

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

**TAIANE FERNANDA DOS SANTOS BARRADAS**

**Genômica comparativa da cianobactéria *Limnospira platensis* formadora  
de florações em lagoas do Pantanal (MS)**

**Piracicaba**

**2020**



TAIANE FERNANDA DOS SANTOS BARRADAS

**Genômica comparativa da cianobactéria *Limnospira platensis* formadora  
de florações em lagoas do Pantanal (MS)**

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

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

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

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marli de Fátima Fiore**

**Piracicaba**

**2020**

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

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

Barradas, Taiane Fernanda dos Santos

Genômica comparativa da cianobactéria *Limnospira platensis* formadora de florações em lagoas do Pantanal (MS) / Taiane Fernanda dos Santos Barradas; Marli de Fátima Fiore. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

70 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Genes de resistência 2. Genoma 3. Genômica comparativa  
4. Sequenciamento genético 5. Sistema Crispr/Cas I. Título.

CDU 575.511 : 582.232

**Elaborada por:**

Marília Ribeiro Garcia Henyei  
CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

## DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Marina e Aniel, por sempre apoiarem meus sonhos e caminharem comigo  
durante essa jornada.

À Everton C. Francisquini (*in memoriam*).

Dedico.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me manter de pé nos momentos difíceis.

Agradeço à Profa. Dra. Marli de Fátima Fiore, pela orientação e amizade durante todo esse período;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida (133914/2018-6);

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

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

Aos Prof. Dr. Luis Branco e Prof. Dr. Diego Pachón suporte durante a realização deste estudo;

Aos amigos de Laboratório, Juliana Costa, Bruno Evangelista, Endrews Delbaje, Thierry Pellegrinetti, Gladys Castillo, Caroline Carvalho, Stella Lima e Rafael Dextro, que foram fundamentais para a conclusão do projeto, agradeço pelo carinho, apoio nos momentos mais difíceis, gratidão por tudo;

Às estagiárias Lara Losovoi e Julia Formagio, pela amizade e ajuda. A pós doc Simone Cotta, pelo suporte oferecido;

Às técnicas do Laboratório Ana Paula Andreotti e Renata Cruz, que além da ajuda, foram amigas;

Às minhas tias Kathiane e Keila Santos, minha mãe Kelly e meu irmão Guilherme Felipe, por me apoiarem em qualquer decisão;

Aos meus amigos de Presidente Epitácio - SP, que sempre se mantiveram por perto, mesmo a distancia;

Às minhas amigas de república de Presidente Prudente – SP, Nair Karina, Vanessa Dantas, Letícia Jalloul e Dayane Costa, pelos anos de amizade;

Aos amigos de Piracicaba, Nathália Lopes, Anna Fett, Paul Lineker, Yara Barros, Cátia e Carla Simon, Ayumi Kinoshita, Larissa Maffeis;

À família Briigliadori, por terem sido tão presentes e acolhedores nesse período tão importante para mim, obrigada pelo carinho e palavras de conforto.

À família Cavalieri Francisquini, por serem minha segunda família e me ajudarem em tudo que precisei.

À todos que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.





“O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é  
consentido sermos crianças por toda a vida.”  
**Albert Einstein**



## RESUMO

BARRADAS, T. F. S. **Genômica comparativa da cianobactéria *Limnospira platensis* formadora de florações em lagoas do Pantanal (MS)**. 2020. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

As análises genômicas possibilitam investigar a capacidade funcional e as adaptações ambientais de numerosos microrganismos de relevância global, incluindo as cianobactérias. Nas condições extremas das lagoas salino-alcálinas do pantanal, as cianobactérias têm importância ecológica fundamental como produtores primários e engenheiras de ecossistemas. Embora o seu papel nos ciclos biogeoquímicos seja reconhecido, muito pouco se sabe sobre a composição dos genomas cianobacterianos do Pantanal. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar análises genômicas e funcionais de duas linhagens de *Limnospira platensis* isoladas do pantanal brasileiro visando a compreensão de sua evolução, ecologia e adaptação funcional. Para isso, as linhagens foram submetidas a um tratamento com Extran (0,1) para reduzir a abundância da comunidade de bactérias associadas e o DNA extraído das células tratadas foi sequenciado em uma plataforma HiSeq e analisado com ferramentas genômicas. O sequenciamento e a montagem dos genomas geraram 28 scaffolds para a linhagem CENA650 com conteúdo GC de 44,13% e tamanho 7.193.576 bp, enquanto que a linhagem CENA597 apresentou um (1) scaffold com conteúdo GC de 44,14% e tamanho de 7.483.160 bp. A análise filogenética baseada no gene de 16S rRNA posicionou as linhagens CENA597 e CENA650 em um clado bem suportado de *Limnospira*, dentro de um subclado formado somente por linhagens de *Limnospira platensis*. A análise filogenômica baseada no alinhamento de 120 proteínas conservadas em todas as cianobactérias posicionou as linhagens CENA597 e CENA650 no clado contendo linhagens do gênero *Limnospira*. Os resultados mostraram que apesar da distância geográfica (~ 21 km) entre as duas lagoas de onde as duas linhagens foram isoladas, os seus genomas são muito semelhantes, o que era esperado uma vez que as pressões seletivas são similares, reduzindo as divergências do genótipo. Entretanto, a análise genômica comparativa dessas duas linhagens com *L. platensis* originárias de regiões mais distantes mostrou diferenças significativas. O diagrama de Venn identificou 3649 clusters de genes que foram compartilhados por todas as linhagens analisadas, indicando a conservação destes genes. Foram encontrados genes específicos que estão envolvidos na resistência a metais pesados e em respostas celulares a estresses oxidativos, resistência a patógenos e a antibióticos. A mineração dos genomas identificou genes específicos relacionados a adaptação ao ambiente extremo estudado, o que possivelmente contribuem para a sobrevivência e a dominância da *L. platensis*. Os genomas sequenciados neste estudo trazem importantes contribuições para a taxonomia e conhecimento da distribuição do gênero *Limnospira*, além de permitir futuras explorações do potencial biotecnológico desses isolados.

Palavras-chave: Genoma. Taxonomia. Filogenômica. Genes adaptativos. Ambiente extremo.



## ABSTRACT

BARRADAS, T.F.S. **Comparative genomics of bloom-forming cyanobacterium *Limnospira platensis* in Pantanal lakes (MS)**. 2020. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

Genomic analyses allow to investigate the functional capacity and environmental adaptations of numerous microorganisms of global relevance, including cyanobacteria. In the harsh conditions of saline-alkaline of Pantanal lakes, cyanobacteria are of fundamental ecological importance as primary producers and ecosystem engineers. Although its role in biogeochemical cycles is recognized, little is known about the composition of cyanobacterial genomes from Pantanal. Thus, the objective of this study was to perform genomic and functional analyses of two strains of *Limnospira platensis* isolated from the Brazilian Pantanal in order to understanding their evolution, ecology and functional adaptation. For this, the strains were subjected to a treatment with Extran (0.1%) to reduce the abundance of associated bacteria community, and the DNA extracted from treated cells was sequenced in a HiSeq platform and analysed with genomic tools. The sequencing and assembly of the genomes generated 28 scaffolds for the strain CENA650, with 44.13% GC content and size of 7,193,576 bp, while the strain CENA597 showed one (1) scaffold, with 44.14% GC content and size of 7,483,160 bp. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene positioned the strains CENA597 and CENA650 in a well-supported *Limnospira* clade, within a subclade formed only by *Limnospira platensis* strains. Phylogenomic analysis based on the alignment of 120 conserved proteins in all cyanobacteria positioned the strains CENA597 and CENA650 in the clade containing strains of the genus *Limnospira*. The results showed that despite the geographic distance (~ 21 km) between the two lakes from which the two strains were isolated, their genomes are very similar, which was expected since the selective pressures are similar, reducing the divergences of the genotype. However, the comparative genomic analysis of these two strains with *L. platensis* originating from more distant regions showed significant differences. The Venn diagram identified 3649 clusters of genes that were shared by all strains analyzed, indicating the conservation of these genes. Specific genes involved in resistance to heavy metals and in cellular responses to oxidative stress, resistance to pathogens and antibiotics were found. The genome mining identified specific genes related to adaptation to the extreme environment studied, which possibly contribute to the survival and dominance of this cyanobacterial species. The genomes sequenced in this study bring important contributions to the taxonomy and knowledge of the distribution of the genus *Limnospira*, in addition to allowing future explorations of the biotechnological potential of these isolates.

Keywords: Genome. Taxonomy. Phylogenomic. Adaptive genes. Extreme environment.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões, conforme Silva e Abdon (1998) (adaptado por Rezende Filho, 2003) .....	22
Figura 2. Floração de <i>L. platensis</i> na Salina Pedra do Sol (adaptado de Santos, 2013) .....	27
Figura 3. A-D. Aspecto geral dos tricomas regularmente espiralados e com aerótopos de <i>Limnospira platensis</i> em lagoas salinas do Pantanal. A, B. Amostras da Salina Pantanal; C. Salina da Reserva; D. Salina do Meio; E-F. Amostras da Salina do Meio. E. Tricoma sem aerótopos, F. Hormogônios com grânulos e sem aerótopos. Escalas = 10 µm (adaptado de Santos, 2013) .....	31
Figura 4. Localização geográfica das lagoas onde foram coletadas as linhagens cianobacterianas CENA597 e CENA650 .....	34
Figura 5. Microfotografias da <i>Limnospira platensis</i> CENA650 em cultura. a: Células apicais arredondas; b: Visão geral do tricoma; c: Grânulos visíveis; d: Flutuação livre .....	40
Figura 6. Qualidade Phred das bases por leitura dos dados brutos sequenciamento da linhagem <i>Limnospira platensis</i> CENA597 .....	40
Figura 7. Qualidade Phred das bases por leitura dos dados brutos do sequenciamento da linhagem <i>Limnospira platensis</i> CENA650 .....	41
Figura 8. Qualidade Phred das bases por leitura do sequenciamento da linhagem <i>Limnospira platensis</i> CENA597 após a trimagem das reads .....	41
Figura 9. Qualidade Phred das bases por leitura do sequenciamento da linhagem <i>Limnospira platensis</i> CENA650 após a trimagem das reads .....	42
Figura 10. Posicionamento filogenético do gênero <i>Limnospira</i> com base no gene de 16S RNAr inferido pela árvore máxima verossimilhança com os valores de pontuação de bootstrap. Barra, 0,1 alterações por posição de nucleotídeo .....	45
Figura 11. Árvore filogenômica de máxima verossimilhança baseada no alinhamento de 120 proteínas conservadas em genomas de cianobactérias. As linhagens <i>L. platensis</i> CENA597 e <i>L. platensis</i> CENA650 são indicadas em negrito. Barra, 0,1 alterações por posição de nucleotídeo .....	47
Figura 12. Subsistema da linhagem <i>Limnospira platensis</i> CENA650 .....	49

Figura 13. Subsistema da linhagem <i>Limnospira platensis</i> CENA597 .....	49
Figura 14. Diagrama de Venn mostrando a distribuição de famílias de genes compartilhados (clusters ortólogos) entre as linhagens de <i>Limnospira/Arthrospira</i> .....	51
Figura 15. Análise genômica comparativa de 13 linhagens de <i>Limnospira</i> .....	52
Figura 16. Tabela de ausência e presença de genes relacionados aos mecanismos de concentração de carbono das linhagens de <i>Limnospira</i> .....	53
Figura 17. Tabela de ausência e presença de genes de fósforo .....	55
Figura 18. Tabela ausência e presença de genes relacionados à resistência de salinidade .....	56
Figura 19. Tabela ausência e presença de genes relacionados à resistência a altas temperaturas .....	57
Figura 20. Mapeamento genômico de genes da proteína Cas e arranjos de genômicos preditos .....	59
Figura 21. Mapeamento genômico de genes da proteína Cas e arranjos de genômicos preditos na linhagem <i>L. platensis</i> CENA650 .....	60



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Principais características separando os gêneros <i>Arthrospira</i> Stinzenberger 1852 e <i>Spirulina</i> Turpin 1829 (Vonshak e Tomaselli, 2000) .....	24
Tabela 2. Distribuição de espécies de <i>Limnospira</i> no Brasil observadas em amostras da natureza .....	26
Tabela 3. Genomas de espécies de <i>Limnospira</i> disponíveis em bancos de dados públicos .....	31
Tabela 4. Avaliação de sequências contaminantes das bibliotecas de sequenciamento .....	43
Tabela 5. Avaliação da qualidade das montagens genômicas .....	43



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1	O Pantanal e a sub-região da Nhecolândia .....	21
2.2	Reclassificação de espécies do gênero <i>Arthrospira</i> .....	23
2.3	O gênero <i>Limnospira</i> / <i>Arthrospira</i> .....	23
2.4	<i>Arthrospira platensis</i> das lagoas salino-alcálinas do Pantanal.....	27
2.5	Genomas de <i>Limnospira</i> / <i>Arthrospira</i> .....	30
3.	OBJETIVOS .....	32
3.1	Objetivo geral .....	32
3.2	Objetivos específicos:.....	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Origem e cultivo das linhagens de <i>Limnospira platensis</i> .....	33
4.2	Produção de biomassa .....	34
4.3	Caracterização morfológica.....	35
4.4	Extração de DNA, preparo da biblioteca genômica e sequenciamento.....	36
4.5	Montagens dos genomas.....	36
4.6	Análise comparativa dos genomas de <i>Limnospira</i> .....	37
4.7	Anotações de genes ou agrupamentos gênicos de interesse .....	37
4.8	Análise filogenômica.....	37
4.9	Filogenia do gene 16S RNAr .....	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1	Caracterização morfológica.....	39
5.2	Análise de qualidade das sequências, montagem do genoma .....	40
5.3	Análises filogenéticas com base no gene 16S rRNA e nos genomas.....	43
5.4	Anotação funcional dos genomas de <i>Limnospira platensis</i> CENA597 e CENA650.....	46

5.5	Análise comparativa entre os genomas de <i>Limnospira/Arthrospira</i> .....	48
5.5.1	Mecanismo de concentração de carbono .....	51
5.5.2	Fósforo .....	52
5.5.3	Salinidade.....	53
5.5.4	Temperatura .....	54
5.5.5	Sistema CRISPR/Cas .....	55
6.	CONCLUSÕES .....	59
	REFERÊNCIAS .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias possuem bilhões de anos de evolução (Schirmer et al., 2016) e têm persistido no ambiente enfrentando as flutuações climáticas extremas e glaciação em escala global (Fairchild; Kennedy, 2007). Como tal, as cianobactérias são organismos altamente resilientes e evoluíram estratégias para sobreviver em muitos ambientes extremos (Seckbach, 2007). Nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal, devido às condições ambientais extremas, não existem plantas no seu interior e na periferia (Costa; Telmer, 2006). Assim, a importância relativa de outros fotoautotróficos, como as cianobactérias, conseqüentemente é ampliada, principalmente com relação aos processos de sequestro de carbono e sustentação da cadeia alimentar microbiana. Frequentes e muitas vezes contínuas florações de cianobactérias, principalmente dos gêneros *Arthrospira* e *Anabaenopsis*, são observadas nas lagoas salino-alcálicas do Pantanal brasileiro (Santos; Sant’Anna, 2010; Almeida et al., 2011; Costa et al., 2016; Andreote et al., 2018). Nos habitats onde a luz e água líquida estão prontamente disponíveis, as cianobactérias podem constituir um componente importante das comunidades microbianas, contribuindo para a fixação de carbono e nitrogênio e, muitas vezes, atuando como engenheiras do ecossistema (Whitton, 2012).

Com o advento das tecnologias ômicas (i.e., genômica, metagenômica, transcriptômica, proteômica), os limites das análises dos processos mediados por cianobactérias se expandem de observações e medidas de fluxos de nutrientes para uma compreensão muito mais profunda dos mecanismos moleculares que permitem que esses processos aconteçam e, ao mesmo tempo auxilia na elucidação de como as cianobactérias evoluíram e se adaptaram a uma variedade de ecossistemas diferentes. Por exemplo, o uso da genômica tem expandido o conhecimento sobre cianobactérias em ecossistemas marinhos principalmente com relação à diferenciação de nichos, adaptação funcional e biogeografia (Coleman; Chisholm, 2010; Dufresne et al., 2003; Kashtan et al., 2014; Kent et al., 2016; Palenik et al., 2006; Scanlan et al., 2009; Sun; Blanchard, 2014; Walworth et al., 2015) e em águas termais sobre os mecanismos de sobrevivência nesse ambiente extremo (Bhaya et al., 2007; Klatt et al., 2011). As novas tecnologias de sequenciamento de ácidos desoxirribonucleicos disponibilizadas para a comunidade científica a partir da década de 2000 permitem a análise de um volume muito maior de nucleotídeos e conseqüentemente a realização de projetos de genômica e metagenômica de maneira mais rápida e menos onerosa. A bioinformática tem acompanhado esse avanço, disponibilizando um número considerável de programas computacionais para a análise do crescente volume de informação que se torna

possível pelas novas plataformas de sequenciamento. Essas tecnologias são ferramentas poderosas para a compreensão da diversidade, função, adaptação e evolução de microorganismos e comunidades microbianas em diversos ambientes.

Foram encontrados disponíveis onze genomas de *Arthrospira* (Janssen et al., 2010; Fujisawa et al., 2010; Carrieri et al., 2011; Cheevadhanarak et al., 2012; Lefort et al., 2014; Dong et al., 2015; 2018; Xu et al., 2016; Waleron et al., 2017; Zorz et al., 2019; Suziki et al., 2019). Embora as informações relacionadas com o tipo de água de origem das linhagens com genomas não estejam todas disponíveis, as três isoladas de lagoas da República Chade (um país localizado no centro-norte da África e nenhuma é do continente americano) são de águas salinoalcalinas (Fujisawa et al., 2010; Carrieri et al., 2011; Cheevadhanarak et al., 2012). Considerando o número de genomas cianobacterianos ainda diminuto em comparação com a enorme quantidade de genomas disponíveis para bactérias de outros filos, a atenção dispensada para o gênero *Arthrospira* se deve ao fato de sua importância comercial devido ao seu alto valor nutricional, sendo matéria prima para indústria alimentícia, química e farmacêutica (Gantar; Svirčev, 2008; Furmaniak et al., 2017). As análises desses genomas de *Arthrospira* identificaram numerosos genes responsáveis pela produção de hidrogênio, adaptação ao estresse, sistemas de restrição-modificação, que são usados para proteção de ataques de DNA exógenos, e outros, além de sequências repetitivas altamente intercaladas (alcançando até 9% dos genomas). Há muitas maneiras pelas quais a genômica das cianobactérias das lagoas salino-alcalinas pode avançar a compreensão em diversas áreas ainda sub exploradas, incluindo biologia evolutiva, adaptação funcional a ambientes salino-alcalinos, regulação e ativação de genes associados à salinidade e alcalinidade, interações com vírus e ecologia de comunidades microbianas. Os avanços que os projetos genômicos de larga escala trouxeram para a compreensão das cianobactérias marinhas foram substanciais, levando a novas descobertas em termos de sua biodiversidade global e biogeoquímica. Ao sequenciar o genoma da *Arthrospira* isolada de lagoa salino-alcalina, poder-se-á entender melhor a sua biologia, ecologia e evolução, permitindo-nos compreender seu papel nas comunidades microbianas e como elas podem reagir às pressões ambientais.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Pantanal e a sub-região da Nhecolândia

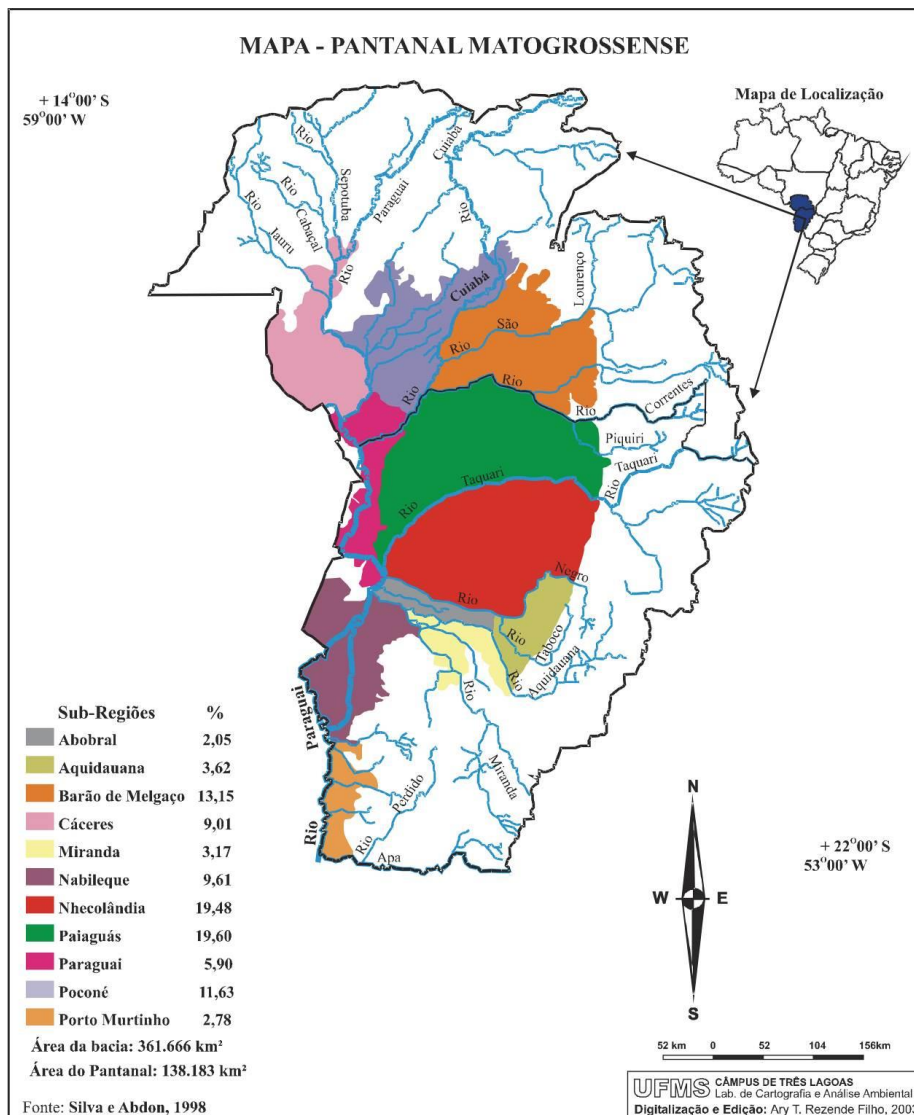
O Pantanal abrange uma área total de cerca de 150.355 km<sup>2</sup> estando a maior parte (140.000 km<sup>2</sup>) em território brasileiro, além de partes dos territórios da Bolívia e do Paraguai (Alho et al., 2019). Ele é conhecido por ser a maior área inundável do planeta e ocupa parte dos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Junk et al., 2006; Por, 1995). A denominação Pantanal deriva-se da palavra pântano, entretanto, a área não é um enorme pântano, pois devido à dinâmica das inundações, ela possui uma extensa planície heterogênea, com áreas permanentemente inundadas (wetlands) e outras sazonais (Assine et al., 2015). Essas áreas com diferentes períodos de inundação foram caracterizadas e individualizadas como diferentes pantanais não só por esse motivo, mas também por representarem áreas de sedimentação distintas, de diferentes sistemas deposicionais (Assine et al., 2015). Este ecossistema funciona como um grande reservatório que coleta água das terras altas vizinhas durante a estação chuvosa transformando o Pantanal em uma grande planície de inundação e então gradualmente a distribui para o rio Paraguai, que possui uma bacia hidrográfica com altitudes pouco elevadas (Thielen et al., 2020). O Pantanal é conhecido como um ambiente particular com grande diversidade e variabilidade de espécies e habitats aquáticos, com rica biodiversidade florística, faunística e de microrganismos (Alho; Gonçalves, 2005; Junk; Cunha, 2005; Junk et al., 2006).

A sub-região da Nhecolândia é uma das cinco sub-regiões em que se divide o Pantanal, com área de 29.000 km<sup>2</sup> se caracteriza pela presença de um complexo sistema, cuja principal particularidade geográfica é a presença de cerca de 15.000 lagoas salinas e não salinas (Brum; Souza, 1985; Mourão et al., 1988; Morrison et al., 2000; Barbiero et al., 2002; Oliveira et al., 2011), que se localizam a pequenas distâncias umas das outras. As lagoas podem alcançar variadas dimensões, porém, são pouco profundas (de 1 a 2 m), com suas características limnológicas diferenciadas são denominadas regionalmente como “baías”, “salitradas” e “salinas” (Allem; Valls, 1987; Calheiros; Oliveira, 1999).

As salinas da Nhecolândia são lagoas alcalinas de água salobra, de coloração diversificada, esverdeada, azulada ou marrom acastanhada, dominadas por cianobactérias (*Anabaenopsis elenkinii* e *Limnospira/Arthrospira platensis*). As condições limnológicas das salinas são consideradas extremas devido ao pH altamente alcalino (9-11) e elevada condutividade (>2.000  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), características típicas de ambientes com alta produtividade

fitoplanctônica e restritas em termos de fauna e flora (Brum; Sousa, 1985, Mourão et al., 1998).

As baías apresentam águas ligeiramente ácidas (pH 5-7,4), pobres em eletrólitos (condutividade  $<1.000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), altas concentrações de macrófitas, presença de peixes e apresentam ligação com outras lagoas durante o período de cheia através de vazantes (Mourão et al., 1998). Nos períodos de seca, as lagoas salitradas apresentam pH elevado (até 9), o que as aproximam das características das salinas, inclusive com a presença das cianobactérias *Anabaenopsis elenkinii* e *Limnospira/Arthrospira platensis* (Santos; Sant'Anna, 2010) e, nos períodos de cheia predominam espécies de desmídias (Santos, 2008).



**Figura 1.** O Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões, conforme Silva e Abdon (1998) e adaptado por Rezende-Filho (2003). Fonte: Santos, 2013



## 2.2 Reclassificação de espécies do gênero *Arthrospira*

Em 2019 foi publicado uma revisão do gênero *Arthrospira* onde pela primeira vez foram incluídos dados moleculares da espécie tipo a *Arthrospira jenneri* (Nowicka-Krawczyk et al., 2019). Esses autores argumentam que várias espécies (*A. máxima*, *A. fusiformis* e *A. platensis*) têm sido frequentemente isoladas de habitats continentais altamente alcalinos e salinos de regiões tropical e subtropical e esse conhecimento combinado com a falta de informações sobre a espécie tipo, incorretamente sugere que a preferência por altos pH, salinidade e/ou condutividade elétrica é uma característica geral compartilhada por todo o gênero. Entretanto, ao contrário dessas espécies mais populares cultivadas comercialmente, a espécie tipo *A. jenneri* origina-se de ecossistemas de água doce com baixa salinidade. No estudo realizado por Nowicka-Krawczyk et al. (2019) a morfologia, ultraestrutura, ecologia e a filogenia do gene 16S rRNA foram utilizadas para comparar várias linhagens da espécie tipo *A. jenneri* com as espécies populares que são amplamente utilizadas comercialmente. Todos esses parâmetros mostraram diferenças importantes das espécies utilizadas comercialmente com a espécie tipo *A. jenneri*. Dessa forma, esses autores propuseram manter o nome do gênero *Arthrospira* para a espécie tipo *Arthrospira jenneri* e renomear como um novo gênero *Limnospira* as espécies *A. fusiformis*, *A. maxima* and *A. indica*. No estudo de Nowicka-Krawczyk et al. (2019), a espécie *Arthrospira platensis* está posicionada na árvore filogenética dentro do clado fortemente suportado (100% reamostragem) contendo as espécies *A. fusiformis*, *A. maxima* and *A. indica*, o que sugere que ela pertence ao novo gênero descrito.

## 2.3 O gênero *Limnospira*/*Arthrospira*

As cianobactérias do gênero *Arthrospira* estão atualmente classificadas como pertencentes a família Microcoleaceae, ordem Oscillatoriales e filo Cyanobacteria (Komárek et al., 2014). O primeiro relato de um táxon com característica do gênero *Arthorspira*, foi a mais de 170 anos, quando Wittrock e Nordstedt (1844) descreveram a ocorrência perto de Montevideo de uma “alga verde-azulada” com filamentos de forma helicoidal, a qual foi descrita como “*Spirulina jenneri* f. *platensis*”, mesmo tendo sido observado que possuía septos. Alguns anos mais tarde, Stizenberger (1852) que havia observado septos em algumas formas helicoidais de oscilatoriaceas, propôs que estas fossem incluídas em um novo gênero denominado *Arthrospira*. Esse autor incorporou a espécie descrita como *Spirillum jenneri*

Hass. por Hassal em 1845 no novo gênero como *Arthrospira jenneri* (Hass.) Stiz. (Jeeji-Bai, 1999). Em 1959, Desikachary designou *A. jenneri* (Hass.) Stiz. como a espécie tipo do gênero (Desikachary, 1959). No Código Botânico, *A. jenneri* (Hass.) Stizenberger é a espécie tipo, enquanto que a *A. platensis* PCC 7345, isolada de ambiente salino (Del Mar Slough, Califórnia, EUA), é a linhagem referência no Código Bacteriológico (Rippka; Herdman, 1992). A descrição do gênero *Arthrospira* feita nos primórdios dos tempos é baseada na presença de septo, característica esta que a distinguiu do gênero *Spirulina* (ausência de septo) (Stizenberger, 1852; Gomont, 1892). O Manual de sistemática bacteriológica de Bergey sugere três características para separar os dois gêneros proximamente relacionados *Spirulina* de *Arthrospira* com tricomas enrolados helicoidalmente: (1) grau de inclinação da altura da hélice do tricoma (a partir do eixo transversal); (2) aspecto e visibilidade (microscópio óptico) dos cruzamentos entre as paredes das células no filamento; (3) distribuição (microscopia eletrônica) dos poros de junção no cruzamento da parede celular. Assim, *Arthrospira* pode ser diferenciada da *Spirulina* com base no grau de inclinação da altura da hélice do tricoma, que forma um ângulo  $>45^\circ$  a partir do eixo transversal, a presença de septos visíveis e a distribuição dos poros de junção em uma linha circular em torno do cruzamento da parede celular. Os critérios principais para distinguir os dois gêneros estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais características separando os gêneros *Arthrospira* Stinzenberger 1852 e *Spirulina* Turpin 1829 (Vonshak; Tomaselli, 2000)

<b>Critério</b>	<b><i>Arthrospira</i></b>	<b><i>Spirulina</i></b>
Diâmetro do tricoma	2,5-1,6 $\mu\text{m}$	0,5-5 $\mu\text{m}$
Tipo de helicidade	frouxamente espiralado	firmente espiralado
Cruzamento da parede	visível no microscópio óptico	invisível no microscópio óptico
Padrão do poro da parede celular	linha única ao redor do tricoma	várias linhas no lado côncavo da espiral
Modo de fragmentação do tricoma	Intracelular (necridio)	intercelular
Inclusões cilíndricas	presente	ausente
Fotossíntese anoxigênica	ausente	presente em algumas linhagens
Fícoeritrina-C	não encontrada	presente em algumas linhagens
Ácido linolênico- $\gamma$	presente	ausente

Além das características morfológicas, as sequências do gene de RNAr 16S claramente têm demonstrado que *Arthrospira* e *Spirulina* são gêneros filogeneticamente distantes (Giovannoni et al., 1988; Nelissen et al., 1994; Tomaselli et al., 1996). Komárek (1992) descreve o gênero *Arthrospira* como organismos com filamentos não ramificados, solitários e de vida livre (flutuante) ou formando mantos, os quais são microscópicos ou

macroscópicos, cobrindo um substrato, regularmente espiralados como parafusos e livremente enrolados ao longo de todo o comprimento, com inalterada ou continuamente alterando (diminuindo ou aumentando) a largura das espirais (tricomas com largura das espirais variando de 2,5-5-10). As bainhas geralmente estão ausentes e quando raramente desenvolvem são incolores, parecidas com tubos, unidas aos tricomas, abertas nas extremidades, e contém sempre apenas um tricoma. Os tricomas são isopolares, 3-10 µm de largura, uniserial, composto de células cilíndricas, constricta e não constricta nos cruzamentos das paredes visíveis, não atenuado ou ligeiramente atenuado na direção das extremidades, com movimento (rotação). Células sem aerótopos ou (em espécies planctônicas) com aerótopos, mais ou menos isodiamétricos, menores do que largos, às vezes granulares e com grânulos condensados nos cruzamentos das paredes. As células terminais são amplamente arredondadas e geralmente com paredes celulares externas engrossadas ou com caliptras (em tricomas desenvolvidos); perfuração especial de paredes celulares (cruzamentos das paredes e paredes laterais). Conteúdo celular pálido ou verde-azul brilhante ou verde-oliva. Tilacóides situados perpendicular e irregularmente ao longo das paredes celulares. Ausência de heterócitos e acinetos. Existem aproximadamente 15 espécies descritas de *Arthrospira* que ocorrem em habitats de água corrente ou parada, lagoas de água doce, alcalina, salobra e em ambientes marinhos (Komárek; Hauer, 2013).

Ao contrário dos membros de *Spirulina*, elas não ocorrem em ambientes termais. Grande parte das espécies conhecidas é bentônica e algumas planctônicas em regiões tropicais. A maioria das espécies de água doce é planctônica e possuem aerótopos (Jeeji-Bai, 1999, Komárek; Kaštovský, 2003). Em populações de ambientes naturais o gênero apresenta tipicamente tricomas espiralados, mas podem apresentar formas retas quando em cultivo (Lewin, 1980; Jeeji Bai, 1985; Desikachary; Jeeji-Bai, 1996; Komárek; Anagnostidis, 2005). A questão da designação adequada de *Arthrospira* se estende aos produtos comerciais, uma vez que a biomassa de *Arthrospira* é vendida como alimento saudável (Figura 1). Duas espécies de *Arthrospira*, *A. platensis* e *A. fusiformis*, são cultivadas em escala industrial para produção de biomassa devido ao seu alto teor proteico (65-70% da massa seca) (Sili et al., 2012).

Entretanto, comercialmente e de forma generalizada, utiliza-se o termo “Spirulina”, para tal material, o que claramente causa problemas em aceitar a terminologia correta, embora seja altamente importante estar ciente do tipo de organismo que está sendo cultivado. Algumas espécies de *Spirulina* (por exemplo, *S. subsalsa*) são de fato cultivadas para fins comerciais por crença equivocada de que elas têm a qualidade nutricional e segurança toxicológica das

espécies de *Arthrospira* comestíveis tradicionais (Shimada et al., 1989; Briebe; Merinos, 1993).

A *A. platensis* é uma espécie amplamente utilizada como matéria prima para indústria alimentícia, química e farmacêutica (Pelizer, 2002; Volkmann et al., 2008). Essa cianobactéria tem sido cultivada e estudada devido à suas propriedades nutricionais e terapêuticas no tratamento de doenças como câncer, hipercolesterolemia e aterosclerose (Colla; Furlong; Costa, 2007; Colla et al., 2007). Além disso, *A. platensis* produz compostos fenólicos, antioxidantes, antivirais, antiinflamatório e redutores de colesterol (Milié et al., 1998; Estrada et al., 2001; Hongsthong; Bunnag, 2009). As espécies *A. maxima* e *A. fusiformis* também são espécies comumente utilizadas em cultura para vários produtos biotecnológicos (Oliveira et al., 1999). A utilização de *Arthrospira* como suplemento alimentício para o homem e animais é indicada pela FAO (Food and Agriculture Organization) por apresentar composição de proteínas superior aos valores recomendados pela referida organização (Dillon et al., 1995), e vários produtos comercializados dessa cianobactéria são classificados pela FDA (Food and Drug Administration) como alimento “geralmente reconhecido como seguro” – GRAS (Generally Recognized as Safe) para humanos.

No Brasil, existem relatos de quatro espécies de *Arthrospira* (Tabela 2). O primeiro registro foi publicado por Magrin et al. (1997), que mencionaram *A. jenneri* e *A. skujae* para lagos de Minas Gerais e Rondônia, respectivamente.

**Tabela 2.** Distribuição de espécies de *Arthrospira* no Brasil observadas em amostras da natureza

Espécie	Localidade	Referência
<i>A. platensis</i>	Lagoa Salina do Meio (Fazenda Nhumirim) e Lagoa Salitrada Campo Dora (Fazenda Campo Dora), Município de Corumbá, MS – Pantanal da Nhecolândia	Santos e Sant’Anna, 2010
<i>A. jenneri</i>	Lagoa rasa, município de Arceburgo, MG Lago das Rosas, município de Goiânia, GO São Paulo, SP	Magrin et al., 1997 Nogueira et al., 2008 Sant’Anna et al., 2011
<i>A. santannae</i>	Lagoa, município do Rio de Janeiro, RJ	Komárek e Komárková-Legnerová, 2006
<i>A. skujae</i>	Lago do Jardim Botânico e Lago do Parque Vaca Brava, município de Goiânia, GO Reservatório Samuel, Rio Jamari, Porto Velho, RO	Nogueira et al., 2008 ( <i>Spirulina gigantea</i> ) Magrin et al., 1997

As pesquisas desenvolvidas com *Arthrospira* no Brasil foram realizadas utilizando linhagens provenientes de coleções de culturas de outros países. Esses estudos abordaram a influência da temperatura, pH e nutrientes (principalmente fontes de nitrogênio) na produção

de biomassa em fotobiorreatores e testes de propriedades antioxidantes (Carvalho et al., 2004; Sánchez-Luna et al., 2004; 2007; Bertolin et al., 2005; Colla; Furlong; Costa, 2007; Colla et al., 2007; Bezerra et al., 2008). Existe um relato do que seria a primeira linhagem brasileira isolada de *Arthrospira* proveniente da lagoa Mangueira (Rio Grande do Sul), a qual foi denominada *Arthrospira* sp. LEB 18. Porém, os autores destacaram que, apesar da lagoa Mangueira apresentar condições favoráveis para o desenvolvimento de *Arthrospira* spp. (pH >8, elevadas concentrações de carbonatos e bicarbonatos), a ocorrência deste organismo jamais foi documentada para esta lagoa (Morais et al., 2008). A ocorrência natural de *Arthrospira* nas lagoas salino-alcálicas da região do Pantanal da Nhecolândia, MS (Costa et al., 2016; Santos; Sant'Anna, 2010; Andreote et al., 2018) representa uma importante fonte de linhagens nativas para os estudos deste gênero no Brasil.

#### **2.4 *Arthrospira platensis* das lagoas salino-alcálicas do Pantanal**

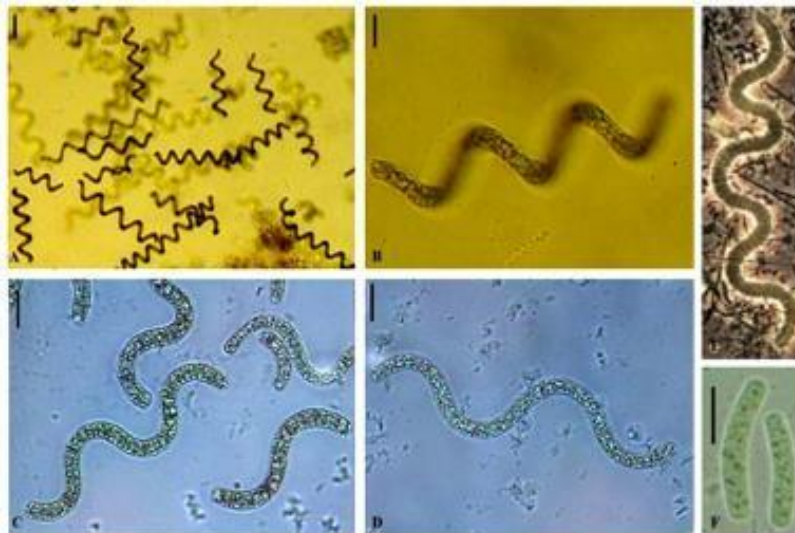
Estudos investigando em microscópio óptico amostras ambientais de lagoas salino-alcálicas da região do Pantanal da Nhecolândia relataram a presença da espécie *Arthrospira platensis* formando florações ou não (Figura 2, Santos, 2008; Santos; Sant'Anna, 2010; Malone et al., 2012). A *A. platensis* ocorreu nas lagoas salinas do Pantanal em valores de pH que variaram de 9,2-10,2, condutividade elétrica de 716-19020  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e temperatura 22,8-33,3°C (Santos, 2013). Esse autor constatou a necessidade de pH alcalino, elevada condutividade e temperaturas mornas para o desenvolvimento da *A. platensis* nas lagoas do Pantanal.



**Figura 2.** Floração de *A. platensis* na Salina Pedra do Sol (Santos, 2013)

As variações dos tricomas de *A. platensis* observadas em material da natureza (Figura 3) indicam que as características diagnósticas desta espécie devem ser ampliadas e revisadas (Santos; Sant'Anna, 2010; Santos, 2013). Segundo Santos (2013) o material brasileiro está de acordo com a circunscrição original de *A. platensis* (medidas e forma do tricoma) apresentada por Gomont (1892) acrescida dos caracteres observados por Jeeji-Bai (1999), principalmente em relação à presença ou não de aerótopos (Figura 3). Esse autor também constatou que além das características morfométricas, a ocorrência de *A. platensis* no Pantanal, parece ser mais coerente com essa espécie descrita originalmente para a região de Montevideu, Uruguai, América do Sul. O autor Santos (2013) resumiu os caracteres morfológicos

da *A. platensis* do pantanal brasileiro como: 1) A presença de aerótopos é facultativa e o hábito é planctônico; 2) A ausência de caliptra nas células apicais, tanto em material da natureza quanto de cultura, é uma característica morfológica estável; 3) Tricomas regularmente espiralados e hormogônios retos ou curvos são características inerentes do seu ciclo de desenvolvimento.



**Figura 3.** A-D. Aspecto geral dos tricomas regularmente espiralados e com aerótopos de *Arthrospira platensis* em lagoas salinas do Pantanal. A, B. Amostras da Salina Pantanal; C. Salina da Reserva; D. Salina do Meio; E-F. Amostras da Salina do Meio. E. Tricoma sem aerótopos, F. Hormogônios com grânulos e sem aerótopos. Escalas = 10  $\mu\text{m}$  (Santos, 2013)

Dois estudos existentes usaram uma abordagem molecular nas lagoas salino-alcálicas do pantanal brasileiro, recuperando sequências do gene de 16S rRNA de *Arthrospira platensis* (Costa et al., 2016; Andreote et al., 2018). A reconstrução *in silico* das vias metabólicas dos ciclos N e S (assimilação de amônia e assimilação inorgânica de enxofre) indicaram a participação de *A. platensis* nestes processos (Andreote et al., 2018).

## 2.5 Genomas de *Limnospira*/*Arthrospira*

Os avanços das técnicas de sequenciamento massivo de DNA, a redução dos custos deste procedimento e a disponibilidade de novas ferramentas de bioinformática de uso público e de fácil acesso pela internet têm propiciado um aumento substancial de informações genômicas de diversos organismos. Embora o número atual de genomas cianobacterianos seja baixo quando comparado com outros filos, esforços recentes têm havido visando aumentar este número. Atualmente existem onze genomas do gênero *Arthrospira* publicados, (Tabela 3).

De acordo com as comparações estatísticas (Cheevadhanarak et al., 2012), os tamanhos dos genomas das linhagens de *Arthrospira* variam de 4,9 Mbp a 6,8 Mbp. Cada genoma é organizado como um cromossomo circular único e as células não possuem DNA plasmidial conhecido. O número total de genes varia de 5.401 a 6.676 e a porcentagem de genes codificadores de proteínas chega a 99% (Fujisawa et al., 2010; Janssen et al., 2010; Carrieri et al., 2011; Cheevadhanarak et al., 2012; Lefort et al., 2014; Dong et al., 2015).

Todos os genomas contêm sequências repetitivas altamente intercaladas (atingindo até 9% dos genomas), incluindo íntrons do grupo II, sequências semelhantes a fagos, elementos de inserção e, em média, 6 a 13 CRISPRs (“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”). Juntamente com os sistemas de RM (restrição-modificação), eles compõem um sistema de defesa celular, que é uma barreira importante na transformação de células cianobacterianas (Fujisawa et al., 2010; Janssen et al., 2010; Cheevadhanarak et al., 2012; Lefort et al., 2014). Na maioria desses genomas não foi analisado agrupamentos gênicos envolvidos com a síntese de substâncias bioativas. Somente um desses estudos menciona que o genoma da *Arthrospira plantensis* C1 não possui sequências gênicas codificadoras de peptídeo sintetases não ribossômicas (NRPSs) e policetídeo sintases (PKSs) (Cheevadhanarak et al., 2012). Essas duas enzimas, NRPS e PKS, são conhecidas por estarem envolvidas na biossíntese de diversas cianotoxinas, tais como, microcistina, cilindrospermopsina, saxitoxina, anatoxina-a (Dittmann et al., 2015). Embora



exista relato de produção de microcistina e anatoxina-a por algumas linhagens de *Arthrospira* (Cronberg; Annadotter, 2006) os estudos genômicos não focaram em genes codificadores de moléculas tóxicas.

A divergência genômica geralmente reflete adaptações fisiológicas aos diferentes nichos que as cianobactérias podem ocupar. Duas estratégias de adaptação podem ser inferidas pelas análises de genomas do filo Cyanobacteria: a expansão genômica, que confere amplo potencial adaptativo pelo aumento de famílias gênicas, e a redução genômica, que resulta na eliminação de genes dispensáveis à adaptação a um nicho específico (Larsson et al., 2011). Pressões de seleção provocariam mudanças em fatores como tamanho do genoma, percentual G-C, número de genes e taxa de evolução. Enquanto cianobactérias podem desenvolver estratégias individuais de interação com o ambiente, outros de seus sistemas são conservados globalmente (Simm et al., 2015). Assim como ocorre em outros organismos, há um conjunto de genes essenciais em cianobactérias que apresenta taxas de conservação bastante elevadas e maior resistência à transferência horizontal, consistindo de sequências geralmente envolvidas na produção de estruturas proteicas complexas e em vias bioquímicas indispensáveis (Larsson et al., 2011; Shi; Falkowski, 2008). É esse conjunto de genes, que encerra grande parte da história evolutiva do organismo, o alvo de vários trabalhos recentes.

No Brasil, avanços têm sido feitos pelo grupo de pesquisa da Profa. Marli de Fátima Fiore do CENA/USP, que realiza estudos de isolados brasileiros de cianobactérias, incluindo sequenciamento, caracterização e mineração de seus genomas. Vários genomas cianobacterianos foram publicados (Fiore et al., 2013; Guimarães et al., 2015; Rigonato et al., 2015; Leão et al., 2016; Popin et al., 2016; Abreu et al., 2018) e a descrição completa de vários agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de produtos naturais foram reportados (Hoff-Rissetti et al., 2014; Lima et al., 2017; Shishido et al., 2017; Jokela et al., 2017; Heck et al., 2018; Abreu et al., 2018).

**Tabela 3.** Genomas de espécies de *Arthrospira* disponíveis em bancos de dados públicos

<b>Cianobactéria</b>	<b>Localidade</b>	<b>Tamanho do genoma (pb)</b>	<b>No. scaffold</b>	<b>G+C%</b>	<b>No. acesso GenBank</b>	<b>Referência</b>
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	Desconhecida	6.228.153	16	44,7	NZ_FO818640	Janssen et al., 2010
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	Chade, Africa: Lago Chade	6.788.435	1	43,6	NC_016640	Fujisawa et al., 2010
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	Chade, Africa: Lago Chade	6.003.314	129	44,8	ABYK00000000	Carrieri et al., 2011
<i>Arthrospira platensis</i> C1	Chade, Africa: Lago Bodou, Kanem	6.089.210	1	43,5	NZ_CM001632	Cheevadhanarak et al., 2012
<i>Arthrospira platensis</i> Paraca	Desconhecida	6.501.886	268	44,3	ACSK00000000	Lefort et al., 2014
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	China: costa do Mar Ocidental da Baía de Bohai, Tianjin, 39°17'N 117°47'E	6.311.308	25	44,7	LAYT00000000	Dong et al., 2015
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	China: Lago Chenghai, Yunnan Province	6.520.772	1	44,2	NZ_CP013008	Xu et al., 2016
<i>Arthrospira</i> sp. 0913F	Rússia – Lago Solenoye, Omsk	4.945.448	928	44,4	GCA_003268325	Waleron et al., 2017
<i>Arthrospira</i> sp. PLM2 BIN9	Canadá - Planalto Cariboo	4.788.243	181	44,4	REEX01000000	Zorz et al., 2019
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	China - Tianjin	6.434.389	1	44,5	CP028914	Dong et al., 2018
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-46	México, Lago Texcoco	5.728.646	343	44,5	GCA_003060805	Suziki et al., 2019



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo é realizar a análise genômica e funcional de duas linhagens de *Limnospira platensis* CENA597 e CENA650 isoladas de uma lagoa salino-alcalina do Pantanal brasileiro, visando avaliar a diversidade genômica desses isolados em comparação com os outros genomas disponíveis e identificar genes de interesse responsáveis pelo mecanismo de concentração de carbono, genes de resistência de salinidade, temperatura e fósforo, e sistema CRISPR-Cas de imunidade adaptativa ao ataque de fagos.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- I. Caracterizar a morfologia da cianobactéria *Limnospira platensis*;
- II. Sequenciar, montar e analisar o genoma da linhagem;
- III. Caracterizar os genomas da linhagem;
- IV. Comparar o genoma da *Limnospira platensis* com outros genomas de *Limnospira* disponíveis em banco de dados;
- V. Avaliar genes funcionais no genoma da *Limnospira platensis*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem e cultivo das linhagens de *Limnospira platensis*

As linhagens CENA597 e CENA650 foram isoladas de amostras de florações coletadas na Lagoa Salina Grande da Fazenda Centenário em 10 de setembro de 2015 (19°27'3,13"S, 56°7'42,19"O) e na lagoa 08SR da Reserva São Roque em 18 de outubro de 2017 (19°22'47,2"S, 56°18'51,6"O), respectivamente, localizadas no município de Aquidauana, região do Pantanal da Nhecolândia, MS a 140 km de Campo Grande – MS (Figura 4).

A distância entre essas duas lagoas é de aproximadamente 21 km. O isolamento das linhagens foi realizado pelo grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup>. Marli F. Fiore e é mantida em cultivo no Laboratório de Biologia Molecular e Celular no meio de cultura Z8 (Kotai, 1972) modificado, composto pelos seguintes reagentes e concentrações: NaNO<sub>3</sub> 46,7g/L; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 5,9g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,5g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 776 μL<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 150μL<sup>-1</sup>; Solução de Fe 10 mL (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 2,8 g em 100 mL de HCl 0,1 M); Solução EDTA 9,5 mL (EDTA-Na<sub>2</sub> 3,9 g em 100 mL de NaOH 0,1 M); Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,33 g/mL; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,88 g/mL; KBr 1,2 g/mL; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,87 g/mL; Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1,55 g/mL; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,46 g/mL; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1,25 g/mL; NiSO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,98 g/mL; Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O 0,41 g/mL; V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,089 g/mL; KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O 4,74 g/mL; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 3,1 g/mL e 1,6 g/mL respectivamente e NaCl 15 g/L. As culturas são mantidas em uma sala de crescimento com iluminação fluorescente (40-50 μmol fótons·μm<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), com ciclo claro/escuro de 14/10h, temperatura de 21°C ± 1°C e umidade relativa do ar de 60 ± 5%.



**Figura 4.** Localização geográfica das lagoas onde foram coletadas as linhagens cianobacterianas CENA597 e CENA650

## 4.2 Produção de biomassa

A produção de biomassa para a extração do DNA genômico foi feita inoculando 1000  $\mu$ L de células de cada linhagem em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido Z8 modificado. Após aproximadamente quatro semanas de crescimento, as células foram submetidas a um processo de lavagens para reduzir a abundância da comunidade de bactérias associadas às linhagens em estudo. Inicialmente, cada cultura foi concentrada em eppendorfs de 1,5 mL para a primeira lavagem. Os microtubos foram para centrifugados (Hettich Universal Mikro320R, Tuttlingen, Alemanha), com rotação de 5000  $\times$ g, podendo variar até no máximo 7000  $\times$ g, durante 5 minutos para formação do pelete. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 500  $\mu$ L de Extran® 0,1% (Merck, Darmstadt, Germany), ficando em repouso por 30 minutos. Em seguida 500  $\mu$ L do meio de cultura foram adicionados homogeneizando cuidadosamente por inversão. Essa lavagem foi repetida mais uma vez, sendo então o pelete lavado com o meio de cultura por três vezes utilizando centrifugação de 7000  $\times$ g por 5 minutos, a última rotação por durante 15 minutos. O pelete foi transferido para um erlenmeyer de 50 mL e ressuspenso com 50 mL de água ultrapura e homogeneização em vórtex. Após centrifugação e descarte do sobrenadante as

células foram submetidas a uma nova lavagem com a solução de Extran® 0,1 % seguida de homogeneização, centrifugação a 7000 ×g durante 10 minutos e descarte do sobrenadante. O procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes, sendo que uma vez com o uso de uma solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM pH 8,0 e etanol 50 %) e centrifugação a 5000 ×g, seguido de uma lavagem com solução salina 0,85 % a 7000 ×g. Antes da extração de DNA, foi feita uma última lavagem e filtragem. Tubos falcon foram centrifugados a 6000 ×g durante 6 minutos, sobrenadante foi retirado e 5 mL de Extran® 0,1 % adicionados, centrifugando por mais 6 minutos a 5000 ×g, após o sobrenadante ser retirado, adicionou-se 2 mL de água deionizada e 1 mL de Sucrose >99,5% (GC) no fundo do tubo, centrifugar por 7 minutos a 7000 ×g, descarta o sobrenadante e adiciona água deionizada para filtragem.

Para a filtragem, o pellet total obtido foi inserido sobre a membrana de nitrocelulose (8 µm) acoplada no filtro a vácuo, aplicando 5 mL de Extran® 0,1 %, 10 mL de água deionizada, as células foram recuperadas da superfície da membrana de filtro para a extração de DNA.

### 4.3 Caracterização morfológica

Amostras da cultura líquida da linhagem CENA650 foram enviadas ao laboratório do Prof. Luis Henrique Z. Branco do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP para caracterização morfológica. As investigações morfológicas foram feitas utilizando um microscópio vertical Olympus BX53 com contraste de interferência diferencial (DIC) e câmera digital DP 71 com sistema de análise de imagem cellSens, seguindo os critérios usuais da taxonomia morfológica para ilustrar as características mais importantes para a taxonomia destes organismos. As análises foram feitas segundo as características taxonômicas, como: células solitárias ou agrupadas em colônias ou em tricomas; tamanho e forma das células solitárias; presença de bainha; estrutura dos tricomas; forma e dimensões celulares.

A identificação foi feita com base na literatura específica para o organismo, proposto por Komárek et al. (2014).

#### 4.4 Extração de DNA, preparo da biblioteca genômica e sequenciamento.

Cerca de 10 µg de DNA genômico da linhagem CENA597 foram utilizados para o preparo de uma biblioteca “mate pair” de 8 kb usando o kit Nextera Mate Pair Library Prep (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento da linhagem CENA650 utilizou-se 1 µg de DNA genômico e preparou-se uma biblioteca paired-ends usando o kit Nextera XT DNA Sample Prep (Illumina), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi feito na plataforma HiSeq 2500 (Illumina) com o kit HiSeq v4 Reagent (Illumina), segundo as instruções do fabricante. O preparo das bibliotecas genômicas e o sequenciamento foram realizados no Laboratório multiusuários centralizado de Genômica Funcional aplicada à Agropecuária e Agroenergia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

#### 4.5 Montagens dos genomas

A qualidade das leituras obtidas nos sequenciamentos genômicos foi verificada e gráficos de análise foram gerados com o programa FastQC (v.0.11.8) (Andrews, 2010). Bases de baixa qualidade foram filtradas, utilizando pontuação *phred* acima de 25 com Cutadapt (v.2.7) (Martin, 2017). Cortes de 10 bp foram feitos a partir da posição 5' em todas as reads com PRINSEQ (Schmieder et al., 2011). Em seguida, os dados de cada sequenciamento foram montados individualmente com SPAdes 3.13.0 (Bankevich et al., 2012). O programa Velvet (1.2.10) (Zerbino et al., 2011) também foi utilizado para as montagens, utilizando como genoma de referência a linhagem filogeneticamente mais próxima *Arthrospira platensis* NIES-39 (GCF\_000210375.1). Posteriormente, os contigs gerados foram aprimorados usando CheckM (Parks et al., 2014). As montagens que geraram o menor número total de sequências contíguas, a sequência contígua mais longa e o maior valor de N50 foram selecionadas para as buscas dos genes de interesse. SSPACE (Boetzer et al., 2011) para mesclar scaffolds, Pilon (Walker et al., 2014) para detecção de variantes e GapFiller (Boetzer & Pirovano, 2012) para preenchimento de lacunas. A avaliação da qualidade das montagens foi feita com Quast 5.0.2 (Alexey et al., 2013) e o nível de completude e contaminação da sequência foi medido com CheckM (Parks et al., 2014).



#### 4.6 Análise comparativa dos genomas de *Limnospira*

As análises genômicas dos agrupamentos ortólogos, pan-genoma pan e o genoma central ao nível de gene foram realizadas usando o OrthoVenn2 server (Wang et al., 2015). Mapas do genoma e a comparação dos genes anotados são gerados no programa GView Server v.3 com e-values de  $1 \times 10^{-10}$ , 80% de percentual de corte de identidade e 100% de corte do comprimento do alinhamento, parâmetros padrão do programa, sendo construídos no Inkscape (v. 0,91).

#### 4.7 Anotações de genes ou agrupamentos gênicos de interesse

Comparações genômicas das linhagens *Limnospira platensis* CENA650 e CENA597 com genomas de linhagens disponíveis em bancos de dados públicos foram realizadas com o servidor RAST para verificação da proximidade com outros genomas e sintenia (Aziz et al., 2008), utilizando o visualizador do SEED (Overbeek et al., 2014). As análises desses programas subsidiaram a identificação de genes candidatos que apresentam funções envolvidas na síntese da molécula. Curadorias manuais e comparações com o banco de dados GenBank foram utilizadas para o refinamento dos genes candidatos selecionados.

#### 4.8 Análise filogenômica

A posição evolutiva da linhagem *Limnospira* CENA597 e CENA650 no filo Cyanobacteria foi determinada pela construção de uma árvore filogenômica, usando o programa GTDBtk v1. 0.0 (Chaumeil et al., 2019). O programa utilizou o Prodigal (Hyatt et al., 2010) na predição de genes e o HMMER (Eddy, 2011) para identificar genes marcadores bacterianos (Parks et al., 2018) usando os modelos ocultos de Markov (perfil HMMs).

A árvore de referência foi composta pelos genes marcadores concatenados com genomas cianobacterianos, disponíveis na Database de Taxonomia de Genomas (GTDB) (Parks et al., 2018) e construída pelo método de Máxima Verossimilhança. A classificação taxonômica foi atribuída baseada no recente sistema GTDB. O GTDB-Tk designou a classificação do genoma de estudo em relação a um genoma de referência, de acordo com a divergência

evolutiva relativa (RED) e a identidade média de nucleotídeos (ANI), calculadas com PhyloRank (<https://github.com/dparks1134/PhyloRank/>) e FastANI (Jain et al., 2018), respectivamente.

#### **4.9 Filogenia do gene 16S RNAr**

O gene 16S rRNA foi recuperado dos genomas, resultando em duas cópias idênticas do gene da *A. platensis* CENA597 e uma cópia de *A. platensis* CENA650, idênticas também entre as linhagens. Este gene e as sequências relacionadas mais próximas de outras cianobactérias foram alinhados usando MUSCLE (Edgar, 2004) com parâmetros padrão. As árvores filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML). *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (código de acesso AP008231) foi usada como o grupo externo. A árvore de máxima verossimilhança foi reconstruída usando MEGA X (Kumar et al., 2018), aplicando o modelo GTR + I + C melhor ajustado de acordo com o método NJ automático. A robustez da árvore filogenética foi estimada por meio de análise de bootstrap usando 1000 repetições. Árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas no ITOL 5.3 (Letunic; Bork, 2019).

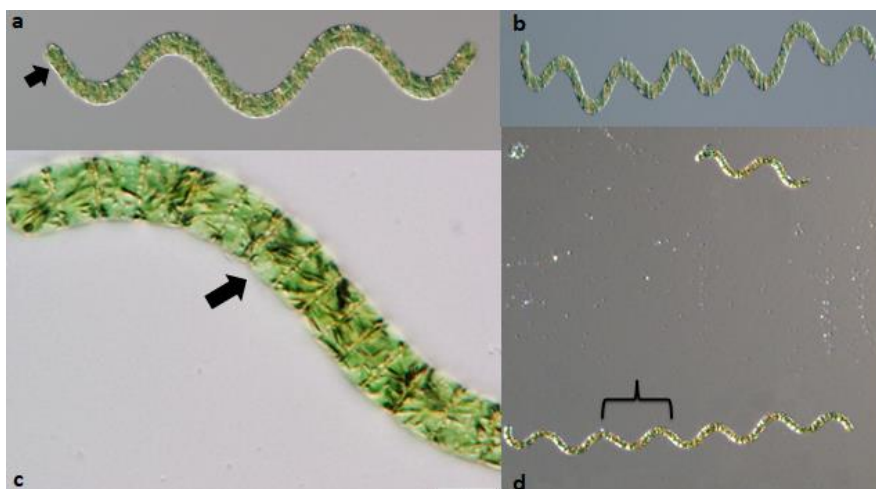
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização morfológica

A linhagem de *Limnospira platensis* CENA650 apresentou células apicais cilíndricas e arredondadas, coloração azul-esverdeado para verde claro com muita granulação (Figura 5). Tricomas solitários de flutuação livre, curtos, com comprimento de 300  $\mu\text{m}$  contraídos em paredes transversais. Distância entre espirais 27,5 a 57,5  $\mu\text{m}$  e altura das espirais 17,7 a 26,2  $\mu\text{m}$ . Paredes transversais visíveis e granuladas. Células de 1,3-3,9  $\mu\text{m}$  de comprimento, (2,5  $\mu\text{m}$  em média), 5,1–7,6  $\mu\text{m}$  de largura, com média de 6,3  $\mu\text{m}$ , razão comprimento/largura das células de 0,2 a 0,6.

Na descrição de Gomont (1892), a *Limnospira platensis* possui massa celular granulosa, tricomas levemente ou não atenuados, altura das espirais de 26-36  $\mu\text{m}$ , com largura de 6-8  $\mu\text{m}$ . O referido autor não mencionou a presença de aerótopos e se a cianobactéria possuía hábito bentônico ou planctônico não é mencionada na espécie registrada pelo autor. O autor ainda cita a ocorrência de formação de uma camada fina de floração, com coloração verde escuro de cianobactérias, o que não exclui a possibilidade da espécie possuir aerótopos, sendo que as florações de *Limnospira* sp. geralmente possuem essa mesma característica de floração.

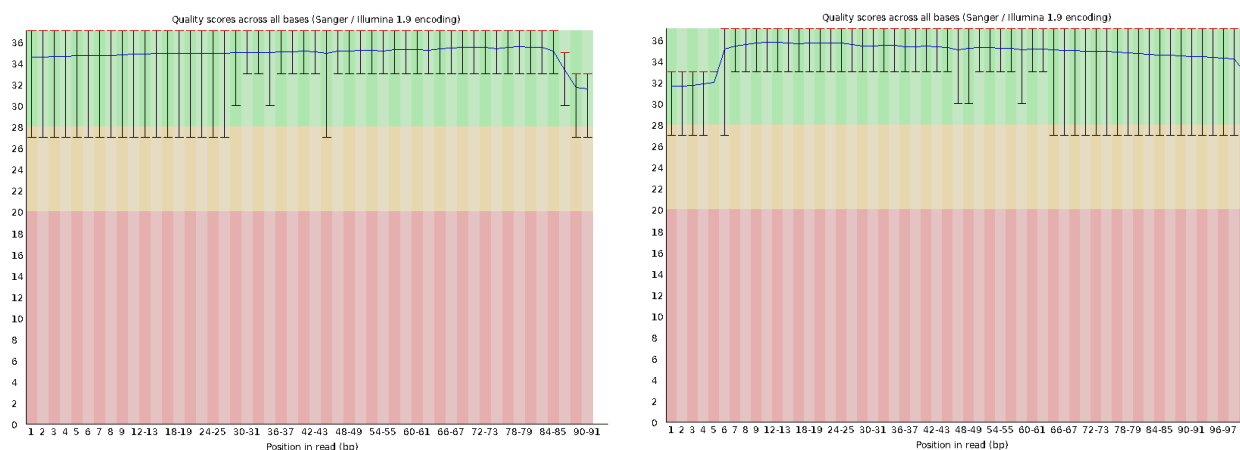
As características morfológicas da linhagem *Limnospira platensis* CENA650 coletada no Pantanal mantiveram-se similar a descrição de Gomont (1892), porém evidenciou-se que a CENA650 possui espirais com tamanhos menores e ausência de caliptras.



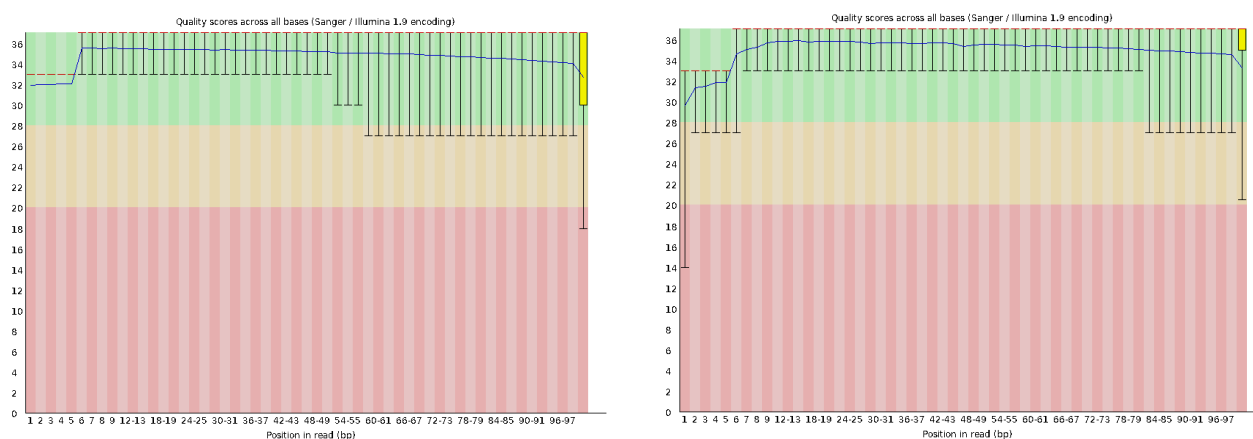
**Figura 5.** Microfotografias de *Limnospira platensis* CENA650, em cultura não axênica. a: Células apicais arredondas; b: Visão geral do tricoma; c: Grânulos visíveis; d: Flutuação livre

## 5.2 Análise de qualidade das sequências, montagem do genoma

O sequenciamento dos dois genomas de *Limnospira platensis* resultou em um total de 27.964.961 sequências geradas para a linhagem CENA650 com conteúdo de GC médio de 45%, enquanto que para a linhagem CENA597 obteve-se 32.737.862 sequências com conteúdo GC médio de 43%. De forma geral, as leituras apresentaram excelente qualidade, com valores de *Phred* acima de 25 em todas as bases (Figuras 6-9).



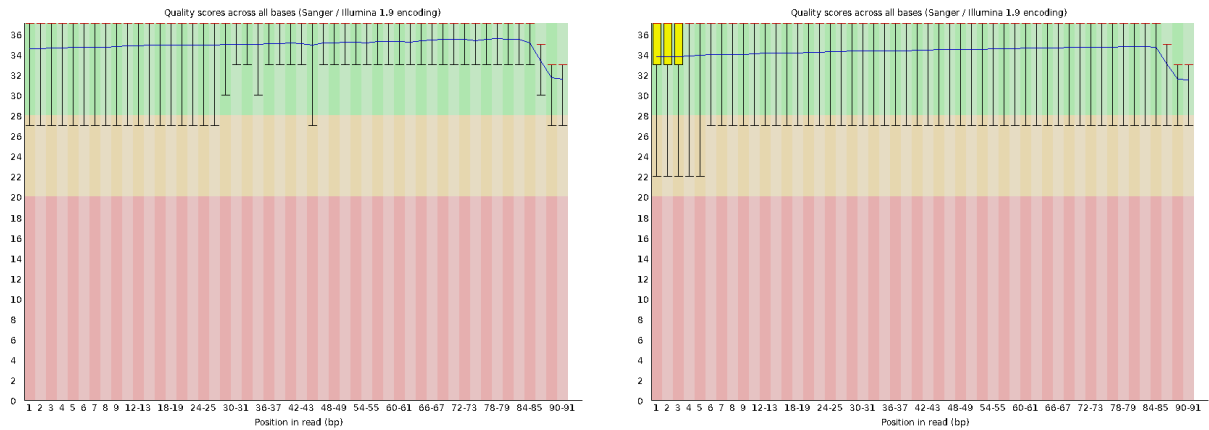
**Figura 6.** Qualidade *Phred* das bases por leitura dos dados brutos sequenciamento da linhagem *Limnospira platensis* CENA597



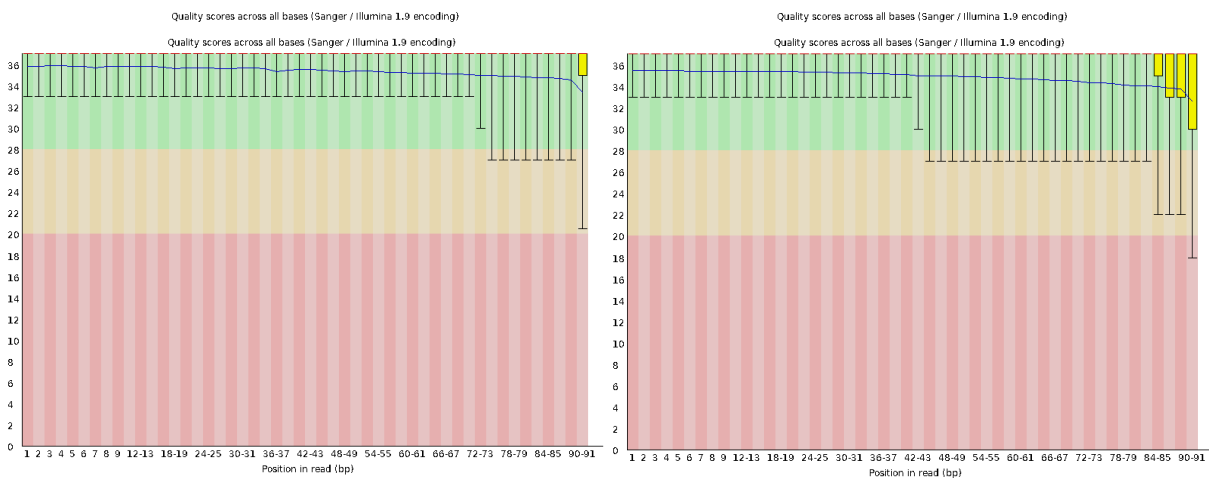
**Figura 7.** Qualidade *Phred* das bases por leitura dos dados brutos do sequenciamento da linhagem *Limnospira platensis* CENA650

Foi realizado o corte de 10 bp da extremidade 5' devido ao desvio de proporção das bases nessa região. Após a remoção dos adaptadores e leituras com baixa qualidade, o comprimento das leituras variou de 14 a 91, com 27.964.961 de sequências para a linhagem CENA650, com porcentual de conteúdo GC de 44% e, para a linhagem a CENA597 variando

o comprimento de 20-91, com 22.090.973 sequências e porcentual GC de 44%. O número total de leituras gerado pelas bibliotecas permitiu uma alta cobertura genômica média estimada para ambas as linhagens (Tabela 5).



**Figura 8.** Qualidade *Phred* das bases por leitura do sequenciamento da linhagem *Limnospira platensis* CENA597 após a trimagem das *reads*



**Figura 9.** Qualidade *Phred* das bases por leitura do sequenciamento da linhagem *Limnospira platensis* CENA650 após a trimagem das *reads*

O método de lavagem de células utilizado antes da para extração do DNA genômico teve efeitos muito positivos na redução dos contaminantes de ambas as linhagens. O número de sequências de bactérias heterotróficas foi baixo, com 1% de contaminantes na biblioteca de sequencias da *L. platensis* CENA597 e 3% na biblioteca da *L. platensis* CENA650 (Tabela 4). Obter sequências de DNA genômico de cianobactérias sem sequências de outras bactérias contaminantes é um trabalho de difícil execução, devido a existência de associação simbiótica com comunidades bacterianas heterotróficas na natureza, sendo assim

faz-se necessário tratar os dados genômicos provenientes de cianobactérias em cultivo, como dados de origem metagenômica (Alvarenga et al., 2017).

A montagem dos genomas envolveu a utilização de dois montadores. Após o tratamento das sequências, inicialmente foi utilizado o montador Spades, e o programa Velvet foi utilizado posteriormente para montagem da *L. platensis* CENA597, utilizando a linhagem filogeneticamente mais próxima *Limnospira platensis* NIES-39 (GCF\_000210375.1). Ambas as montagens foram comparadas e as que obtiveram os melhores resultados de N50 e completude foram utilizadas para o processo de *scaffolding* e *gapfilling*, que levou a seleção da montagem pelo SPAdes para *L. platensis* CENA650 e a montagem pelo Velvet para *L. platensis* CENA597.

A montagem final resultou em um total de 28 sequências *contigs* para *L. platensis* CENA650, com valores de completude de 99,78% e contaminação de 1,26% (Tabela 5). A montagem da linhagem *L. platensis* CENA597 resultou em apenas um *scaffold*, com índice de completude de 99,78% e contaminação 12,88%, porém, deve ser considerado que o valor de heterogeneidade desta linhagem foi de 100%, que é o índice que atribui a contaminação às variações dos *scaffolds* que são classificados dentro da linhagem, indicando que 100% desta contaminação são sequências dentro do próprio gênero *Limnospira*, que pode ser resultado de uma possível variação no genótipo da população cultivada ou eventos de duplicações genômicas. Os diferentes resultados entre as duas montagens se deve a utilização de duas bibliotecas de sequenciamento diferentes. A vantagem da utilização de uma biblioteca que utiliza fragmentos de sequências maiores, mesmo com o uso de comprimento virtual, como no caso da biblioteca mate-pair permitiu a montagem completa do genoma da linhagem CENA597.

**Tabela 4.** Avaliação de sequências contaminantes das bibliotecas de sequenciamento

Linhagens	Reads de Cyanobacteria (%)	Índice de cobertura médio	Biblioteca de sequenciamento
<i>Arthrospira</i> sp. CENA597	99	194,47	<i>Mate-pair</i>
<i>Arthrospira</i> sp. CENA650	97	538,19	<i>Paired-end</i>

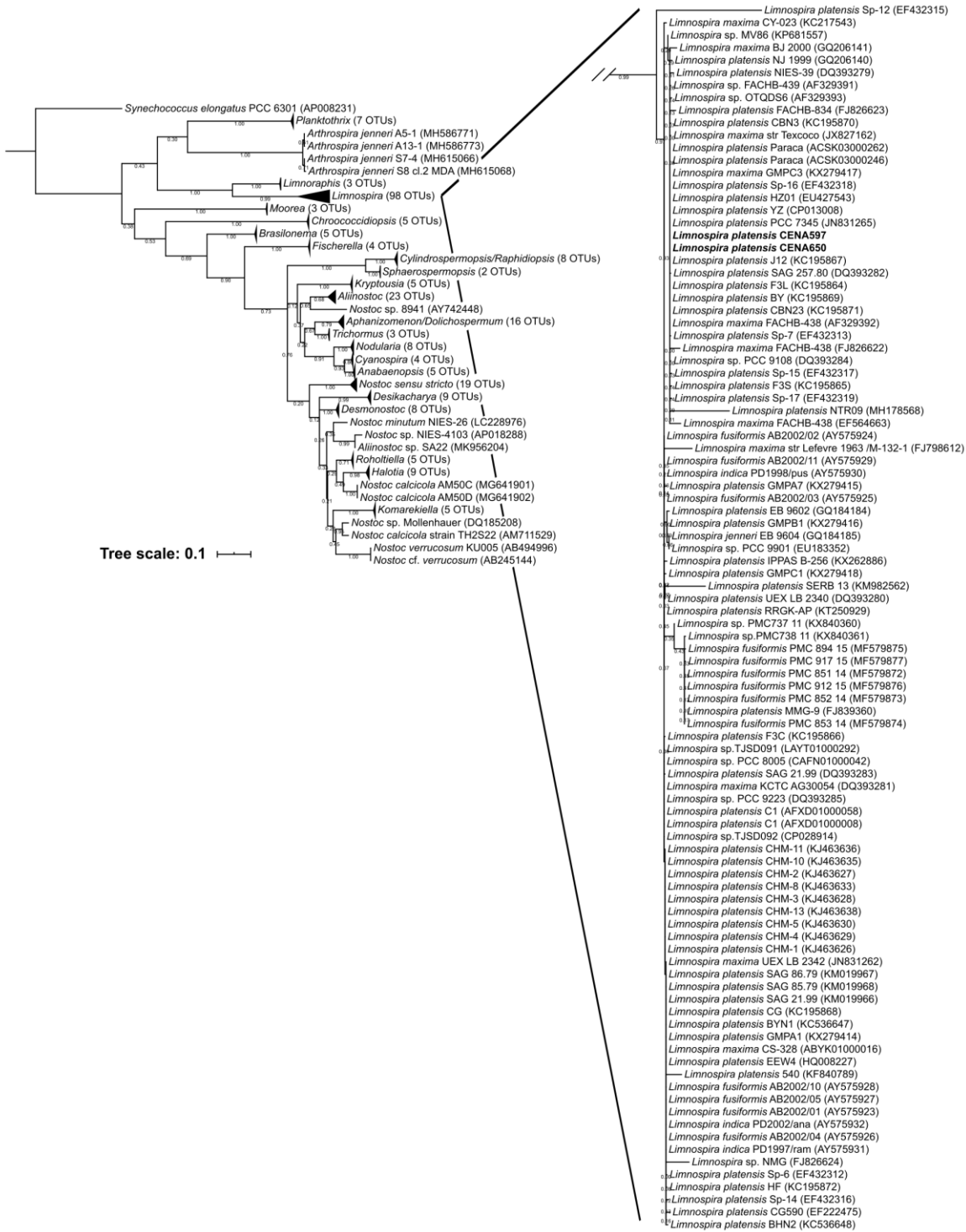
**Tabela 5.** Avaliação da qualidade das montagens genômicas

Linhagem	<i>Scaffolds</i>	Tamanho do genoma (bp)	Maior contig	N50	GC (%)	Completude (%)	Contaminação (%)	Heterogeneidade da linhagem (%)
<i>Limnospira platensis</i> CENA597	1	7183460	7183460	7183460	44.14	99.78	12.88	100.00
<i>Limnospira platensis</i> CENA650	28	7193576	1116598	523178	44.13	99.78	1.26	0.00

### 5.3 Análises filogenéticas com base no gene 16S rRNA e nos genomas

As sequências do gene de 16S RNAr foram recuperadas dos genomas das duas linhagens de *Limnospira*, que resultou em duas cópias idênticas do gene em regiões diferentes para a *L. platensis* CENA597 (coordenadas: 209745-211230 e 6434716-6436201) e apenas uma sequência para a *L. platensis* CENA650 (coordenadas do *scaffold* 9: 18316-19801). A identidade dos genes de 16S RNAr entre as duas linhagens foi de 100%. A identificação de apenas uma cópia do gene na linhagem CENA650 possivelmente pode ser atribuída ao resultado da montagem, que não foi capaz de gerar a cópia do gene, talvez pelo fato de serem sequências idênticas (como na CENA597) e serem colapsadas no processo de montagem ou o gene faltante estar localizado em uma região de difícil resolução. A revisão da montagem poderá eventualmente resolver esse problema. A análise filogenética baseada no gene de 16S RNAr posicionou as linhagens CENA597 e CENA650 em um clado bem suportado de *Limnospira*, dentro de um subclado de *Limnospira platensis*, distante de outros gêneros (Figura 10).

A espécie *Limnospira platensis* tem a denominação de seu gênero como resultado de uma recente re-classificação feita por Nowicka-Krawczyk et al (2019), que redefiniu um clado de *Arthrospira* para *Limnospira*, delegando o status de espécie tipo para a *Limnospira fusiformis* e separando o clado cuja espécie tipo é a *Arthrospira jenneri* em um outra entidade filogenética. O resultado da análise filogenética apresentado aqui é coerente com o trabalho de re-classificação, que posicionou o clado de *Limnospira* distante do clado de *Arthrospira* spp. *sensu stricto*. Como até o momento não se tem genoma disponível de representante do gênero *Arthrospira*, a filogenia com base no gene de 16S RNAr fornece a melhor resolução das relações filogenéticas do clado de *Limnospira* spp. dentro do filo Cyanobacteria.

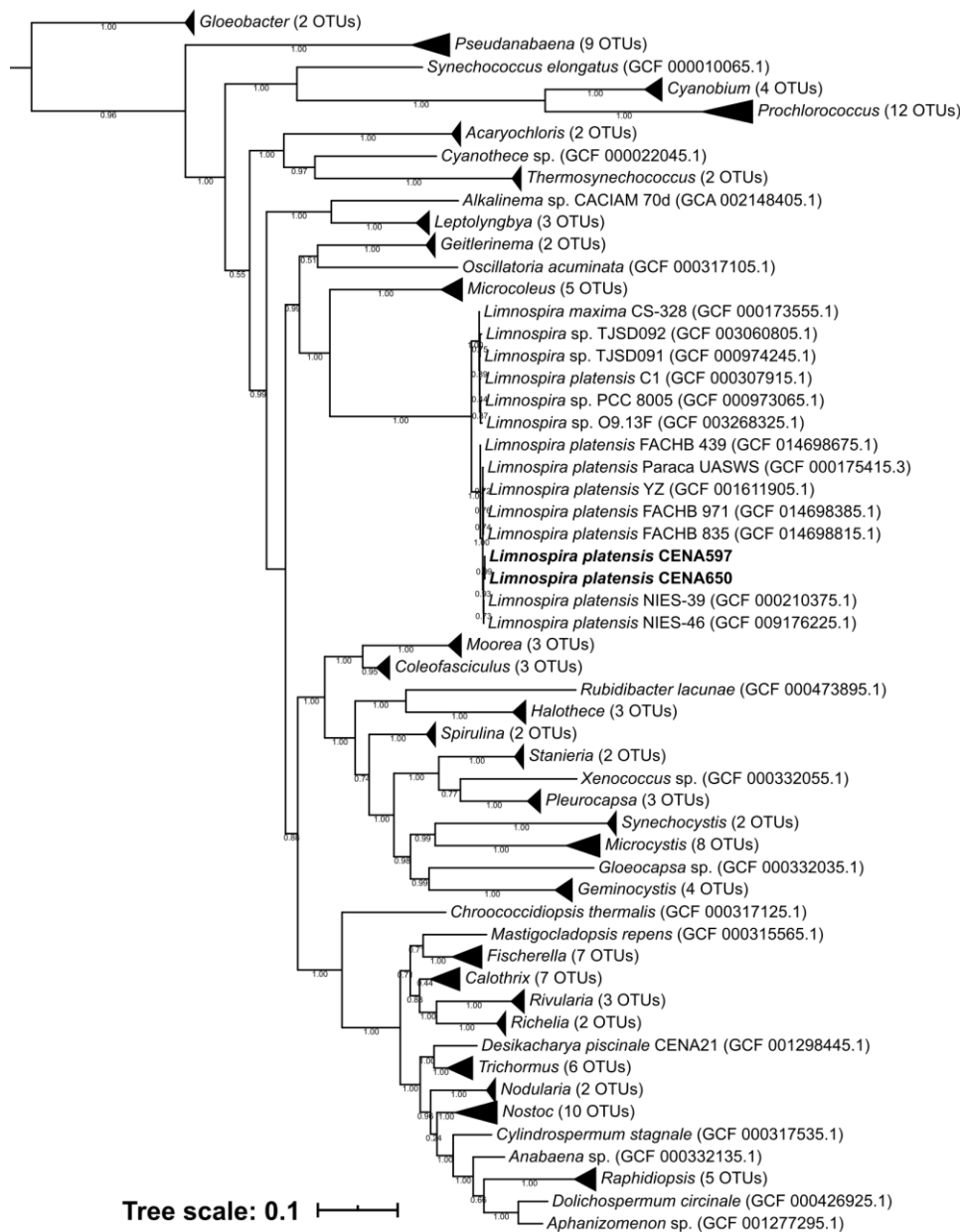


**Figura 10.** Posicionamento filogenético do gênero *Limnospira* com base no gene de 16S RNAr inferido pela árvore máxima verossimilhança com os valores de pontuação de bootstrap. Barra, 0,1 alterações por posição de nucleotídeo.



A análise filogenômica baseada no alinhamento de 120 proteínas conservadas entre cianobactérias posicionou as linhagens CENA597 e CENA650 no clado contendo linhagens do gênero *Limnospira* (Figura 11). A análise utilizou como referência o sistema de classificação taxonômica proposto pelo GTDB (*Genome Taxonomy Database*) (Parks et al., 2018). O clado de *Limnospira* ficou subdividido em dois, com um subclado formado apenas de espécies de *L. platensis*, no qual as duas linhagens CENA597 e CENA650 se posicionaram, e outro subclado com outras várias espécies do gênero.

Ambas as análises filogenéticas mostram a grande proximidade entre as linhagens CENA597 e CENA650, que se apresentaram em posições adjacentes nas duas árvores filogenéticas, e também mostraram um valor de ANI (*Average Nucleotide Identity*) de 99,28% entre elas, além da identidade de 100% entre as sequências do gene de 16S RNAr. Esses resultados indicam que apesar da distância geográfica entre as duas lagoas de onde elas foram isoladas, a população é a mesma, o que pode ser considerado esperado uma vez que as pressões seletivas são semelhantes reduzindo as divergências do genótipo. A linhagem mais próxima de ambas as linhagens do Pantanal foi a *L. platensis* NIES-39 (GCF\_000210375.1), de acordo com análise de identidade média de nucleotídeos, que apresentou valor ANI de 98,8% e fração de alinhamento de 89% para CENA597 e ANI de 98,92% e fração de alinhamento de 92% para CENA650. *L. platensis* NIES-39 foi isolada do lago Chade, localizado no país Chade, no continente Africano (Fujisawa et al., 2010), que possui águas salinas.



**Figura 11.** Árvore filogenômica de máxima verossimilhança baseada no alinhamento de 120 proteínas conservadas em genomas de cianobactérias. As linhagens *L. platensis* CENA597 e *L. platensis* CENA650 são indicadas em negrito. Barra, 0,1 alterações por posição de nucleotídeo

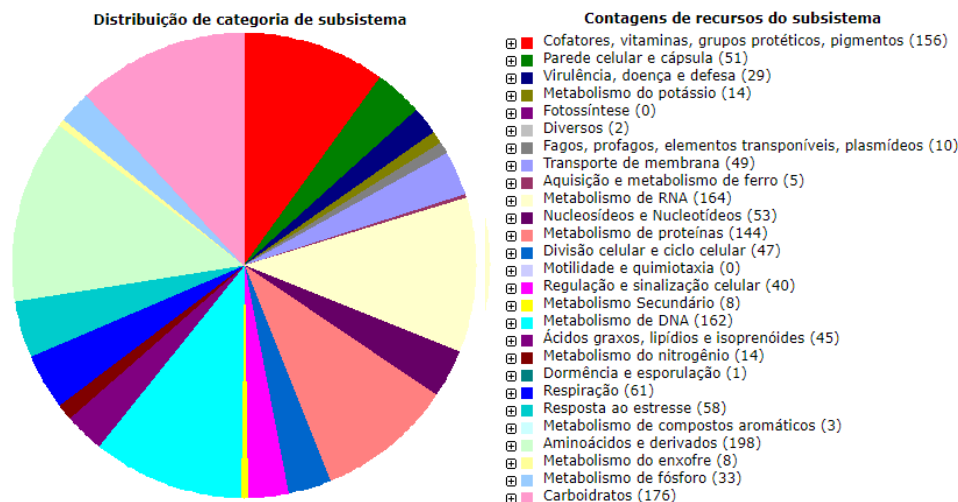
#### 5.4 Anotação funcional dos genomas de *Limnospira platensis* CENA597 e CENA650

No genoma da *L. platensis* CENA597 foram encontrados 7.168 genes preditos, 6 RNAs ribossômicos (RNAr) e 56 RNAs transportadores (RNAt), enquanto que a *L. platensis* CENA650, apresentou 5.378 genes preditos, 04 RNAs ribossômicos (RNAr) e 38 RNAs transportadores (RNAt), de acordo com a predição do Prokka. Buscou-se anotar os elementos

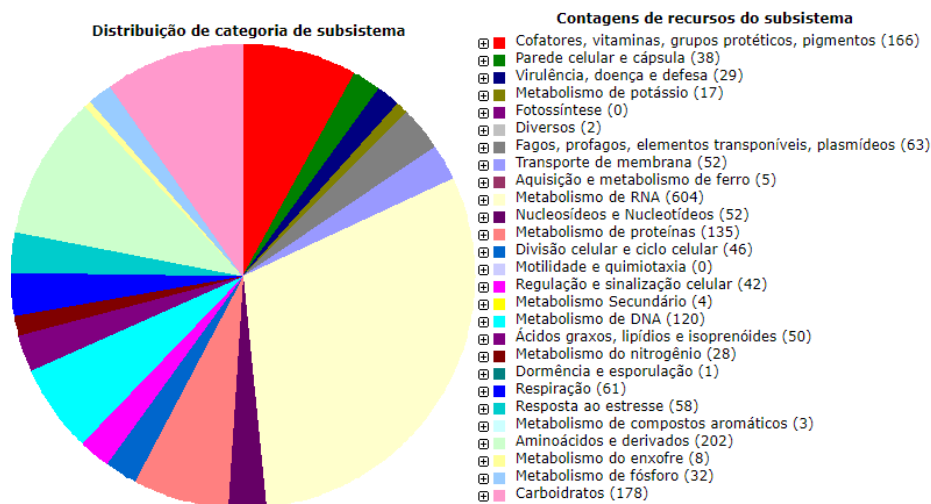
genômicos, as proteínas e funções desempenhadas pelo genoma do organismo para a determinação de seu metabolismo primário e secundário. Uma das características das cianobactérias é a grande diversidade morfológica, genética e metabólica (Larsson et al., 2011).

O servidor RAST proporcionou de forma ampla a funcionalidade dos genes da *Limnospira platensis*, resultando na identificação de 5726 e 6269 de regiões codificantes (CDS) para CENA597 e CENA650, respectivamente. Foram classificados 271 subsistemas na linhagem CENA650, onde 17% foram classificados como conhecidos no subsistema e 83% ligados a processos ainda desconhecidos (Figura 12). Na linhagem CENA597 foram classificados 278 subsistemas, 20% como subsistemas conhecidos e 80% de processos desconhecidos (Figura 13). A maior parte dos genes encontravam-se fora de subsistemas, ou seja, ligados a grupos de famílias protéicas ligados a processos biológicos desconhecidos. Desse total de genes, aproximadamente 60% codificaram proteínas hipotéticas, indicando a alta diversidade genética ainda desconhecida.

Para combater o estresse biótico e abiótico, muitas cianobactérias produzem várias substâncias biologicamente ativas como vitaminas, polissacarídeos, aminoácidos, carboidratos, proteínas e fito-hormônios (SINGH, 2014). A abundância de CDS nas categorias de aminoácidos e derivados nas linhagens CENA597 e CENA650 foi notável no genoma. Genes envolvidos na biossíntese de auxinas e proteína reguladora de biossíntese TOMM foram detectados na categoria de metabólitos secundários. Verificou-se que outras linhagens de *Limnospira/Arthrospira* também apresentavam os mesmos genes. A relação entre os organismos pode explicar a capacidade de produzir esses metabólitos. A categoria de virulência, doença e defesa, encontram-se regiões associadas à resistência de antibióticos e substâncias tóxicas, codificando enzimas de resistências a metais pesados como: cobre, cobalto, zinco, cádmio e mercúrio. A virulência apresentou genes que estão relacionados a invasão e resistência intracelular. As cianobactérias comparadas apresentam características de metabolismo bem parecidas, principalmente as linhagens provenientes de lagoas salinas.



**Figura 12.** Subsistema da linhagem *Limnospira platensis* CENA650



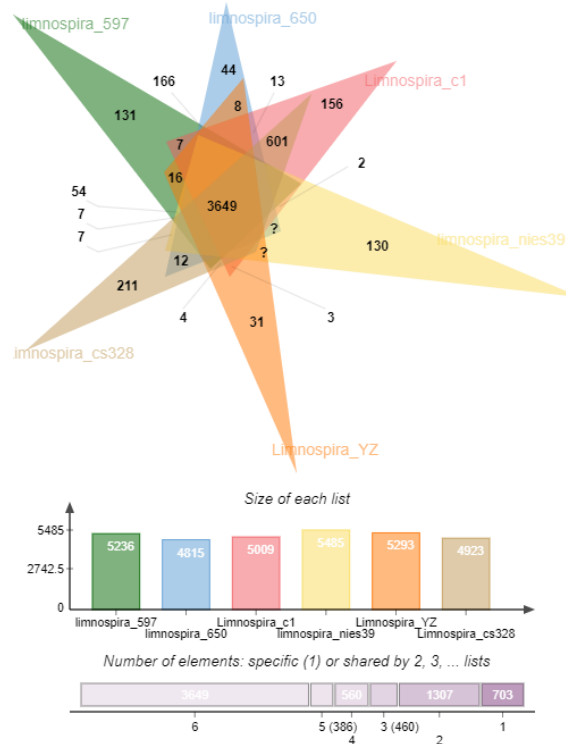
**Figura 13.** Subsistema da linhagem *Limnospira platensis* CENA597

## 5.5 Análise comparativa entre os genomas de *Limnospira*/*Arthrospira*

Os genomas das linhagens de *L. platensis* CENA597 e CENA650, isoladas das lagoas salino-alcálicas do Pantanal, foram comparados com genomas de linhagens de *Arthrospira/Limnospira* depositadas no banco de dados do GenBank. Essas linhagens foram isoladas de lagoas e lagos de variados locais do mundo e várias delas com relatos de formação de florações. O lago Chade, na África, é um lago de água salina, com registro de duas localizado na África, tem uma linhagem com genoma disponível a *Limnospira platensis* C1 (Cheevadhanarak et al., 2012). Outras três linhagens são da China, *Limnospira* sp. TJSD091 linhagens com genomas disponíveis: *Limnospira platensis* NIES-39 (Fujisawa et al., 2010) e

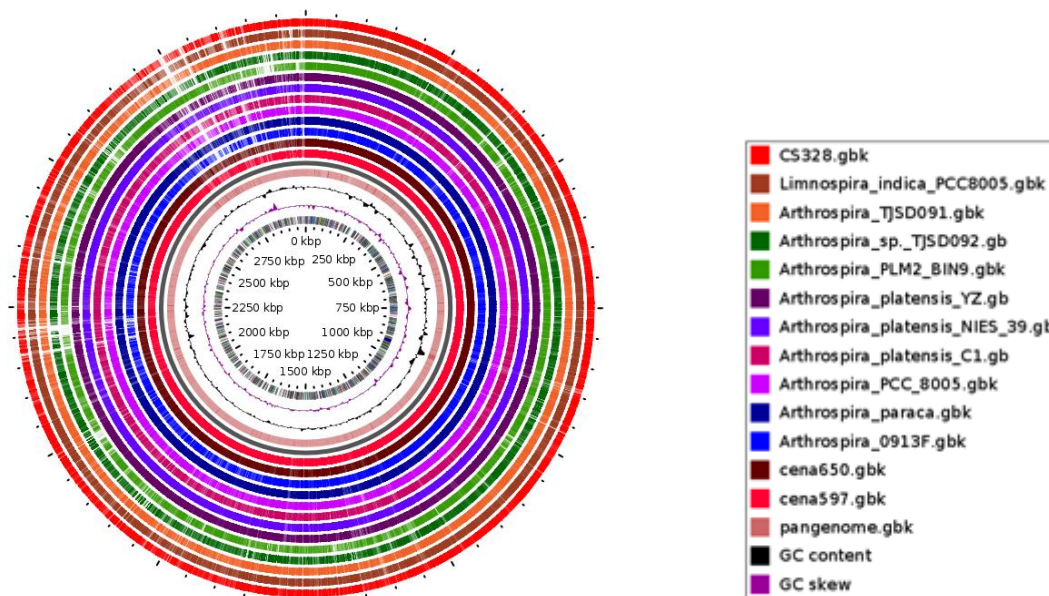
*Limnospira maxima* CS-328 (Carrieri et al., 2011). O lago salino-alcálico Bodou também localizado na África, tem uma linhagem com genoma disponível a *Limnospira platensis* C1 (Cheevadhanarak et al., 2012). Outras três linhagens são da China, *Limnospira* sp. TJS091 (Dong et al., 2015) e *Limnospira* sp. TJS092 (Dong et al., 2018) isoladas do lago Tianjin e a *Limnospira platensis* YZ (Xu et al., 2016) encontrada no Lago Chenghai, ambos os lagos com águas salinas. A *Limnospira* sp. 0913F (Waleron et al., 2017) foi isolada do lago salino Solenoje na Rússia. A *Limnospira* sp. PLM2 BIN9 (Zorz et al., 2019) é originária do Planalto Cariboo no Canadá. A *Limnospira platensis* NIES-46 (Suzuki et al., 2019) é proveniente do Lago salino Texcoco no México. As *Limnospira* sp. PCC 8005 e *Limnospira platensis* Paraca, são de locais desconhecidos.

Apesar da distância geográfica e variações das condições ambientais entre os locais de origem das linhagens, as análises comparativas mostraram muitas semelhanças entre elas. A análise utilizando o OrthoVenn2 mostrou 2.637 clusters baseados nas sequências de proteínas (Figura 14). Os números no diagrama de Venn representam o número de clusters ortólogos que as *L. platensis* CENA597 e CENA650 compartilharam com as outras espécies. O diagrama identificou que 3.649 clusters de genes que foram compartilhados por todas as espécies, indicando a conservação destes genes (Gabaldón; Koonin, 2013). Os clusters únicos, exclusivos para cada uma das linhagens foram 131 genes na CENA597 e 44 genes na CENA650 e compartilharam somente entre si, e não com outras, 166 genes. O maior cluster de genes únicos foi encontrado na linhagem *Limnospira maxima* CS-328, com 211 genes. As linhagens formaram 7304 clusters, 4955 clusters ortólogos e 2349 de clusters de cópia única. A duplicação de genes desses organismos é um mecanismo importante de adaptação (Larsson et al., 2011). A perda de genes entre espécies bacterianas ocorre em grande parte dentro de um pool de genes que são menos conservados e restritos. Embora as mudanças ambientais levem a seleção de genótipos associados a funções específicas, as mudanças no ambiente não são necessárias para explicar a maioria dos casos de perda gênica (Bolotin; Hershberg, 2016).



**Figura 14.** Diagrama de Venn mostrando a distribuição de famílias de genes compartilhados (clusters ortólogos) entre as linhagens de *Limnospira/Arthrospira*.

Mapas do genoma foram gerados no GView Server, utilizados para descrever um complemento total de genes dentro de um grupo de 13 genomas (Figura 15). O genoma completo da *L. platensis* CENA597 foi usado como referência com tamanho de 7.289,027 pb. A contagem ocorre de dentro para fora, indicando que as regiões vazias nos slots de consulta indicaram partes sem ocorrências semelhantes entre os genomas. Essa análise comparativa revela que os genes que são compartilhados entre as espécies estão relacionados ao metabolismo primário, os genes específicos são desconhecidos e, conseqüentemente, não é possível determinar suas funções; ou estão relacionados a respostas ao ambiente, como resistência a altas temperatura, elevadas concentrações de salinidade e fósforo. Enquanto os genes envolvidos no metabolismo primário desses organismos que são compartilhados entre as diversas linhagens, são mais amplamente conhecidos, ainda há uma grande diversidade de genes relacionados ao metabolismo secundário que ainda são desconhecidos (Xu et al., 2016).



**Figura 15.** Análise genômica comparativa de 13 linhagens de *Limnospira*

### 5.5.1 Mecanismo de concentração de carbono

As lagoas salino-alcálinas, são consideradas um ambiente particular com condições limnológicas extremas (alta salinidade e pH -  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Nas lagoas onde ocorrem florações de cianobactérias, o pH fica entre 9,5 a 10,5; salinidade 1 a 25 g/L; carbonato de sódio 10,000 mg/L, sendo que essas variações de valores ocorrem devido a sazonalidade. Para uma análise comparativa mais detalhada, genes de interesse foram designados de acordo com as características do local de coleta.

As cianobactérias desenvolveram um mecanismo de concentração de carbono (CCM), processo importante que maximiza a eficiência da captação de carbono inorgânico, que eleva a concentração de  $\text{CO}_2$  próximo ao sítio ativo da Rubisco (Badger; Pricer, 2003; Klanchui et al., 2017). Este processo permite a adaptação das cianobactérias a vários habitats, especialmente em ambientes com limitação de  $\text{CO}_2$ . O ccm de cianobactérias consiste de dois componentes primários -  $\text{C}_i$  absorção de sistemas e carboxissomos (Klanchui et al., 2017).

Foram selecionados 26 genes envolvidos no processo de mecanismo de carbono -  $\text{C}_i$  absorção de sistemas: NdhD4; NdhF4; *cupB* (baixa afinidade, de captação de  $\text{CO}_2$ ), NdhD3; NdhF3; *cupA* (alta afinidade sistema de captação), BicA; SbtA; SbtB (transporte de  $\text{HCO}_3^-$  localizados na membrana plasmática) (Figura 16).

Carboxissomos: CmpA; CmpB; CmpC; CmpD; CCMK1; CcmK2; CcmK3; CcmK; CcmL; CcmM; CcmN; CcmO; *rbcL*; *rbcS*; RbcX; *cah*; *ecaB* (funções semelhantes que são limitar o vazamento de CO<sub>2</sub>, redução de fotorrespiração e aumento da atividade da carboxilase da Rubisco).

Linhasgens	NdhD4	NdhF4	CupB	NdhD3	NdhF3	cupA	Bica	Sbta	Sbtb	CmpA	cmpB	CmpC	CmpD	CCMK1	CcmK2	CcmK3	CcmK	CcmL	CcmM	CcmN	CcmO	rbcL	rbcS	RbcX	cah	ecaB
<i>Arthrospira</i> CENA597																										
<i>Arthrospira</i> CENA650																										
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328																										
<i>Arthrospira platensis</i> C1																										
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39																										
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-46																										
<i>Arthrospira platensis</i> Paraca																										
<i>Arthrospira platensis</i> YZ																										
<i>Arthrospira</i> sp. 0913F																										
<i>Arthrospira</i> sp. PLM2 Bin.9																										
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091																										
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092																										
<i>Limnospira indica</i> PCC8005																										

Ausência
  Presença

**Figura 16.** Tabela de ausência e presença de genes relacionados aos mecanismos de concentração de carbono das linhagens de *Limnospira*

As linhagens analisadas compartilham quase todos os genes envolvidos no processo CCM, com ausência dos genes *ecaB* e *cah* em todas (Figura 3). Seis linhagens, incluindo CENA597 e CENA650, se diferenciaram pela presença dos genes *Sbta* e *Sbtb*, associados ao transporte de HCO<sub>3</sub> na membrana. Klanchui e colaboradores (2017) observaram que várias espécies de cianobactérias que empregam o mecanismo CCM não possuem os dois genes transportadores, e que a maioria das espécies que possuem são as consideradas altamente alcalifílicas, dentre as quais se inclui a *Limnospira platensis*. O gene *Sbta* é um transportador de alta afinidade (Price et al., 2004), que pode favorecer organismos capazes de utilizar HCO<sub>3</sub> como fonte de carbono. A capacidade das linhagens de *Limnospira* em consumir espécies de carbonatos em um ambiente rico nesse recurso pode ser um dos fatores da dominância em várias lagoas da Nhecolândia.

### 5.5.2 Fósforo

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento das cianobactérias. Além do fósforo inorgânico dissolvido, o fósforo orgânico dissolvido (DOP) é utilizado pelas espécies de cianobactérias por meio da atividade da fosfatase alcalina (APase), que provavelmente



desempenha um papel importante na aquisição de fósforo para o crescimento de algas da mesma maneira que em outras bactérias (Chuai, 2011).

A fosfatase alcalina (APase) está envolvida nos processos de decomposição na DOP e, tem uma importante função no ciclo global do fósforo. Os genes das APases estão agrupadas em três famílias distintas: PhoA, PhoD e PhoX. Os outros genes são importantes para o processo de aquisição do fósforo (Figura 17). A maioria dos genes associados a aquisição de fósforo foram encontrados nas linhagens analisadas, no entanto, o gene da fosfatase alcalina (PhoA), não foi identificado.

Linhagens	PhoA	ppx	ppa	ppk	PstA	PstB	PstC	PstS	PhoB	PhoR	hppA	pita	cph1
<i>Arthrospira</i> CENA597													
<i>Arthrospira</i> CENA650													
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328													
<i>Arthrospira platensis</i> C1													
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39													
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-46													
<i>Arthrospira platensis</i> Paraca													
<i>Arthrospira platensis</i> YZ													
<i>Arthrospira</i> sp. 0913F													
<i>Arthrospira</i> sp. PLM2 Bin.9													
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091													
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092													
<i>Limnospira indica</i> PCC8005													

Ausência
  Presença

**Figura 17.** Tabela de ausência e presença de genes de fósforo

### 5.5.3 Salinidade

As cianobactérias são encontradas em ambientes de diferentes salinidades, incluindo os hipersalinos. As células adaptadas a alta salinidade são capazes de manter um baixo nível de íons inorgânicos tóxicos, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  dentro do citoplasma para evitar danos ao metabolismo (Alvarenga et al., 2020). Na busca para entender melhor a capacidade de linhagens de *Limnospira* em suportar o estresse salino foram encontrados genes associados a tolerância salina, sendo eles *nhaS1*, *nhaS2*, *nhaS3* e *nhaS4*, os quais estão associados ao transporte de íons de sódio; *hik16* e *hik34* associados a proteína quinase de transdução sensorial, atividade quinase do sensor de fósforo; *hisKA* associado a histidina quinase, processo biossintético de nucleotídeo cíclico; e *arcB* associado a proteína do sensor de controle de respiração aeróbica (Figura 18).

A análise dos genes das linhagens de *Limnospira* mostrou presença de alguns dos principais associados ao estresse salino. Exceto pela linhagem *Limnospira indica* PCC 8005, os resultados foram iguais para todas as linhagens. Wang e colegas (2002) mostraram em um estudo de silenciamento gênico que genes antiporter (i.e. *nhaS1*, *nhaS2*, *nhaS3* e *nhaS4*) são importantes não apenas na homeostase salina, mas também na alcalina.

Linhagens	NhaS1	NhaS2	NhaS3	NhaS4	Hik16	Hik34	hiskA	arcB
<i>Arthrospira</i> CENA597	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira</i> CENA650	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira platensis</i> C1	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-46	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira platensis</i> Paraca	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira platensis</i> YZ	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira</i> sp. 0913F	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira</i> sp. PLM2 Bin.9	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Limnospira indica</i> PCC8005	□	□	□	□	□	□	□	□

Ausência    
 Presença

**Figura 18.** Tabela ausência e presença de genes relacionados à resistência de salinidade

#### 5.5.4 Temperatura

Os conjuntos específicos de genes que codificam proteínas de choque térmico (HSP) são sintetizados pelas cianobactérias (Rajaram et al., 2014). A ausência desses genes causa sensibilidade a altas temperaturas. Durante sua evolução, as cianobactérias conservaram seus genes responsáveis pela resistência a elevadas temperaturas, por serem os primeiros seres fotossintetizantes oxigênicos. Nas linhagens de *Limnospira*, todos os genes responsáveis por esse mecanismo foram encontrados (Tabela 19), evidenciando um caráter adaptativo típico desse gênero.

Linhasgens	hrca	SigB	DnaJ	DnaK	lepA	GrpE	CipB	GroEL	groEL2	SigA	SigC	SigE
<i>Arthrospira</i> CENA597												
<i>Arthrospira</i> CENA650												
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328												
<i>Arthrospira platensis</i> C1												
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39												
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-46												
<i>Arthrospira platensis</i> Paraca												
<i>Arthrospira platensis</i> YZ												
<i>Arthrospira</i> sp. 0913F												
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005												
<i>Arthrospira</i> sp. PLM2 Bin.9												
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD091												
<i>Arthrospira</i> sp. TJSD092												

Ausência       Presença

**Figura 19.** Tabela ausência e presença de genes relacionados à resistência a altas temperaturas

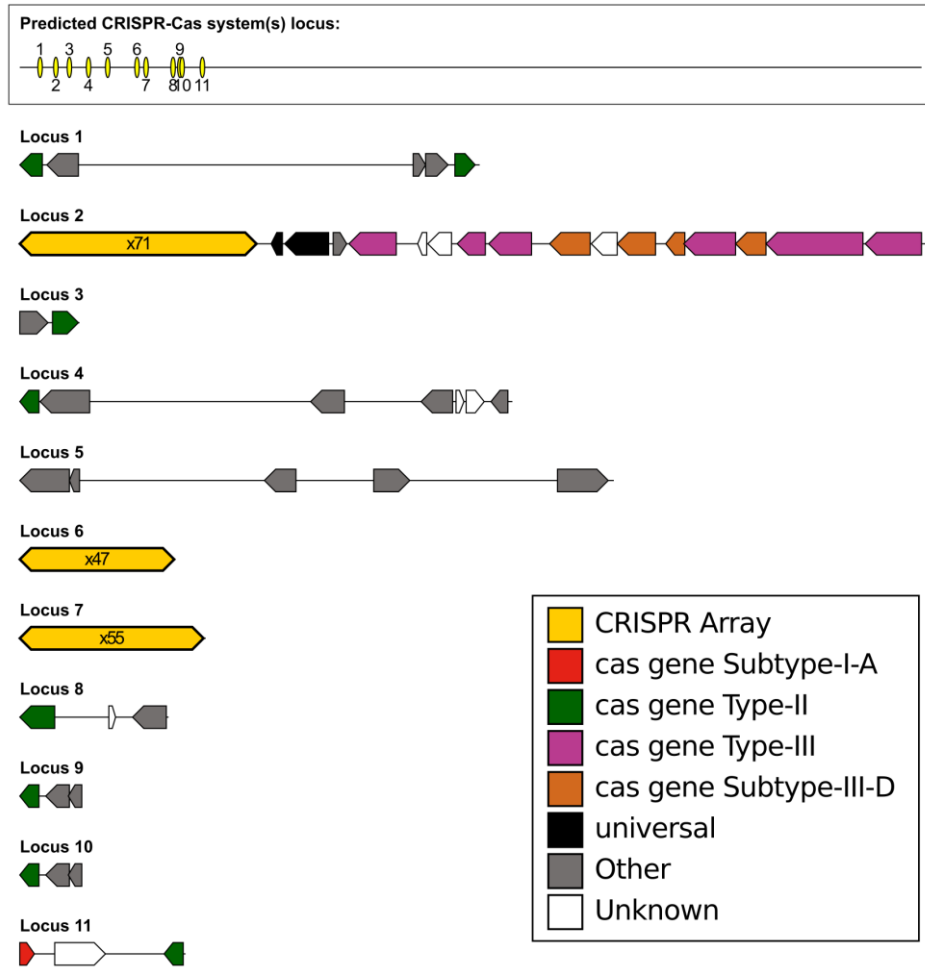
### 5.5.5 Sistema CRISPR/Cas

CRISPR (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) são sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas encontradas em regiões dos genomas dos organismos, sendo que as sequências espaçadoras têm origem extracromossômica, ou seja, são derivadas de plasmídeos ou de vírus (Bolotin et al., 2005). Os vírus são incapazes de infectar com sucesso organismos que possuem espaçadores cujas sequências são correspondentes a trechos de seus genomas, uma vez que moléculas de RNA geradas a partir desses espaçadores são complementares ao patógeno (re)invasor, permitindo combatê-lo de maneira sequência-específica. Próximo ao loco CRISPR existem nucleases, polimerases e helicases denominadas Cas (CRISPR associated genes) que são elementos centrais no funcionamento do loco como um todo (Jansen et al., 2002). Assim, o sistema CRISPR-Cas é uma maquinaria adaptativa de defesa que permite aos organismos protegerem-se contra a (re)invasão de elementos genéticos móveis indesejados, tais como bacteriófagos, transposons e plasmídeos, assemelhando-se a um sistema imune adaptativo nesses organismos (Sampson; Weiss, 2014).

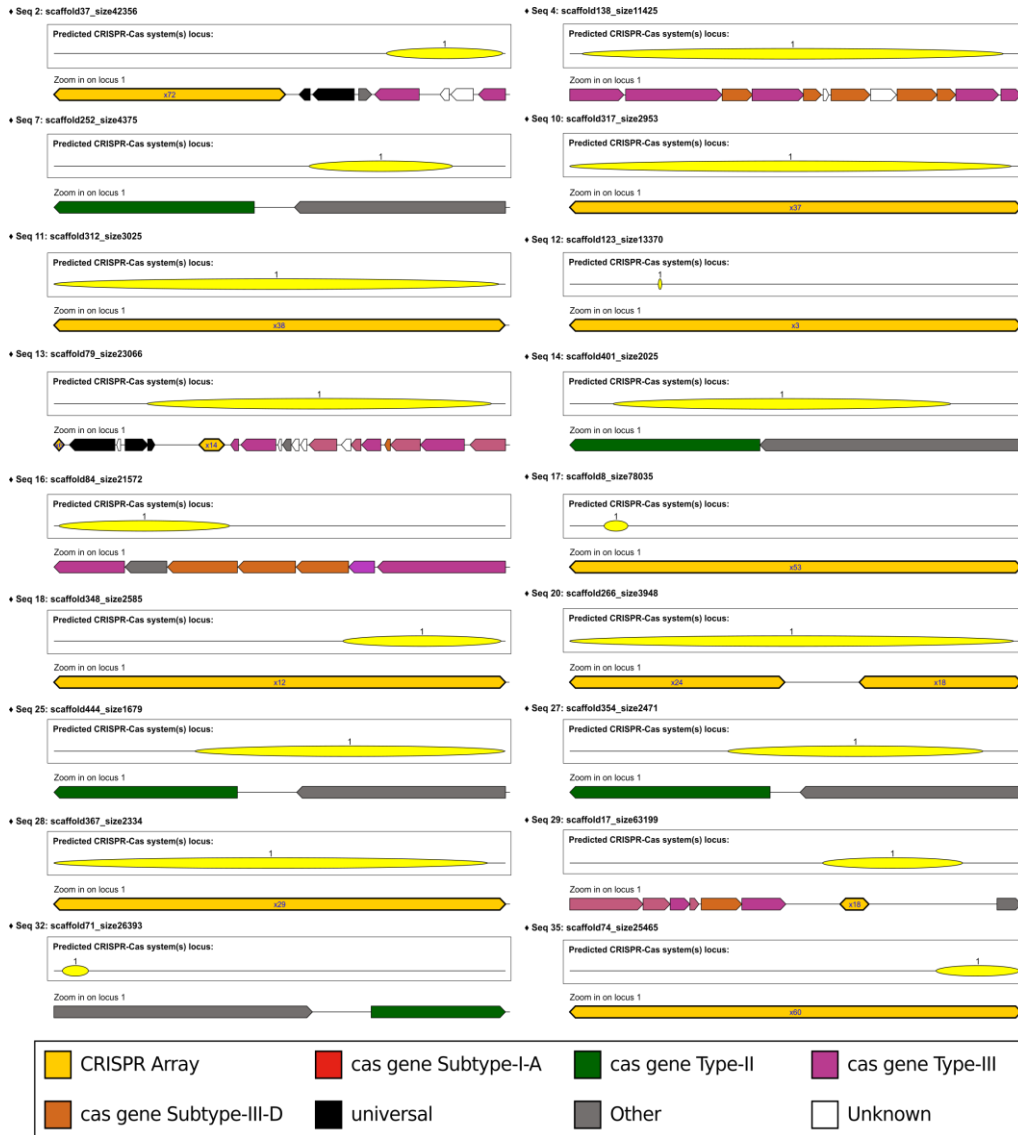
As cianobactérias formadoras de florações que possuem o sistema CRISPR-Cas estão mais protegidas dos ataques de fagos, o que favorece a persistência de suas florações. Xu (2016) analisou alguns genomas da cianobactéria *Arthrospira platensis* identificando três regiões na *A. platensis* YZ e *A. platensis* NIES-39 que continham CRISPR, enquanto na

*A. platensis* C1 e *Arthrospira* sp. PCC 8005 apenas duas. As principais diferenças para os mesmos sistemas CRISPR-Cas entre as linhagens envolveram o número de cópias de repetições e a diversidade de espaçadores.

A análise de CRISPR na *L. platensis* CENA597 e CENA650 resultou na predição de vários agrupamentos gênicos das proteínas Cas e arranjos CRISPR (Figuras 20 e 21). O sistema CRISPR/Cas normalmente é organizado com os genes da síntese proteica localizados adjacentes ao arranjo CRISPR (Rath et al., 2015). Essa configuração foi observada em um locus na *L. platensis* CENA597 (Figura 21), e em três loci na *L. platensis* CENA650 (Figura 21). Foram preditos diversos arranjos em scaffolds pequenos na CENA650, ocupando quase a totalidade ou presentes em algum flanco do contig, que mostra como a presença dessas sequências repetitivas podem impactar na montagem genômica, que são de difíceis resolução quando são utilizadas leituras curtas. A linhagem CENA650 apresentou mais genes e arranjos preditos, comparado a CENA597. Essa divergência provavelmente é resultado de diferentes interações com fagos presentes nas lagoas de origem dessas linhagens, que evidencia infecções mais constantes para CENA650. Embora sejam relativamente próximas geograficamente e tenham uma alta similaridade genômica, os locos de CRISPR dessas cianobactérias se mantêm em constante mudança em resposta às infecções. Essas regiões propensas a alta variabilidade em resposta a estímulos biológicos/ambientais podem ser ferramentas úteis em estudos biogeográficos, por permitirem inferências evolutivas de linhagens muito próximas.



**Figura 20.** Mapeamento genômico de genes da proteína Cas e arranjos de genômicos preditos na linhagem *L. platensis* CENA597



**Figura 21.** Mapeamento genômico de genes da proteína Cas e arranjos de genômicos previstos na linhagem *L. platensis* CENA650

## 6. CONCLUSÕES

- Este trabalho apresenta novos aspectos de duas linhagens de *Limnospira platensis* que habitam as lagoas salino-alcálinas do Pantanal relacionadas à evolução e adaptação dentro de uma mesma espécie. A comparação genômica entre as duas linhagens de lagoas distintas geograficamente mostrou que elas são idênticas entre si, mas apresentam diferenças em relação às linhagens provenientes de locais mais distantes.
- A mineração dos genomas identificou genes relacionados à adaptação das condições ambientais específicas do ambiente extremo estudado, o que possivelmente contribui para a sobrevivência e a dominância dessa espécie cianobacteriana.
- Os genomas sequenciados neste estudo trazem importantes contribuições para a taxonomia e conhecimento da distribuição desse gênero cianobacteriano, além de permitir futuras explorações do potencial biotecnológico desses isolados.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, V.A.C.; Popin, R.V.; Alvarenga, D.O.; Schaker, P.D.C.; Hoff-Rissetti, C.; Varani, A.M.; Fiore, M.F. Genomic and genotypic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii*: Toward an intraspecific phylogenetic evaluation by comparative genomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 306, 2018.
- Almeida, T.I.R.; Calijuri, M.C.; Falco, P.B.; Casali, S.P.; Kupriyanova, E.; Paranhos Filho, A.C.; Sigolo, J.B.; Bertolo, R.A. Biogeochemical processes and the diversity of Nhecolândia lakes, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 391-407, 2011.
- Alvarenga, L.V.; Lucius, S.; Vaz, M.G.M.V.; Araújo, W.L.; Hagemann, M. The novel strain *Desmonostoc salinum* CCM-UFV059 shows higher salt and desiccation resistance compared to the model strain *Nostoc* sp. PCC71201. **Journal of Phycology**, v. 56, p. 496-506, 2020.
- Andreote, A.P.D.; Vaz, M.G.M.V.; Genuário, D.B.; Barbiero, L.; Fiore, M.F. Non-heterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Journal of Phycology**, v. 50, p. 675-684, 2014.
- Andreote, A.P.D.; Dini-Andreote, F.; Rigonato, J.; Machineski, G.S.; Souza, B.C.E.; Barbiero, L.; Rezende-Filho, A.T.; Fiore, M.F. Contrasting the genetic patterns of microbial communities in soda lakes with and without cyanobacterial bloom. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 244, 2018.
- 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.; Sirotkin, 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**, v. 19, p. 455–477, 2012.
- Bezerra, R.P.; Matsudo, M.C.; Converti, A.; Sato, S.; Carvalho, J.C.M. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 297-305, 2008.
- Bertolin, T.B.P.; Costa, J.A.V.; Bertolin, T.E.; Colla, L.M.; Hemkemeier, M. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 118-125, 2005.
- Bhaya, D.; Grossman, A.R.; Steunou, A.-S.; Khuri, N.; Cohan, F.M.; Hamamura, N.; Melendrez, M.C.; Bateson, M.M.; Ward, D.M.; Heidelberg, J.F. Population level functional diversity in a microbial community revealed by comparative genomic and metagenomic analyses. **ISME Journal**, v. 1, p. 703–713, 2007.
- Briebe, C.; Merinos, C. Some advances in the *Spirulina* culture in seawater. In: ICCA, 6., České Budejovice, Czech Republic. **Progress in Biotechnology of Photoautotrophic Microorganisms; abstract...** České Budejovice, Czech Republic, 1993. p. 93.



Carrieri, D.; Ananyev, G.; Lenz, O.; Bryant, D.A.; Dismukes, G.C. Contribution of a sodium ion gradient to energy conservation during fermentation in the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima* CS-328. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 7185–7194, 2011.

Carvalho, J.C.M.; Francisco, F.R.; Almeida, K.A.; Sato, S.; Converti, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially- increasing feeding rates. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 589-597, 2004.

Cheevadhanarak, S., Paithoonrangsarid, K., Prommeenate, P., Kaewngam, W., Musigkain, A., Tragoonrung, S., Tabata, S., Kaneko, T., Chaijaruwanich, J., Sangrakru, D., Tangphatsornruang, S., Chanprasert, J., Tongsimma, S., Kusonmano, K., Jeamton, W., Dulsawat, S., Klanchui, A., Vorapreeda, T., Chumchua, V., Khannapho, C., Thammamongtham, C., Plengvidhya, V., Subudhi, S., Hongsthong, A., Ruengjitchatchawalya, M., Meechai, A., Senachak, J., Tanticharoen, M. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438). **Standards in Genomic Sciences**, v. 6, p. 43–53, 2012.

Chen, F. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D363–D368, 2006.

Coleman, M.L.; Chisholm, S.W. Ecosystem-specific selection pressures revealed through comparative population genomics. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 107, p. 18634–18639, 2010.

Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C., Costa, J.A.V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

Colla, L.M.; Furlong, E.B.; Costa, J.A.V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 161-167, 2007.

Contreras-Moreira, B.; Vinuesa, P. GET\_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 7696–7701, 2013.

Corre, C.; Challis, G.L. New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. **Natural Products Report**, v. 26, p. 977–986, 2009.

Costa, M.P.F.; Telmer, K.H. Utilizing SAR imagery and aquatic vegetation to map fresh and brackish lakes in the Brazilian Pantanal wetland. **Remote Sensing of Environment**, v. 105, p. 204–213, 2006.

Costa, N.B.; Kolman, M.A.; Giani, A. Cyanobacteria diversity in alkaline saline lakes in the Brazilian Pantanal wetland: a polyphasic approach. **Journal of Plankton Research**, v. 38, p. 1389–1403, 2016.

Cronberg, G.; Annadotter, H. **Manual on aquatic cyanobacteria**: a photo guide and a synopsis of their toxicology. Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae; United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation, 2006. 106 p.

Desikachary, T.V. **Cyanophyta**. New Delhi: Indian Council for Agricultural Research, 1959. p. 187-198.

Desikachary, T.V.; Jeeji-Bai, N. Taxonomic studies in *Spirulina* II. The identification of *Arthrospira* ("Spirulina") strains and natural samples of different geographical origins. **Algological Studies**, v. 83, p. 163-178, 1996.

Dillon, J.C.; Phun, A.P.; Dubacq, J.P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 77, p. 32-46, 1995.

Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., Fewer, D.P. Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 642–652, 2015.

Dong, S., Chen, J., Wang, S., Wu, Y., Hou, H., Li, M., Yan, C. Draft genome sequence of cyanobacteria *Arthrospira* sp. TJSD091 isolated from seaside wetland. **Marine Genomics**, v. 24, p. 197–198, 2015.

Donia, M.S.; Schmidt, E.W. Linking chemistry and genetics in the growing cyanobacterium natural products family. **Chemistry and Biology**, v. 18, p. 508-519, 2011.

Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I.M., Barbe, V., Duprat, S., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Le Gall, F., Makarova, K.S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I.B., Scanlan, D.J., Tandeau de Marsac, N., Weissenbach, J., Wincker, P., Wolf, Y.I., Hess, W.R. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 100, p. 10020–10025, 2003.

Estrada, J.E.; Bescós, P.; Villar Del Fresno, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

Fairchild, I.J.; Kennedy, M.J. Neoproterozoic glaciation in the Earth System. **Journal of Geological Society**, v. 164, p. 895–921, 2007.

Fiore, M.F., Alvarenga, D.O., Varani, A.M., Hoff-Rissetti, C., Crespim, 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* SPC777. **Genome Announcements**, v. 1, n. 4, p. e00547-13, 2013.

Fischer, S., Brunk, B.P., Chen, F., Gao, X., Harb, O.S., Iodice, J.B., Shanmugam, D., Roos, D.S., Stoeckert Jr, C.J. Using OrthoMCL to assign proteins to OrthoMCL-DB groups or to cluster proteomes into new ortholog groups. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 35, p. 6.12.1–6.12.9, 2011.

Fujisawa, T., Narikawa, R., Okamoto, S., Ehira, S., Yoshimura, H., Suzuki, I., Masuda, T., Mochimaru, M., Takaichi, S., Awai, K., Sekine, M., Horikawa, H., Yashiro, I., Omata, S.,

Takarada, H., Katano, Y., Kosugi, H., Tanikawa, S., Ohmori, K., Sato, N., Ikeuchi, M., Fujita, N., Ohmori, M. Genomic structure of an economically important cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) platensis* NIES-39. **DNA Research**, v. 17, p. 85–103, 2010.

Furmaniak, M.A.; Misztak, A.E.; Franczuk, M.D.; Wilmotte, A.; Waleron M.; Waleron, K.F. Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2541, 2017.

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

Gantar, M.; Svirčev, Z. Microalgae and cyanobacteria: food for thought. **Journal of Phycology**, v. 44, p. 260-268, 2008.

Genuário, D.B., Andreote, A.P.D., Vaz, M.G.M.V., Fiore, M.F. Heterocyte-forming cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 109, p. 105-112, 2017.

Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, J., Lane, D.J., Pace, N.R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 3584–3592, 1998.

Gomont, M. Monographie des Oscillariées. **Annales des Sciences Naturelles; Botanique Serie 7**, v. 15, p. 263-368; 16: 91-264, 1892-1893.

Guimarães, P.I., Leão, T.F., Melo, A.G.C., Ramos, R.T.J., Silva, A., Fiore, M.F., Schneider, M.P.C. Draft genome of the picocyanobacterium *Synechococcus* sp. strain GFB01, isolated from a freshwater lagoon in the Brazilian Amazon. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. e00876-15, 2015.

Heck, K.; Alvarenga, D.O.; Shishido, T.K.; Varani, A.M.; Dorr, F.A.; Pinto, E.; Rouhiainen, L.; Jokela, J.; Sivonen, K.; Fiore, M.F. Biosynthesis of microcystin hepatotoxins in the cyanobacterial genus *Fischerella*. **Toxicon**, v. 141, p. 43-50, 2018.

Hongsthong, A.; Bunnag, B. Overview of *Spirulina*: biotechnological, biochemical and molecular biological aspects. In: Gault, P.M., Marler, H.J. (Eds.). **Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications**. 1. ed. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 51-103.

Janssen, P.J., Morin, N., Mergeay, M., Leroy, B., Wattiez, R., Vallaes, T., Waleron, K., Waleron, M., Wilmotte, A., Quillardet, P., de Marsac, N.T., Talla, E., Zhang, C.C., Leys, N. Genome sequence of the edible cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 2465–2466, 2010.

Jeeji-Bai, N. A taxonomic revision of the genus *Arthrospira* based on certain new criteria. In: Charpy, L.; Larkum, A.W.D. (Ed.). **Marine cyanobacteria**. Monaco: Musée Océanographique (Bibliothèque), 1999. p. 47-52. (Bulletin of the Institute Oceanography, spec. issue, 19).

Jokela, J.; Heinila, L.M.P.; Shishido, T.K.; Wahlsten, M.; Fewer, D.P.; Fiore, M.F.; Wang, H.; Haapaniemi, E.; Permi, P.; Sivonen, K. Production of high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitors pseudospumigins by the Brazilian benthic *Nostoc* sp. CENA543. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1963, 2017.

Kashtan, N.; Roggensack, S.E.; Rodrigue, S.; Thompson, J.W.; Biller, S.J.; Coe, A.; Ding, H.; Marttinen, P.; Malmstrom, R.R.; Stocker, R.; Follows, M.J.; Stepanauskas, R.; Chisholm, S.W. Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. **Science**, v. 344, p. 416–420, 2014.

Kent, A.G., Dupont, C.L., Yooseph, S., Martiny, A.C. Global biogeography of *Prochlorococcus* genome diversity in the surface ocean. **ISME Journal**, v. 10, p. 1856–1865, 2016.

Kersten, R.D., Yang, Y.L., Xu, Y., Cimermancic, P., Nam, S.J., Fenical, W., Fischbach, M.A., Moore, B.S., Dorrestein, P.C. A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 794, 2011.

Klatt, C.G., Wood, J.M., Rusch, D.B., Bateson, M.M., Hamamura, N., Heidelberg, J.F., Grossman, A.R., Bhaya, D., Cohan, F.M., Köhl, M., Bryant, D.A., Ward, D.M. Community ecology of hot spring cyanobacterial mats: predominant populations and their functional potential. **ISME Journal**, v. 5, p. 1262–1278, 2011.

Komárek, J. Diversity and Modern Classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota). Inaugural Dissertation. Komárek J., Kaštovský, J. 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. **Algological Studies**, v. 109, p. 305-326, 1992.

Komárek, J.; Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B.; Krienitz, L.; Gärtner G.; Schagerl M. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa 19**. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, 2005. p. 1-759.

Komárek, J.; Komárková-Legnerová, J. Taxonomic evaluation of the cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 1. Henotypic diversity of coccoid morphotypes. **Nova Hedwigia**, v. 84, p. 65-111, 2007.

Komárek, J.; Hauer, T. 2013. **CyanoDB.cz** - On-line database of cyanobacterial genera. Word-wide electronic publication. České Budějovice: University of South Bohemia; Institute of Botany AS CR, 2013. Disponível em: <http://www.cyanodb.cz>.

Komárek, K., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, p. 295-335, 2014.

Larsson, J.; Nylander, J.A.A.; Bergman, B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. **BMC Evolution and Biology**, v. 11, p. 187, 2011.

Leão, T., Guimarães, P.I., de Melo, A.G.C., Ramos, R.T.J., Leão P.N., Silva, A., Fiore, M.F., Schneider, M.P.C. Draft genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Nostoc piscinale*

CENA21 isolated from the Brazilian Amazon floodplain. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00189-16, 2016.

Lefort, F., Calmin, G., Crovadore, J., Falquet, J., Hurni, J.P., Osteras, M., Haldemann, F., Farinelli, L. Whole-genome shotgun sequence of *Arthrospira platensis* strain Paraca, a cultivated and edible cyanobacterium. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, p. e00751-14, 2014.

Leikoski, N.; Fewer, D.P.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Rouhiainen, L.; Sivonen, K. Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 701-709, 2010.

Leikoski, N., Liu, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Gugger, M., Calteau, A., Permi, P., Kerfeld, C.A., Sivonen, K., Fewer, D.P. Genome mining expands the chemical diversity of the cyanobactin family to include highly modified linear peptides. **Chemistry and Biology**, v. 20, p. 1033-1043, 2013.

Li, B., Sher, D., Kelly, L., Shi, Y., Huang, K., Knerr, P.J., Joewono, I., Rusch, D., Chisholm, S.W., van der Donk, W.A. Catalytic promiscuity in the biosynthesis of cyclic peptide secondary metabolites in planktonic marine cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 107, p. 10430-10435, 2010.

Lima, S.T., Alvarenga, D.O., Etchegaray, A., Fewer, D.P., Jokela, J., Varani, A.M., Sanz, M., Dörr, F.A., Pinto, E., Sivonen, K., Fiore, M.F. Genetic organization of anabaenopeptin and spumigin biosynthetic gene clusters in cyanobacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 12, p. 769-778, 2017.

Magrin, A.G.E.; Senna, P.A.C.; Komárek, J. *Arthrospira skujae*, a new planktic tropical cyanoprokaryote. **Archiv für Protistenkunde**, v. 148, n. 4, p. 479-489, 1997.

Maksimov, M.O.; Link, A.J. Prospecting genomes for lasso peptides. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 333-344, 2014.

Malone, C.F.S.; Santos, K.R.S.; Sant'Anna, C.L. Algas e cianobactérias de ambientes extremos do pantanal brasileiro. **Oecologia Australis**, v. 16, p. 745-755, 2012.

Medema, M.H., Paalvast, Y., Nguyen, D.D., Melnik, A., Dorrestein, P.C., Takano, E., Breitling, R. 2014. Pep2Path: automated mass spectrometry-guided genome mining of peptidic natural products. **PLoS Computational Biology**, v. 10, p. e1003822, 2014.

Micallef, M.L., D'Agostino, P.M., Al-Sinawi, B., Neilan, B.A., Moffitt, M.C. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. **Marine Genomics**, v. 21, p. 1-12, 2015.

Milié, B.L.; Djilas, S.M.; Canadavnovié-Brunet, J.M. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. **Food Chemistry**, v. 61, p. 443-447, 1998.

Morais, M.G., Reichert, C.C., Dalcanton, F., Durante, A.J., Marins, L.F.F., Costa, J.A.V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

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

Nelissen, B., Wilmotte, A., Neefs, J.-M., De Wachter, R. Phylogenetic relationships among filamentous helical cyanobacteria investigated on the basis of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, p. 206-210, 1994.

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

Nogueira, I.S.; Nabout, J.C.; Oliveira, J.E.; Silva, K.D. Diversidade (alfa, beta e gama) da comunidade fitoplanctônica de quatro lagos artificiais urbanos do município de Goiânia, GO. **Hoehnea**, v. 35, n. 2, p. 219-233, 2008.

Oliveira, M.A.C.L., Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G., Leite, S.G.F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture International**, v. 7, p. 261–275, 1999.

Overbeek, R.; Olson, R.; Pusch, G.D.; Olsen, G.J.; Davis, J.J.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Gerdes, S.; Parrello, B.; Shukla, M.; Vonstein, V.; Wattam, A.R.; Xia, F.; Stevens, R. The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D206–D214, 2014.

Palenik, B., Ren, Q., Dupont, C.L., Myers, G.S., Heidelberg, J.F., Badger, J.H., Madupu, R., Nelson, W.C., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Khouri, H., Mohamoud, Y., Halpin, R., Paulsen, I.T. Genome sequence of *Synechococcus* CC9311: Insights into adaptation to a coastal environment. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 103, p. 13555–13559, 2006.

Pelizer, L.H., Danesi, E.D.G., Rangel, C.O., Sassano, C.E.N., Carvalho, J.C.M., Sato, S., Moraes, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.

Petkau, A., Stuart-Edwards, M., Stothard, P., Van Domselaar, G. Interactive microbial genome visualization with GView. **Bioinformatics**, v. 26, p. 3125–3126, 2010.

Popin, R.V., Rigonato, J., Abreu, V.A.C., Andreote, A.P.D., Silveira, S.B., Odebrecht, C., Fiore, M.F. Draft Genome assembly of the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena* strain CENA596 in shrimp production ponds. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. e00466-16, 2016.

Price, G.D.; Woodger, F.J.; Badger, M.R.; Howitt, S.M.; Tucker, L. Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.101, p. 18228–18233, 2004.

Rath, D.; Amlinger, L.; Rath, A.; Lundgren, M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. **Biochimie**, v. 117, p. 119–128, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>.

Rajaram, H.; Chaurasia, A.K.; Apte, S.K. Cyanobacterial heat-shock response: Role and regulation of molecular chaperones. **Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 647–658, 2014.

Rigonato, J., Alvarenga, D.O., Branco, L.H.Z., Varani, A.M., Brandini, F.P., Fiore, M.F. Draft genome of a novel culturable marine chroococcalean cyanobacterium from the South Atlantic Ocean. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. e00384-15, 2015.

Rippka, R.; Herdman, M. **Catalogue of strains**. Pasteur Culture Collection of cyanobacterial strains in axenic culture. Paris: Institut Pasteur, 1992. 103 p.

Sánchez-Luna, L.D., Bezerra, R.P, Matsudo, M.C, Sato, S., Converti, A., Carvalho, J.C.M. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: A kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 702-711, 2007.

Sánchez-Luna, L.D., Converti, A., Tonini, G.C., Sato, S., Carvalho, J.C.M. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v. 31, p. 237-245, 2004.

Sant'Anna, C.L, Branco, L.H.Z., Gama Júnior, W.A., Werner, V.R. 2011. Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v.11, p. 455-495, 2011. Supl. 1.

Santos, K.R.S. **Biodiversidade de algas e cianobactérias de três lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil**. 2008. 229 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2008.

Santos, K.R.S. **Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales)**. 2013. 194 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2013.

Santos, K.R.; Sant'Anna, C.L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 2, p. 61–83, 2010.

Scanlan, D.J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Gaczarek, L., Hess, W.R., Post, A.F., Hagemann, M., Paulsen, I. Ecological genomics of marine picocyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, p. 249–299, 2009.

Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B.A., Belay, A., Wilmotte, A. *Arthrospira* (*Spirulina*) strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, p. 213-222, 1999.

Schirrmeister, B.E.; Sánchez-Baracaldo, P.; Wacey, D. Cyanobacterial evolution during the Precambrian. **International Journal of Astrobiology**, v. 15, p. 187–204, 2016.



Seckbach, J. (Ed.). **Algae and cyanobacteria in extreme environments**. Dordrecht: Springer, 2007.

Shi, T.; Falkowski, P.G. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 105, p. 2510-2515, 2008.

Shishido, T.K., Jokela, J., Fewer, D.P., Wahlsten, M., Fiore, M.F., Sivonen, K. Simultaneous production of anabaenopeptins and namalides by the cyanobacterium *Nostoc* sp CENA543. **ACS Chemical Biology**, v. 12, p. 2746-2755, 2017.

Shimada, A., Oguchi, M., Otsubo, K., Nitta, K., Koyano, T., Miki, K. Application of tubular photo-bioreactor system to culture *Spirulina* for food production and gas exchange. In: Miyachi, S., Karube, I., Ishida, Y. (Ed.). **Current topics in marine biotechnology**. Tokyo: Japanese Society of Marine Biotechnology, 1989. p. 147-161.

Sili, C.; Giuseppe, T.; Vonshak, A. *Arthrospira* (*Spirulina*). In: Whitton, B.A. (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria**. II: Their Diversity in Space and Time. Durham: Durham University, School of Biological & Biomedical Science, 2012. p. 677-705.

Singh, A.K.; Summerfield, T.C.; Li, H.; Sherman, L.A. The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB. **Archives of Microbiology**, v. 186, p. 273–286, 2006.

Stizenberger, E. *Spirulina* und *Arthrospira* (nov. gen.). **Hedwigia**, v. 1, p. 32-41, 1852.

Sun, Z.; Blanchard, J.L. Strong genome-wide selection early in the evolution of *Prochlorococcus* resulted in a reduced genome through the loss of a large number of small effect genes. **PLoS One**, v. 9, p. e88837, 2014.

Tomaselli, L.; Palandri, M.; Tredici, M. On the correct use of *Spirulina* designation. **Algological Studies**, v. 83, p. 539-548, 1996.

Vaz, M.G.M.V., Genuário, D.B., Andreote, A.P.D., Malone, C.F.S., Sant'Anna, C.L., Barbiero, L., Fiore, M.F. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: two novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline-alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 298-308, 2015.

Volkman H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L.B., Sant'Anna, E.S. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 98–101, 2008.

Vonshak, A.; Tomaselli, L. *Arthrospira* (*Spirulina*): Systematics and Ecophysiology. In: Whitton, B.A. and Potts, M. (Eds.). **The ecology of cyanobacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 505-522.

Walworth, N., Pfreundt, U., Nelson, W.C., Mincer, T., Heidelberg, J.F., Fu, F., Waterbury, J.B., del Rio, T.G., Goodwin, L., Kyrpides, N.C., Land, M.L., Woyke, T., Hutchins, D.A., Hess, W.R., Webb, E.A. *Trichodesmium* genome maintains abundant, widespread noncoding DNA in situ, despite oligotrophic lifestyle. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 112, p. 4251–4256, 2015.

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

Wang, Y.; Coleman-Derr, D.; Chen, G.; Gu, Y.Q. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W78–W84, 2015.

Wang, H.L.; Postier, B.L.; Burnap, R.L. Polymerase chain reactionbased mutagenesis identify key transporters belonging to multigene families involved in Na<sup>+</sup> and pH homeostasis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Molecular Microbiology**, v. 44, p. 1493–1506, 2002.

Wietz M, Millán-Aguiñaga N, Jensen PR. CRISPR-Cas systems in the marine actinomycete *Salinispora*: Linkages with phage defense, microdiversity and biogeography. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2014.

Whitton, B.A. (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria**. II. Their Diversity in Space and Time. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012.

Wittrock, V.B.; Nordstedt, C.S.O. *Algae aquae dulcia exiccata*. **Descriptiones Systematicae Dispositae**, fac. 14, n. 679, p. 59, 1844.

Ziemert, N.; Ishida, K.; Weiz, A.; Hertweck, C.; Dittmann, E. Exploiting the natural diversity of microviridin gene clusters for discovery of novel tricyclic depsipeptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3568-3574, 2010.