitrila foram centrifugadas a 20 000 rcf durante 5 min a 25 °C, sendo coletado o sobrenadante e transferido para frasco de HPLC. Alíquotas de 100 µL das frações foram submetidas à corrida em cromatógrafo (Agilent 1100 Series LC/MSD Trap XCT Plus, Agilent Technologies) em coluna Phenomenex (Torrance) C8(2) (100 a 5 mm, 10 µm x 150 mm), após lavagem da coluna com isopropanol durante 15 minutos e posterior lavagem com acetonitrila com gradiente de 100 – 50 %, com alteração a cada 5 minutos. A corrida com as amostras foi realizada com fluxo de 4 mL.min⁻¹ durante 40 min, eluída em acetato de amônio 0,1 % (A) e gradiente de 50 - 75 % de acetonitrila (B) aplicados para a fração apolar do extrato intracelular, e eluição em acetato de amônio 0,1 % (A) e gradiente de 5 - 50 % de acetonitrila (B) para a fração polar do extrato intracelular. As frações foram coletadas tão logo quanto detectadas no gráfico de corrida, evaporadas e ressuspensas em metanol 100 % para ensaio de bioatividade, utilizando 200 µL da suspensão em discos de bioensaio. As frações que mostraram bioatividade foram encaminhadas para espectrometria de massas para comparar com banco de dados de substâncias bioativas de cianobactérias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Recuperação dos acinetos e isolamento da linhagem

A linhagem *Fischerella* sp CENA161 mostrou-se capaz de recuperar suas células vegetativas após a sobrevivência e recuperação dos acinetos ao longo do período de 60 dias, apresentando seus filamentos tratados, no início, em uma coloração branca, sob efeito oxidante do hipoclorito de sódio, passando para a coloração verde. Portanto, seus pigmentos fotossintéticos foram produzidos novamente. O tratamento com hipoclorito de sódio à concentração de 2 % não revelou a recuperação dos acinetos com nova produção de filamentos após o período de 60 dias, e o tratamento com a concentração de 0,25 % não eliminou as bactérias heterotróficas cultiváveis, mostrando uma contagem em placa de 58 UFC.mL⁻¹. O tratamento com hipoclorito de sódio a concentração de 0,5 % e 1 % mostraram sucesso na eliminação de bactérias heterotróficas cultiváveis na cultura da linhagem tratada, pois não foi observado o crescimento de colônias após o período de incubação mínima de 96 horas, tanto em placas com meio de cultura BG suplementado com glicose, como em Agar TSA.

A abundância de grupos representativos de Bacteria e Cyanobacteria foi avaliada por quantificação da amplificação de fragmentos do gene ribossomal 16S, e a razão de sequências de Cyanobacteria: Bacteria Total foi realizada para mensurar a presença de bactérias remanescentes nas amostras e, assim, avaliar a eficiência dos tratamentos. A lavagem com hipoclorito de sódio (SHW), correspondente às células que receberam o tratamento de recuperação dos acinetos e que passaram por lavagem com detergente antes da extração de DNA, mostrou significativa redução na abundância de Bacteria Total ($10^{10,5}$ cópias de gene 16S rRNA), sendo uma quantificação reduzida, em escala log, quando comparada às células que receberam somente o tratamento de recuperação dos acinetos sem o tratamento de lavagem com detergente ($10^{10,9}$ cópias) e ao controle, correspondente às células que não foram tratadas ($10^{12,5}$ cópias). Contudo, o tratamento “SHW” apresentou a mais alta abundância de cópias de fragmento de Cyanobacteria ($10^{9,4}$ cópias), comparado com o outro tratamento e o controle (Figura 8). Como resultado, a razão Cyanobacteria: Bacteria Total nessa amostra foi superior também, o que sugere a eficiência do tratamento de recuperação dos acinetos através da lavagem com solução de hipoclorito de sódio com posterior lavagem com detergente previamente à extração de DNA, para promover a redução na contagem de bactérias heterotróficas provenientes das culturas de cianobactérias.

Figura 8 - Perfil de abundância de cópias do gene do 16S rRNA de Cyanobacteria versus Bacteria Total entre as amostras analisadas. SHW- tratamento com hipoclorito de sódio e posterior lavagem com detergente; SH- tratamento com hipoclorito de sódio; C- controle (sem tratamento)

4.1.1 Quantificação de Bacteria na cultura

O tratamento de recuperação dos acinetos mostrou alta eficiência na eliminação de grande proporção de bactérias heterotróficas. Os melhores resultados corresponderam ao experimento das células tratadas com hipoclorito de sódio e posteriormente submetidas à lavagem com detergente para, então, serem submetidas à extração de DNA para uso em sequenciamento genômico. O sucesso dos resultados obtidos após os experimentos deve-se à ação química do hipoclorito de sódio, que causou a oxidação dos constituintes celulares na concentração mínima de 0,5 % sem afetar a estrutura dos acinetos, e o emprego do detergente causou a desestruturação da camada de exopolissacarídeos que envolvem os tricomas. Ainda, o processo químico possivelmente dissolveu os lipídeos e ácidos graxos da membrana plasmática e desnaturou as proteínas estruturais nas células vegetativas. Contudo, ainda remanesceu um grupo de bactérias heterotróficas não cultiváveis que se mostrou resistente aos dois tratamentos empregados.

Há que se considerar que o número de cópias do gene ribossomal pode variar no genoma das diferentes bactérias, mas, por maior que seja a quantificação das cópias entre as bactérias heterotróficas presentes na cultura e que porventura possam distorcer a verdadeira razão de cópias entre os grupos, houve, também, a amplificação do gene ribossomal do genoma da linhagem cianobacteriana CENA161 através desse mesmo iniciador universal utilizado nos ensaios. Isso faz com que o resultado do número de cópias, e a estimativa da razão entre cópias de Cyanobacteria e Bacteria total, continuem apontando para uma resposta positiva do tratamento realizado com a cultura, direcionando um DNA mais limpo para o sequenciamento genômico.

Conforme Fogg (1942), o sucesso da eliminação de bactérias heterotróficas durante o tratamento seria devido, em um primeiro momento, à ausência de bactérias produtoras de endósporos na cultura cianobacteriana. Vaz et al. (2014) obtiveram culturas axênicas de três linhagens do gênero *Nostoc* que foram submetidas a tratamento de hipoclorito de sódio em concentrações de 1, 2 e 3 % durante 10 segundos de exposição. Nessa situação, o sucesso do tratamento foi devido ao padrão morfológico dos tricomas, que apresentaram pouca agregação durante todas as etapas de crescimento da linhagem e reduziu a probabilidade de nova adesão de bactérias heterotróficas durante e após o tratamento (HOICZYK; BAUMEISTER, 1995), bem como à resistência dos acinetos ao tratamento com hipoclorito de sódio nas concentrações testadas e ao longo do experimento. Tassigny, Laporte e Pourriot (1942) obtiveram cultura axênica de cianobactérias após exposição ao hipoclorito de sódio à concentração de 0,0025 % durante 2 minutos. Os filamentos da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 mostraram alguma resistência ao tratamento e à eliminação de todas as bactérias heterotróficas em razão do tamanho das células (aprox. 8 μ m) e sua superfície de contato, e isso influencia proporcionalmente a presença e espessura da bainha de exopolissacarídeos que envolve o tricoma que, ainda, provê substrato e fonte de carbono para hospedar bactérias heterotróficas.

A anotação automática do arquivo de montagem do genoma, através do servidor MG-RAST, mostrou uma abundância de 90 % de sequências nucleotídicas com identidade com sequências do filo Cyanobacteria, que são disponíveis em banco de dados público (Figura 9). Em seguida, 4,1 % das sequências anotadas pelo servidor correspondem ao filo Proteobacteria, e menores percentuais correspondentes aos outros filos com menor abundância de leituras anotadas. O percentual de 10 % dos filos, especialmente os filos correspondentes a bactérias, podem corresponder aos grupos que sobreviveram ao tratamento

polimerase em tempo real, que é sensível e representativa para o perfil de diversidade bacteriana em uma amostra.

Com o objetivo de avaliar o processo de limpeza da linhagem cianobacteriana para aumentar a cobertura do genoma através da obtenção de leituras do sequenciamento com alta identidade com genomas de cianobactérias, a técnica de recuperação dos acinetos mostrou-se positiva, e a técnica de *real time* PCR confirmou a eficiência. Ainda, a técnica é promissora para resultados em curto prazo, comparada a outras técnicas de cultivo, como o uso de produtos antimicrobianos ou esgotamento de células em placa. O tratamento da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 teve duração de cerca de 60 dias e apresentou baixo custo, rendendo uma cultura de cianobactéria com baixa contagem de células de bactérias heterotróficas. É importante considerar que a extração de DNA das células para sequenciamento genômico, nesse caso, deve ser realizada imediatamente após a observação da recuperação das células vegetativas após o tratamento, em razão das bactérias heterotróficas não cultiváveis que não foram eliminadas não se multiplicarem novamente em grande escala.

A axenia da linhagem foi confirmada após o tratamento químico que a linhagem sofrera, com a técnica de esgotamento em placa, através da obtenção de um filamento curto de oito células e sem colônias de bactérias heterotróficas na região de axenia na placa. Após 60 dias de cultivo em meio sólido, a região do talo axênico foi recortada e transferida para uma nova placa de cultivo (Figura 10)

Figura 10 - Visualização de um talo da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 em recuperação e multiplicação em placa de cultura sólida. Aumento 40 X

4.2 Amplificação dos fragmentos de genes da biossíntese da microcistina

Dez fragmentos gênicos (*mcyA-mcyJ*) foram investigados para confirmar a presença do agrupamento gênico envolvido na biossíntese da microcistina no genoma da linhagem de estudo. Sete genes foram avaliados com iniciadores descritos pela literatura e previamente amplificados em pesquisa anterior (*mcyA-mcyE*, *mcyG*, *mcyI*) (SHISHIDO, 2009) e três fragmentos gênicos foram avaliados utilizando iniciadores que foram elaborados neste presente trabalho (*mcyF*, *mcyH*, *mcyJ*). Durante todos os ensaios de amplificação por reação em cadeia da polimerase, a linhagem *Microcystis aeruginosa* SPC777 foi utilizada como controle positivo. Esses três iniciadores mostraram sucesso na elaboração, visto que houve amplificação de única banda apresentada por corrida eletroforética e sem necessidade de otimização do programa de ciclagem térmica. Os tamanhos dos fragmentos estimados durante o ensaio de desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi equivalente aos obtidos com a amplificação e sequenciamento, sugerindo que não tenha ocorrido consideráveis eventos de deleções ou inserções de nucleotídeos, como pode ocorrer com outros genes de maior comprimento, que codificam peptídeos sintetases e policetídeos sintases e apresentam mais de um módulo e/ou domínio catalítico. Os produtos obtidos variaram de 447 a 1016 pb, sendo que a maior sequência amplificada correspondeu à do gene *mcyH*, o que permite uma análise comparativa que faça mais uso da cobertura fornecida pelas sequências das outras linhagens utilizadas para as reconstruções filogenéticas, tendo o tamanho do fragmento amplificado de 1016 pb, contra aproximadamente 1700 pb do comprimento total do gene. Sobre todos os conjuntos de iniciadores testados durante as análises, não foi possível obter um produto com o par de iniciadores NMT-F e NMT-R, que amplifica toda a extensão da sequência do domínio que codifica a enzima N-metiltransferase no gene *mcyA* (FEWER et al., 2008). Embora sua sequência seja degenerada, o par de iniciadores foi elaborado de forma a anelar em uma região específica para o gênero *Anabaena*, que flanqueia o domínio da expressão da enzima N-metiltransferase, e onde ocorreu a substituição de um nucleotídeo que pode não estar presente no genoma das linhagens de outros gêneros cianobacterianos. Os autores evidenciaram, através dos produtos amplificados por esses iniciadores, a deleção de parte dessa região em algumas linhagens do gênero *Anabaena*, porém, a produção de microcistina não foi comprometida. A enzima N-metiltransferase incorpora o radical metil na molécula da microcistina em formação, e a metilação ocorre em moléculas bioativas, desempenhando a função de protegê-las contra a atividade de proteases (FINKING; MARAHIEL, 2004). O par

de iniciadores *mcyH5KF* e *mcyH5KR*, que se anela na região codificadora de um transportador ABC em linhagens de *Microcystis* sp. (PEARSON et al., 2004), também não mostrou sucesso na amplificação do fragmento do gene *mcyH*. O produto obtido não corresponde à região correspondente ao gene.

As sequências de nucleotídeos dos fragmentos amplificados e sequenciados por Sanger de *mcyB* e *mcyC* da linhagem CENA161 não mostraram identidade entre si. Já as sequências nucleotídicas completas desses dois genes na linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339 mostraram identidade de 91 % em uma região de aproximadamente 1100 pb. Em comparação, Rouhiainen et al. (2004) obtiveram resultados com 96 % de identidade entre as sequências desses dois genes da linhagem *Anabaena* sp. 90, para um fragmento de 1617 pb, e 94,6 % de similaridade entre as duas sequências gênicas para a linhagem *Microcystis aeruginosa* UV027, o que sugere um evento de duplicação do fragmento do domínio de adenilação a partir do gene *mcyC* para o gene *mcyB*. Os iniciadores utilizados neste presente trabalho, com a linhagem *Fischerella* sp. CENA161, não contemplaram o domínio de adenilação do gene *mcyC*, e apenas os últimos nucleotídeos do fragmento de *mcyB* correspondem ao domínio de adenilação do gene, fazendo-se necessário o sequenciamento completo do agrupamento gênico para possibilitar uma análise mais rebuscada sobre a comparação entre os domínios desses dois genes.

Os eletroferogramas obtidos a partir do sequenciamento Sanger foram utilizados para buscar a sintenia no alinhamento das leituras obtidas do sequenciamento genômico da linhagem CENA161, e realizar a montagem do agrupamento gênico envolvido na biossíntese da microcistina. Dessa forma, todas as sequências obtidas por amplificação via reação em cadeia da polimerase passaram por controle rigoroso da qualidade dos nucleotídeos, cujo valor Phred foi igual ou superior a 20. A qualidade Phred está inversamente relacionada à probabilidade de erro de incorporação de nucleotídeo durante o sequenciamento (EWING; GREEN, 1998).

4.3 Análise de qualidade das leituras de sequenciamento genômico e da montagem das leituras

As leituras produzidas pelo sequenciamento MiSeq foram avaliadas quanto à qualidade Phred das bases incorporadas nas sequências, pelo programa FASTQC (Figura 11), bem como o percentual G:C médio entre o total de leituras. O processo de sequenciamento rendeu um número em 24.544.410 de leituras, com comprimento variando de 35 a 301 pb.

Todas as leituras com comprimento máximo de 200 pb apresentaram qualidade Phred acima de 30 (zona verde das figuras), tanto para a corrida R1 (gráfico à esquerda) quanto para a R2 (gráfico à direita), e a corrida R1 apresentou mais leituras longas (acima de 250 pb) com qualidade Phred acima de 20. O percentual G:C do produto do sequenciamento genômico foi encontrado em 47 %.

Figura 11 – Qualidade Phred das leituras produzidas pelo sequenciamento genômico MiSeq, comparadas ao seu comprimento, em pares de bases. Panorama à esquerda corresponde ao sequenciamento R1 e, à direita, ao R2.

A montagem do genoma, através das leituras obtidas a partir do sequenciamento e após seu devido tratamento, foi avaliada quanto à qualidade e os padrões do genoma. A linhagem *Fischerella* sp. CENA161 apresentou um comprimento estimado em 7,2 Mpb, percentual G:C de 40,27 %, e o arquivo está dividido em 429 sequências contíguas, valor N50 de 26.856, e o comprimento da maior sequência contígua correspondente a 169.047 pb. Tanto o tamanho estimado do genoma, quanto o percentual G:C mostrados, estão de acordo com os valores obtidos a partir do sequenciamento genômico das oito linhagens do mesmo gênero, disponíveis no *GenBank*.

4.4 Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas

4.4.1 Microcistina

O agrupamento gênico envolvido na biossíntese da microcistina foi localizado no genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161. O conjunto de genes apresenta todos os 10 genes relacionados à biossíntese descritos pela primeira vez para a linhagem *Microcystis*

aeruginosa PCC 7806 (TILLET et al., 2000) e posteriormente para a linhagem *Anabaena* sp. 90 (ROUHIAINEN et al., 2004): *mcyA*, *mcyB*, *mcyC*, *mcyD*, *mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, *mcyH*, *mcyI* e *mcyJ*. Os genes estão organizados em dois *operons*, totalizando um comprimento aproximado de 53 000 pb entre as duas extremidades flangeadoras do agrupamento. O *operon* menor apresenta, no sentido 5' → 3' os genes responsáveis pela expressão de NRPS - *mcyA*, *mcyB* e *mcyC* – e o gene *mcyJ*, envolvido no processo de acabamento da molécula. O *operon* maior apresenta os genes híbridos que codificam NRPS/PKS, *mcyE* e *mcyG*, e o gene codificante de PKS, *mcyD*. Esses três genes estão envolvidos na síntese do ADDA na molécula da microcistina. Ainda no *operon* maior, estão presentes o gene *mcyF* e o gene *mcyI*, envolvidos no acabamento da microcistina, e, finalmente, o gene *mcyH*, que é relacionado ao transportador ABC de exportação da toxina (Figura 12).

Os módulos e domínios de cada gene responsável pela adição de aminoácidos na molécula de microcistina em formação foram investigados para avaliar a integridade do complexo multienzimático. O primeiro gene do *operon* menor, *mcyA*, codifica uma sequência de 2787 aminoácidos e apresenta integralmente os dois módulos: o primeiro com os domínios de adenilação, metilação, proteína carreadora peptidil e condensação, e o segundo módulo apresenta os domínios de adenilação, proteína carreadora peptidil e epimerização. O primeiro módulo do gene desempenha a atividade de N-metiltransferase, catalisando a incorporação de um grupo metil-dehidroxialanina na posição 7 da microcistina, e o segundo módulo catalisa a incorporação de uma D-alanina na posição 1 da molécula (FEWER et al., 2008). Os genes *mcyB* e *mcyC* são responsáveis pela incorporação de aminoácidos nas posições 2 e 4 na molécula de microcistina, respectivamente, o que proporciona a variabilidade às variantes que já são descritas (FEWER et al., 2007). O sequenciamento genômico não cobriu toda a extensão desses genes, deixando lacunas correspondentes a 820 e 577 nucleotídeos, respectivamente, no domínio de adenilação de *mcyB* e *mcyC*. Foi reconhecido apenas o domínio de condensação do primeiro módulo do gene *mcyB* e os domínios de condensação, adenilação e proteína carreadora de peptidil do segundo módulo do gene, integralmente. Do gene *mcyC*, foram reconhecidos os domínios de condensação, proteína carreadora de peptidil e tioesterase do módulo único do da sequência. Iniciando o *operon* de maior comprimento, o gene híbrido *mcyG* apresenta as duas subunidades completas, com a região NRPS apresentando os domínios de adenilação e proteína carreadora de peptidil, e a região PKS com os domínios cetoacil sintase, aciltransferase, C-metiltransferase, cetorredutase e proteína carreadora de acila. Na sequência 5' → 3', o próximo gene, *mcyD*, é o mais extenso do

agrupamento gênico, codificando uma sequência de 3872 aminoácidos, sendo reconhecidos, no primeiro módulo, apenas os domínios cetoacil sintase, desidratase, cetorredutase e proteína carreadora de acila. Os domínios aciltransferase e C-metiltransferase não foram anotados de forma adequada para o primeiro módulo. No segundo módulo desse gene, foram reconhecidos todos os domínios de catálise e modificações da unidade do ADDA. O gene *mcyE* foi anotado em sua sequência codificada de aminoácidos, e foram reconhecidos, na subunidade PKS, os domínios de cetoacil sintase e aciltransferase. Em substituição ao domínio C-metiltransferase, foi reconhecida uma proteína carreadora de peptidil, e os outros dois domínios não foram reconhecidos ou anotados adequadamente.

Figura 12 - Agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese da microcistina, descritos para os gêneros *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Fischerella*

A sintonia dos genes *mcy* mostra uma proximidade, em relação à ordem dos genes na linhagem *Fischerella* sp. CENA161, ao agrupamento presente no genoma da linhagem *Nostoc* sp. 152, que apresenta a mesma organização dos genes, em mesma sequência, situados nos

dois *operons*. A ordem em que os genes estão dispostos no genoma da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339 é diferente da linhagem desse estudo e, inclusive, apresenta o gene *mcyD* no mesmo sentido apresentado pelo agrupamento gênico da linhagem *Planktothrix aghardii* NIVA-CYA 126/8, e que difere do restante das linhagens. Ainda, o gene codificante de NRPS, *mcyB*, encontra-se deslocado dos genes *mcyA* e *mcyB* na linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339. Esse trio de sequências contíguas é claramente conservado no restante dos agrupamentos gênicos descritos. Por fim, essa última linhagem apresenta dois genes que não fazem parte do agrupamento de biossíntese de microcistina, correspondendo às sequências de *strB*, que codifica para um fator de resistência à estreptomicina (CHIOU; JONES, 1995), e *npnA*, gene envolvido na biossíntese de nostoficina (FEWER et al., 2011).

A linhagem *Nostoc* sp. 152 apresenta o gene *mcyL* em substituição ao gene *mcyJ* no seu agrupamento. Enquanto o gene *mcyJ* codifica a enzima o-metiltransferase, realizando uma ligação de metil à molécula do Adda (CHRISTIANSEN et al., 2003), ao gene *mcyL* foi inferida a atividade de o-acetilase, realizando a incorporação de um grupo acetil, em substituição ao metil, na hidroxila sobre a molécula do ADDA, produzindo análogos de microcistina – ADMAdda - na posição 5 da molécula. Dessa forma, linhagens desse gênero e simbióticas de líquens apresentam, em sua grande maioria, essa variante e, em menor proporção, com a metilação no Adda (OKSANEN et al., 2004; KAASALAINEN et al., 2012).

Todas as 10 sequências de aminoácidos do agrupamento gênico da linhagem CENA161 foram alinhadas e comparadas com sequências dos isolados produtores de microcistina, para os quais foi descrito o agrupamento gênico de biossíntese dessa toxina e que, portanto, apresentam o maior número de sequências completas de genes depositadas em banco de dados público, da ordem Nostocales (*Fischerella* sp. PCC 9339, *Anabaena* sp. 90 e *Nostoc* sp. 152), sequências de *Microcystis aeruginosa* SPC777 e *Planktothrix aghardii* NIVA-CYA 126/8, além das sequências dos genes codificadores da nodularina sintetase (*Nodularia spumigena* NSOR 10), cujas sequências traduzidas a aminoácidos mostraram similaridade com as sequências de microcistina sintetase (Tabela 3). As 10 sequências do complexo multienzimático Mcy para a linhagem *Fischerella* sp. CENA161 apresentaram a mais alta similaridade com as sequências da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339, o que é esperado de acordo com a relação e proximidade filogenética entre elas, por pertencerem ao mesmo gênero. Interessantemente, as sequências de aminoácidos codificadas pelos genes *mcyI* e *mcyJ* apresentaram alta similaridade com as sequências de aminoácidos transcritas a

partir dos genes envolvidos da biossíntese da nodularina, logo após a maior similaridade com sequências da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339.

Tabela 3 - Percentuais de similaridade entre sequências de aminoácidos das enzimas Mcy para a linhagem *Fischerella* sp CENA161 e outras linhagens com o agrupamento gênico já descrito

Linhagem	McyA	McyB	McyC	McyD	McyE	McyF	McyG	McyH	McyI	McyJ
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339	97	90	96	95	95	99	93	99	99	96
<i>Anabaena</i> sp. 90	82	86	82	79	78	79	81	82	80	82
<i>Nostoc</i> sp. 152	82	81	77	78	80	82	79	76	79	
<i>P.agardhii</i> NIVA-CYA 126/8	65			73	76		75	76		82
<i>M.aeruginosa</i> SPC777	67	69	76	70	74	79	70	73	72	81
<i>N. spumigena</i> NSOR10 (Nda)	53		78	76	79	81	78	81	86	85

A nodularina é uma outra hepatotoxina produzida por linhagens de *Nodularia spumigena* e também descrita para uma linhagem simbiótica de *Nostoc* sp. (MOFFITT; NEILAN, 2004; GEHRINGER et al., 2012). Todas as sequências de aminoácidos de Mcy da linhagem CENA161 apresentaram similaridade com as sequências de aminoácidos da nodularina sintetase, com exceção para as sequências de McyB. Rantala et al. (2004), investigando a história evolutiva dos genes envolvidos na biossíntese de microcistina e nodularina, juntamente a genes constitutivos e essenciais de linhagens potencialmente produtoras (16S rRNA e *rpo*), encontraram vestígios de que os genes envolvidos na biossíntese da nodularina (*nda*) seriam recentemente derivados daqueles que codificam para a produção de microcistina (*mcy*). Também, a molécula de nodularina tenha possivelmente derivado da microcistina, sofrendo alterações na sua estrutura, uma vez que a microcistina apresenta a incorporação de sete aminoácidos na sua composição, e a nodularina, apenas cinco, tendo perdido os aminoácidos D-Ala, incorporado na posição 1 da molécula de microcistina, e a substituição do resíduo de metil-dehidroxialanina (Mdha), por metil-dehidroxibutirato (Mdhb), na mesma posição, além de que o aminoácido da posição 2, que dá origem as diversas variantes da microcistina, foi eliminado durante o processo. Ainda, o agrupamento gênico de biossíntese da nodularina apresenta nove genes, em contraste com o agrupamento gênico da linhagem deste trabalho, que apresenta 10. No agrupamento gênico de biossíntese de nodularina, as sequências gênicas apresentam alta identidade com os genes

biossintéticos de microcistina, com exceção da *orf ndaB*, que apresenta homologia e alta identidade com o gene *mcyC*. (MOFFITT; NEILAN, 2004).

As análises filogenéticas realizadas com as sequências concatenadas de *Mcy* e *Nda* (Figura 13) vieram ao encontro dos valores de similaridade obtidos por alinhamento simples entre as sequências da *Fischerella* sp. CENA161 e as sequências das linhagens que apresentam o agrupamento gênico de biossíntese da microcistina e nodularina (Tabela 3). Porém, as sequências concatenadas de *Mcy* da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 não formaram clado com as sequências da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339, que seria esperado, o que traz à tona a necessidade de realização de mais sequenciamentos genômicos entre linhagens produtoras de microcistina, para oferecer melhor esclarecimento, elucidação e inferências filogenéticas que proporcionem a investigação da história evolutiva dos genes *mcy* e *nda* e a suposição de um ancestral comum produtor de microcistina. As outras linhagens produtoras de microcistina e nodularina, *Nostoc* sp. 152 e *Nodularia spumigena* NSOR10, também da ordem Nostocales, ficaram agrupadas em um clado, permanecendo a *Anabaena* sp. 90 em um clado externo a esse. Por fim, as linhagens *Planktothrix aghardii* NIVA-CYA 126/8 e *Microcystis aeruginosa* SPC777 formaram também um clado, com 100 % de reamostragem.

A linhagem *M. aeruginosa* SPC777 foi isolada de uma floração no reservatório Billings, São Paulo, Brasil, e o sequenciamento de seu genoma revelou a presença de genes envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas, além da microcistina (FIORE et al., 2013). Apesar das deficiências impostas pelo baixo número de linhagens avaliadas, a árvore filogenética obtida por inferência bayesiana sugere respaldo à teoria de que o agrupamento gênico da microcistina originou-se em um ancestral comum das cianobactérias produtoras de microcistina, o que reforça a sugestão da transferência vertical desses genes dentro dos gêneros de cianobactérias produtoras de microcistina (RANTALA et al., 2004). Ainda, há estudos que defendem que a distribuição esporádica atual dos genes de biossíntese de microcistina sugere que a capacidade de produção da toxina tem sido perdida a uma taxa maior do que a ocorrência dos mecanismos de transferência horizontal de genes entre as linhagens atuais de cianobactérias (KURMAYER et al., 2004; RANTALA et al., 2004).

Figura 13– Análise filogenética dos agrupamentos gênicos *mcy* e *nda* das linhagens potencialmente produtoras de microcistina e nodularina. Sequências de aminoácidos das enzimas Mcy e Nda foram concatenadas, e foi utilizada a inferência bayesiana. Valores de reamostragem por gerações acima de 50 % estão representados nos nós

As sequências de aminoácidos dos sítios ligantes no domínio de adenilação, transcritas a partir das sequências nucleotídicas completas do segundo módulo dos genes *mcyA*, *mcyB* e do gene *mcyE*, foram avaliadas (Tabela 4). As sequências mostraram alta conservação entre si, havendo predição de incorporação de ácido glutâmico pela atividade de adenilação de McyE, que catalisa a ligação de aminoácido na posição 6 da molécula, na síntese de microcistina para todas as linhagens, em uma probabilidade de 100 %. Também é predita para todas as linhagens amostradas a incorporação de alanina na posição 1 da microcistina, fazendo a ressalva de probabilidade de 90 % de incorporação para *Planktothrix agardhii* NIVA/CYA 126/8. Shishido et al. (2013) avaliaram a conservação da sequência de aminoácidos do domínio de adenilação dos genes *mcy*, e verificaram que a linhagem *Phormidium* sp. CENA270, isolada de um lago no nordeste brasileiro, produz microcistina e incorpora D-Leu em substituição à D-Ala na posição 1 da molécula de microcistina. A sequência do sítio catalítico do domínio de adenilação observada na ocasião foi DAWFLGNVVK, idêntica à sequência da linhagem *Nostoc* sp. UK89IIa, também avaliada no trabalho, e que incorpora o mesmo aminoácido na microcistina, e se diferenciando da sequência da *Fischerella* sp. CENA161 nos oito aminoácidos internos da sequência. A maioria das variantes de microcistinas relatadas pela literatura apresenta o resíduo D-ala na

posição 1 da molécula (SIVONEN et al., 1999), sendo a incorporação de aminoácidos alternativos um evento pouco comum.

Tabela 4 - Sequências do sítio ligante do domínio de adenilação mostradas para o módulo 2 das enzimas McyB e McyA, e para a enzima McyE

Linhagem\	McyB ₂	McyA ₂	McyE
Domínio de Adenilação			
<i>Fischerella</i> sp. CENA161	D A R H V G I F V K	D L F N N A L T Y K	D P R H S G V V G K
	tyr 60 %	ala 100 %	glu 100 %
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339	D A R H V G I F V K	D L F N N A L T Y K	D P R H S G V V G K
	tyr 60 %	ala 100 %	glu 100 %
<i>Anabaena</i> sp. 90	D A R H V G I F V K	D L F N N A L T Y K	D P R H S G V V G K
	tyr 60 %	ala 100 %	glu 100 %
<i>Nostoc</i> sp. 152	D A R H V G I F V K	D L F N N A L T Y K	D P R H S G V V G K
	tyr 60 %	ala 100 %	glu 100 %
<i>Planktothrix</i> <i>aghardii</i>	D A R H V G I F V K	D L F N N A L S Y K	D P R H S G V V G K
NIVA-CYA 126/8	glu 60 %	ala 90 %	glu 100 %
<i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i>	D A R H V G I F V K	D L F N N A L T Y K	D P R H S G V V G K
SPC777	tyr 60 %	ala 100 %	glu 100 %

A probabilidade de 60 % está para a predição de que as moléculas de microcistina produzidas recebam, na posição 3, a tirosina durante a sua produção, para as duas linhagens do gênero *Fischerella*, *Anabaena* sp. 90, *Nostoc* sp. 152 e para *Microcystis aeruginosa* SPC777. Para a linhagem *Planktothrix aghardii* NIVA-CYA 126/8, a predição é de que 60 % das moléculas produzidas recebam ácido glutâmico nessa posição. Essa incorporação é realizada pela atividade do segundo módulo de McyB. No presente trabalho, foi avaliado somente o domínio de adenilação transcrito a partir do segundo módulo do gene *mcyB*, visto que o primeiro módulo não foi coberto pelo sequenciamento genômico. Os eventos de recombinação no domínio de adenilação do primeiro módulo de McyB estão relacionados a uma alta diversidade de aminoácidos que podem ser incorporados na posição 2 da molécula de microcistina (FEWER et al., 2007; MIKALSEN et al., 2003; CHRISTIANSEN et al., 2008; JIANG et al., 2013). O nível de conservação da estrutura terciária do domínio de adenilação possibilita a predição de atividade do sítio ligante de aminoácido e, por conseguinte, a especificidade pelo substrato. Na maioria dos casos, os oito aminoácidos internos da sequência de 10 aminoácidos do domínio de adenilação são responsáveis pela determinação do aminoácido que será incorporado na molécula da microcistina em síntese (STACHELHAUS et al., 1999; CHALLIS; RAVEL; TOWNSEND, 2000).

O servidor “Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell” é apresentado em uma plataforma para exploração e mineração de genomas, que realiza a busca por sequências, no genoma de estudo, com identidade com sequências relacionadas à biossíntese de metabólitos secundários e substâncias bioativas presentes nos genomas depositados em bancos de dados públicos (WEBER et al., 2015). A análise do genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 contribuiu com a identificação de 27 potenciais agrupamentos envolvidos na biossíntese de substâncias bioativas de diferentes grupos químicos, o que permitiu encontrar sequências nucleotídicas que apresentaram identidades com outras sequências públicas envolvidas na biossíntese de NRPS, NRPS-t1PKS, PKS tipo 1, bacteriocinas, microviridina e terpeno (Figura 14). Foram reconhecidos os agrupamentos gênicos de biossíntese da microcistina, com homologia de 76 % das sequências recuperadas durante a anotação; o agrupamento gênico envolvido na biossíntese de ambiguina, com 95 % de genes alinhados apresentando homologia; e parte do agrupamento gênico de biossíntese de nostopeptolida, com 100 % de genes comparados durante as anotações apresentando homologia. Os outros resultados da anotação automática corresponderam a percentuais de genes homólogos de até 53 % em cada conjunto de sequências contíguas avaliadas.

A curadoria manual dos outros agrupamentos gênicos candidatos revelou sequências com identidade com sequências anotadas como “proteína hipotética”, “NRPS/PKS” e “genoma completo” no GenBank do NCBI. Interessantemente, a predição da estrutura química da molécula da microcistina, identificada através das sequências anotadas a partir do agrupamento gênico presente no genoma da linhagem CENA161, mostrou uma estrutura de cadeia linear, ao contrário da sua estrutura cíclica característica da toxina. Isso pode ter ocorrido em decorrência da anotação incompleta ou inadequada do gene responsável pela ciclização da molécula, *mcyC*. De fato, o sequenciamento genômico não forneceu cobertura de leituras em toda a extensão desse gene, fazendo ocorrer formação de lacunas (*gaps*) a serem preenchidas futuramente.

Cluster	Type	From	To	Most similar known cluster	MIBiG BGC-ID
The following clusters are from record c00001_NODE_72.. (original name was: NODE_72_length_169047_cov_31.8363_ID_343..):					
Cluster 1	Bacteriocin	45695	55934	-	-
Cluster 2	Nrps	59904	132202	Nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster (85% of genes show homology)	BGC0000397_c1
The following clusters are from record c00002_NODE_11.. (original name was: NODE_114_length_119903_cov_29.9546_ID_227..):					
Cluster 3	Microviridin	1	15757	Microviridin K biosynthetic gene cluster (37% of genes show homology)	BGC0000594_c1
Cluster 4	Nrps-t1pks	94310	119603	Microcystin biosynthetic gene cluster (76% of genes show homology)	BGC0001016_c1
The following clusters are from record c00006_NODE_18.. (original name was: NODE_187_length_69923_cov_50.1976_ID_373..):					
Cluster 5	Nrps-t1pks	1	30669	Nostopeptolide biosynthetic gene cluster (50% of genes show homology)	BGC0001028_c1
Cluster 6	Nrps-t1pks	20240	69923	Nostopeptolide biosynthetic gene cluster (50% of genes show homology)	BGC0001028_c1

Figura 14- Resultado da predição de genes / agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários presentes no genoma da linhagem CENA161

4.4.2 Ambiguína

A ambiguína é uma substância bioativa produzida pela via ribossomal, ou seja, sua síntese se inicia a partir de um aminoácido, e cada sequência de quadro de leitura aberto codifica uma enzima que desempenha independentemente uma função específica na molécula que está sendo sintetizada. Assim, a ambiguína é um alcaloide do grupo hapalindol, que é um alcaloide indol tetracíclico contendo um grupo isonitrila e um grupo clorina sintetizados a partir de precursores derivados do triptofano e geranil pirofosfato. Foi isolada pela primeira vez no gênero *Fischerella* (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984; SMITKA et al., 1992). O genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 apresenta o agrupamento gênico envolvido na biossíntese da ambiguína, tendo sido identificados 25 genes, do total de 32 genes, de acordo com a montagem que foi realizada pela abordagem metodológica deste trabalho.

O agrupamento gênico de biossíntese de ambiguína apresenta os genes que desempenham papel na biossíntese de hapalindol e, posteriormente, na finalização da molécula de ambiguína, sendo os principais envolvidos na biossíntese os genes *ambD1-D4*, com atividade de síntese de dimetilalil difosfato (DMAPP), *ambT1-T5*, com papel na síntese de triptofano, *ambO1-O5*, que desempenham atividade de oxigenase, *ambI1-I3* com papel na síntese de isonitrila e, por fim, os genes *ambP1-P3*, que desempenham função de prenil transferase (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014). No genoma da linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903, os genes *ambT*, *ambI*, *ambU* e *ambE* estão organizados de forma sequencial, enquanto que na linhagem *Fischerella* sp. CENA161 essa disposição sequencial é verificada somente

para os genes *ambE*. Esse gene está envolvido na expressão das três enzimas responsáveis pela atividade das bombas de efluxo, que promovem a extrusão de metabólitos para o meio extracelular. Os genes *ambD1-D4* estão dispostos de forma muito semelhante ao agrupamento da linhagem UTEX 1903, bem como os genes *ambO*. Desses, os genes *ambO1* e *ambO2* não foram contemplados pela montagem do genoma. Os genes essenciais *ambT1*, *ambT2* e *ambT3*, envolvidos na biossíntese de triptofano, situam-se mais próximos à região reguladora (*ambR1-R2*) na linhagem CENA161, mas os genes *ambT4* e *ambT5* não foram alcançados pelo sequenciamento, podendo estar localizados à região flangeadora, à montante no agrupamento, após o gene *ambD3*. Os genes *ambU1* e *ambU2* não foram cobertos igualmente, embora os genes *ambU1* e *ambU4* estejam sendo flanqueados, respectivamente, pelos genes *ambO3* e *ambO4*, como dispostos na linhagem UTEX 1903. Os genes *ambC2* e *ambC3*, que codificam enzimas *core*, não foram contemplados pelo sequenciamento, provavelmente localizados após o gene *ambD3* (Figura 15). Por fim e mais importante, os três genes envolvidos na biossíntese da enzima prenil transferase, *ambP1-ambP3*, estão todos presentes no agrupamento obtido pela montagem genômica da linhagem CENA161, em disposição sequencial similar à apresentada pela linhagem UTEX 1903. Adicionalmente, o genoma da CENA161 apresenta quatro sequências curtas (em cinza) que variam de 75 a 258 pb e apresentam alta identidade com agrupamentos gênicos de biossíntese dos hapalindoís, porém, sem predição de funcionalidade. O agrupamento gênico incompleto da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 está atualmente flanqueado por uma sequência de 2862 pb, após o gene *ambE3*, que codifica uma enzima ATPase transportadora de cátion, com identidade de 96 % com o genoma de uma linhagem da espécie *F. muscicola*. A outra extremidade do agrupamento, que termina após o gene *ambD3*, corresponde ao limite das sequências contíguas do genoma.

Figura 15– Agrupamento gênico envolvido na biossíntese de ambiguaína para: *Fischerella* sp. UTEX 1903 e *Fischerella* sp. CENA161

A curadoria e anotação manual foram realizadas utilizando como referência a identificação dos genes reguladores (R1 e R2), que se encontram ao centro do agrupamento e facilmente detectáveis por serem transcritos em sentidos opostos um em relação ao outro. Ainda, através da anotação manual, foi observado que a maioria dos genes codificam sequências de aminoácidos com maior valor de similaridade em suas sequências com os produtos gênicos relacionados à biossíntese de ambiguaína, proposto para a linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903 e, com o segundo valor de escore máximo de alinhamentos, a similaridade corresponde a sequências de aminoácidos das enzimas do agrupamento gênico envolvido na biossíntese de hapalindol para a linhagem *Fischerella* sp. ATCC 43239 (BECHER et al., 2007). A similaridade permaneceu alta para outras sequências de enzimas envolvidas em biossíntese de outros indóis do grupo hapalindol (Tabela 5), com similaridade acima de 92 % entre as sequências da linhagem CENA161 e as sequências das linhagens produtoras de hapalindol (*Fischerella* sp. PCC 9339) e welwitindolinona (*Fischerella muscicola* SAG 1427-1, *Fischerella* sp. PCC 9431, *Hapalosiphon welwitschii* IC-52-3 e *Westiella intricata* HT-29-1).

O agrupamento gênico de biossíntese de ambiguaína foi finalmente proposto de forma putativa por Hillwig, Zhu e Liu (2014), após 30 anos de início de investigações químicas com o grupo das biomoléculas do grupo hapalindol (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984), resultado de um esforço que uniu análises de sequenciamento genômico, análises químicas dos precursores biossintéticos produzidos pela atividade das enzimas prenil transferase e isonitrila sintase, e utilizando também sequências de genes que codificam enzimas homólogas para outras bactérias, fazendo uso de ferramentas de bioinformática para conduzir a anotação gênica. Essa estratégia permitiu a anotação funcional de 28 genes, baseada em homologia com outros genes presentes em outros grupos de bactérias, e que podem ser categorizados nos oito grupos, de acordo com a sua função sobre a biossíntese da ambiguaína.

Tabela 5 - Percentuais de similaridade entre sequências de aminoácidos das enzimas Amb do agrupamento gênico da linhagem *Fischerella* sp CENA161 alinhadas com as sequências das outras linhagens produtoras de hapalindois

Linhagem/Seq. aa	AmbD1	AmbD2	AmbD3	AmbT1	AmbT2	AmbT3	AmbP1	AmbP3
<i>Fischerella</i> sp. UTEX 1903	98	98	99	65	99	98	59	100
<i>Fischerella</i> sp. ATCC 43239	99	99	99	98	99	99	98	
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339	98	98	99	98	98	99	98	59*
<i>F. muscicola</i> SAG 1427-1	96	97	99	89	95	92	96	
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9431	96	97	99	93	96	97	96	
<i>Hapalosiphon welwitschii</i> IC-52-3	96	97	99	93	96	96	96	
<i>Westiella intricata</i> HT-29-1	96	97	99	65	97	96	97	59*

*similaridade às sequências de aminoácidos transcritas a partir da *orf-2*

Foi consolidado que moléculas do grupo hapalindol compartilham uma unidade de indol e uma de isonitrila, que são conectados por uma ligação C-C, entre os carbonos 10 e 11 da molécula de hapalindol, onde também é anexada uma unidade de monoterpreno. As ambiguinas são moléculas do grupo hapalindol que sofrem modificação pela incorporação de grupo terc-prenil no carbono 2 do anel indol, sugerindo que a enzima indol prenil transferase é necessária nessa etapa de montagem (BONITZ et al., 2011). A investigação elucidou que a presença de grande configuração de genes voltados para a síntese de triptofano e isoprenoide é consistente com a origem estrutural das ambiguinas, assim como os alcaloides indol terpenoides, no caso da biossíntese por outros grupos de bactérias, que requerem L-Trp, DMAPP, e IPP para sua montagem do esqueleto da molécula. Fazendo alusão aos genes *ambO*, com atividade de oxigenase, foi comprovado que o gene *ambO5* codifica uma enzima com atividade de uma halogenase que faz a mediação da transformação de uma molécula precursora de ambiguina e/ou hapalindol não clorado a uma clorada por estereoseletividade, através de uma ligação C-Cl no carbono 13 da molécula em síntese. Essa

descoberta vai ao encontro com a observação, por análises químicas, de que muitas moléculas de ambiguina são isoladas como clorinadas e não clorinadas, o que sugere que moléculas de ambiguina não clorinadas são provavelmente um intermediário a ser montado em um estágio posterior da biossíntese. Ainda sobre os genes essenciais envolvidos na biossíntese, o gene *ambP2* é um candidato à atividade de geranyl pirofosfato sintase, que fornece um monoterpreno para a molécula de ambiguina. Os genes *ambP1* e *ambP2* são homólogos às prenil transferases de moléculas aromáticas produzidas por outras bactérias, que podem transferir grupos isoprenoides aos carbonos das posições 5 ou 10 do anel aromático da molécula em síntese (BONITZ et al., 2011), tornando-se imprescindível para converter a variante hapalindol U ou G, juntamente com um grupo tert-prenil do DMAPP, para gerar a variante ambiguina H ou A, parada crucial na biossíntese da ambiguina. Essa conclusão foi gerada pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão, após purificar moléculas da variante hapalindol G, DMAPP, avaliando juntamente a expressão do gene *ambP3*, observando a geração de uma nova molécula cujo tempo de aquisição foi exatamente o mesmo da variante ambiguina A. Paralelamente, foi verificado que o gene *ambP1* não mostrou o mesmo efeito. Assim, o gene *ambP3* participa essencialmente na conversão de hapalindol em ambiguina. A sequência de aminoácidos da enzima AmbP3 da linhagem CENA161, alvo de estudos do presente trabalho, apresentou 100 % de similaridade com a mesma enzima presente no agrupamento da linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903. Por outro lado, a sequência de aminoácidos da enzima AmbP3 também apresentou uma similaridade de 59 % com as sequências de aminoácidos transcritas pela *orf-2* para as linhagens *Fischerella* sp. PCC 9339 e *Westiella intricata* HT-29-1, para as sequências gênicas envolvidas na biossíntese de hapalindol e westielindolinona, respectivamente.

O agrupamento gênico de biossíntese de ambiguina (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014) passou por nova avaliação após novo sequenciamento, em que foram anotadas novas *orfs* que flanqueiam os genes *amb* - *ambO6*, *orf-4*, *orf-5* e *ambO7* - à jusante, após o gene *ambE3*, e *orf-1*, *s1* e *s2*, à montante, após o gene *ambC3* (MICALLEF et al., 2014). Ao gene *ambO6* foi atribuída a atividade de alcanossulfato mono-oxigenase, e é homólogo ao gene *hpiO6* no agrupamento gênico de biossíntese de hapalindol na linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339. O gene *ambO7* codifica a enzima oxidoredutase e atividade de dissulfito nucleotídeo piridina dependente de FAD, e não apresenta homologia com outras sequências. Foi constatado que o gene *ambP1*, bem como os genes envolvidos no processo regulatório, na síntese de DMAPP, triptofano e isolitrila, estão localizados nos agrupamentos gênicos de biossíntese de

hapalindol, ambiguina e welwitindolinona, sendo, portanto, sequências conservadas, e os genes *ambP2* e *ambP3* são encontrados somente nos agrupamentos gênicos de biossíntese de hapalindol e ambiguina. Por fim, o gene *ambP3* foi confirmado estar presente somente no agrupamento gênico de biossíntese da ambiguina, confirmando seu papel chave na conversão de hapalindol a ambiguina (MICALLEF et al., 2014), estando presentes, agora, nos genomas das linhagens *Fischerella* sp. UTEX 1903 e *Fischerella* sp. CENA161. O segundo estudo comparativo dos genomas permitiu a observação da sintenia entre os genes envolvidos na rota bioquímica dos alcaloides hapalindol, verificando também quais são as sequências conservadas entre todas as linhagens estudadas. A linhagem *Fischerella* sp. CENA161, alvo do presente trabalho, parece apresentar uma diferença na sintenia desses genes, o que contribuirá para os estudos de comparação de genomas de linhagens produtoras de substâncias bioativas.

A sequência codificante da subunidade 16S do ribossomo da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 foi sequenciada e comparada com a sequência de linhagens cianobacterianas produtoras e não produtoras de substâncias bioativas, quanto à identidade dos nucleotídeos (Figura 16). O gene ribossomal é um dos parâmetros mais adequados para ser utilizado como ferramenta para a realização de inferências filogenéticas e taxonomia bacteriana, uma vez que está presente em todas as bactérias, compõe uma molécula relativamente estável, apresenta um comprimento em sequência de nucleotídeos adequado, em termos estatísticos, e a taxa de mutações em sua sequência de nucleotídeos é baixa, em relação a outros genes, acompanhando as mudanças evolutivas dos organismos de forma coerente. Isso faz desse gene um bom marcador evolutivo (WOESE, 1987; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; ZHANG et al., 2014).

A linhagem deste estudo ficou agrupada em um clado com 99 % de reamostragem com as linhagens *Fischerella* sp. PCC 9339 e *Fischerella* sp. UTEX 1903. A linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339 é também potencial produtora de microcistina e de hapalindol (SHIH et al., 2013; MICALLEF et al., 2014), cujas sequências de genes *mcy* mostraram alta identidade com as sequências da CENA161, e apresenta hábito bentônico igualmente. A linhagem *Fischerella* sp. UTEX 1903 é produtora de ambiguina, hapalindol e fishambiguina, e foi isolada de ambiente terrestre (MOORE; CHEUK; PATTERSON, 1984; SMITKA et al., 1992). A linhagem *Fischerella* sp. ATCC 43239, também produtora de hapalindol, ficou apresentada no clado anterior, com 57 % de reamostragem. A linhagem *Fischerella* sp. NQAIF311, isolada de água doce na Austrália, também é produtora de microcistina (CIRÉS et

al., 2014), mas não se encontra no mesmo clado das outras duas linhagens que apresentam o agrupamento gênico de biossíntese da microcistina - CENA161 e PCC 9339. Todas as seis linhagens do gênero, que foram agrupadas em um clado externo com 100 % de reamostragem, apresentaram identidade de 99 % entre as suas sequências nucleotídicas do gene ribossomal 16S rRNA. Curiosamente, dentre essas, as linhagens CENA161, PCC 9339, UTEX 1903 e ATCC 43239 apresentam o agrupamento gênico de biossíntese dos alcaloides ambigua e hapalindol, cuja sintenia gênica foi mais conservada em relação aos outros agrupamentos de biossíntese de welwitindolinona, descritos para as linhagens *Fischerella* sp. PCC 9431 *Hapalosiphon welwitschii* UH IC 52 3 e *Westiella intricata* UH HT 29 1 (MICALLEF et al., 2014), que ficaram agrupadas em um clado com 99 % de reamostragem, e a linhagem *Fischerella muscicola* SAG 1427-1, que é apresentada separadamente em outro clado.

Essa organização observada dos genes biossintéticos dos alcaloides do grupo hapalindol parece ser congruente, portanto, com a organização baseada na filogenia do gene do 16S rRNA para as linhagens produtoras dos alcaloides, com exceção do agrupamento gênico da linhagem desse trabalho, CENA161. Micallef et al. (2014) observaram que as linhagens produtoras de ambigua e hapalindol, e as linhagens produtoras de welwitindolinona, apresentam um alto nível de conservação da ordem das sequências gênicas de biossíntese em seus agrupamentos.

Figura 16 – Dendrograma realizado com as sequências do gene do 16S rRNA utilizando a inferência bayesiana. Valores de reamostragem de gerações acima de 50 % estão representados em cada nó. Linhagem em negrito é o objeto do presente trabalho. ○ Agrupamento de microcistina; △ Agrupamento de ambigua; ▲ Agrupamento de hapalindol; ● Agrupamento de nostopeptolida; ■ Agrupamento de welwitindolinona;

4.4.3 Nostopeptolida

Nostopeptolidas e nostociclopeptídeos são peptídeos cíclicos sintetizados a partir da via não ribossomal, que foram descritos primeiramente para as linhagens *Nostoc* sp. GSV224, isolada de solo na Índia, e *Nostoc* sp. ATCC 53789, isolada de líquen na Escócia (GOLAKOTI et al, 2000; 2001). Enquanto a nostopeptolida é constituída por nove resíduos de aminoácidos, sendo sete aminoácidos proteinogênicos e dois não proteinogênicos - L-4-metilprolina (mePro) e L-leucilacetato (LeuAc), a molécula de nostociclopeptídeo é sintetizada a partir de sete resíduos de aminoácidos, com um grupo E-imina ($R'R=N-R''$) ligado ao resíduo de L-tirosina, além do resíduo de L-4-metilprolina em comum com a molécula de nostopeptolida (GOLAKOTI et al., 2000; LUESCH et al., 2003). O agrupamento gênico envolvido na síntese deste PS/PKS foi proposto por Hoffmann et al. (2003) para a linhagem *Nostoc* sp. GSV224 através do preparo de biblioteca de cosmídeos, apresentando um comprimento de aproximadamente 40 kb e a participação de sete genes: *nosA*, *nosB*, *nosC*, *nosD*, *nosE*, *nosF* e *nosG*, e uma *orf5*, distribuídos em dois *operons*: o de maior comprimento, apresentando os genes *nosA-nosD* e, o *operon* menor, apresentando as sequências de *orf5*, *nosE*, *nosF* e *nosG*. Os genes *nosA-nosD* codificam enzimas PS/PKS na molécula de nostopeptolídeo em síntese. Os outros genes – *orf5*, *nosE-nosG* - codificam enzimas relacionadas à biossíntese dos aminoácidos mePro e à atividade de efluxo. Sendo assim, o complexo nostopeptolida sintetase é constituído de quatro enzimas modulares: NodA, que apresenta quatro módulos, NodC, que apresenta três módulos, e NosD, que apresenta dois módulos, apresentam função de NRPS; e a enzima NosB, que apresenta apenas um módulo e é uma PKS tipo 1. Os módulos das enzimas NosA, NosC e NosD apresentam a série de domínios relacionados à atividade de adenilação, condensação e proteína carreadora de peptidil. O segundo módulo da enzima NosD apresenta adicionalmente o domínio tioesterase, com atividade de liberar a estrutura linear da molécula em formação e catalisar sua ciclização. A enzima NosB apresenta os domínios de cetoacil-ACP sintase, acil transferase e proteína carreadora de acil, o que sugere atividade de incorporação de acil-CoA na extensão da molécula. A enzima NosE mostra alta similaridade com as enzimas álcool desidrogenase ligantes de zinco. A enzima NosF mostra homologia com enzimas de atividade de redução sobre o aminoácido mePro, catalisando a reação terminal na biossíntese de prolina. A enzima NosG é homóloga a transportadores ABC, apresentando alta similaridade com a enzima

McyH, envolvida no transporte de microcistina para o exterior da célula. Assim, essa enzima provavelmente é responsável pelo efluxo de nostopeptolida para o meio extracelular (HOFFMANN et al., 2003).

Cinco sequências gênicas com alta identidade de nucleotídeos com o agrupamento gênico de biossíntese de nostopeptolida foram anotadas no genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161, através do alinhamento contra sequências disponíveis em banco de dados público. O agrupamento gênico de biossíntese de nostopeptolida na linhagem *Nostoc* sp. GSV224 apresenta sete genes envolvidos (*nosA-nosG*) e mais uma *orf5*, a linhagem CENA161 apresenta, em sentido 5' → 3', cinco sequências codificadoras: *nosD* e *nosA*, envolvidos na síntese de PS, acabamento e ciclização da molécula; uma sequência codificadora de proteína hipotética (conforme anotação realizada em genoma de *Fischerella* sp. PCC 9339), que apresenta identidade com a sequência de *orf5*, mas com função desconhecida; *nosE*, *nosF* e *nosG*, com confirmação de alta identidade com os genes relacionados à biossíntese da L-4-metilprolina e transporte extracelular, respectivamente (Figura 17).

Figura 17– Agrupamento gênico envolvido na biossíntese de nostopeptolida para as linhagens *Nostoc* sp. GSV224 e *Fischerella* sp. CENA161. Genes em cor cinza correspondem a NRPS

As sequências de aminoácidos mostraram a mais alta similaridade com as sequências da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339 (Tabela 6), que possivelmente apresenta um agrupamento gênico relacionado à biossíntese de peptídeos não ribossomais ainda não anotado. A sequência de NosD da linhagem CENA161 apresenta similaridade (53 %) com sequência do domínio de adenilação de NRPS para a linhagem *Nostoc punctiforme* PCC

73102, e 57 % de similaridade com sequências de NpnB e NpnC da linhagem *Nostoc* sp. 152, enzimas essas envolvidas na biossíntese de nostoficina.

Embora as sequências de aminoácidos tenham apresentado a mais alta similaridade com sequências codificantes de enzimas biossintéticas de nostociclopeptídeo (Ncp) para dois dos seis genes anotados após a montagem das leituras do genoma (NosA e NosG), a sintenia gênica para a linhagem CENA161 está parcialmente de acordo com a do agrupamento gênico de nostopeptolida; os genes *orf5*, *nosE*, *nosF* e *nosG* estão organizados de forma idêntica, e os seis genes localizados, codificando no mesmo sentido (Figura 15). A análise da sequência do domínio de adenilação do primeiro módulo de NosD verificou uma sequência idêntica dos aminoácidos conservados em relação à sequência de NosD para a linhagem *Nostoc* sp. GSV224 (Tabela 7), o que permite inferir a essa sequência a atividade enzimática de incorporação de um resíduo de tirosina à molécula de nostopeptolida em formação. Ainda, a sequência de aminoácidos do domínio de adenilação do módulo 3 da enzima NodA mostra a predição de incorporação de metilprolina na montagem da molécula, que vem a ser o aminoácido não proteinogênico precursor da estrutura da nostopeptolida. Durante a biossíntese dos peptídeos cíclicos, a redução de MeP5C a metilprolina é facilitada pela enzima MeP5C redutase, codificada pelo gene *nepE*, cuja sequência nucleotídica é 92 % idêntica à de *nosF* (LUESCH et al., 2003). Embora a metilprolina seja comum em ambas as moléculas – nostopeptolida e nostociclopeptídeo – sua conversão é catalisada pela enzima NosF para a linhagem *Nostoc* sp. GSV224, na produção de nostopeptolida (HOFFMANN et al., 2003), e pela enzima NcpE para *Nostoc* sp. ATCC 53789, na produção de nostociclopeptídeo (BECKER; MOORE; MOORE, 2004). A sequência de aminoácidos localizada no genoma da CENA161 revelou homologia com a família dessas enzimas redutoras, apresentando maior similaridade com a enzima NosF (89 %) em relação à enzima NcpE (85 %). Stocking et al. (2001) comprovaram que a L-4-metilprolina é derivada do aminoácido Leu através da rota relacionada à conversão da isoleucina à 3-metilprolina. Posteriormente, Luesch et al. (2003) comprovaram, por técnica de clonagem, que os genes *nosE* e *nosF* codificam as enzimas desidrogenase de cadeia longa dependente de zinco e a delta¹-pirrolina-5- ácido carboxílico, que foram expressas em *Escherichia coli*, mostrando, portanto, estar envolvidas nas duas etapas finais da biossíntese da L-4-metilprolina.

Tabela 6 - Percentuais de similaridade entre sequências de aminoácidos das enzimas Nos do agrupamento gênico da linhagem *Fischerella* sp CENA161 alinhadas com as sequências das outras linhagens produtoras de PS/PKS

Linhagem/Sequência aa	NosA	NosD*	NosE	NosF	NosG	Proteína hipotética
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9339 (nostopeptolida)	98	95	99	99	98	99
<i>Nostoc</i> sp. ATCC 53789 (nostociclopeptídeo)	74		94	85	81	87
<i>Nostoc</i> sp. “Peltigera membranaceae cyanobiont”	68		93	88	74	86
<i>Nostoc</i> sp. GSV224 (nostopeptolida)	68		94	89	73	87

*Sequência de NosD apresenta percentual de similaridade com *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (53 %) e *Nostoc* sp.152 (Npn) (57 %)

Tabela 7 – Análise de sequências do domínio de adenilação para as enzimas NosA e NosE e as predições dos substratos de ligação

Domínio/Sequência	<i>Fischerella</i> sp. CENA161	<i>Nostoc</i> sp. GSV224
NosA – domínio 1	D V W H I S L I (Ser)	D A F F L G V T (Ile/Leu/Val)
NosA – domínio 2	D A F W L G G T (Val)	D V W H I S L I (Ser)
NosA – domínio 3	D V Q F I S H L (mePro)	D V Q F I A H I (Pro) *mePro
NosA – domínio 4	D A S T I A A V (Tyr)	D A W F L G N V (Leu)
NosD – domínio 1	D A S T I A A V (Tyr)	D A S T I A A V (Tyr/Phe)
NosD – domínio 2	D L K C F G X X	D V Q F I A H V (Pro)

*mePro foi o substrato ativado pelo domínio 3 NosA na biossíntese de nostopeptolida A1 e A2 (estrutura secundária)

A análise do sentido das sequências codificadoras envolvidas na biossíntese de nostopeptolida para a linhagem *Fischerella* sp. CENA161 não apresentou a mesma organização em relação à linhagem *Nostoc* sp. GSV224. O atual agrupamento gênico para a linhagem de estudo está incompleto, e os genes envolvidos na síntese de PS estão dispostos em ordem diferente na linhagem de estudo, sugerindo a necessidade de mais investigações e explorações com outras linhagens que potencialmente possam apresentar o agrupamento gênico de biossíntese da nostopeptolida, para fins comparativos de sentença e filogenia entre as linhagens produtoras. Visto que as duas linhagens em comparação pertencem a gêneros

diferentes, não seria incomum apresentarem diferença de sintonia em seus agrupamentos de genes.

Os agrupamentos gênicos de biossíntese de substâncias bioativas encontrados no genoma da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 mostram promessa na prospecção de novas variantes de moléculas, e até mesmo de novas moléculas, visto que foram encontrados, além de genes relacionados à produção de microcistina, ambiguina e hapalindol, sequências com identidades com genes codificadores de NRPS/PKS ainda não anotados em bancos de dados públicos, além de outras classes de substâncias. É crucial o aumento no número de sequenciamentos genômicos de cianobactérias a fim de facilitar a busca por agrupamentos gênicos de substâncias bioativas promissoras, promovendo a busca especialmente por novas classes de antimicrobianos e moléculas terapêuticas, já que a incidência de micro-organismos ambientais e de importância clínica multirresistentes está em ascensão. Cerca de 5 % do genoma de linhagens produtoras de substâncias bioativas são voltados para a síntese de rotas metabólicas secundárias, na maioria peptídeo sintetases e policetídeo sintases (SHIH et al., 2013; CALTEAU et al., 2014). Em termos filogenéticos, embora seja reconhecida a existência de homologia entre as sequências gênicas envolvidas na síntese de algumas substâncias bioativas, podendo ser encontradas entre os diferentes filos do domínio Bacteria, a origem biossintética de muitas substâncias bioativas ainda permanece desconhecida (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014; WANG et al., 2014; CALTEAU et al., 2014).

4.5 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados a partir do extrato intracelular da linhagem de estudo em condições não axênicas e axênicas. Em ambas as condições, foi observada a bioatividade contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e também contra levedura (Figuras 18 – 21).

Figura 18- Bioensaios realizados com o extrato bruto intracelular da linhagem CENA161 não axênica. Disco de nistatina (N) – controle positivo

Figura 19- Bioensaios realizados com a fração polar- MeOH (à esquerda nas placas) e apolar - DCM (à direita nas placas) separadas do extrato intracelular da linhagem CENA161 não axênica. Disco de nistatina (N) – controle positivo. A- *Staphylococcus aureus*; B- *Salmonella typhimurium*; C- *Candida albicans*

Figura 20 - Bioensaios realizados com o extrato bruto intracelular da linhagem CENA161 axênica. A- *Salmonella typhimurium*; B- *Bacillus cereus*; C- *Staphylococcus aureus*; D- *Candida albicans*

Figura 21 - Bioensaios realizados com a fração polar (à direita nas placas) e apolar (à esquerda nas placas) separadas do extrato intracelular da linhagem CENA161 axênica. A- *Staphylococcus aureus*; B- *Candida albicans*

O maior halo de inibição correspondeu à resposta dos extratos contra *Staphylococcus aureus*, com diâmetro de 24 mm, com bioatividade a partir do extrato intracelular da linhagem *Fischerella* sp. CENA161 axênica. Ainda, os isolados *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans* apresentaram halos de 21 mm e 20 mm, respectivamente, para as condições axênicas da CENA161. (Tabela 8).

Tabela 8 – Comprimento dos halos de inibição, em milímetros, obtidos após os bioensaios realizados com o extrato bruto intracelular da linhagem *Fischerella* sp. CENA161. Experimento realizado em condições não axênicas e axênicas

Halo(mm) /Cepa	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>X. campestris</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>C. albicans</i>
CENA161	17	11	15	17	11	16
não axênica						
CENA161	24	14	21	---	---	20
axênica						
--- não testado						

Tabela 9 – Comprimento dos halos de inibição, em milímetros, obtidos após os bioensaios realizados com as frações apolares e polares do extrato intracelular da linhagem *Fischerella* sp. CENA161. Experimento realizado em condições não axênicas e axênicas

Halo (mm) /Cepa	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
CENA161	16	14	15
Fração apolar (DCM)			
CENA161	18	17	12
Fração polar (MeOH + H ₂ O)			
CENA161 axênica	20	---	15
Fração apolar (DCM)			
CENA161 axênica	15	---	8
Fração polar (MeOH + H ₂ O)			
--- não testado			

A técnica de difusão de disco em Agar (BAUER et al., 1996) é amplamente utilizada para a avaliação da atividade de substâncias bioativas por meio da inibição do crescimento de linhagens alvo em superfície de meio de cultura sólido, evidenciado pela formação de halo de inibição. Os resultados obtidos dos bioensaios realizados com a linhagem *Fischerella* sp. CENA161 mostraram atividade de amplo espectro contra bactéria e também contra levedura, tanto em condições axênicas como não axênicas de cultivo da linhagem CENA161. Raveh e Carmeli (2007) também obtiveram atividade simultânea contra bactéria e fungo a partir do extrato polar da linhagem *Fischerella* sp. IL-199-3-1, isolada de solo, que comprovou posteriormente tratar-se das variantes ambigua H e ambigua I. No presente trabalho, foi verificado que as frações apolar (DCM) e polar (MeOH + H₂O) apresentam bioatividade

contra bactéria e levedura (Tabela 9), com o comprimento dos halos variando de 8 mm, para a fração polar do extrato de células axênicas, a 20 mm, para a fração apolar de células axênicas.

4.6 Análises químicas – microcistina

A técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi utilizada para a avaliação química da presença e variantes de microcistinas produzidas pela linhagem CENA161. A amostra liofilizada de células (60 mg) foi utilizada para a extração de compostos e análise por experimento de varredura em cromatógrafo acoplado a espectrometria de massas de triplo quadrupolo. O triplo quadrupolo é composto de três quadrupolos dispostos em série linear, o que permite a análise de fragmentos de íons precursores, permitindo a passagem somente de íons com massa/carga específica, seguindo com sua fragmentação e posterior detecção dos fragmentos obtidos, o que permite uma técnica analítica com alta sensibilidade e especificidade para a detecção de variantes de microcistina (NEFFLING; SPOOF; MERILUOTO, 2009). Para a execução das análises, realizou-se somente a detecção e composição de microcistinas intracelulares. Foi realizada a varredura de íons precursores para o fragmento de m/z 135. Este íon é característico da cadeia lateral do Adda, ou seja, é uma via de varredura para microcistinas. A amostra da linhagem *Microcystis aeruginosa* LTPNA08 foi utilizada como controle positivo para produção de microcistina (Figuras 22 - 25).

Figura 22 - Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 para padrões analíticos de MC-LYR, LR e LA. (A) Varredura entre m/z 450-900, região onde aparecem íons duplamente carregados $(M+2H)^{2+}$; (B) Varredura entre m/z 800-1250, região onde aparecem íons protonados $(M+H)^+$. A fração em 13 min no painel B não corresponde a uma microcistina

Figura 23- Espectros de massas (íons precursoros) correspondentes às frações cromatográficas identificados no painel B da Figura 20. (A) MC-YR, m/z 1045 ($M+H$)⁺; (B) MC-LR, m/z 995 ($M+H$)⁺; (C) MC-LA, m/z 910 ($M+H$)⁺ e 927 ($M+NH_4$)⁺

Figura 24- Cromatograma de varredura de íons precursoros de m/z 135 para amostra *M. aeruginosa* LTPNA08, sabidamente produtora de MC-RR e MC-LR. (A) Varredura entre m/z 450-900, região onde aparecem íons duplamente carregados ($M+2H$)²⁺; (B) Varredura entre m/z 800-1250, região onde aparecem íons protonados ($M+H$)⁺

Figura 25- Espectros de massas (íons precursoros) correspondentes às frações cromatográficas identificadas. (A) MC-RR, m/z 519,8 ($M+2H$)²⁺; (B) MC-LR, m/z 995 ($M+H$)⁺

A amostra foi analisada em equipamento *ion trap* para aquisição de espectros de fragmentação, na tentativa de identificar as variantes. As frações correspondentes à fragmentação do íon precursor da microcistina (m/z 135) foram obtidas pela varredura dos íons do intervalo 800-1250 m/z , com obtenção de íons protonados, correspondentes às variantes de microcistina, no intervalo de tempo de aquisição de 7 a 14 minutos, para as condições de passagem de gradiente de 35 a 100 % de acetonitrila, no intervalo de tempo de 0 a 16 minutos (Figuras 26 e 27). Foram encontradas sete variantes de microcistina: MC-LR, MC-LL MC-FR, MC-LA, MC-LM, MC-LAba e [D-Asp³]MC-LL (Figuras 28 - 36). A variante MC-LR já havia sido identificada anteriormente (FIORE et al., 2009) e essa, juntamente com as variantes MC-LL e MC-FR, foram relatadas para a linhagem em análise prévia a partir do extrato intracelular (SHISHIDO, 2009), por aparelho de tecnologia Q-TOF MS/MS. Visto que a concentração de acetonitrila aumenta com o passar do tempo de aquisição das frações, as variantes mais apolares foram obtidas após os 10 minutos de corrida (Figuras 37 e 38).

Os resultados mostraram que MC-LR e MC-LL foram as variantes proporcionalmente mais produzidas pela linhagem (Figura 38), e são também as descritas com maior frequência pela literatura para a maioria dos gêneros produtores da hepatotoxina (SIVONEN, 2009). A variante MC-LR é uma das mais tóxicas e mais estudadas variantes de microcistina (Tabela 10), com valor $DL_{50}=50$, ou seja, 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ são necessários para matar 50 % dos animais testados e expostos por intoxicação a essa substância (CHORUS; BARTRAM, 1999). Em virtude disso, é recomendado que seja realizado o controle da presença dessa toxina em águas de consumo, principalmente dessa variante, cuja concentração limite não deve ultrapassar 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A linhagem CENA161 foi isolada de barragem em uma nascente, o que não é considerado mais agravante pelo fato de não formar florações, e pelo desenvolvimento lento dos talos não proporcionar o surgimento de grandes populações.

Figura 26 - Cromatograma de varredura de íons precursores de m/z 135 para amostra CENA161. (A) Varredura entre m/z 450-900, região onde aparecem íons duplamente carregados $(M+2H)^{2+}$; (B) Varredura entre m/z 800-1250, região onde aparecem íons protonados $(M+H)^+$. As frações numeradas apresentaram valores de m/z no intervalo característico de microcistinas

Figura 27- Espectros de massas (íons precursores) correspondentes às frações cromatográficas identificadas na Figura 24 B. (A) MC-LR, m/z 995 $(M+H)^+$; (B) possível MC, m/z 1029 $(M+H)^+$; (C) possível MC, m/z 968 $(M+H)^+$ e 985 $(M+NH_4)^+$; (D) MC-LA, m/z 910 $(M+H)^+$ e 927 $(M+NH_4)^+$; (E) possível MC, m/z 924 $(M+H)^+$ e 941 $(M+NH_4)^+$; (F) possível MC, m/z 970 $(M+H)^+$ e 987 $(M+NH_4)^+$; (G) possível MC, m/z 938 $(M+H)^+$ e 955 $(M+NH_4)^+$; (H) possível MC, m/z 952 $(M+H)^+$ e 969 $(M+NH_4)^+$; (I) composto suspeito, m/z 873 $(M+H)^+$ e 890 $(M+NH_4)^+$

Figura 28- Espectro de fragmentação para composto de m/z 995. A fragmentação característica e o tempo de retenção semelhante ao do padrão analítico confirmam a identificação como MC-LR

Figura 29 - Espectro de fragmentação para composto de m/z 1029. A fragmentação característica indica a presença de MC-FR

Figura 30- Espectro de fragmentação para composto de m/z 968. A fragmentação é característica para microcistinas, mas a variante é desconhecida

Figura 31- Espectro de fragmentação para composto de m/z 910. A fragmentação característica e o tempo de retenção semelhante ao do padrão analítico confirmam a identificação como MC-LA

Figura 32- Espectro de fragmentação para composto de m/z 924. A fragmentação característica indica a presença de MC-LAb

Figura 33 - Espectro de fragmentação para composto de m/z 970. A fragmentação característica indica a presença de MC-LM

Figura 34- Espectro de fragmentação para composto de m/z 938. A fragmentação característica indica a presença de [D-Asp³]MC-LL

Figura 35- Espectro de fragmentação para composto de m/z 952. A fragmentação característica indica a presença de MC-LL

Figura 36- Espectro de fragmentação para composto de m/z 873. A fragmentação não é característica de microcistinas

Figura 37- Comparação entre espectros de fragmentação das diferentes microcistinas. O perfil de fragmentação é o mesmo para todas variantes apolares

Figura 38- Cromatograma em modo negativo de ionização para as microcistinas presentes na amostra CENA161

Tabela 10 - Variantes identificadas durante as análises de espectros de fragmentação (SIVONEN et al., 1999; DIEHNELT et al., 2006)

Variante	Toxicidade (DL ₅₀)	m/z	Aminoácidos (X e Y)
MC-LR	50	995	Leucina, Arginina
MC-FR	250	1029	Fenilalanina, Arginina
MC-LA	50	910	Leucina, Alanina
MC-LAba	ND	923	Leucina, Ácido aminobutírico
MC-LM	ND	970	Leucina, Metionina
[Asp ³]MC-LL	ND	938	Leucina, Leucina
MC-LL	ND	952	Leucina, Leucina

ND : não determinado

As variantes MC-LAba e a desmetilada [D-Asp³]MC-LL são pouco descritas pela literatura, embora já tenham sido identificadas em análises com duas linhagem da espécie *Microcystis aeruginosa* (GATHERCOLE; THIEL, 1987; DIENHELT et al., 2006), mas não foram encontrados registros para linhagens da ordem Nostocales. A variante [D-Asp³]MC-LL também foi uma das produzidas em maior proporção pela linhagem CENA161. Essa molécula de microcistina sofre uma modificação no aminoácido da posição 3, o qual sofre uma desmetilação (remoção de metila) do ácido β-metilaspártico, convertendo-o a ácido isoaspártico (SIVONEN; JONES, 1999). Kaasalainen et al. (2012) avaliaram a produção de microcistina em uma quantidade de 23 associações de cianolíquenes, e encontraram, dentre 52 diferentes variantes, três com modificação do aminoácido da posição 3 na molécula: [D-Asp³,

DMAdda⁵]MC-LR (m/z 967), [D-Asp³]MC-RR (m/z 1,024), [D-Asp³, ADMAdda⁵]MC-RR (m/z 1,052), mostrando uma alta diversidade genética para o gene *mcyE*, que codifica a enzima responsável pela incorporação do resíduo de aminoácido nessa posição, e elucidando a relação dos líquenes na variabilidade de microcistinas e diversidade cianobacteriana encontradas nessa interação. A linhagem australiana *Fischerella* sp. NQAIF311 produz, igualmente à CENA161, as variantes MC-LR, MC-LA e MC-FR, além das variantes que não são em comum com as produzidas pela CENA161, MC-LF e [D-Asp³]MC-LR (CIRÉS et al., 2014). A desmetilação do resíduo de aspartato, na posição 3 da microcistina, além da substituição de Dha na posição 7 por um Dhb, foram comprovadas ser influentes na toxicidade da molécula da microcistina (SHIMIZU et al., 2014).

As variantes identificadas para a linhagem deste estudo, por espectrometria de massas, estão de acordo com a predição das sequências de estrutura secundária dos domínios de adenilação para McyA₁, McyB₂ e McyE, por serem as mesmas bastante conservadas pelas análises comparativas, visto que não foram encontradas modificações na incorporação de aminoácidos, especialmente nas posições 1 (McyA₁) e 5 (McyE) das variantes de microcistina.

A resposta para a produção de mais de sete variantes de microcistina pela linhagem *Fischerella* sp. CENA161 pode ser a diferenciação na sequência do domínio de adenilação, especialmente do gene *mcyC*, que desempenha a função de incorporar os aminoácidos na posição 4 da molécula da toxina. Sugere-se a possibilidade de que a sequência de aminoácidos dessa região, o sítio ligante e de reconhecimento de aminoácidos para a posição 4 da molécula, não seja conservada, ao ponto de as enzimas apresentarem baixa especificidade pelo substrato, permitindo o reconhecimento e a incorporação de outros aminoácidos na molécula, inclusive com diferenças de polaridade em relação aos frequentemente descritos pela literatura, dando origem a outras e novas variantes, conforme relatado também para gêneros *Anabaena*, *Planktothrix* e *Microcystis* (SIVONEN et al., 1999; FEWER et al., 2007; CHRISTIANSEN et al., 2008; JIANG et al., 2013). Para a linhagem CENA161, que pode apresentar dois análogos de aminoácidos possíveis na posição 7 – cujo aminoácido sofre a remoção do grupo metil e havendo a alteração da estrutura da molécula do metildiidroxi alanina (MDha) para dihidroxi alanina (Dha), e uma correspondente aos resíduos de L-ser, que são precursores da síntese da molécula do Mdha e incorporados na região da molécula na substituição deste. No entanto, não foram identificadas variantes com modificações na posição 7 da molécula de microcistina para a CENA161. Durante as análises químicas, foi avaliado somente o extrato

intracelular, sem investigação da microcistina que as células estariam exportando, portanto, não há a confirmação de que não seja produzido.

4.7 Análises químicas das outras substâncias bioativas

Foi avaliado o perfil de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com corrida sequencial de 4,5 mL.min⁻¹ durante 40 minutos e gradiente de acetonitrila de 50 a 75 %, com um volume de 100 µL da fração apolar (diclorometano), e uma corrida sequencial de 4,5 mL.min⁻¹ durante 35 minutos e gradiente de acetonitrila de 5 a 50 % da fração polar (metanol e água) do extrato intracelular obtido a partir de células liofilizadas cultivadas em condições axênicas. Foram observadas 25 frações durante a corrida da fração diclorometano do extrato intracelular (Figura 39), sendo quatro frações com amplitude acima de 50 mAU, no intervalo de tempo de 20 a 30 minutos de corrida. O tempo de retenção dessas moléculas sugere fraca polaridade, já que foram removidas da coluna em uma concentração de acetonitrila em torno de 60 %.

Figura 39- Corrida em HPLC de 100 µL da fração apolar (DCM) do extrato intracelular da linhagem CENA161. Gradiente de acetonitrila 50 - 75 %, tempo de 40 minutos

As frações coletadas durante a corrida de HPLC para a fração hidrofóbica do extrato intracelular foram submetidas a novo ensaio para a observação da bioatividade contra bactéria e fungo. A avaliação de 300 μ L de suspensão das moléculas isoladas mostrou que a fração coletada aos 16 minutos de aquisição apresenta uma fraca e bacteriostática atividade contra *Staphylococcus aureus*; a fração coletada aos 24,9 minutos mostrou a mais eficiente atividade contra a mesma bactéria, e a fração coletada aos 27,7 minutos mostrou atividade intermediária contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* simultaneamente (Figura 40)

Figura 40- Bioensaio realizado com as frações isoladas em corrida de HPLC com a fração apolar (DCM) do extrato intracelular da linhagem CENA161

A amostra polar (MeOH + H₂O) revelou uma concentração de frações durante os primeiros seis minutos de aquisição em HPLC, e, após 20 minutos, outras frações foram visualizadas. A separação das moléculas na coluna ocorreu, dessa forma, durante a passagem de baixa concentração de acetonitrila (5 – 15 %), e alta concentração de acetato de amônio 0,1 %, carreando as moléculas mais polares. Após, a lavagem com carregamento de substâncias ocorreu no intervalo de 21 a 29 minutos de aquisição, com passagem de maior concentração de acetonitrila (35 - 50 %), removendo as moléculas menos polares da coluna. Foi observada a fração de microcistina (MCY) com o tempo de aquisição de 21.5 minutos, com boa amplitude (aproximadamente 100 mAU) em relação às frações obtidas subsequentemente na corrida. A microcistina foi detectada nas condições de acetonitrila / acetato de amônio 0,1 % 30/70, comprimento de onda UV (DAD) de 220,4 nm e sinal referência de 550 nm (Figura 41).

Figura 41- Corrida em HPLC de 100 μ L da fração polar (MeOH + H₂O) do extrato intracelular da linhagem CENA161. Gradiente de acetonitrila 5 - 50 %, tempo de 40 minutos

Os bioensaios realizados com 300 μ L das frações coletadas durante a corrida da fração polar do extrato intracelular foram testados contra *Straphylococcus aureus* e *Candida albicans* e não mostraram bioatividade. Algumas hipóteses podem ser sugeridas, como a forte ligação da(s) molécula(s) bioativa(s) com a coluna de sílica utilizada, de forma que esta as retenha com alta afinidade, e sejam liberadas somente no posterior processo de lavagem com o solvente ou com a lavagem da coluna com isopropanol 100 %. Por outro lado, a etapa pós-corrida, com tempo de aquisição de 15 minutos, não revelou a aquisição de novas frações durante a corrida sequencial constante de acetonitrila 50 %. Ainda, outras propriedades bioativas da(s) molécula(s) podem ser inativadas ao longo do processo de extração do conteúdo intracelular, como nas etapas subsequentes de evaporação e exposição aos diversos solventes e pela passagem pela coluna de sílica, o que justificaria a característica lábil da estrutura química.

A avaliação da estrutura química das moléculas de ambiguaína e hapalindol foi realizada por Smitka et al. (1992), que aplicaram o extrato intracelular para corrida cromatográfica utilizando metanol como eluente, coletando a fração ativa após bioensaio e

dissolvendo-a novamente em metanol para, enfim, submetê-la novamente, após filtração, em coluna cromatográfica com gradiente de 80 a 100 % de metanol para a coleta das frações e posterior análise. Raveh e Carmeli (2007) investigaram novas variantes de ambiguina também através da fração polar do extrato intracelular. Hillwig, Zhu e Liu (2014) isolaram a fração correspondente à variante ambiguina A aos 35 minutos de aquisição, com comprimento UV de 280 nm. No comprimento de onda de 310 nm, a fração do isômero *cis* de indol-isonitrila obtida da linhagem *F. ambigua* UTEX 1903 foi obtida com tempo de aquisição de 8,8 minutos, enquanto o isômero *trans* foi detectado aos 13 minutos (MICALLEF et al., 2014). Essas metodologias evidenciam a classificação polar das moléculas de ambiguina, o que sugere que a bioatividade na fração polar (MeOH + H₂O) do extrato intracelular da linhagem CENA161 corresponda à molécula de ambiguina.

As estruturas químicas das moléculas de ambiguina e hapalindol são muito semelhantes, pertencem à família química dos alcaloides indoís do tipo hapalindol, sendo produzidos a partir de precursores de triptofano e geranil pirofosfato (STRATMANN et al., 1994), e compartilham a estrutura molecular de indol e isonitrila ligados pelos carbonos 10 e 11 do esqueleto, juntamente com um terpeno. As variantes são produzidas especialmente por modificações simples da molécula promovidas pelas enzimas prenil transferases e oxigenases (HILLWIG; ZHU; LIU, 2014). Ambiguinas e suas variantes apresentam bioatividade antibacteriana, antifúngica e antimalárica (RAVEH; CARMELI 2007), enquanto as variantes de hapalindol são bioativas contra fungos (SMITKA et al., 1992).

Nostopeptolida e suas variantes foram investigadas através da extração intracelular utilizando acetonitrila/diclorometano 80/20 e, após evaporação, foi eluído em acetonitrila para realização de corrida em HPLC de fase reversa, com operação do UV em comprimento de onda de 220 nm, utilizando ácido trifluoroacético 0,02 N em acetonitrila 35 % como eluente (GOLAKOTI et al., 2000). As frações coletadas foram evaporadas com posteriores etapas de caracterização das variantes. A metodologia de extração intracelular abordada pelos autores mostra que as moléculas de nostopeptolida são miscíveis em solventes orgânicos apolares. Foi descoberto recentemente o papel antitoxina para esse nanopeptídeo cíclico, que atua como inibidor de apoptose de hepatócitos induzida por microcistina e da captação de microcistina pelo bloqueio dos transportadores aniônicos orgânicos (LIU et al., 2014). Ainda, cabe a esse peptídeo o papel de regulação da diferenciação de hormogônios, filamentos móveis que desempenham função especialmente nos processos infecciosos na interação simbiótica de

linhagem da espécie *Nostoc punctiforme* com plantas hospedeiras, promovendo a inibição da divisão celular durante o processo de simbiose (LIAIMER et al., 2015).

Assim, as frações isoladas em HPLC e identificadas durante os bioensaios não correspondem aos produtos bioativos sintetizados a partir de partes dos agrupamentos gênicos já descritos e anotados nesse trabalho, visto que as moléculas de ambiguinas e hapalindois são obtidas a partir da fração polar (metanol + água) do extrato intracelular da linhagem CENA161, de onde não foi possível isolar as frações bioativas. No entanto, a elucidação dessas moléculas será de grande valia para a complementação da descrição dos agrupamentos gênicos que mostraram sua sintenia diferenciada dos agrupamentos já conhecidos. As três frações isoladas com atividade antibacteriana e a fração correspondente à atividade simultânea contra bactéria e levedura correspondem a outro grupo de antimicrobianos, tratando-se possivelmente de moléculas da classe das bacteriocinas.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Novo sequenciamento genômico da linhagem CENA161, cultivada em condições axênicas, deverá ser realizado com tecnologia "*Single Molecule Real Time, Pacific Biosciences*" para obtenção de leituras longas que viabilizem o fechamento das lacunas do genoma e obtenção de agrupamentos gênicos completos. A caracterização química de novas variantes e novas biomoléculas deverá ser realizada por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A linhagem *Fischerella* sp. CENA161 possui em seu genoma o agrupamento gênico de biossíntese da microcistina, apresentando os 10 genes (*mcyA* – *mcyJ*) envolvidos na expressão das enzimas voltadas à síntese de microcistina. A sintenia dos genes não corresponde à apresentada pela linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339 e, sim, com a linhagem *Nostoc* sp. 152, havendo o gene *mcyJ* em substituição ao gene *mcyL* descrito para essa última linhagem. Por outro lado, a maior similaridade das sequências de aminoácidos codificadas pelos 10 genes da CENA161 corresponde às sequências da linhagem *Fischerella* sp. PCC 9339. Outros agrupamentos gênicos de biossíntese da NRPS/PKS nostopeptolida e do alcaloide ambigua foram identificados no genoma. Assim, à linhagem *Fischerella* sp. CENA161 corresponde ao relato da primeira cianobactéria do gênero, coletada de águas brasileiras, a apresentar os três agrupamentos gênicos biossintéticos para as substâncias microcistina, ambigua e nostopeptolida, e o primeiro agrupamento gênico de biossíntese de microcistina para o gênero oficialmente descrito na literatura. A linhagem CENA161 está produzindo atualmente sete variantes de microcistina, estando o agrupamento gênico de biossíntese em funcionalidade também em condições axênicas. Três prováveis novas moléculas bioativas – duas com propriedade antibacteriana e uma com propriedade antibacteriana e antifúngica simultaneamente – são produzidas por ela, o que a torna uma importante fonte de bioprospecção de novas drogas de aplicações diversas nos campos de farmacologia e agronomia. Por fim, os agrupamentos gênicos descritos no presente trabalho poderão auxiliar em futuras investigações de filogenias e desenhos de oligonucleotídeos iniciadores voltados para o monitoramento de qualidade das águas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R.; FIORE, M.F.; FRANCO, M.W.; VENTRELLA, M.C.; LORENZI, A.S.; VANETTI, C.A.; ALFENAS, A.C. A novel epiphytic cyanobacterium species from the genus *Brasilonema* causing damage to Eucalyptus leaves. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 44, p. 1322-1334, 2008.
- ALLEN, M.M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates, **Journal of Phycology**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-4, 1968.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 1- Introduction. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v.38/39, p.291-302, 1985.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 5- Stigonematales. **Archiv für Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.
- AZMA, M.; MOHAMAD, R.; RAHIM, A.; ARIFF, A.B. Improved protocol for the preparation of *Tetraselmis suecica* axenic culture and adaptation to heterotrophic cultivation. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 4, 36-46, 2010.
- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A.A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A.S.; LESIN, V.M.; NIKOLENKO, S.I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A.D.; PYSHKIN, A.V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M.A., PEVZNER, P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2014.
- BARRIOS-LLERENA, M.E.; BURJA, A.M.; WRIGHT, P.C. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthetase genes in cyanobacteria as a mining tool for secondary metabolites. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 34, p. 443-456, 2007.
- BAUER A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1996.
- BECHER, P.G.; KELLER, S.; JUNG, G.; SÜSSMUTH, R.D.; JÜTTNER, F. Insecticidal activity of 12-epi-hapalindole J isonitrile. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 2493-2497, 2007.
- BECKER, J.E.; MOORE, R.E.; MOORE, B.S. Cloning, sequencing, and biochemical characterization of the nostocyclopeptide biosynthetic gene cluster: molecular basis for imine macrocyclization. **Gene**, Amsterdam, v. 325, p. 35-42, 2004.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y.; KÜPPER, H.; KOLBER, Z.; BERGMAN, P.F. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, Washington, v. 294, n. 5546, p. 1534-1537, 2011.

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

BODE, H.B.; MÜLLER, R. 2005. The impact of bacterial genomics on natural product research. **Angewandte Chemie International**, Frankfurt, v. 44, p. 6828-6846, 2005.

BONITZ, T.; ALVA, V.; SALEH, O.; LUPAS, A. N.; HEIDE, L. Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n.8, p. 1-8, 2011.

BOTES, D.; WESSELS, P.; KRUGER, H.; RUNNEGAR, M.; SANTIKARN, S.; SMITH, R.; BARNA, J.; WILLIAMS, D. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1**, Cambridge, v. 1, p. 2747-2748, 1985.

BOWYER, J.W.; SKERMAN, V.B.D. Production of axenic cultures of soil-borne and endophytic blue-green algae. **Journal of General Microbiology**, London, v. 54, p. 299-306, 1968.

BRANCO, L.H.Z.; HOFFMANN, L.; TEIXEIRA, J.P.; FERREIRA, V.; MORAIS FILHO, J.C. Aerophytic cyanoprokaryotes from the Atlantic rainforest region of São Paulo State, Brazil: Chroococcales and Oscillatoriales. **Cryptogamie Algologie**, Paris, v. 30, p. 135-152, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2.914, 12/12/2011**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 20 jul. 2015.

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

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 55, p. 611-622, 2009.

CALTEAU, A.; FEWER, D.P.; LATIFI, A.; COURSIN, T.; LAURENT, T.; JOKELA, J.; KERFELD, C.A.; SIVONEN, K.; PIEL, J.; GUGGER, M. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 977, 2014.

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

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

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.

CHIOU, C.S.; JONES, A.L. Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*. **Gene**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 47-51, 1995.

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

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

CHRISTIANSEN, G.; YOSHIDA, W.Y.; BLOM, J.F.; PORTMANN, C.; GADEMANN, K.; HEMSCHEIDT, T.; KURMAYER, R. Isolation and structure determination of two microcystins and sequence comparison of the McyABC adenylation domains in *Planktothrix* species. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, p. 1881–1886, 2008.

CIRÉS, S.; ALVAREZ-ROA, C.; WOOD, S.A.; PUDDICK, J.; LOZA, V.; HEIMANN, K. First report of microcystin-producing *Fischerella* sp. (Stigonematales, Cyanobacteria) in tropical Australia. **Toxicon**, Oxford, v. 88, p. 62-66, 2014.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 50, n. 1, p. 7-17, 2006.

DIEHNELT, C.W.; DUGAN, N.R.; PETERMAN, S.M.; BUDDE, W.L. Identification of microcystin toxins from a strain of *Microcystis aeruginosa* by liquid chromatography introduction into a hybrid linear Ion Trap-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, Washington DC, v. 78, p. 50-512, 2006.

DOAN, N.T.; RICKARDS, R.W.; ROTHSCCHILD, J.M.; SMITH, G.D. Allelopathic actions of the alkaloid 12-epi-Hapalindole E isonitrile and calothrixin A from cyanobacteria of the genera *Fischerella* and *Calothrix*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 12, p. 409–416, 2000.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 24, p. 1073–1109, 2007.

EILER, A.; BERTILSSON, S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1228–1243, 2004.

- ERSMARK, K.; DEL VALLE, J.R.; HANESSION, S. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. **Angewandte Chemie International**, Frankfurt, v. 47, 1202-1223, 2008.
- ETCHEGARAY, A.; RABELLO, E.; DIECKMANN, R.; MOON, D.H.; FIORE, M.F.; VON DÖREN, H.; TSAI, S.M.; NEILAN, B.A. Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp. CENA19. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, p. 237-243, 2004.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.
- FERRIS, M. J.; HIRSCH, C.F. Method for isolation and purification of cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 57, p. 1448-1452, 1991.
- FEWER, D.P.; ÖSTERHOLM, J.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K. Nostophycin biosynthesis is directed by a hybrid polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase in the toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 77, n. 22, p. 8034-8040, 2011.
- FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; LAAKSO, K.; WANG, H.; SIVONEN, K. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 183, 2007.
- FEWER, D.P.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; ROUHIAINEN, L.; KRISTENSEN, T.; ROHRLACK, K.; JAKOBSEN, K.SK.; SIVONEN, K. Natural occurrence of microcystin synthetase deletion mutants capable of producing microcystins in strains of the genus *Anabaena* (Cyanobacteria). **Microbiology**, Reading, v. 154, p. 1007-1014, 2008.
- FEWER, D.P.; WAHLSTEN, M.; ÖSTERHOLM, J.; JOKELA, J.; ROUHIAINEN, L.; KAASALAINEN, U.; RIKKINEN, J.; SIVONEN, K. The genetic basis for O-Acetylation of the microcystin toxin in Cyanobacteria. **Chemistry & Biology**, London, v. 20, p. 861-869, 2013.
- FINKING, R.; MARAHIEL, M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 453-488, 2004.
- FIORE, M.F.; ALVARENGA, D.O.; SILVA-STENICO, M.E. Genética de cianotoxinas. **Microbiologia in foco**, São Paulo, v. 12, p. 24-35, 2011.
- FIORE, M.F.; ALVARENGA, D.O.; VARANI, A.M.; HOFF-RISSETI, C.; CRESPI, E.; RAMOS, R.T.J.; SILVA, A.; SCHAKER, P.D.C.; HECK, K.; RIGONATO, J.; SCHNEIDER, M.P.C. Draft genome sequence of the Brazilian toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Strain SPC777. **Genome Announcements**, Washington DC, v. 1, n. 4, p. 1-2, 2013.

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

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

GANTAR, M.; BERRY, J. P.; THOMAS, S.; WANG, M.; PEREZ, R.; REIN, K. S.; KING, G. Allelopathic activity among cyanobacteria and microalgae isolated from Florida freshwater habitats. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 64, n. 1, p. 55-64, 2008.

GATHERCOLE, P.S.; THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 408, p. 435–440, 1987.

GAYLARDE, C.C.; ORTEGA-MORALES, B.O.; BARTOLO-PEREZ, P. Biogenic black crusts on buildings in unpolluted environments. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 162–166, 2007.

GEHRINGER, M.M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 557, p. 1–8, 2004.

GEHRINGER, M.M.; ADLER, L.; ROBERTS, A.A.; MOFFITT, M.C.; MIHALI, T.K.; MILLS, T.J.T.; FIEKER, C.; NEILAN, B.A. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. **The ISME Journal**, London v. 6, p. 1834–1847, 2012.

GENUÁRIO, D.B.; SILVA-STENICO, M.E.; WELKER, M.; MORAES, L.A.B.; FIGLIORE, M.F. Characterization of a microcystin and detection of microcystin synthetase genes from a Brazilian isolate of *Nostoc*. **Toxicon**, Oxford, v. 55, p. 846-854, 2010.

GIGLIO, S.; MONIS, P.T.; SAINT, C.P. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 22, p.136, 2003.

GINN, H.P.; NEILAN, B.A. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 76, p. 4362–4368, 2010.

GIOVANNONI, S.J.; STINGL, U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. **Nature**, London, v. 437, p. 343–348, 2005.

GLEZ-PEÑA, D.; GÓMEZ-BLANCO, D.; REBOIRO-JATO, M.; FDEZ-RIVEROLA, F.; POSADA, D. ALTER: program-oriented format conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. 14-18, 2010.

GOLAKOTI, T.; YOSHIDA, W.Y.; CHAGANTY, S.; MOORE, R.E. Isolation and structures of nostopeptolides A1, A2 and A3 from the cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV224 **Tetrahedron**, Oxford, v. 56, p. 9093-9102, 2000.

GOLAKOTI, T.; YOSHIDA, W.Y.; CHAGANTY, S.; MOORE, R.E. Isolation and structure determination of nostocyclopeptides A1 and A2 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 64, p. 54–59, 2001.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 195–202, 1998.

GUGGER, M.F.; HOFFMANN, L. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 54, p. 349–357, 2004.

GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 8, p.1072–1075, 2013.

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

HICKS, L.M.; MOFFITT, M.C.; BEER, L.L.; MOORE, B.S.; KELLEHER, N.R. Structural characterization of in vitro and in vivo intermediates on the loading module of microcystin synthetase. **ACS Chemical Biology**, Washington DC, v. 1:, p. 93–102, 2006.

HILLWIG, M.L.; ZHU, Q.; LIU, X. Biosynthesis of ambigua indole alkaloids in cyanobacterium *Fischerella ambigua*. **ACS Chemical Biology**, Washington DC, v. 9, p. 372–377, 2014.

HO, L.; TANG, T.; MONIS, P.T.; HOEFEL, D. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. **Chemosphere**, Oxford, v. 87, n. 10, p. 1149–1154, 2012.

HOFFMANN, D.; HEVEL, J. M.; MOORE, R. E.; MOORE, B. S. Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. **Gene**, Amsterdam, v. 311, p. 171–180, 2003.

HOICZYK, E.; BAUMEISTER, W. Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 177, p. 2387–2395, 1995.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 754–755, 2001.

ISHII, H.; NISHIJIMA, M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. **Water Research**, Oslo, v. 38, p. 2667–2676, 2004.

IZAGUIRRE, G.; HWANG, C.J.; KRASNER, S.W.; MCGUIRE, M.J. Geosmin and 2-Methylisoborneol from Cyanobacteria in three water supply systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 43, n. 3, p. 708–714, 1982.

IZAGUIRRE, G.; JUNGBLUT, A.D.; NEILAN, B.A. Benthic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) that produce microcystin-LR, isolated from four reservoirs in southern California. **Water Research**, Oslo, v. 41, p. 492–498, 2007.

JIANG, Y.; YU, G.; CHAI, W.; SONG, G.; LI, R. Congruence between *mcy* based genetic type and microcystin composition within the populations of toxic *Microcystis* in a plateau lake, China. **Environmental Microbiology Reports**, Washington DC, v. 5, n. 5, p. 637-647, 2013.

JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL, W. W.; AN, J.; CARDO, D.; COOKSON, S. T.; HOLMES, C. E. M.; ANTUNES, M. B. C.; MELO FILHO, D. A.; LYRA, T. M.; BARRETO, V.; AZEVEDO, S. M. F. O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death following exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brasil. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 13, p. 873-878, 1998.

JONES, G.J.; ORR, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. **Water Research**, Oslo, v. 28, p. 871–876, 1994.

KAASALAINEN, U.; FEWER, D.P.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; SIVONEN, K.; RIKKINEN, J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington DC, v. 109, p. 5886–5891, 2012.

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

KLEIGREWE, K.; ALMALITI, J.; TIAN, I.Y.; KINNEL, R.B.; KOROBAYNIKOV, A.; MONROE, E.A.; DUGGAN, B.M.; DI MARZO, V.; SHERMAN, D.H. Combining mass spectrometry metabolic profiling with genomic analysis: a powerful approach for discovering natural products from cyanobacteria. **Journal of Natural Products**, Washington DC, v. 78, p. 1672-1682, 2015.

KOLMONEN, E.; SIVONEN, K.; RAPALA, J.; HAUKKA, K. Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. **Aquatic Microbial Ecology**, Luhe, v. 36, p. 201–211, 2004.

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**, Dordrecht, v. 639, p. 245–259, 2010.

KOMÁREK, J. **Cyanoprokaryota 3**. Teil/Part 3: Heterocytous Genera. Springer Spektrum. 2013.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4. Nostocales. **Archiv fur Hydrobiologie - Algological Studies**, Stuttgart, v. 82, p. 247-345, 1989.

KOMÁREK, J.; HAUER, T. **CyanoDB.cz**: a database of cyanobacterial genera. South Bohemia, 2004. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz>>. Acesso em: 08 AGO. 2015.

KOTAI, J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. **Norwegian Institute for Water Research**, Oslo, v. B-11/69, p. 1–5, 1972.

KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; BÖRNER, T. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 6, p.831–841, 2004.

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

LARSSON, J.; NYLANDER, J.A.; BERGMANN, B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptative traits. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 11, n. 187, p. 1-22, 2011.

LEÃO, P.N.; ENGINE, N.; ANTUNES, A.; GERWICK, W.H.; VASCONCELOS, V. The chemical ecology of cyanobacteria. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 29, p. 372-391, 2012.

LERMAN, L.S.; FISHER, S.G.; HURLEY, I.; SILVERSTEIN, K.; LUMELSKY, K. Sequence-determined DNA separations. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, Palo Alto, v. 13, p. 399–423, 1984.

LIAMER, A.; HELFRICH, E.J.; HINRICHS, K.; GULJAMOW, A.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C.; DITTMANN, E. Nostopeptolide plays a governing role during cellular differentiation of the symbiotic cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington DC, v. 112, n. 6, p. 1862- 1867, 2015.

LIU, L.; JOKELA, J.; HERFINDAL, L.; WAHLSTEN, M. SINKKONEN, J.; PERMI, P.; FEWER, D.P.; DOSKELAND, S.O.; SIVONEN, K. 4-Methylproline guided natural product discovery: co-occurrence of 4-hydroxy- and 4-methylprolines in nostoweipeptins and nostopeptolides. **ACS Chemical Biology**, Washington DC, v. 9, n. 11, p. 2646-2655, 2014.

LUESCH, H.; HOFFMANN, D.; HEVEL, J.M.; BECKER, J.E.; GOLAKOTI, T.; MOORE, R.E. Biosynthesis of 4-methylproline in cyanobacteria: cloning of *nosE* and *nosF* genes and biochemical characterization of the encoded dehydrogenase and reductase activities. **Journal of Organic Chemistry**, Washington DC, v. 68, p. 83–91, 2003.

LUUKKAINEN, R.; SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; FÄRDIG, M.; RINEHART, K.L.; NIEMELÄ, S.I. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.59, n.7, p. 2204-2209. 1993.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**, Washington DC, v. 97, p. 2651-2673, 1997.

McDANILE, H.R.; MIDDLEBROOK, J.B.; BOWMAN, R.O. Isolation of pure cultures of algae from contaminated cultures. **Applied Microbiology**, London, v. 10, n. 3, p. 223, 1962.

MEDSKER, L. L.; JENKINS, D.; THOMAS, J.F. Odorous compounds in natural waters. An earthy-smelling compound associated with blue-green algae and actinomycetes. **Environmental Science & Technology**, Berkeley, v. 2, p. 461-464, 1968.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, n. 386, p. 1-8, 2008.

MICALLEF, M.L.; SHARMA, D.; BUNN, D.B.; GERWICK, L.; VISWANATHAN, R.; MOFFITT, M.C. Comparative analysis of hapalindole, ambiguine and welwitindolinone gene clusters and reconstitution of indole-isonitrile biosynthesis from cyanobacteria, **BMC Microbiology**, London, v. 14, p. 213-231, 2014.

MIKALSEN, B.; BOISON, G.; SKULBERG, O.M.; FASTNER, J.; DAVIES, W.; GABRIELSEN, T.M.; RUDI, K.; JACOBSEN, K.S. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 185, p. 2774–2785, 2003.

MO, S.Y.; KRUNIC, A.; CHLIPALA, G.; ORJALA, J. Antimicrobial ambiguine isonitriles from the cyanobacterium. *Fischerella ambigua*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, p. 894–899, 2009.

MO, S.; KRUNIC, A.; SANTARSIERO, B.D.; FRANZBLAU, S.G.; ORJALA, J. Hapalindole-related alkaloids from the cultured cyanobacterium *Fischerella ambigua*. **Phytochemistry**, New York, v. 71, p. 2116-2123, 2010.

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**, Baltimore, v. 70, p. 6353-6362, 2004.

MOHAMED, Z.A.; ALAMRI, S.A. Biodegradation of cylindrospermopsin toxin by microcystin-degrading bacteria isolated from cyanobacterial blooms. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 8, p. 1390–1395, 2012.

MOORE, R. E. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: A review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 16, p. 134-143, 1996.

MOORE, R.E.; CHEUK, C.; PATTERSON, G.M.L. Hapalindoles: New alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 106, p. 6456–6457, 1984.

MOORE, R.E.; CHEUK, C.; YANG, X.Q.G.; PATTERSON, G.M.L.; BONJOUKLIAN, R.; SMITKA, T.A.; MYNDERSE, J.S.; FOSTER, R.S.; JONES, N.D.; SWARTZENDRUBER, J. K.; DEETER, J.B. Hapalindoles, antibacterial and antimycotic alkaloids from the cyanophyte

Hapalosiphon fontinalis. **Journal of Organic Chemistry**, Washington DC, v. 52, p. 1036–1043, 1987.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDER, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.59, n.3, p. 695-700, 1993.

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

NEFFLING, M.R.; SPOOF, L.; MERILUOTO, J. Rapid LC-MS detection of cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularins - comparison of columns. **Analytica Chimica Acta**, London, v. 653, n. 2, p. 234-241, 2009.

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

NEILAN, B.A.; PEARSON, L.A.; MUENCHHOFF, J.; MOFFITT, M.C.; DITTMANN, E. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 15, n. 5, p. 1239–1253, 2013.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 63, p. 3327-3332, 1997.

OKSANEN, I.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; WAHLSTEN, M.; RIKKINEN, J.; SIVONEN, K. Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 70, p. 5756–5763, 2004.

OLIVER, R.L.; GANF, G.G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 149-194.

PARK, A.; MOORE, R E.; PATTERSON, G.M.L. Fischerindole L, a new isonitrile from the terrestrial blue-green alga *Fischerella muscicola*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 33, p. 3257–3260, 1992.

PEARSON, L.A.; BARROW, K.D.; NEILAN, B.A. Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 7, p. 4681–4692, 2007.

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

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

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

PIMENTEL, J.S.M.; GIANI, A. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 80, n. 18, p. 5836-5843, 2014.

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

PRINSEP, M.R.; CAPLAN, F.R.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L.; HONKANEN, R.E.; BOYNTON, A.L. Microcystin-LA from a blue-green alga belonging to the Stigonematales. **Phytochemistry**, New York, v. 31, p. 1247-1248, 1992.

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

RAUSH, C.; WEBER, T.; KOHLBACHER, O.; WOHLLEBEN, W.; HUDSON, D.H. 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.

RAVEH, A.; CARMELI, S. Antimicrobial Ambiguines from the cyanobacterium *Fischerella* sp. Collected in Israel **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, p. 196-201, 2007.

RICHTER, J.M.; ISHIHARA, Y.; MASUDA, T.; WHITEFIELD, B.W.; LLAMAS, T.; POHJAKALLIO, A.; BARAN, P.S. Enantiospecific total synthesis of the hapalindoles, fischerindoles and welwitindolinones via a redox economic approach. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 130, p. 17938-17954, 2008.

RIPPKA, R. Isolation and purification of cyanobacteria. **Methods in Enzymology**, Pasadena, v. 167, p. 3–27, 1988.

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

ROHRLACK, T.; DITTMANN, E.; HENNING, M.; BÖRNER, T.; KOHL, J.G. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 65, p. 737–739, 1999.

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

RÖTTIG, M.; MEDEMA, M.H.; BIN, K.; WEBER, T.; RAUSH, C.; KOHBACHER, O. NRPSpredictor2—a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, p.362–367, 2011.

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

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M-A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 944–945, 2000.

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

SANT'ANNA, C.L.; MELCHER, S.S.; CARVALHO, M.C.; GEMELGO, M.P.; AZEVEDO, M.T.P. Planktic cyanobacteria from upper Tietê basin reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 3, p. 1-17, 2007.

SCHATZ, D.; KEREN, Y.; VARDI, A.; SUKENIK, A.; CARMELI, S.; BÖRNER, T.; KAPLAN, A. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. **Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 9, p. 965–970, 2007.

SHIH, P.M.; WU, D.; LATIFID, A.; AXEN, S.D.; FEWER, D.P.; TALLA, E.; CALTEAU, A.; CAI, F.; de MARSAC, N.T.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M. SIVONEN, K.; COURSin, T.; LAURENT, T.; GOODWIN, L.; NOLAN, M.; DAVENPORT, K.W.; HAN, C.S.; RUBIN, E.M.; EISEN, J.A.; WOYKE, T.; GUGGER, M.; KERFELD, C.A. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **Proceedings of the National of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 110, n. 3, p. 1053–1058, 2013.

SHIMIZU, K.; SANO, T.; KUBOTA, R.; KOBAYASHI, N.; TAHARA, M.; OBAMA, T.; SUGIMOTO, N.; NISHIMURA, T.; IKARASHI, Y. Effects of the amino acid constituents of microcystin variants on cytotoxicity to primary cultured rat hepatocytes. **Toxins**, Basel, v. 6, p. 168-179, 2014.

SHISHIDO, T.K. **Análise fenotípica, genética e de bioatividade de isolados brasileiros de cianobactérias dos gêneros *Fischerella* e *Hapalosiphon***. 2009. 134p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SHISHIDO, T.K.; KAASALAINEN, U.; FEWER, D.P.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; FIORE, M.F.; YUNES, J.S.; RIKKINEN, J.; SIVONEN, K. Convergent evolution of [D-Leucine¹] microcystin-LR in taxonomically disparate cyanobacteria. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 13, p. 1-15, 2013.

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

SILVA-STENICO, M.E.; KANENO, R.; ZAMBUZI, F.A.; VAZ, M.G.M.V.; ALVARENGA, D.O.; FIORE, M.F. Natural products from cyanobacteria with antimicrobial and antitumor activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Schiphol, v. 14, p. 820-828, 2013.

SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B.; FIORE, M.F. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 166, p.161-175, 2011.

SIVONEN, K. Cyanobacterial Toxins. In Moselio, S. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 290–307.

SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; DAHLEM, A.M.; NIEMELA, S.I. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 56, p. 2650–2657, 1990.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health significance, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p. 41-111.

SMITKA, T.A.; BONJOUKLIAN, R.; DOOLIN, L.; JONES, N.D.; DEETER, J.B.; YOSHIDA, W.Y.; PRINSEP, M.R.; MOORE, R.E.; PATTERSON, G.M.L. Ambiguine isonitriles, fungicidal hapalindole-type alkaloids from three genera of blue-green algae belonging to the Stigonemataceae. **Journal of Organic Chemistry**, Washington DC, v. 57, p. 857–861, 1992.

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

STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D.; MARAHIEL, M.A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. **Chemical Biology**, Cambridge, v. 6, p. 493–505, 1999.

STAL, L.J. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. **New Phytologist**, Malden, v. 131, n. 1, p. 1-32, 1995.

STENROOS, S.; HÖNABRA, F.; MYLLYS, L.; HYVÖNEN, J.; THELL, A. High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. **Cladistics**, Oxford, v. 22, p. 230-238, 2006.

STOCKING, E.M.; MARTINEZ, R.A.; SILKS, L.A.; SANZ-CERVERA, J.F.; WILLIAMS, R.M. Studies on the biosynthesis of paraherquamide: concerning the mechanism of the

oxidative cyclization of L-isoleucine to β -methylproline. **Journal of American Chemical Society**, Washington DC, v. 123, p. 3391–3392, 2001.

STRATMANN, K.; MOORE, R.E.; BONJOUKLIAN, R.; DEETER, J.B.; PATTERSON, G.M. L.; SHAFFER, S.; SMITH, C.D.; SMITKA, T.A. Welwitindolinones, unusual alkaloids from the blue-green algae *Hapalosiphon welwitschii* and *Westiella intricata*: relationship to fischerindoles and hapalindoles. **Journal of the American Chemical Society**, Washington DC, v. 116, p. 9935–9942, 1994.

SUURNÄKKI, S.; GOMEZ-SAEZ, G.V.; RANTALA-YLINEN, A.; JOKELA, J.; FEWER, D.P.; SIVONEN, K. Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds. **Water Research**, Oslo, v. 68, p. 56–66, 2015.

TASSIGNY, M.; LAPORTE, G.; POURRIOT, R. Recherches sur les techniques de purification des cultures algales: élaboration des méthodes applicables aux Desmidiaceées et Cyanophyceées filamenteuses, Diatomeées. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 117, p. 64–75, 1969.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; BRAMBILLA, E.; DE WIT, R.; WIILMOTTE, A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 69, p. 5157–5169, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673–4680, 1994.

TILLET, D.; DITTMAN, E.; ERHARD, M.; VON DOHREN, H.; BORNER, T.; NEILAN, B.A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: as integrated peptide-polyketide synthetase system. **Chemical Biology**, Cambridge, v. 7, p. 753–764, 2000.

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

UTKILEN, H.; GJOLME, N. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 797–800, 1995.

VAN APELDOORN, M.E.; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.; BAKKER, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Molecular Nutritional Food Research**, Hoboken, v. 51, p. 7–60, 2007.

VÁSQUEZ-MARTÍNEZ, G.; RODRÍGUEZ, M.H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; IBARRA, J.E. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 57, p. 115–121, 2004.

VAZ, M.G.M.V.; BASTOS, R.W.; MILANEZ, G.P.; MOURA, M.N.; FERREIRA, E.G. PERIN, C.; PONTES, M.C.F.; NASCIMENTO, A.G. Use of sodium hypochlorite solutions to obtain axenic cultures of *Nostoc* strains (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 2 115-120, 2014.

WANG, H.; FEWER, D.P.; HOLM, L.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, L. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. **Proceedings of the National of Sciences of the USA**, Washington DC, v. 111, n. 25, p. 9529-9564, 2014.

WEBER, T.; BLIN, K.; DUDDELA, S.; KRUG, D.; KIM, H.U.; BRUCCOLERI, R.; LEE, S. Y.; FISCHBACH, M.A.; MÜLLER, R.; WOHLLEBEN, W.; BREITLING, R.; TAKANO, E.; MEDEMA, M.H. antiSMASH 3.0 — a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.45, n.1, p. 237-243, 2015.

WHITTON, B.A. Soils and rice-fields. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 233-255.

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

WOOD, D.; SALZBERG, S.L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biology**, London, v.15, n.3, p. 1-12, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998). **Guidelines for drinking-water quality**. 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization. pp. 95-100.

WRIGHT, A.D.; PAPENDORF, O.; KÖNIG, G.M. Ambigol C and 2,4 dichlorobenzoic acid, natural products produced by the terrestrial cyanobacterium *Fischerella ambigua*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 459-461, 2005.

YANG, F.; ZHOU, Y.; YIN, L.; ZHU, G.; LIANG, G.; PU, Z. Microcystin-degrading activity of an indigenous bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* MCLTH2 isolated from Lake Taihu. **PLoS One**, San Francisco, v.9, n.1, p. 1-7, 2014.

YOUNG, F.M.; THOMSON, C.; METCALF, J.S.; LUCOCQ, J.M.; CODD, G.A. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 151, p. 208–214, 2005.

ZHANG, J.; KOBERT, K.; FLOURI, T.; STAMATAKIS, A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2014.

ZHANG, W.; LOU, I.; UNG, W.K.; KONG, Y.; MOK, K.M. Application of PCR and real-time PCR for monitoring cyanobacteria, *Microcystis* spp. and *Cylindrospermopsis raciborskii* in Macau freshwater reservoir. **Frontiers of Earth Science**, Beijing, v. 8, n. 2, p. 291–301, 2014.

APÊNDICES

Apêndice A

Meios de cultura utilizados durante os experimentos deste trabalho

BG11 (ALLEN, 1968)

	Solução estoque	g.L ⁻¹	mL.L ⁻¹	Solução final (g.L ⁻¹)
1	NaNO ₃	150	10	1,5
2	K ₂ HPO ₄	40	1	4.10 ⁻²
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1	7,5.10 ⁻²
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	36	1	3,6.10 ⁻²
5	Ácido cítrico	6	1	6.10 ⁻³
6	Citrato de amônio férrico	6	1	1.10 ⁻³
7	EDTA.Na ₂	1	1	1.10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	2,86		2,8.10 ⁻³
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81		8,1.10 ⁻³
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,220		2,2.10 ⁻³
8	Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0,390	1	3,9.10 ⁻³
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079		7,9.10 ⁻⁵
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049		4,9.10 ⁻⁵

Z8 (KOTAI, 1972)

	Solução estoque	g.L ⁻¹	mL.L ⁻¹	Solução final (g.L ⁻¹)
1	NaNO ₃	46,70	10	0,46
2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5,9	10	5,9.10 ⁻²
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2,5		2,5.10 ⁻²
3	K ₂ HPO ₄	3,1	10	3,1.10 ⁻²
	Na ₂ CO ₃	2,1		2,1.10 ⁻²
4	Solução Fe*		10	2,8.10 ⁻³
	Solução EDTA**			
	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0,333		3,3.10 ⁻³
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,880		8,8.10 ⁻³
	KBr	1,2		1,2.10 ⁻²
	KI	0,83		8,3.10 ⁻³
5	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,87	1	2,8.10 ⁻³
	Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,55		1,5.10 ⁻³
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1,46		1,4.10 ⁻³
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,25		1,2.10 ⁻³
	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O	1,98		1,9.10 ⁻³
	Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,41		4,1.10 ⁻³
	V ₂ O ₅	0,089		8,9.10 ⁻⁴
	KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	4,74		4,7.10 ⁻³
	H ₃ BO ₃	3,1		3,1.10 ⁻³
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,6		1,6.10 ⁻³

*2,80 g FeCl₃.6H₂O dissolvidos em 100 mL 0.1 N HCl

** 3,90 g EDTA-Na₂ dissolvidos em 100 mL 0.1 N NaOH. 10 mL da solução Fe acrescidos de 9,5 mL da solução de EDTA são completados para 1000 mL de H₂O.

Agar triptona de soja (TSA, HiMedia)

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
Digestão pancreática de caseína	15
Cloreto de sódio	5
Digestão papaica de farinha de soja	5
Agar	15

Ajustar o pH, após a esterilização, para 7.3 ± 0.2

Agar R-2A (SP Labor)

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
Caseína ácida hidrolisada	0.5
Extrato de levedura	0.5
Peptona proteose	0.5
Dextrose	0.5
Amido solúvel	0.5
Fosfato dipotássico	0.3
Sulfato de magnésio	0.024
Piruvato de sódio	0.3
Agar	15

Ajustar o pH, após a esterilização, para 7.2 ± 0.2

APÊNDICE B

Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho (sentido 5' → 3')

Gene ribossomal 16S rRNA

27F1 AGAGTTTGATCCTGCTCAG
23S30R ACCTAGGCACACAGAGGCGAGG

Região interna do gene do 16S rRNA

357F CCTACGGGAGGCAGCAG
357R CTGCTGCCTCCCGTAGG
704F GTAGSGGTGAAATSCGTAGA
704R TCTACGSATTTCAACCSCTAC
1114F GCAACGAGCGMRACCC
1114R GGGTYKCGCTCGTTGC

Fragmento do gene ribossomal 16S rRNA com anelamento na região exclusiva de cianobactérias.

CYA GGGGAATYTTCCGCAATGGG
781a ATTACCGCGGCTGCTGG
781b GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT

Fragmento do gene ribossomal 16S rRNA com anelamento na região em comum de Bacteria.

P1F CCTACGGGAGGCAGCAG
P2R GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT

Vetor de clonagem

M13F GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
M13R GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG

Genes *mcy*

OMET-F TTATTCCAAGTTGCTCCCCA
MSR TGCAGATAACTCCGAGTTG
pB9R CCAATCVCTATCTAAACAC
pB3F CAAAARCARGCAGAAMTTCAGG
pC1F GGMTKTGGATTYTGASCATAT
pC13R CACTTTCTAACCCTGATTTTGCCA
*mcy*DF GATCCGATTGAATTAGAAAAG
*mcy*DR GTATTCCCCAAGATTGCC
*mcy*EF2 GAAATTTGTGTAGAAGGTGC
*mcy*ER4 AATTCTAAAGCCCCAAAGACG
*mcy*FKf GAACAAGAAKCMCCYAA
*mcy*FKr CCAGAAATAWAGGARCGA
*mcy*GF GAAATTGGTGC GGGAAGTGGAG
*mcy*GR TTTGAGCAACAATGATACTTTGCTG
*mcy*HKf CAAGAAATMGAACCYATTGC
*mcy*HKr AGGCGTTGTTGTTCTCCTA
*mcy*IdgenF TGTGCGTTATCCTAMTAA
*mcy*IdgenR GGCTTCTDCCCTGAAGC
*mcy*JKf GGYTATTGGMAAGARGAAAC
*mcy*JKr GCCATAAACCMCCYCKATYTC

APÊNDICE C

Sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA e dos genes *mcy* amplificados por PCR a partir de DNA da linhagem *Fischerella* sp. CENA161.

>CENA161.16S rRNA

```
GATGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGCTCTTTCGGGGGCAAGTGGCGGACGGGTGAGT
AACGCGTGAGAATCTGGCTCTAGGTTCTGGGACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGAGAGGTG
AAAGGTTAACTGCCTGGAGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGTGTAAAGGGACTACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAAC
CTCTTTTCTCAGGGAATAAGCAAGTGAAGGTACCTGAGGAATCAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTAGCAGTGTGTGTCTATTGT
TAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAGGCGGTAGAAACTACACAGCTAGAGTGCCTTCGGGGCAGAGGGAATTCC
TGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTGCTAGGCCGCAACTGACA
CTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGGATACTAGG
CGTTGAGAGTATCGACCTCTCAGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAGGGCTTGACATGTCTGGAATCTTGGGGAACTCAAGAGTGCCTTCGGGAGCCAGAACACAGGTGGTGC
ATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTACTTAGTTGCC
AGCACTTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCAT
GCCCCTTACGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGCTACGGACAAAGGGCAGCGAGACTGCGAAGTTAAGCAAA
TCTCAGAAACCGTAGCTCAGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGGAATCGCTAGTAATTGCA
GGTCAGCATACTGCAGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCTGGTCACGCC
CGAAGTCGTTACCCTAACCATTATTTGGAGGGGGACGCCGAAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTCAGGGAGACCTGCCCACTCAAGTTACCGAGAACA
ATGTAAAAGTTGGCAAGAGGTAATGAGTTGGTCATCCCAGGTCGGTCGTAGGATAGTAATAAGGCTTTCAAACCTA
TAGAAAGGTTTCGTGAAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGTTGAGGTCCCTGGTTC
GAGTCCAGGATGGCCCACTGAAGAATTTGAGATTGGCGATTTGAGATTGAGATTGAAGAAACATCAATTCCAA
ATCGCAAATGTAAAAATCGCAAGTTCAGTTTGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGA
TGTCAGGAGTTCGAGTCTCCTAACCTCCACCTTTAGAAAGAAACAAAGGACAAAGTCTAGCACCTGAAAGCAAAAA
AGTCAGACTGCTGGGTATTGTTCCAGGCCAGAACCTTGAAAACCTGCATAGAGAAGCGAAAGTATGGTAGTCAGTAG
TCAGTGAACAGTTTACAGGAATCAAAAATTGATAGCTGGTAACAGAGAACTGAAGACTGAACAGACACGAAAGTGT
AAAGAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTTGCGGAGGAT
```

>CENA161.*mcyA* (997pb)

```
CTGCCGCCATTATTGGGGTACAGACATCTCACCAGTGGCAATAGACTACATTCAGCAGCAATTGAGTCAACTACA
GCCAGACTTAGATCATGTGAATCTATTGCAACGTGCAGCCGATAATTTTGAGGGTTTAGAGGCACAAGGATTTGA
CACCATTATCCTCAACTCGGTCTGTCAGTACTTCCCCCACATTGATTATTTGTTGCGCGTTTTAGAAGGTGCAGT
GAATGTAGTTGTCCCTGGAGGCTGTATTTTCTTGGGAGATGTACGAAATCTGCAATTACTAGAAGCTTTCCACGC
CTCTGTGGAGTTGCATAAAGCTCCGCCTGAGCTATCTGTAGCCCAAGTGGCAACAACGTGTACACAAGCAAATTGC
CCAAGAGAATGAACTACTCATTACCCAGCCTTCTTTACAGCTATTCAGCAGCGTTTTTCCCCAAATTACCCATGT
ACAGATCCAGCTACAGCAAGGTGAGCACCACAACGAACCTCAATTTTCGCTACAACGTTCTACTGCGTGTGGG
AGCTGCGGGGGATGTTCCCCAGAATGTTTCAGTGGTTGGACTGGCAAAACCAACAACCTCACATTGTCTGCGGTGCG
ACATCTGCTAGTAGAGACAAAACCTGAAATCATGGGTTTTACACGGATACCAAATGCAAGATTAATAACATCTCT
AAAAAGTGCCGCACTCCTGGAAAATCCCCAGGAATATCAGACAGTCAGCCAATTACATCAACTGATAAATGCGAT
CGTCCCCAATCAGGAGTCGAACCTGATGACTTTTATGCTCTAGCTGAAGTTTTGTCCTATTCTGTAGTTGTTAC
TTGGTCAGATTCCAGTATATTAGACTACTACGATGTCATTTTTGTGCAACGCCAAAGTCAGGGGCAAGTCCCTGT
GAGAGCGTTTACTCCAGCAAAAAGCAAACCAACATGACTGGCGATTTTATACCAACCAACCTTTACAGCCAAG
GTTGAACCGTCAACTCATACCC
```

>CENA161.mcyB (766pb)

AATACGCTTATAGCACTCTGGCGGAAGTACAAAGGCTGAGTGATGTACCACCAGGAGTCCCCTTATTTGAAAGTT
 TGGTGGTGTGTTGAGAACTATCCTATGGATAGCTTGTGAGAAGAGCCAAATCAATTATTGCCGATCAGCAAGGTAG
 AGAATTTTGAAGAAACAACTATCCTTTGACTGTGGCAGCAATACCCAAAAAGAATTACTCATAAAATTTAGTT
 ACGATACTAGTCGTTTTACAAACAATACAATTGTGCGGATGGCTGGCCATTTACAGACCTTGTTAACAGCCATTG
 TCGCTAATCCCCAGCAGCAGGTAGCTGATCTGCCGCTCTTGACAGAGGTAGAACGACATCAGTTATTAGTAGAGT
 GGAACAATACTCAAGCTGACTATCCTCAAGATAAATCAATCCATCAGCTATTTGAAGAACAAGTAGAACGCAACC
 CTGATGCGGTAGCTGTTATCTTTGAAAAATCAAAAAATTAATTTATCAACAATTAATGAACAAGCCAATCAATTAG
 CTCACTATTTGCGAACAAAAGGCGTAGAACCAGAAAGTATTGGTAGGAATTTTGTGAGCGTTCAATTGAGATGG
 TAGTCGGACTACTAGGAATTTTAAAGGCAGGAGGAGCTTATCTACCTTTAGATCCTAGTTATCCAACAGAGCGCT
 TGACTCATATGATCTCCGATGCAGCAGTGCCAATTTTACTAACTCAGCAATCTCTGGTAGATTTTTTACCAGCAA
 ATCAAGCTGAGGTAGT

>CENA161.mcyC(481pb)

AAGTGAATATTCCAGTGGTTATAATATTAGGCTGGCGATGAGAATTAATGGCAGCTTAGATATTTTGGCATTGAC
 AGCAGCTTTCCAACAACCTAGTGAGTCGCCACGAAATTTTGCCTACTACTTTTACAAGTGTTGCAGGCAAGATTCA
 GCAAATAGTGATGAAAAATTTATCTACAGAAGAGTTAATAAATTTTAAAGATTTAAGAGAAGAAAAAGATGCTGA
 GAGCATAGCTGATAGACTAATTCAAGAGTCAGCAAACTCGCGTTTTGATTTGGAGAATTTACCTTTAATGCGAGT
 TTTGTTAATACAGATCAAGTCAGAAGATTTTTTGTGTTGGCTTGACTATACATCATATTATTGGGGATGCGCGATC
 GCTCGATATCCTTTTTCAAGAGTTCGTCACTTTTATACTCTGCTTGACGCAACAACAACTGCTGCCCTACCTCC
 ACTATCATTGCAGTATAAGGATTATGCTGCA

>CENA161.mcyD (839pb)

TATGGCTGCGGTTTTTGGGAAACGTCCCCAAAATCGACCTTTAATTATTGGTTCTGTCAAAACCAATTTAGGACA
 TTTAGAAGGAGCAGCTGGAATTGCTGGATTAATCAAACTGTTTTAGCCTTGCAAAACAATAAAATTCCTCCCCA
 TCTTCACTTTCAACAACCCAATCCTCGTTTTGATTGGAGTTCTGATATTTTTGAAGTTCAGTACATGGAAAAAA
 CTGGCATTCTAGTGAACGTCAACGCATTCAGGAGTCAGTTCTTTTGGATTTAGTGGTACGAATGCTCATGTAAT
 TGTAGGAGAAATTGCCGATTATTCTACCCGAAATTTTGATCAAAAATTTTACCTGTTACCCTTTTCGGCTCGTTC
 CGAAAAATCTCTCCAAGAATTAGCAAAAAATTTATCAATCTTCTTTTAATGAATCTGTTAATTTAGCAGATGCGTG
 TTTTACTGCTAGCAGGAAGATCTGTTTTTCGCCATAGATTGTGTATCTTAGCCGAATCAATCACCACAGTTCA
 ACAAGCACTTATTGATTTTCAAACAGGTGAGGATTATGAGAATTTAATTACACCAATTTTATCAGAAATTCAGCC
 CGATGTCGCTTTTCTATTTTTCAGGACAAGGTTCCCAATATTTCAGGGATGGGACAAACGCTTTTATAATCAAGAACC
 CGTTTTTTAAAAATACTTTAGATCTTTGTCAACCAATCCTCGAACCAATTTTAGAAACATCACTGTTAGATATAAT
 CTTTGAATTGCAAAATAGTGATTTGCTACAACAGACTCAAATTACCCAGCCAGCCTTATTTGCACTTGAATATTC
 ACTAGCTAAATTAT

>CENA161.mcyE(769pb)

AGCATTAGCAGCTGGTTATCACAATCTCCCCCAAATCACCAAAGAAAAATTTCAACCAAGCTTTATTAGTGAGGG
 AAGAACTCTTTTTAGAACCGAGATTTAGGTAAACAAATTGCTCCTGGTGTGATTGAATTTATTGGTCGCAAGA
 TAATCAAGTTAAAGTCAATGGTTATCGCATAGACCCAGGAGAAATCGAATATCAACTCAACCGTCATGCTGATAT
 TGACAGAGCAATTGTCTTACCTATCGAGGTAGATAATCGAATTCGAATTATCTGCTTATTGTCAAACCTGCCAAAGA
 TATAGAAATTTTTGACATCCGAAAAATTTCTCTCTCATGCTTTGCCAGTTTATATGATTCCCTAGTTATTTTATTTT
 ATTAAGCAATTTCTCTCACTAGACATGGAAAAATTGACTGGCGATCGCTCCTTGAACCTCCAAGAAACGAGTAA
 ATCAACACAGGTAAATTATACAGCACCACGTAATAGTTTAGATTCCAGACTAGTCAATATCTGGGAAAAATTTAT
 TAGCAAACGTCCCATCGGTATTTTTGATAATTTTTTGAATCGGTGGACACTCTCTGCTACTTTTCGCGAGTTGT
 AACTCATGTTCAATAAGAATTAAATGTAGTAGTCAAATTGGCTGATTTTTTTAAAGTTCTTACCATCGCCGGATT
 AGCAGCTTTAGTATCTCAAGCCCAATATGACTATCAAAAACCCATACCACCAATCACTCAGCAAACATCTTATCC
 TATGTCTCATGGACAACGG

>CENA161.mcyF (447pb)

CGTGATTGTTTTCTCACTTCCATCTGCACCTGACCGCACAAAGTTCTATTAATAGTGGAATGAAAGAGAATTTAT
 TGATTTCATACAATTGCATTTGGAAACACTCAATAAATTAGTTGATCGGATAGTAATTGGTTGTTGTACAGCACA
 TTATGCTCTACCTCATATTCTGAGCATCTTACTAATAAGGTAATTTCTTAAATTAATAATTTGCAGACCAACAAC
 GCAAGAACATGATGAACCAGCTATTTTACTAGCAGGTACTGGGACTTATCGTAAAAAATTTATTTACGAAGGTTG
 TACTGCTGCTAATCGCATTTATTTCTCTATCTGAAAAAGACCAATACCTTAATCCATGATATTATCTTTAAAGTACT
 AAAACGAGGGCAAGATCCACTGACAATCTTCCAGATATCGAAGAATTGTTAGATAAATACAAGACTCGCTC

>CENA161.*mcyG* (485pb)

GAAGTACCCATGAAATTCTCAAAGCTTGCACCTCTTACCAAATGATCTACACATTTACTGATATTTACCATTCT
 TTTTAGAGAACGCGAAAGATACCTTTGCTCAATCCCCTTCATAGAATACAACTTCTGGACATAGAAAAAATC
 CAGAAATGCAAAATTTTTCACCCAATACCTATGATTTGATTATTGCGGCAAATGTATTGCATTTCGACGCGGGATT
 TGCAAGCAGAAACATTACCTCACATTCGGAATTTATTGCGTCCTGGCGGACATTTGTTACTTTTAGAACTCACCA
 ATCAATCGCGGTGGATTGATTTGATATTTGGCTTGACTCAAGGTTGGTGGCGATTTAGCGATCGCCATTTACGCC
 CAGATCATCCGATTATTACAGCATCTACATGGCAATCTATTCTGTTAGAATCAGGTTTTGCTGAAGTTGAATTTA
 TTTCTCCTGATCAAAAAATTGGTAGTGCTTTATTC

>CENA161.*mcyH* (1016pb)

CAGGACTGCTCTGAATTTTTCAGCTACTTTTGTTAGAAAAATCCTGGAAATGACGACTTTTTTAATAATTCTTTG
 GTCAATTTCCCAACTGGCTGTAGCTATTCTGCTTGTTTATACAATTATAGGCAATATAATTGCTGTGTACTTGAG
 TCAAGAAATTAGATAAAAATTACTCAAGAGGAACCTGAATTTAAAGCTAATTACACTTACAGCCTGACTCATGTTTCG
 CAATCACGCCGAATCGATAGCATTTCTTCAAGGAGAAGACCAAGAATTAAATATTATTTCAGCGCCGATTTAATAA
 TCTGATCAAAAAGTTCTGTAAGCAAAATTGAGTGGGAAAAAATAAAGATATTTTTAACAGGGGATATCGGTCTAT
 TATCCAAATATTTCCGTTTGTAATATTCGCACCTGCATATATTCGTGGAGAAATTGATTTTCGACAAAGTTAACCA
 AGCAGTCATCGCTTGTAAGTATGGTTGCTAATGGTTTGGCAGCATTAATAGATGAATTTGGAACCTCTGGACGATT
 TTCTAGTTATGTTGAGCGTTTAGCTGAATTTTCAGATGCTTTAGAATCTGTCACTAAACAACCAGAGAATGTAAG
 TACGATTAAAACCTATTGAAGAAAACCGTCTGGCTTTTGAATGTTACTTTACAAACACCAAATTATGAACAAGT
 GATCGTCGAAGATTTGTCACTTTCTGTTCAACCAGGCGAAGGTTTATTAATTGTTGGGCTTAGTGGTCGGGGTAA
 AAGTTCTTTACTCAGAGCTATTGCTGGTTTGTGGAATGCAGGAACAGGTCGTTTAATGCGACCTCCTAGAGAAGA
 TGTTTTGTTTTTACCTCAACGTCCATATATCATTTTGGGAACCTTTCGCGCAACAGTTACTTTATCCAAGTACAAA
 TCATCAAATGACCGACACACAACCTCAAAGATGTTTTACAACAAGTTAACCTTGAAAACGTAGAAACAAAAGGCGG
 TGGTTTCGATGCAGAGGTACCTTGGGAGAATATATTATCGT

>CENA161.*mcyI* (756pb)

ATTAGATGCTCAAGCGATCGCATTAGCCAAAAATTTAAAGTTATCAGTACATCTGGATTTGGAACCTGATGCAAT
 TAATATTGCTGCTGCAACAAAAACAGGGGATTGTTGTAGTCAACAATCCTGGTTTGTCAACAACCGCTGTTGCTGA
 ACACACGATTTGCATGATTTTAGCTTTAGCGAAAAAGCTGACTTTTCTCAATCAGTGTGTCAAAACAGGAAACTA
 CCTGATTTCGTAATCAGGTACAACCAATGCAACTCGAAGGAAAAACACTTGGAATTGTTGGTTTGGGAAGAATTGG
 TAGTGCTGTGCGCCATAAGTGCAGTACAGCATTCAGATGCGAGTTTTAGCATACGATCCTTACGTCCTGGCTAG
 TAAAGCAGAAGCATTGGGTGGAACCTTTGGTAAATGATTTAGAATACCTTTTGGCTGAATCCGACTTTGTATCTTT
 ACACCTGAATTAACCGATGAAACCTATGAAATGTTTGCTCTAGAACTTTTGAATAAATGAAATCCACTGCTTT
 CTTAATCAATACATCTCGTGGGAAGATAGTTTCAGAAAAAGATTTGGTTGTAGCTATCCATGAAAAATTGATCGC
 AGGAGCAGCAATAGATGTGTTTGTAGCCAGAACCCCATCTCACGATAATCCTTTGTATGACTTTGACAATGTAAT
 TTTGTCACCCCATCTCGCTGGAGTTACACCTGAAGCTGCTATAGCTGCTGCACCTTCCGCAGCTAATCAAATACT
 GCAAGT

>CENA161.*mcyJ* (650pb)

TACTTATAACCAAGCTTGTGCTGCTTTAGCTCGTAAATTAGGAGAACTTGCAGAACTTAGTTCTGGGGATCAAGT
 TCTAGATGTTGGCTTCGGTTTTGGCGAACAAGATATACTCTGGATACATGAAAATAATGTTGGCTCAATTACTGG
 TATTAATACTACGGAATTACAAGTAGAAATTGCTAAAGAAAGAATAGCTAGAGCGGGATTAGCTGAACGAATACA
 TCTCCATGTAGGTTTCGGCTACAAAAATACCTTTTCCAGAACATTCCTTTGATAAAGTTACAGCTTTAGAATGTGC
 TTTTCATTTCAATACTCGTGAGGATTTCTTTGCTGAAGCCTTTTCAGATTTTACGTCCTGGTGGAAGCTTGCAAT
 AGCAGATTGTTTACCTAGAGTAGGGCGAGATATTAACCTTTTGGCTTCGCATCAATAGTAAAAAATGTGTATTCC
 TTTGCTAATCAATATAATCAACATACCTTATGTTGAAAAACTCAAAAAGCATGGGTTTATAAATATTCAAGCTGT
 ATCTATTAGTGAATATGTTTGGCTGCTATGGTTCAATTTTTGCAAGGTAGGCAAAGGGGTTAGTAAACATGA
 CCTAGTAATTGATCTCCAGAAAGATAATCCAGGAATTGAAGCTTGGTCAA

APÊNDICE D

Sequências completas de aminoácidos *Mcy* obtidos por sequenciamento genômico da linhagem *Fischerella* sp. CENA161.

>McyA

MELKEKNLVAIDYQIRQIKDNQPVTPLEFKNVSSNQIEHKNKIINPISTSLHNKIHKLTTNSPVNKLVLVLYLSTIKV
LILKYTAQEEFVIATGALNQDTSDSLIFSRFDHQQFVIFKDLLQATRSHLQEGYRYQNYDPDGLIETFLARGGNP
ETILDIAFIQQGLCSYSSLLNSFQLVFEIDPQDTSVAVTFFPKDAFHTNFIQRM LGHFQQI LETVTADPDCELSAI
DILT TAEREQLLTQWNNTAIQYPQDKCIHQLFEEQVEKSPDAIAVVFADQKLQ LNEESNQLAHYLQKLGVKPEVM
VGICLERSLDMVVGLLGILKAGGAYVPLDPSYPTERLSYLLLED TAVEVLLTQQSLTELLPRHQATVVS LDTDWQV
IAQESQKNFNSGVEGDNLAYVIYTSGSTGKPKGAMNTHKGISNRLLWMQD TYQLTPSDRILQKTPFSFDVSVWEF
FWPLLAGATLVIAKPQGHQDSAYLIKLIQQQQITTIHFVPSMLRVFLQERDLTNC SCLKRVICSGEALPYELTQS
FFEHFNCELHNLVGPTEAAIDVTYRCLPQIQQQIVPIGRPITNTQIYILDQYLQPVVPGIAGELHIGGVGLARG
YLNQPELTSSQKFISHPFGDGKLYKTGDLARYLPDGNIEYLGRIDHQVKIRGFRIELGEIETVLSQHPAVEQAVVI
AHEAETGNKSLLAYIVQNSQPNNAVEHNQELELFDEQVWQWQMLYNQTY SQANVEPDPIFNIVGWNSSYT GQPI P
AVQMREWLNDKVETILAQQPKRVLEIGCGTGLILFQVAPHRHYWGTDISPVAIDYIQQQLSQLQPNLDHVNLLQ
RAADNFEGLEAQGFDTIILNSVVQYFPHIDYLLRVLEGAVNVVPGGCIFLGDVRNLQLLEAFHASVELHKAPPE
LSVAQWQQRVHKQIAQENELLIHPAFFTAIQQRFPQITHVQIQ LQQGQHHELTQFRYNVLLRVGAAGDVPQNVQ
WLDWQNQQLTLSAVRHLLVETKPEIMGFTRIPNARLITSLKSAALLENPQEYQTVS QLHQLINAIAPQSGVEPDD
FYALAEVLSYSVVVTWSDSSILDYDVIFVQRQSQGVVPVRAFTPSKKQTKHDWRFYTNQPLQPRLNRLIPQLR
SYLQTLLEPYMMPNAAFVLLDAIPLTTNGKIDRRALPSPEQIRLELADTFVAPCTPIEEMLALI WSEVLGIEQVGI
HDNFFELGGDSIRGIAIAKARQIGFDFSLPQLLQHQTIQELAGLV SRELSSLPIQKTEAFSLISEEQRVNLSKG
VEDAYPLAALQAGMIFHSEYSTNVPIYHDVFTYHIRATLNLQILHTAIKQV VNRHAVLR TSFALTDYQQPLQLVH
LQVDVPLNLDLSHLSTTDQEVTLDTWIEQEKRHF DWNVPPLRFHVHRR TSETFNLTLSFHHSILDGWSVASL
LTEL LQQYLYLLGKNVPLSAPPKIAFRDFVALEQTTVQSQEYREYWQQKLN DITITKLPRWSQSNLTINSWEFS
VPISSGVSQGLKQLSKTAGVPLKSVLLAAHFRVLSLLTNQTDILTGLV SNGRLEDTDGEKVLGFLNLTPLRLQL
LGGSWIDL VHQTFDIERECLHLRRYPLAELQRTFGGQQLFETAFNFVHFHVYQSIIDVKDLEILGGKFFNQTNFT
LLANFSLHPISSQVELTLKYDANQLGEEQIKMIGGYREALTAMASQSSELYEYHCLLTDAQQHQLLVKWNNTKA
DHAQNKCLHQLFVEQVECNPD AVAVVFRNQQLTYRQLNEQANQLAHYLQTKGVKPEVLVGICVERS LDMIVGLLG
ILKVG GAYVPLDPAYPTERLEMILADSQVS VLLTQQKL VTRLPE NTADVTLDTDKATISLESQKNPVSQVNPRN
SAYVIYTSGSTGKPKGVVIEHHSSVALLCWAKEVFTSEELAGVLATTSICFDLSVFELFVPLAWGGKVI IAENAL
DLSSIKAAQDITLINTVPSAIAQLLEIQAI PNSVRTINLAGEPLSNQLAQRLYQQENIERVYNLYGPSED TTYST
FSLVTKGSTQLPSIGRPISNTQIYILNQYLQVPPIGTVGELYIGGEGLARGYFNQPELTSSQKFISHPFGDRKLYQ
TGD LARYLPDGNIEFLGRSDNQVKLRGFRIELGEIAAVLETYPQIKQAVVILREDTPENKKLVAYVVTQSQSTNI
SDLRRFLQQKL PDYMTPSAFVYLEALPLTPNGKVN RKMLPVPEVESTREQE FVPPQTANEQILATI WQDVLGVKQ
VSR YDKFFEMGGDSILSIQVVGRRARQAGIKITPRQIFQYPSLAELA AVADTTT SILAEQGLVTGVVPLTPIQHWF
FEQNQSQPHHFNQSVLLQISSHLKPELLSQVITK LLEHHDALRLRFNFEEGKWKQISDRISDEIPFQVIDLGQTS
QSQLTQTLEQIATTQQASLNLTSTGPLIRVVLFKLGNNQDSRLLII IHHLAVDGVSWRILLED LFTAYQQLEQQET
IQLPLKTLAFRDWAI FLQEYQGANIVRSQLDYWLKQPWSELNSLPVDDPTGKQNNSVANAANVS VYLSKEQTRDL
LQKVPSAYNTQINDVLLTALVQTLTQWTEKSTVCIDLEGHGREDLFADVDVSRTV GWFTSIFPVILQLENQNRPG
EALKSIKEQLRAIPQH GIGYGILRYLNQDQEIRSQIAALPPREVSFNYLGQFDQGLLGVDWKLAESKGSNQN L
EGHRTYLLDITARVLEEQLQVNWSYSRHHVHQHSTVESLAQKYLQSLQTLIDHCLCPEVGGYTPSDFPVADLNQQE
LDEILAEID

>McyB

MVAEKSQKSKNVELIYPLSPMQQGM LFHSIYTPDSGVYCTQTLITISASINIVAFQRAW EKVV ERYSVLRTLFLW
EKRQQPLQIVRKQVDLPWNYEDWRNFS PKEQQEHLDSLQTERQTGFQLNQAPLMRCHLIRLSDQTYEFLWNRHH
IILDGWSLP I IYQDVLTFYKSENQGCYLP PPRPYQDYIVWLKQQDLSVAENFWRR TLEGFTAPTPLMVDRPLV
HSSGVQPTYQE QEINLSRATTQGLESLGLQYGLTSLTLLQA AWAILLSRYSGEPEVLFVGTVSGRPASLP AVENM
VGLFINTLPLRV SIPSS ELIIPWLQKLQQKQAE LQEYAYSTLA EVQR LSDVPPGVPLFESLVVFENYPMDSLSEE
PNQLLPISKVENFEETNYPLTVAAIPK KELLIKFSYDTSRFTNNTIVRMAGHLQTLTLLTAIVANPQQQVADLPLLT

EVERHQLLVEWNNTQADYPQDKSIHQLFEEQVERNPDAAVAVIFEDQELTYQQLNEQANQLAHYLQAKGVEPEVLV
GIFIERSIEMVVGLLGILKAGGAYLPLDPSYPTERLTHMISDAAVPILLTQQCMTTFLIWEDTASKQLL

MYDNFFDLGGHSLKAIALVSQIQEKLALPFQLKEVFSHPTIAEQAELLTTCASISVPQIPHLSSEQETYQTSHAQR
RFFVLQQMDLNNVAYHIVSALKIEGNFDLGAFEKAMQVLIARHESLRTSFVLVNGEPRQVRANFDFSVGFQDWT
HKPNAESQIIIEIIKQYREPFNLEISPLLRSNYKYLSEQKYILFLEIHIIICDGWSMDLLAKECLTYNYFVKGLQ
PNPEKLPIQYKDYAVWQANILRSEDNRKNLDYWRQKLDNGQIPRVHLPTDFQRPSIKTFNGSHLSWTFKPELVSE
LRGICQQTESTLFMALSAAVKVLLYRYSQGQYDIAIGTEIATRNPQLQSLIGLFLNLTLVIRDQIEPKQGYKNLLN
KVRKTVTEAFEHADYPFDILVEELAISREINRTPFLFDVLVLLQNFDQPGVIEEIQIESLDLLTPTSKFDLSFVFS
EHNDKLRDLIYNTDLFQAERMEKCLSYFDELLTEMVNPSPICEISLLSPTEIALVKKFIEPIPRLEKRTVIH
DFIDQVKATPDKTSIVYPGEEFSYQELDIITNSWASILNFLGIQKDTICGVMLEGDYRQVLGMLAVFKAGGIYLP
LRLDEPEERFSRMMKTSPTIVVNNENLGTVPKRLAILSKPPQILVVTDHEIQYYQWNGINYQCLPVVASNDE
KPLIMPDADDSNYIMFTSGSTGEPKAILGSHGSLRHFINWEKQEFGINQDWRCQLIAQINFDAYLRETTLVTLCSG
GTLYIPNSTDREDSERLLLKLGEWQINLLHTVPSVMRFLNIGRNLANADQLLKNLRVFLVGGEPLFVKELCEWH
QVFGSQAEFVNIYGASETTFKVHFHRIADPNKITYARVPGGKTLPEAVFAVIDGTRPCAVGEVGEIFVKSPYLT
GYYQDENLNSVFPNPLNYGTDVVYRTGDLGRLLPDLTVEVIGRSDNQIKLNGVRIELAEIEDALAGIDGVKKV
VVIAQKQDESVTITAYYQGDENINYQHISNQLKQVLPYMQPNYLMQLADFPLLPNGKINRLALPKPEANISQTS
NEITNFNQQEVLLASIWNELLEVDSANQSFFELGGNSLKAMRLVSHIRNNFGVTLRLREIFTQNTLKAQALLI
KSRQ

>McyC

MIKSLPNQKYYEVSHAQRRMWILHHISEYSSGYNIRLAMRINGSLDILALTAAFQQLVSRHEILRTTFTSVAGKI
QQIVHENLSTEELINFKDLREEKDAESIADRLIQESANSRFDLENLPLMRVLLIQUIKSEDFLFLGTIHHIIGDAR
SLDILFQEFVTLYSACTQQQTAALPPLSLQYKDYAAWQNQWLESDEIKEQHXYWCDRFAVQPPILNLPDTPRPQ
FKSSQAGVYTYDFSQSLSEKLRSFAGQNHTTLFIILLTLFKILLYRYTGQRDLVIGIPISGRNHPDENQIGFYV
NTLALRTLPLPETGTGFQEALVEVTNTCLDAYEYSNYPFDKLVSALDLERDLNRNPLFDVMFSLLSQESKAVMKIPG
LVHQEYPLQPRTAQFDLGSFFEDGKNLKLIEYETDIFREQTIARMSGHFLQVIQSVLENPHCQLSEINLLTPE
ERDQLLTPLLIILRLTY

MQLARGYLNQPELTNQKFISNPFQGRLYKTGDLARYLSDGNIEYLGRIDHQVKLRGLRIELGEIESVLDTHPHV
EQTVVVLRTDTSSENQRLVAYIVRRDNLSTQSELRQFLQKKLPVYMIPSAFVMLSDDLPLNPSGKIDTKQLPPPDEA
SIVESTYLPNRNQTESILANIWQQVLQVSNIGVNDNFFDLGGHSLQAMNLIALIYQELEIEIPLSMIYDKPTVAE
LSEYIIYAQEMNIQPKERPYPVFNQQRNQAFLFPALGFATAYANLADYLNQDYTIYTFRYIADEASLEKYAELI
DHLTVNQDIKLMGHSAGGFLAMLMAQKLESRDIVSDVILLDTYRGGREAKQADMSEIKEGVDTFLLNPKRQELR
RYFLDNQKLRDRTYNQVWEYFSLWHSDIKNLQINGNIHLIRAEGNYDVADDWIQATKGQRINHYAYGLHREMID
PPYLEQNATIINAILNQ

>McyD

MDISDNDKSIQTRVFKALNEAKEKLKAVEAKQTEPIAVIGLGRFGKNISTPESFWSFLKTGGNTLTNIPSDRWN
TSDFYDSRDRSKPGKIYISQGGFLDDVSMFDPHFFGIAPREALHIDPQQRLLLEVAYEALENAGMAAPTTRIGKTG
VFIGITNNDYARLISPNEGYSTIGAYHISGNHTNAAAGRISYLLNLNGPSLAVDTACSSSLVAVHLACRSLRAQE
CRQALVGGVNLILTPEVPIALCKNQMLAADGRCKTFDASADGFGIGEGCGVVVLKRLSEALADGDRIWALIRGTA
VNNDGASGGFTVPNGPVQTDLIREALIDARLNADIIDYVEAHGTGTSGLDPIEIKAIADALCVNRSRSQPLLVS
IKTNLGHAAAAAGISGLIKTVLSIYYSEIPAHNLNQTNPINWDSLPIINVVTLTRPWTVSNSKMKAAAGVSSFGA
SGTNAHVILSEPPQVKFHKNRFPVLVTLAKDEERLHLIANNFVDYINKKPKINLNDIAFSLNTGRFHHNQRLA
LLVSNVTSFQKQLRSFTSDHSRETNIIHGEAQGNPKIAFLFHDHQAIFSGIGEDFFVNEPIFHDAFDRCDRLFQN
YFNFSIENLLYNNQNIDNHLISIQPILFALQYAICELWKSNGITPTAVLGTGFGEYLAQQAGVFSLEDAVKLVAT
RVRLFSNNQNLDQEKVLAFQKVAEKIIYNNPQLTLINSLNGEVASNYVKNAAYWVQNLQSEHIYQGISLLNKL
YQIFDIETGNQPIILTKIDQSNLPNKKILWLCSLAKDGSNEQQIQTVLAELYVRGVDINWQEFHRSRLGQKISLPNS
PFIRKRYWVDSVRKPHHDHSGHPLLGDRFSPSLSSIQYRASVSQHNPAFLAEHQVFGKPIFPGAFFIEMALAATE
GEAVIVENIEFKKALILQDKVDNLQLVINQESFQIYHQVDHNWDVLVAGEIQKLKSIDSIVQNLEQITANSPEQL
EISAFYEIYKSGVNYGNSFQLINQLQCSQNTAFAQIKLTDNLRLEAKNYHFHPAMLDACFQAIAAILFQQESSV

TYVPIRIGKFQFFKSPGERIISAVRLTNNSHNLVISDIDIYSEQGELLVSIIGFELKAVQRQEILHNGTQPQSYI
 EEWIPLPSLLPDGRDTPNNVIKTQVQPPQLEQQQLADKLQYERLLAEMESLSVSYIWEGLKQLNWQPELGQIY
 QEQQIAVQGGVVDYFYPRLLSRCLAILAEEGILNQQQNGWLLIKEPEIFSSQLQIQHLRSRFPDYLAELNLIERCG
 AALANVMRCQIEPLELLFPQGDNLAIASVYSDAAGAKLMNELVAANIRCAVANLPTNRQLRILEIGGGTGSSTAA
 ILPHLPQKQIEYVFTDISSSFLTRAKENFSHYPIKYQTLDIENNPFTQGFLPGSFDIIIAANVLHATADINKTL
 ENVRSLMAPNALIVLLESTGARRWVDLTFGLTGGWWLCSQDPLRNGYPLMDTKHWQDLLTNHQFTEINVIEPNKS
 QTRNLLRQSVIVAKGNNVCKPVSHELIFADSKENTHNLVTSLQQRGVACSVICPDINPDHPDDYLSLLQNLNP
 ETREIIYLWPLQEIVGEIYQTVEIFCRRFLFLIQALLQQENPPSLILVTQGSVPAKEITTLTSPAQSSLLGIAFS
 LILEHPELNFRAIDVDPHTQDFGEKLFREIYSNTQENRVALRGEQRFCPRLIERKLTGDNINFRQDGYLLVSGGT
 GGLGLATARWMIERGARHLVLCRSRGAKAVNTEVLASLQTTNADIKIKDIDIIDAELKHTLLEECRSQYPVRGIF
 HIAGTLDDTILIRLTPEFSFNHVLAPKVKGTTWLLHQLTLNDPLDFFVCYTSAVSLIGSPGQANAAAAANAFEDAFTY
 YRHAQNLPATAINWGPWSEIGAADVDRNVLERLAAGYDAIAPDLALQTLKILFNQILRAGVIAIDWERFPYINQ
 NFYQNFLPQGQTKSPTKSNILEQWQAVPIKQRRDLLIRHISLRVSTVLGLSIGEISPPQGGFFDLGMDSLTSTELR
 NLLQTDFNCSLPATITFRFPNVEALADYILREVLNISEVQISAKLIPEIPQIQVEKSIKPTPQQQEDPIVIVGM
 ACRFPGGANDVESFWKLLLEEGKDAVGEIPGDRWDSQAWYHPDPTPGKIYSPYGAFLDQVDQDAEFFGIVPREA
 VAIDPQQRLLETSWQALESAGQNPQQLRNSQTGVFVGAMTQDYAQLSYAPEAINAYTSGSTSVSVAAGRLSYVL
 GLQGPSMTVDTACSSSLVAVHLAYNALRNGECDIALAGGVNIILTPIISLIESRAHMLAPDGRCKTFDASANGMV
 RGECCGMIVLKRLSQAIKNGDRILARVYGTAVNHDGPSSGLTVPNGDAQEKLLHQALKTAQLKPEQIDYIEAHGT
 GTAIGDPFIELESMAAVFGKRPQNRPLIIGSVKTNLGHLEGAAGIAGLIKTVLALQNNKIPPHLHFQQPNPRFDWS
 SDIFEVPVHGKNWHSSERQRIAGVSSFGSGTNAHVIVGEIADYSTRNFDQKFYLLPLSARSEKSLQELAKNYQS
 SFNESVNLADACFTASTGRSVFRHRLCILAESITTVQQALIDFQTGEDYENLITPISSEIQPDVAFFLSFGQGSQY
 SGMGQTLYNQEPVFKNTLDLCHQILEPILETSLLDIIFELQNSDLLQQTQITQPALFALEYSLAKLWQSWG IQPS
 ALLGHSIGEYVAACLAGVFSLEDGLQLVVQGRMLGELPQNGAMVAIYADYQTVLDHLNPNYKNQVNIAAANGAIN
 VISGLSEIVEQLEKTFIEQGYKTRRLAVSHAFHSPMEAMLDDFAKILSKISFHEPSLKIISNLTGKPIGKEIAT
 PDYWLSHIRNTVHFGQGFYKYLIDTGYRCFLELGSKPVLGMARLSYQTKDILWLPSIIPGQNEQAQMYKSLATLF
 VNGYSVEWTGVFKPGKRIPLPTYPFQREYRWLSNSQFSIAAIQNNLHPFISDFKKLATGEIIFEGEITSQQPDYL
 AEHKVFNKTIFFPATGFIEAILAASQKIFTHGLVTIQNVSIHQGLLLSVSPTTLQLIFKTKKSSEYSLEIFSSNSA
 KDNWILHVTGEIKPHNQKAPTSISNWSDFKGESIAVPEFYELYQQMGITYGQRFQAIQELRYLNGNSQAQISIDR
 SLADQRYCLHPVLIDACLQSIGAAFEIHGQELHLPYGFSSLELFGNPGSQAETRI FVKSDSNSEMRVDVEVYNQ
 QQQLCARFIDLVARRTHPAVLQHLWQESEQNWFYQIQWQYLNVSVNIAHNSKSWLIFVPSSTVLDQLINLLKQA
 GERVITVELGDDYKRRSQDNFVINLSQKSDFORLYQEAYPSGEFPTGVIFAWENAPVAEYADTVYKSSHAVNLNI
 QTITTSWQKLPDLWLVTNRANQILTDASIQPQQYCLWGLGAVINQEYPMRCVCCLDSPTEEPDEAEFLFQELHS
 FSNELRLALRQGNRYGARLVSATIPPAQKQQFVSKEGAYLITGGLGKLGLLLAQWLSKMGASHLVLC SRNIKSLP
 EAIASLRQNGTQITVIGADITSADVIEQIFSRFGVDLPPLRGVIAHAGILDDGLLSNQNWARYENVMRPKVEGTL
 LLDTRYTRNLSLDDFITFSSAAVILGSPGQSSYAAANSFMDALMQQRQSLGLPGISINWGAWDTENEIEKQRFASW
 GIQSMSSDLALKYLSSELIMGVNSQGSIIDINWSKFNQVFTINQPFFAEVLITKEDIQNSAKLLEKLNSLPIDER
 AESLIQGIEQILREVTGLSGNNFIPQQTSTFLELGLNSLMVLEFKNRLETNLACSLSASIIFDYPNLTSLSITYIRE
 EVLATYVDFEVRINTQADDIHYPYDSLNEEELTILLNQKLAELDQYGE

>McyE

MSQNTDYKKLIATTLTKMEAMQARITELEGRESEPIAVVGMGCRFPGGINSPEAYWNYCLAGLDAIVEVPKSRWD
 ISKFYAQEVTPGKMNTYGGFLQEDITEFDARFFSISAREAMSIDPQQRLLEVTWEALANLPPNNLASDRVG
 VFIGITSIDHAMTVYKSNYEQIDSFFGTGNALSAAAGRLSYFLNLRGPCMSIDAACASSLVAVHQAIRSLRNYEC
 ELALVGGVNLILNPAITINLSQSGMMSPDGRCKTFDAAANGYVRGEGCGVLVLKRLSAAQKKGDRI LAVLRGSAV
 NHNGAAAGLTVPSGPAQQDLLRQALADARITSEKVGYIEAHGTGTS LGDPDIEMNAIAAVYGERSQPLYVGSVKTN
 IGHLEAAAGIAGMIKTILALQHGEIPPHLHFQEPNPLVNWQKYNIKIPTQTSPPWDNGAVRIAGVSSFGSGTNA
 HVIVEQAPIAEMPAIKQQLPSHLLTISAHNQIALKELARRFYTRLEFEPEIGDICYSAAIGRSALPERLAIADT
 LPQLQQLRAAFADKTLDNSTFYQRYTGEKQPKIVFLFTGQGACYPGMGEQLYQTQPTFRKYIDQCAAILANHLE
 YPLVEILFGDRDLDLNLQATAYAPAIFALEYAIAMLWQSWGITPGLLIGHSVGEYVAACVAGVFSLEAGLALIVKR
 GQLMQAAPIGKMASVFADETTVNSLIQNYTNQVAIAAINHPQQIVISGASNGIDEIITNCKNQKIAAQHLSVAGA
 FHSPILIEPILDEFETFARRISYNHPQNLLISGIDGQVFKTAPDASYWRQQSRQPVQFLQSLITAINKGYNLFLFV
 GSRPILVEQGRRYNDELILWSSLNRGVDNWQTILSTLGQLYTHGIHFNAENFNADYGYRNIQLPNYPFQRKRKF
 QSYNETSIEKEVITMTQSTISNNQKYQQDIRHQKLSILALLKENENDIRDETLLNLGADSIILTDFARKIEEK

LGIKIKIDQLFTDLQTITEIAQYLANFVKQESLETSVKLANNDSELSNYLWVISQLQPIVIAYILKALAVLGKKL
 NRAESWTTENLLQTLPIAPKYYILISRYLKTLEQAGILQNGNVWTVKNLPTPVDLPAAIENLQQTCPAAKPELE
 MLQRCGENLPEVIKGNIDPLELIFPAGSVVHAESIYGASPVSRMLNQRVSEAINDILKSFDLSDRSNQIIIEIGGG
 TGATSEAILNHLNLSHATYTFTELSPVLLNKARQKFQONQSGLKHFQLDIEKSPVSQGLPAHSYHIVVAANVLHST
 RNITETLNHIRELLLPGGYLVLLETVENNSWLDLTFGLTPGWWRFDKELRVDSPLLSGETWCTVLKSCGFATAD
 SFSQKNNISIIYNGQELIIACAAEESVSEAPKFIPVAAASSGKEALMMAQLQSLKELKELHEKTI IKQLEVLQSVS
 VTPKTETLIIPPSLPQTSKIETVSPQTSKTDTVKKTGSPNLNPLALKLNENKSLTEKQQA FIRNLQVIYNKKA
 KSKAYSQNSRKSMVDVKPTIDFRMALKEFQYPIVSESAQGAYFRDIDGNDYIDLAMGFGVNFFGHSPDFVLSAIQ
 QQMEHGI GLMQSNIAAETASLISEIAGVERVAFSNTGTAEAIMGAIRIARSRTKRPKIAVFAGSYHGTDFDGILAR
 VGEEPPTAQPLSPGTPLGMVEDVIVLTYGAEESLDIIAAHADNLA AVLVEPVQSRKPDLPKEFLKQLRKLTQEQ
 EIALIFDEIITGFRIAPGGAQEWFDVEADIVVYGKAIGGGLPISMICGKADFLDTIDGGFWSYGDHSHPQTELT
 YGGTFCRHPALAAACRAVLLHLRQQGATIQETVNQLTNRLATEVNQFFQEVGIPIRIVHFGSLFRFEPFGAYSIF
 LQPIELPLFYLLNLKGIYTWEKRVCFSTSTHNTEDIDKVVTAVKEVIELQQAGFFENAKPPQAKKTEVSDRSD
 DEDGRNNLKKQFPTSEAQRQLWLMGELDTNAAAYNVTTSLHLHGDLDSLQEAINEVVRHEALRTKILAQGE
 IQEVVPQIKIDLPLINLTDEKNPETTSFTFRTOQAQKPFDLSTAPLFAAALIRLAPEHHLLSLKTHHIVADGWSL
 GVILNEIGKLYSAKIGGATNYLASPMQFQOYLALRQQAQNPQMLEHRNFWLQTYEGEIPVFELTTDFPRPAVKT
 YTGGRESKIIASQLWKNLQTVGRKNQATLFMTMFAAYTAFLQRIFGQDDLVIIGIPISGRQIEGSETLVGFCSQFL
 PIRIQPDVTTSFVEHLHHTKNTLIAAFKHQNYALEELLSALQLQRDFRSPLISVSFNMDPSLTLPGFEGLKVSL
 PPEPIGYTPFDLGFNFIEVDNDLIVYCNYNTELFKQKTIQQFLTSEILLEGVIDNVNSLLYQLPLITQIQQKL
 WSELGTETIELPQNITIIINDFIAKVNSTPNVPALIVGQTSLTRENEQVNRNLANYLHQEHLRGAGKAIAMLMGR
 NQHIIIGILAI FKTGATYVPIDPQYPSNRIDFILKDSGCQVCLTESNLISQLPQNTETICLDKIAHILADFDNDE
 PQLQRDYNQIAYIILYTSGSTGNPKGVMGRHISILNVIRSLRLTFDLQHPWRYIFTAPITHDPSLRNIFLPLSI
 GAALYMYEVQHIGDLVEFLQANQINALHTTTPSIYREMLNVLAPTETISGVGQKEDETTNRIRQSRSRVDKAYAK
 KEFLKEERNENHPANMQFPISSLYISAGGEKLDREIAIALRKRFPISAIISNVYGSTETCVGVSQYTI GTNLDTD
 VPLGQVFHNNRFLVLDDEFNNTVPLHVGEICVEGAALAAGYHNL PQITKEKFQPSFISEGRTLFRGTDLGKQIAP
 GVIEFIGRKNQVKVNGYRIDPGEIEYQLNRHADIDRAIVLPIEVDNRIQLSAYCQTAKDIEIFDIRKFLSHALP
 VYMIPSYFILLKQFPLTRHGKIDWRSLELQETSKSTQVNYTAPRNSLDSRLVNIWEKFISKRPIGIFDNFFEIG
 GHSLLLSRVVTHVHKELNVVVKLADFFKVPTIAGLAALVSQAQYDYQKPIPPITQQTSYPM SHGQRRWLWALEFLD
 RHHNAYGMP SAYQFNGNLNIAAFETAQDLIRRHEILRTTFTLIDNQPRQVVHEQMNFALQQIDLTEYAEPERTK
 IIAEYVDKNAKTTFDLEMGPLLKVSLLKLNQHSIIILFNMHHIISDGWSAGVLIKDFLTHYHAYGQQNSELPSP
 KIH YKDYSDWQEKQFETSILQAQRDYWLAKLTPLPARLDPLDYARPAVQNFQGTAVTWKPNQELIKRFEVLIKT
 QQASLFMGLVTLVKSFLFCYTEQNEITIGSPIAGRNHPDLEEQIGFYVNTLVLCDRIAADDSFASLLTKVKTTL
 FAYENQEYFPDKLVSDLVNQRDPSRNPIFDIVVVLQNNQNVLDALDGITVNFIEQKIVTSKFDLEFI FLDEAELC
 LKLIYNTDIFANERISLIINLLESLEAVVKS PDPPLLQIPFYRKNSEIEDSNLFGTDFNF

>McyF

MNKKLPTLGVLGGMGPVVTAEFFKSIYEHNQFIDNEQEAPNVIVFSLPSAPDRTSSINSGNEREFIDFIQLHLET
 LNKLVDRIVIGCCTAHYALPHIPEHLTNKVISLIKIADQQLEHDEPAILLAGTGTYRKKLFHEGCTAANRIISL
 SEKDQYLIHDIIFKVLKRGQDPLTILPDIEELLDKYKTRSYISACTEFHLLTKSLKLNIDSIAKIDPLTTIAQN
 LFQLEPVIYSINSKSLPEKRKYLKKFKFICNIDFFK

>McyG

MDIHRSIKLT KYLHDQSHDELIQENTCENS MFFGGYLEDNLRILPNLLVDAIKHESKGITYIKNDEAEYFQSYK
 DLYKDALVILNGLYKYGLKLGDKVILQIGINQDFIPTLWACFLGGIIPVPLSVAPNYDLENAAVKKLYNVWQILD
 KPVILSDCELISNIEKLATQPHLKGLRVSVNNLRINQNSQNLHAIIPDFAPRDPALLLFTSGSTGLPKGVMLS
 HSNLLSMSAGTVRMNFTQQEVTLNWMPLDHVGAI VFLGIMAVDLACDQIHVPIELILRQPLKWLDLIQKHQATI
 SWAPNFAFSLINQHTTEELNHSCYNLSSMKFLVNAGEQVSVKTI RSFLELLEKHQLRDGVIKPAFGMTESCSGITW
 SAGLSKDELIEENSFVSLGKPIPGATIRIVDQQNHILPENEIGKLQIKGPSVTEGYYNHPELNQELFQDDGWFTT
 GDLGYLHKGELFITGREKQEI IINGINYFAHEIETAIEELEGV AISYTAFAVFDKNKETDLLIIIFSPELNNFE
 QWVRLVREIRSYLTQKIGIAPAHVIPLEADLVPKTSIGKVQAKLQKDFIQGLFSDRIQKINEYLASDRTKNQTL
 PQSETERQIAAVWCEVLQLESVGLHDNFFELGGHSLYLIRVQNQLEKLFRRQIPVAEMFKNSTVATLAYFLTDQS
 NSTTDISQKSRQRAENRSRSHIHDIAIIGMAGKFP GANNLEIFWENLKNGIETISFFSEAEELLES GVEPELFN

QPNYVKARPILDNVECFDSEFFGYTDREAELLDPQQRLLQLCSWECLNAGYNNSHSYQGAIGMFAGASMNTYLIN
 NCYPNRRGQLDANDELQPFITLDSMGGFQTMVANDKDYLTTRISYKLNLRGPSVNVQTACSTGLVVVHMACQSLLSG
 DSDMALAGAASINSPQKIGYLYQEGLIVSPDGHCRAFDAQAEGTIFGSGVGVVLLKRLQDAIADNDHIYAVIKGS
 AINNDGGTKLGFTAPGGEGQTSVAAEALAFAGVEADTIGFVEAHGTGTLGDPIEIDALARAYSTAHQGEALGS
 VKTNIGHMQIASGIVGLIKTALALKHQIIPPTLHFQTPNPQIDFSKTPFYINTQAIPTWAKQRDGKELPRRAGVN
 SLGIGGVNVHVILEEAPTIIIPQQHDNQRPHHLLTLSARTEQGLLDLANSYAEFLENHPETDIDCVVFTANTSRVH
 FQNRLAVTGSQTGDFITKLRQFEQSDQESIVYAQVDEKQPPKIAFLFTGQGSQYAGMAHQLYQTQPTFRQILDQC
 ETIYQELTSQSLLKVI FAHSDISLTYTSYTQPALFVIEVALAQLWHSWGIQPTAILGHSLEGEYAAACFAGIFDIE
 SGLKLITQRANLIGELPADQGAMAAIFIDQKSVRQVCENQEIKVAIAAINTDQHTVISGKKELIKQLCEYFTNIG
 IKVRQLKVSHAFHSPLIEPVCEEFFKTLRKINFAPKQIPIISNLTGEIADDSIVTPEYWIQHLLHTVQFHQGVVS
 LQSLGCDTFIEIGPQPVLLGIIQSSISLSNSLSPLSRSGFSDWEVLES LGKIYVRGANIDWFGVEQDYQPRRC
 ALPTYFPQQSRHWIPLKTQLPTTSESSNIVKMLSQKDTNTLMQTLEETGNYSEGEKQTVSAIVQQLIKHLHQNRD
 HGNFEDLLYQVEWLPCALSPDKLQNLKILINIEADLEEQIQSAQFTGISLAFAMEELSADFIKALKDLQLFE
 LNTILSPKTSFSETGMKEEYKMLWNHCLKILAKTGVQLKHNADEWIIKEPRQSHPDLIIDNLITQYPNARVELTL
 FRRVATNLAAIITGKISPLSILFSQDGQVGATEFYKDTSWAKVLNFTISQTIELLLSNYSPLEPLRILEIGAGTG
 GTTHEILKACTSYQMIYTFITDISPFLENAKDTFAQFPFIEYKLLDIEKNPELQNFSPNTYDLIIAANVLHSTRD
 LQAETLPHIRNLLRPGHLLLELTNQSRWIDLIFGLTQGWWRFSRHLRDPDHPIITASTWQSILLESFGFAEVEF
 ISPDQKIGSALFQQSIIVAQNSKQISDISGDWLIFTDRADNLALAIQEQLSKYYGCCAIANPNSSELETWLA VSS
 SARGI IYLLDADHSNQYESTLFNRC SYFLNLLQAIKNLPSPPKLFVLTQGGQPFGLERPSFVTQSPWLSMGRVIA
 LEEP ELWGGMIDLDPHADIAQNTTFLFSGLINSVTE DHLLFRNGQTYIARLVPIESLATKPVIIQAQATYLITGG
 IGHGLQLAHHLVDFGAKHLIITTRRQFP SKAEWELNTEFAEIIQNLKILEQKGVSVVEVCQADVGNFEQMSRIFA
 NIQKTSYPLRGIFHLAGISGRKARLSDCTLDLEELFQAKVSGSWNLHQLSLDTQLDYFVLFSAGAIWGAKEQG
 LYDAVNHHMDALAYLRHLEGLPATTLNWALLAGNGIVSQDYEHWLKQIGMNEIPLDKAFQAMD AIIASDKTQILL
 ADVDWVQFKNIYQFQGNKSLLEKLGKLQTPVKHVQKSKSQRSFLEDVPPGERRENLE YIGKEVAKILGIKHIPD
 PEQGF IEMGIDSLLSIELKNRLEKGLEIALPATLIFDFPNIRKLIDYLVEQIFAWQVNTTMETTLDVVEVNEDLI
 LQELADLEAFLGNS

>McyH

MQTEVFHKKQNSNNIPIISGFTKFWNYVNAIASPYWYPTDPKGRPFSDVIRSWGMLILLILLIIISLVGVTALNSFV
 DRYLIDVIVQQKEMSLFAKTL SIYGIGLLITLLTGFTK FVRKKIALDWYQWLNRRILEKYLSDRAYYKINFRSD
 VDNPDQRLSQEIEPIARTALNFAATLLEKILEMTTFLIILWSISQLAVAILLVYTIIGNIIAVYLSQELDKITQE
 ELEFKANYTYSLTHVRNHAESIAFFQGEDQELNIIQRRFNLIKSSVSKIEWEKNKDI FNRGYRSIIQIFFPVIF
 APAYIRGEIDFGQVNQAVIACSMFANGLAALIDEFGTSGRFSYVERLAEFSDALESVTKQPENVTIKTIEENR
 LAFENVTLQTPNYEQVIVEDLSLSVQPGEGLLIVGPSGRGKSSLLRAIAGLWNAGTGRMLRPPREDVLF LPQRPY
 IILGTLREQLLPSTNHQMTDTQLKDV LQQVNLENVETKGGGFD AEVPWENILSLGEQQRLAFARLLITHPRFTI
 LDEATSALDLKNEENLYQQI QSTNTTFISVGHRESLFKYHQWVLELSQNSSWRLVSMHDYQLEKV

>McyI

MTAIFPQIPTVNIKNHKILLIGRMYHETGEKFLQEYTNVEILKEPTNNQIYDAIQEASGVFVRYPTKLDAQAIAL
 AKNLKVISTSGFGTDAINIAAATKQGIVVVNNPGLSTTAVAEHTICMILALAKKLTFLNQCVKTGNYLIRNQVQP
 MQLEGKTLGIVGLGRIGSAVAHKCSTAFQMRVLAYDPYVLASKAEALGGTLVNDLEYLLAESDFVSLHPELTDEY
 EMFALETFEKMKSTAFLINTSRGKIVREKDLVVAIHEKLIAGAAIDVFEPEPPSHDNPLYDFDNVILSPHLAGVT
 PEAAIAAALSAANQILQVLQGGKPPHIVNPEVWQKFPPDLQ

>McyJ

MENIGKIPFNDEWRNRWIIKEFIKNPVQEISFLRDNFQVSELYTGIAKRDPNLHDPNVPQWLNFGYWEETTYN
 QACAALARKLGELAE LSSGDQVLDVGFGEQDILWIHENNVSITGINTTELQVEIAKERIARAGLAERIH LHV
 GSATKIPFPEHSFDKVTALECAHFHNTREDFFAEAFRVL RPGGKLALADCLPRVGRDINFWRIRNSKKMCIPFAN
 QYNQHTYVEKLKKHGFINIQA VSISEYVWPAMVHYFAKVGKGVSKHDLVIDLQKDNPGIEAWSRNRGWFMGFDDY
 ILFSGEKADNEKI