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

Caracterização genômica de bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias
da ordem Nostocales

Bruno Costa Evangelista de Souza

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

Piracicaba
2020

Bruno Costa Evangelista de Souza
Bacharel e m Ciências Biológicas

Caracterização genômica de bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias da ordem
Nostocales
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2020

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

Souza, Bruno Costa Evangelista de

Caracterização genômica de bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias da ordem Nostocales / Bruno Costa Evangelista de Souza -- versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.-- Piracicaba, 2020.

70 p.

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

1. Simbiose 2. Cianosfera 3. Metagenômica 4. Binning I. Título

Aos

*Meus pais, Lêda e Gabriel, meu porto seguro,
que sempre me apoiam, confortam e acalmam,*

A

*Minha avó Lindaura, nesse eterno sentimento de
saudades que tanto me dói,*

Aos

*Meus irmãos, os melhores do mundo, tão queridos e
intensos, que nem a distância nos afasta,*

Ao

*Ian, que me surpreende com ligações de saudades
inesperadas no meio da tarde,*

Ao

*Lucas, que suportou com muita paciência
todos os dramas que uma
pós-graduação pode gerar.*

A todos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha família, meu bem maior. São eles que acreditam realmente que a educação pode me levar a qualquer lugar. São eles que estão ali para o apoio incondicional. Foi por vocês que eu aguentei a distância, as ausências, que tanto me doeram, superei as frustrações. Mãe, cada passo que eu dou adiante é para te dar orgulho e te fazer feliz.

À Prof.^a. Dr.^a. Marli de Fátima Fiore, pela orientação, confiança, ensinamentos e a oportunidade de desenvolver este projeto da melhor maneira possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Doutorado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelo fornecimento de toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Danilo Alvarenga pelos ensinamentos, lições, apoio e, principalmente, pela amizade.

A Dr.^a. Ana Paula Dini Andreote por todo suporte, apoio, conselhos, lições e, principalmente, pela amizade nesses 6 anos de convívio quase diário.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP que passaram pela minha vida ao longo desses quatro anos e com quem dividi as angústias e ensinamentos do dia-a-dia, Stella Camargo, Renata Cruz, Lara Lovosoi, Gladys Castillo, Andrews Delbaje, Rafael Dextro, Júlia Formaggio, Rafael Popin e Thierry Pellegrinetti.

Um agradecimento especial a Carolinne Rosa, Juliana Costa, Taiane Barradas e Paul Lineker pelo companheirismo, ajuda, suporte e amizade que construímos nesses últimos anos.

Aos amigos de toda vida, Catharine Coelho, Carol Oliveira, Rafaela Oliveira, Danilo Matos que não permitiram que a distância enfraquecesse nosso amor e amizade. Um

agradecimento especial e a Sidney Pereira e Matheus Nolasco que estiveram nos meus piores momentos me orientando e ajudando.

Aos amigos conquistados em Piracicaba, especialmente a Alan Sartori, Lu Soares, Bruna Castilho e Mariana Finotti por ajudar a diminuir meus sentimentos de solidão.

A Marta Moitinho e Laura Bononi, amigas para toda vida e que estivemos juntos desde o início do mestrado, nos ajudando e dando suporte sempre que necessário. Muito obrigado, sem vocês essa tese não teria saído.

Ao Lucas Valverde, pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo, por fazer meus dias mais felizes, menos tensos, por me fazer enxergar a vida de uma forma mais simples e menos dramática.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e à secretaria de Pós-Graduação da ESALQ, especialmente a Maria Solizete, por todo o auxílio fornecido.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não há nada melhor do que a adversidade.
Cada derrota, cada mágoa, cada perda,
contém sua própria semente, sua própria lição
de como melhorar seu desempenho na próxima vez.”*
Malcolm X

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. BIOLOGIA DAS CIANOBACTÉRIAS	13
2.2. ASSOCIAÇÕES SIMBIÓTICAS COM CIANOBACTÉRIAS	14
2.3. CIANOSFERA – A ASSOCIAÇÃO ENTRE CIANOBACTÉRIAS E OUTRAS BACTÉRIAS	17
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. INFORMAÇÕES DOS CONSÓRCIOS E GERAÇÃO DOS DADOS	23
4.2. EXTRAÇÃO DE DNA E SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO.....	24
4.3. MONTAGEM DO METAGENOMA E <i>BINNING</i>	24
4.4. ANOTAÇÃO DOS GENOMAS	25
4.5. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISES FILOGENÉTICAS	25
4.6. DIVERSIDADE MICROBIANA DOS CONSÓRCIOS	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. MONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS GENOMAS	27
5.2. PADRÃO TAXONÔMICO DOS GENOMAS	31
5.3. DIVERSIDADE TAXONÔMICA NOS CONSÓRCIOS BASEADA NO METAGENOMA E NO GENE 16S rRNA.....	37
5.4. ANOTAÇÃO FUNCIONAL DA COMUNIDADE BACTERIANA	45
6. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	66
<p>APÊNDICE A. ÁRVORE FILOGENÔMICA CONSTRUÍDA PELO PROGRAMA GTDB-Tk UTILIZADA COMO BASE PARA A INFERÊNCIA TAXONÔMICA. A PRIMEIRA ÁRVORE MOSTRA A ÁRVORE COMPLETA, MAS, PARA FACILITAR A VISUALIZAÇÃO, ELA FOI SUBDIVIDIDA EM PARTES.</p>	

RESUMO

Caracterização genômica de bactérias heterotróficas associadas a cianobactérias da ordem Nostocales

Cianobactérias podem estabelecer associações ecológicas com muitos organismos, como fungos, animais e plantas. Embora cianobactérias possam também interagir com outras bactérias, essas associações são pouco estudadas. As cianobactérias da ordem Nostocales são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, sendo que todos utilizam a mesma estratégia para conseguir realizar esse metabolismo. Logo, tornam-se um modelo adequado para o estudo da interação bactéria-cianobactérias. Os avanços das técnicas de sequenciamento e da bioinformática vêm, nos últimos anos, permitindo que essas interações sejam estudadas em maior detalhe. Dessa forma, neste trabalho, tivemos o objeto de caracterizar os genomas das bactérias da cianosfera de cinco linhagens de cianobactérias da ordem Nostocales analisando o potencial metabólico do consórcio. Para isso, os dados resultantes do sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq dos cultivos unicelulares das linhagens *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, *Nostoc* sp. CENA67, *Fischerella* sp. CENA161 e *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 e CENA303 foram analisados, pré-processados e montados, e os genomas das cianobactérias e das bactérias da cianosfera foram reconstruídos, levando em conta a abundância e a proporção de conteúdo GC. Os genomas foram taxonomicamente classificados e funcionalmente anotados. A diversidade da comunidade foi acessada por meio da recuperação de sequências do gene 16S rRNA. Os dados brutos do sequenciamento também foram analisados para taxonomia e função no servidor MG-RAST. No total, 33 genomas de alta qualidade foram recuperados e identificados como pertencentes às classes Actinobacteria (1), Alphaproteobacteria (23), Bacteroidetes (2), Betaproteobacteria (4), Deltaproteobacteria (1) e Gammaproteobacteria (3). As análises de diversidade baseadas no gene 16S rRNA identificaram 41 gêneros de bactérias associadas às cianobactérias, distribuídos em 5 filos diferentes, revelando estrutura e composição distintas para cada consórcio. A análise funcional do consórcio revelou o potencial de produção de muitos metabólitos secundários pelas bactérias da cianosfera que podem atuar no estabelecimento e manutenção de sua associação com as cianobactérias. Os dados revelam ainda que a cianobactéria é a única fornecedora de nitrogênio para os organismos do consórcio, uma vez que é a única capaz de realizar o processo de fixação de nitrogênio. Por sua vez, as cianobactérias apresentam maior capacidade de utilização de fósforo inorgânico, enquanto que as bactérias da cianosfera têm genes para consumo de fontes de fósforo orgânico. Esses dados sugerem que as bactérias da cianosfera são dependentes do hospedeiro tanto em estrutura, como em função.

Palavras-chave: Simbiose, Cianosfera, Metagenômica, Binning

ABSTRACT

Genome characterization of heterotrophic bacteria associated with nostocalean cyanobacteria

Cyanobacteria may establish ecological associations with several organisms like fungi, animals and plants. Although cyanobacteria may also interact with other bacteria, these associations are little studied. Cyanobacteria from Nostocales order can fix atmospheric nitrogen, using the same strategy to perform the metabolism. Thus, they are an adequate model for study of bacteria-cyanobacteria interactions. The advantages of sequencing and bioinformatic techniques in the last years, allow a deeper study of these association. Then, this work aimed to characterize the genomes of cyanosphere bacteria of five Nostocalean cyanobacterial strains as *in vitro* consortia, analyzing the metabolic potential of the consortia. To achieve these goals, the MiSeq Illumina data sequencing from the unicyanobacterial strains *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, *Nostoc* sp. CENA67, *Fischerella* sp. CENA161 and *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 and CENA303 were analyzed, pre-processed and assembled for subsequent genomes separation of the cyanobacterium and its cyanosphere bacteria, in function of abundance and GC content. The genomes were classified and functionally annotated. Consortia diversity was inferred by retrieving 16S rRNA gene sequences from metagenome. The raw data sequencing were also analyzed to taxonomy and function on MG-RAST server. A total of 33 high-quality genomes were recovered and identified on the classes Actinobacteria (1), Alphaproteobacteria (23), Bacteroidetes (2), Betaproteobacteria (4), Deltaproteobacteria (1) e Gammaproteobacteria (3). The diversity analysis based on 16S rRNA identified 41 genus of cyanosphere bacteria, distributed into five distinct phyla, revealing different structure and composition to each consortium. Functional analysis showed the potential production of many secondary metabolites by cyanosphere bacteria that can act in establishing and maintaining their association with cyanobacteria. Furthermore, the data reveal the cyanobacteria as the only nitrogen provider, since it is the only one capable of performing the nitrogen fixation process. On the other hand, cyanobacteria have a high capacity for using inorganic phosphorus, while associated bacteria have genes for consumption of organic sources of phosphorus. These results suggest that the cyanosphere bacteria are dependent on host in structure and function.

Keywords: Symbiosis, Cyanosphere, Metagenomic, Binning

1. INTRODUÇÃO

Cianobactérias são organismos fotoautotróficos e cosmopolitas com uma grande plasticidade fenotípica e fisiológica. Esses organismos possuem uma longa história evolutiva, tendo sua origem no planeta à aproximadamente 2,4 bilhões de anos (Blank; Sánchez-Baracaldo, 2010), o que favoreceu que muitas espécies desenvolvessem associações com vários organismos, incluindo eucariotos, tais como acídias, vermes equioides, larvas de mosquitos, esponjas, diatomáceas, dinoflagelados, fungos (líquens) e plantas (cicas, briófitas, *Azolla*, *Gunnera*) (Rai et al., 2002). Embora sendo muito comuns, as associações entre cianobactérias e outras bactérias só recentemente começaram a ser melhor estudadas.

Associações entre cianobactérias e outros microrganismos têm sido estimadas entre as mais antigas formas de vida conhecidas. Estudos realizados com estromatólitos – estruturas litificadas complexas organizado em camadas bem definidas, na qual acredita-se que tenham sido formadas pela captura e ligação de partículas de sedimentos a microrganismos, especialmente cianobactérias (Kromkamp et al., 2007) – sugerem que agregados microbianos dominados por cianobactérias favoreceram o desenvolvimento de comunidades microbianas com interações complexas, que podem durar um longo período (Cohen & Gurevitz, 2006). Mais recentemente, trabalhos mostram que florações, caracterizadas pelo aumento massivo de cianobactérias em corpos d’água eutrofizados, são frequentemente acompanhadas por interações com diversas comunidades microbianas heterotróficas que podem favorecer o crescimento cianobacteriano (Berg et al., 2009). Outras interações, em outros ambientes dominados por cianobactérias, como biofilmes e crostas, também mostram uma intrínseca relação entre cianobactérias e a comunidade microbiana heterotrófica associada modulando as características ambientais e os processos que ocorrem.

A investigação *in situ* dessas interações entre cianobactérias e bactérias heterotróficas é metodologicamente complexa. Contudo, culturas unicianobacterianas isoladas em laboratórios frequentemente contém bactérias associadas devido, em parte, a sua co-dependência (Cole et al., 2014). Logo, essas culturas poderiam ser utilizadas como um bom modelo para entender como essas interações ocorrem, permitindo buscar por possíveis complementaridades metabólicas entre esses microrganismos.

Cianobactérias são organismos que apresentam uma grande variedade metabólica, com diferentes estratégias para obtenção nutrientes. A fixação de nitrogênio, por exemplo, é um metabolismo realizado por diferentes grupos de cianobactérias, que só ocorre em axônia, de modo que, dentro do filo das cianobactérias existem diferentes estratégias para proteger a

nitrogenase, a enzima responsável pelo processo de fixação de nitrogênio, da ação deletéria do oxigênio (Herrero et al., 2013). As diferentes estratégias vão desde a separação temporal entre a fixação de nitrogênio e a fotossíntese (processo no qual há a liberação de oxigênio) até a separação espacial, como ocorre nas cianobactérias da ordem Nostocales (Fiore, Honda, 2008). Dentre as cianobactérias, as Nostocales constituem um grupo no qual todos os organismos possuem a mesma estratégia para a realização do processo de fixação de nitrogênio, que é a diferenciação de células vegetativas em heterócitos, que são células que perdem o aparelho fotossintético e passam por outras modificações que as deixam tornam aptas para realização exclusivamente da fixação de nitrogênio.

Nesse trabalho, cinco consórcios microbianos incluindo cianobactérias da ordem Nostocales e bactérias associadas foram sequenciados e seus genomas recuperados e caracterizados, numa tentativa de tentar verificar características que possam favorecer a interação entre os organismos. Desse modo, aqui, hipotetizamos que as comunidades bacterianas associadas às cianobactérias apresentam metabolismos complementares ao metabolismo do hospedeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia das cianobactérias

As cianobactérias têm sua origem datada em pelo menos 2,4 bilhões de anos, sendo um dos organismos com a história evolutiva mais longa. São microrganismos Gram-negativos, pertencentes ao domínio Bacteria, caracterizados principalmente pela sua capacidade de realizar fotossíntese oxigênica (Blank; Sánchez-Baracaldo, 2010), e cuja morfologia varia desde formas unicelulares até talos formados por ramos filamentosos ramificados, com células diferenciadas e com diferentes funções (Rai et al., 2002). Considerados um dos organismos mais antigos do planeta, as cianobactérias estão presentes em praticamente todos os ambientes, sendo comumente encontrados em corpos d'água doce ou marinhos, no solo, sobre rochas, sobre troncos de plantas, e também em ambientes considerados extremos, como lagos com extremos de pH, desertos, águas termais e lagos antárticos (Castenholz, 1973; Dor; Danin, 1996; Skulberg, 1995).

As cianobactérias foram os primeiros organismos a realizar a fotossíntese oxigênica, fazendo com que ocorresse o acúmulo de oxigênio na atmosfera terrestre, tornando-a oxidante, e permitindo, assim, o desenvolvimento da vida aeróbica mais complexa como conhecemos hoje. Esse marco geológico é conhecido como Grande Evento de Oxidação, ocorrido há 2,4 bilhões de anos (Fischer et al., 2016; Allen et al., 2019). Além da capacidade de fixar carbono através da fotossíntese, as cianobactérias ainda são capazes de realizar outro importante processo biológico, a fixação de nitrogênio. Desse modo, elas podem ser consideradas como um dos principais produtores primários de matéria orgânica e de entrada de nitrogênio nos ecossistemas (Castenholz, 2001).

O nitrogênio faz parte da estrutura de proteínas, ácidos nucleicos, peptidoglicanos e outras moléculas essenciais a todos os seres vivos (Young, 1992). Dessa forma, ele é um elemento limitante ao desenvolvimento e sustentabilidade de toda a cadeia trófica de um ecossistema. Embora seja abundante na atmosfera, a introdução desse elemento na cadeia trófica é realizada apenas por microrganismos que possuem a enzima nitrogenase, que é capaz de catalisar a reação de quebra da tripla ligação entre dois átomos de nitrogênio formando, assim, amônia, que é então incorporada na cadeia trófica. Entre os principais organismos capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio, temos bactérias de vida livre do solo, rizóbios simbiotes de raízes de plantas e cianobactérias, que são os principais fornecedores de nitrogênio em ambientes de aquáticos (Holguin et al., 2001; Zehr, 2011).

Embora a fotossíntese e fixação biológica de nitrogênio sejam os principais metabolismos encontrados em cianobactérias, existem algumas particularidades que nos mostram a versatilidade metabólica desse grupo de microrganismos. Algumas cianobactérias, por exemplo, são capazes de sobreviver no escuro e em condições de anaerobiose, uma vez que apresentam a capacidade de realizar fermentação de substratos orgânicos por diferentes vias metabólicas, produzindo CO₂, hidrogênio, formato, acetato, lactato e etanol, além de poder utilizar sulfeto como aceptor de elétrons (Cohen et al., 1986; Stal; Moezelaar, 1997).

Além de metabolismos primários, as cianobactérias ainda são capazes de produzir muitas substâncias químicas, derivadas de seu metabolismo secundário, como hidrocarbonetos, ácidos graxos, terpenoides, carotenoides, sacarídeos, lipopeptídeos, toxinas, entre outras que possuem importância ecológica, estando associadas a vantagem competitiva ou contribuindo para a realização de associações e simbioses (Dembitsky; Rezanka, 2005; Liaimer et al., 2015).

Toda essa diversidade metabólica faz com que as cianobactérias sejam um exemplo de sucesso evolutivo, o que se reflete em seu desempenho de importantes funções ecológicas e no estabelecimento de associações mutualísticas e simbióticas com muitos outros organismos.

2.2. Associações simbióticas com cianobactérias

O termo simbiose pode ter diferentes significados, mas de forma geral ele está relacionado a relações mutualísticas obrigatórias entre dois organismos distintos, envolvendo a troca de metabólitos entre ambos os simbiontes, com benefício entre ambos, mesmo que em diferentes proporções (Rai, 1990). Quando se estuda a ocorrência de simbioses em cianobactérias, o primeiro ponto que se destaca é a amplitude de organismos com os quais elas conseguem interagir. Enquanto alguns organismos tendem a interagir com uma ou poucas espécies, como é o caso dos rizóbios, as cianobactérias já foram descritas em associação com diatomáceas, dinoflagelados, fungos, ascídias, esponjas, ursos e diversos grupos de plantas (Adams, 2000 ; Rai et al., 2002 ; Usher et al., 2007; Adams et al. 2013).

Embora cianobactérias sejam bastante diversas e abundantes em ecossistemas terrestres, apenas uma pequena parte destas podem realizar simbioses bem definidas com hospedeiros eucarióticos (Rikkinen, 2017). Os gêneros *Nostoc*, *Calothrix*, *Dichothrix*, *Stigonema* e *Rhizonema* apresentam linhagens capaz de formar simbioses com plantas (Lücking et al. 2009, 2013; Dal-Forno et al. 2013). Enquanto isso, *Gloeocapsa* e *Anacystis* são encontradas geralmente associados a fungos ascomicetos formadores de líquens (Tschermak-Woess, 1988; Voytsekhovich et al. 2011a, b).

A identificação taxonômica de cianobactérias em simbiose é bastante dificultada pela grande alteração fenotípica que ocorre quando em associação com outros organismos. Essas mudanças são resultado de uma intensa troca de sinais químicos entre o hospedeiro e a cianobactéria. Por exemplo, quando dentro do hospedeiro, a produção de hormogônios em *Nostoc* é reprimida por fatores de repressão de hormogônios. Liaimer et al. (2015) reportou que a produção de nostopeptolida, um peptídeo não ribossomal, pode funcionar como um fator de repressão de hormogônios ou como quimioatraente, dependendo de sua concentração extracelular. Similarmente, a sacarose produzida pelo hospedeiro, pode reprimir a produção de hormogônios e induzir a produção de bainhas de mucilagem, que desempenha um importante papel no estabelecimento da simbiose (Splitt; Risser, 2016).

Os casos mais bem estudados de simbioses com cianobactérias são com plantas, tendo já descritas associações com antocerotófitas, cicadáceas, hepáticas, musgos, *Azolla* e *Gunnera* (Adams et al., 2013). Todos os cianobiontes de plantas possuem pelo menos duas características essenciais: (I) a habilidade de diferenciar células vegetativas em heterócitos, que são células especializadas em fixação de nitrogênio, e (II) hormogônios, que são pequenos filamentos de células vegetativas que funcionam como propágulos de dispersão (Adams et al., 2006). Geralmente essa associação com plantas ocorre nas raízes, mas também é possível encontrar cianobactérias infectando o caule, gemas e folhas. Essa interação visa o fornecimento de compostos nitrogenados para as plantas, sendo o gênero *Nostoc* o mais comumente encontrado em associação com plantas, tais como as briófitas (principais hospedeiros) *Blasia* spp e *Anthoceros* spp., a angiosperma *Gunnera* spp (única angiosperma cuja simbiose com cianobactérias foi identificada), a planta aquática *Azolla* e cicadáceas (Chappman; Margulis, 1998). Em geral, quando em simbiose, as taxas de fixação de carbono das cianobactérias tendem a diminuir, enquanto a fixação de nitrogênio é estimulada., ao passo que as células vegetativas podem ter seu tamanho aumentando, apresentando formas irregulares (Adam, Duggan, 2008; Adams et al., 2013). Além disso, há um aumento considerável do número de heterócitos (Meeks; Elhau, 2002).

Dentre as simbioses realizadas por cianobactérias, os líquens são alguns do mais bem estudados. Líquens são associações entre certos fungos e organismos fotossintetizantes no qual há a formação de uma estrutura nova, diferente dos dois organismos originários, que representam a integração de um metabolismo heterotrófico (micobionte) e autotrófico (Rai, 2002). Cerca de 8 a 10% dos líquens são compostos por cianobactérias. Entre as heterocitadas, já foram relatados os gêneros *Calothrix*, *Nostoc*, *Scytonema* e *Fischerella* formando interações com diferentes fungos. Já entre as unicelulares, *Hyella*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca* e

Synechocystis foram encontrados associados a fungos (Ahmadjian, 1993; Rikkinen, 2015). Uma vez formado o talo do líquen, é estabelecida a simbiose entre a cianobactéria e o fungo, onde o cianobionte passa a suprir com glicose e/ou nitrogênio fixado o micobionte. Em troca, o fungo fornece água, dióxido de carbono e um ambiente estável, tamponado e seguro da predação de invertebrados (Rikkinen, 2017).

Nos ambientes aquáticos, as cianobactérias desempenham um importante papel ecológico, tanto por conta da fixação de carbono, quanto pelo incremento de nitrogênio nesses ecossistemas, através da fixação biológica de nitrogênio. Em virtude disso, simbioses com cianobactérias, principalmente aquelas capazes de realizar a transformação de N_2 atmosférico em amônia, são particularmente importantes na ciclagem desses elementos, em especial nos oceanos (Foster; Zehr, 2019). Dentre essas associações, duas são mais comumente estudadas: (I) as simbioses entre cianobactérias e protistas heterotróficos e (II) entre cianobactérias fixadoras de nitrogênio e protistas fotossintetizantes. Os protistas heterotróficos geralmente obtêm carbono através da alimentação e, ao realizar simbiose com cianobactérias, mantém dentro de seu corpo, um organismo capaz de fornecer carbono para seu sustento, dando em troca, proteção contra predadores.

Diversos trabalhos já identificaram essa associação em dinoflagelados, radiolários, tintinídeos, silicoflagelados e amebas tecadas. Em todos esses organismos foram observadas cianobactérias unicelulares, geralmente *Synechococcus* ou *Prochlorochoccus*, as vezes envoltas por uma bainha mucilaginosa, mas com aspecto íntegro e vivo, sem sinais de degradação, e com grânulos de glicogênio e cianoficina. Isso é um sinal de que esses organismos realmente estão em associação e não são apenas resultado da ingestão pelos protistas. Em alguns casos, foi observado também a presença de nitrogenase ativa, indicando que as cianobactérias possam estar fornecendo, ainda, nitrogênio para os hospedeiros (Norris, 1961 ; Sournia, 1970 ; Buck; Bentham, 1998; Carpenter, 2002; Takahashi et al., 2003; Foster et al., 2006a,b; Escalera et al., 2011; Gómez et al., 2011).

A associação entre cianobactérias e os protistas fotossintetizantes parece ser, entretanto, um pouco mais complexa, pois, dentre as poucas associações já estudadas, parece haver uma relação de dependência obrigatória, onde um não sobrevive sem o outro (Foster; Zehr, 2019). As diatomáceas, um tipo de microalga fotossintetizante, já foram encontradas associadas com as cianobactérias heterocitadas *Richelia intracellularis* e *Calothrix rhizosoleniae* (Janson et al., 1999; Foster; Zehr, 2006; Foster; O'Mullan, 2008). Nessas associações, apenas a *C. rhizosoleniae* conseguiu ser isolada (Foster et al., 2010), no entanto, o hospedeiro não conseguiu sobreviver sem a cianobactéria, demonstrando a dependência da

simbiose. Os estudos de nitrogênio mostraram a transferência do nitrogênio fixado para a diatomácea hospedeira (Foster et al., 2011). Em 2010, Moisaner et al., conseguiu identificar pela primeira vez a cianobactéria unicelular e fixadora de nitrogênio *Crocospaera watsonii* associada com diatomáceas. Seis linhagens já foram isoladas e estão em estudos genômicos para tentar entender as mudanças dos genomas da cianobactéria durante a simbiose, uma vez que essa espécie é tradicionalmente de vida livre e pode funcionar como um ótimo modelo para estudos evolutivos (Wilson et al., 2017; Caputo et al., 2019).

Por fim, uma cianobactéria fixadora de nitrogênio foi encontrada vivendo em simbiose com uma diatomácea amplamente distribuída (Zehr et al., 2008). Chamada inicialmente de UCYN-A, e posteriormente catalogada como “*Candidatus Atelocyanobacterium thalassa*,” essa cianobactéria não sobrevivia ao cultivo e, após o sequenciamento e montagem do genoma (Thompson et al., 2014) descobriu-se que a mesma não tinha o aparato fotossintético completo e dependia, portanto, da microalga hospedeira para sua sobrevivência.

2.3. Cianosfera – a associação entre cianobactérias e outras bactérias

Consórcios de cianobactérias com bactérias associadas são taxonomicamente complexos, metabolicamente interativos e autossustentáveis. Os registros fósseis indicam que essas associações representam os primeiros habitantes existentes e modificadores da Biosfera da Terra (Paerl et al., 2000). Embora as associações entre cianobactérias e outros microrganismos sejam estimadas entre mais antigas, vide os registros fósseis de estromatólitos, essas interações não receberam ao longo dos anos a mesma atenção que as associações entre cianobactérias e outros eucariotos (Alvarenga et al., 2017). Apenas com o desenvolvimento de métodos mais refinados como sequenciamento de DNA, métodos metabolômicos, microscopia eletrônica e ferramentas bioinformáticas, é que essas associações puderam ser analisadas de uma forma mais assertiva.

Cianobactérias são produtores primários, fixadores de nitrogênio, produtores de diversos metabólitos secundários, além de possuírem uma bainha mucilaginosa que apresenta alta qualidade nutricional capaz de sustentar uma grande biomassa de consumidores primários (Nagarkar et al., 2004). A bainha mucilaginosa de cianobactérias de fato auxilia na interação com outros microrganismos, que se firmam em seu envelope mucilaginoso ou mesmo o colonizam, podendo dar origem a mantos e biofilmes com uma complexa rede de interações entre cianobactérias e bactérias heterotróficas (Paerl et al., 2000; Zhubanova et al., 2013; Cole et al., 2014).

Os “*mats*” microbianos (ou tapetes microbianos em tradução literal) são um exemplo de como as cianobactérias podem interagir com outros microrganismos. Os *mats* microbianos são comunidades bênticas formadas por diferentes microrganismos que estão organizadas de forma vertical, seguindo um gradiente físico-químico resultante da atividade metabólica microbiana (Stal et al., 2017). Em ambientes iluminados os *mats* são geralmente construídos por cianobactérias que colonizam o sedimento e formam o arcabouço para o desenvolvimento das redes microbianas mais complexas, sendo então os produtores primários do ambiente, fixando carbono através da fotossíntese e fornecendo matéria orgânica para as funcionalidades de diferentes microrganismos (Stal, 2001).

Associações semelhantes ocorrem em florações de cianobactérias, um processo comum em corpos d’água eutróficos, porém muito perigoso, uma vez que representa a proliferação desordenada de cianobactérias potencialmente tóxicas, afetando a qualidade da água, seja pela liberação de cianotoxinas, seja pela alteração das propriedades da água, como turbidez, pH e oxigênio dissolvido (Azevedo et al., 2002). Nas florações de cianobactérias, especialmente aquelas dominadas por *Microcystis*, Worm; Sondergaard (1998) e Havens (2008) notaram que a maior parte das células de cianobactérias estavam em agregados formados por polissacarídeos extracelulares aos quais se atavam vários microrganismos, formando uma cianosfera. Nessa comunidade, a hipótese é que as cianobactérias forneceria energia para os microrganismos associados e, em troca, as bactérias supririam com nitrogênio, fósforo e elementos traços as cianobactérias (Grant et al., 2014; Shi et al., 2012).

Durante muitos anos, as pesquisas com cianobactérias formadoras de floração focaram na diversidade de microrganismos presentes em ambientes com floração (Cai et al., 2013; Kara et al., 2013; Liu et al., 2014; Otten; Paerl, 2011), geralmente utilizando o sequenciamento do gene 16S RNAr para identificar as bactérias associadas às florações de cianobactérias ou como a estrutura dessa comunidade é modulada pela cianobactéria (Niu et al., 2011). Entretanto, poucos trabalhos são focados no metabolismo das bactérias e nas relações ecológicas que podem ser estabelecidas com as cianobactérias.

A forte interação entre cianobactérias e microrganismos heterotróficos já é bem conhecida dos estudiosos de cianobactérias, dada a dificuldade de isolamento e obtenção de culturas puras. Existem diversas técnicas de purificação de cianobactérias já descritas, desde métodos físicos de separação, como a centrifugação, a químicos, utilizando soluções de lavagens, mas além de dispendiosos e complexos, a maioria das técnicas se mostram ineficazes (Choi et al., 2008; Sena et al., 2009; Vazquez-Martínez et al., 2004). A dificuldade de obtenção de culturas axênicas de cianobactérias é um problema em algumas linhas de pesquisa como a

de produtos naturais, já que os contaminantes podem atrapalhar a produção ou mesmo degradar o metabólito de interesse.

Outra área de pesquisa afetada pela presença de bactérias associadas é a genômica, uma vez que o material genético dos microrganismos associados também acabará sendo sequenciado, atrapalhando o processo de montagem do genoma de interesse, no caso, a cianobactéria (Alvarenga et al., 2017). De fato, o trabalho de Cornet et al. (2018), mostrou de 5% dentre os 440 genomas de cianobactérias disponíveis nos bancos de dados estavam altamente contaminados, enquanto outros 209 estavam levemente contaminados com material genético de bactérias associadas. Entretanto, a montagem de genomas de cianobactérias tem utilizado abordagens não convencionais para superar a tal entrave, como o uso de métodos de metagenômica para separar os dados de acordo com a taxonomia e assim reconstruir os genomas dos microrganismos integrantes da comunidade (Alvarenga et al., 2017).

Essa separação, conhecida popularmente por *binning*, pode ser realizada de diferentes formas, seja por métodos baseados em comparação com banco de dados construídos a partir de genomas referência, seja por algoritmos que considerem as diferenças na composição das sequências e/ou perfil diferencial de cobertura de cada genoma (Drögue; McHardy, 2012; Mande et al., 2012; Albertsen et al., 2013; Alneberg et al., 2014; Nielsen et al., 2014). O desenvolvimento de novos métodos de montagem de dados de sequenciamento de amostras metagenômicas tornou possível inferir, via sequências genômicas, as características únicas compartilhadas pelas associações de bactérias heterotróficas e cianobactérias e ainda, avaliar se essas associações são capazes de produzir diferentes compostos de interesse biotecnológico (Lima et al., 2014).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é caracterizar os genomas de bactérias heterotróficas associadas a cinco linhagens de cianobactérias da ordem Nostocales comparando o potencial metabólico dos consórcios.

3.1. Objetivos específicos

- Obter os genomas dos microrganismos de cada consórcio;
- Avaliar a diversidade microbiana em cada consórcio;
- Analisar o potencial metabólico de cada consórcio;
- Avaliar *in silico* o potencial de produção de metabólitos secundários nos organismos da cianosfera;
- Identificar as interações ecológicas funcionais em cada consórcio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Informações dos consórcios e geração dos dados

Cinco consórcios bacterianos contendo linhagens de cianobactérias da ordem Nostocales e bactérias associadas foram mantidas em frascos Erlenmeyers contendo 500 ml de meio líquido, sob luz fluorescente ($50 - 80 \mu\text{mol photons} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), com fotoperíodo de 14:10 horas de claro/escuro e a temperatura de 25 ± 1 °C. Cada consórcio é composto por uma única linhagem de cianobactéria e um número de bactérias associadas que tem persistido, após técnicas tradicionais de purificação, desde o isolamento da linhagem. Antes e após o crescimento, as células foram concentradas e lavadas com água ultrapura estéril, solução de Extran® 0,05%, solução salina (NaCl) a 0,85% e uma solução de lavagem contendo 50 mM NaCl, 10 mM pH 7.5 Tris-HCl e 2,5 mM pH 8.0 EDTA, seguindo metodologia proposta por Heck et al, 2016. Então, apenas as células de cianobactérias e os microrganismos mais fortemente associados a elas permaneceram. Maiores informações sobre as condições de cultivo e locais de isolamento de cada consórcio estão descritas na tabela 1 e na figura 1.

Tabela 1: Detalhes sobre cultivo, isolamento e sequenciamento dos consórcios. (Isol. = Ano de isolamento; Seq. = Ano de sequenciamento; Ref. = Referência)

<i>Linhagem</i>	<i>Origem</i>	<i>Hábito</i>	<i>Meio de cultivo</i>	<i>Isol.</i>	<i>Seq.</i>	<i>Ref.</i>
CENA67 <i>Nostoc sp.</i>	Terra preta de Amazônia	Solo	AA/4 (Allen; Arnon, 1955)	2004	2014	Alvarenga, 2015
CENA161 <i>Fischerella sp.</i>	Nascente, Piracicaba -SP	Água doce	BG11 ₀ (Allen, 1968)	2006	2014	Silva, 2015
CENA302 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Reservatório Billings, Riacho grande, SP	Água doce	ASM-1 (Gorham et al., 1964)	2008	2015	Abreu et al., 2018
CENA303 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Lago Theobaldo Dick, Lajeado, RS	Água doce	ASM-1 (Gorham et al., 1964)	2010	2015	Abreu et al., 2018
ITEP-024 <i>Sphaerospermopsis torques-reginae</i>	Reservatório Tapacurá, PE	Água doce	ASM-1 (Gorham et al., 1964)	2002	2015	Lima, 2016

Figura 1 – Fotomicrografias das cianobactérias em cada consórcio. (A) *Nostoc* sp. CENA67, (B) *Fischerella* sp. CENA161, (C) *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302, (D) *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA303 e (E) *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-0224

4.2. Extração de DNA e sequenciamento metagenômico

Após a lavagem, as células foram coletadas por centrifugação e a extração de DNA foi realizada utilizando o kit AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi verificado quanto à sua integridade em eletroforese em gel de agarose 1% e foi quantificado em espectroscopia de fluorescência, com o equipamento Qubit (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Posteriormente, 1ng do DNA foi utilizado para preparação das bibliotecas pair-end com o kit Nextera XT (Illumina San Diego, CA, USA), que foram sequenciadas em plataforma MiSeq, com o kit MiSeq Reagent v3 (Illumina), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado no Centro de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e à Agroenergia, Campus “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP.

4.3. Montagem do metagenoma e *Binning*

Sequências com baixa qualidade (Phred<20), bases ambíguas e sequências curtas (<50pb) foram filtradas com o programa PRINSEQ (Schmieder; Edwards, 2011). Os dados filtrados foram então montados com SPAdes 3.9.0 (Bankevich et al., 2014). O resultado dessa montagem foi então mapeado com o Bowtie2 (Langmead et al., 2012) gerando um perfil de cobertura que foi utilizado para a recuperação de genomas utilizando o programa MetaBAT (Kang et al., 2015), utilizando a opção *--specific* para favorecer a eliminação de contaminação, gerando genomas (ou bins) mais puros. Em seguida, o programa Platanus 1.2.4 (Kajitani et al., 2014) foi utilizado para o fechamento de gaps e junção dos contigs. Posteriormente, a qualidade da montagem foi verificada com o QUAST (Gurevich et al., 2013) e as estimativas de tamanho

de genoma, completude dos genomas reconstruídos e cobertura média foram verificadas com o programa CheckM (Parks et al., 2015).

4.4. Anotação dos genomas

Os genomas recuperados com contaminação inferior a 5% e completude superior a 90% seguiram para anotação funcional automática que foi realizada através do servidor RAST (Aziz et al., 2008) e do programa Prokka (Seemann, 2014). Quando necessário, curadoria manual das anotações foram realizadas com o programa Artemis (Rutherford et al., 2000) e BLAST (Altschul et al., 1990; Camacho et al., 2009). Agrupamentos gênicos para metabólitos secundários foram preditos com antiSMAH 5 (Medema et al., 2011; Weber et al., 2015). Em complementação aos dados das bins obtidas, os dados brutos de cada consórcio foram submetidos à anotação taxonômica e funcional automática no servidor MG-RAST (Meyer et al., 2008).

4.5. Classificação taxonômica e análises filogenéticas

O primeiro passo para atribuição taxonômica de cada *draft* genoma montado foi tentar recuperar a sequência do gene 16S ribossomal de cada bin e compará-lo com o banco de dados do NCBI. Contudo, devido à dificuldade de montar sequências de 16S dentro de genomas a partir da abordagem de *binning*, utilizamos o software GTDB-Tk (Parks et al., 2018) e o Genome Taxonomy Database (GTDB - <http://gtdb.ecogenomic.org>), um conjunto de ferramentas que fornece automaticamente uma classificação taxonômica de bactérias e arqueias através de seu posicionamento em domínios específicos em árvore filogenética de referência produzida a partir da sequência de 120 marcadores genéticos concatenados. Para aqueles genomas nos quais os montadores conseguiram incorporar sequências de 16S ribossomal, análises filogenéticas mais acuradas foram realizadas. Para tanto, cada sequência foi comparada com o banco de dados do NCBI através de BLASTn e aqueles resultados maiores valores de identidade foram selecionados e recuperados do GenBank. Todas as sequências foram alinhadas usando CLUSTALW (Larkin et al., 2007), usando o Mega v.10.0.5 (Tamura et al., 2013) e árvores filogenéticas, usando o método de máxima verossimilhança, foram construídas aplicando modelo evolutivo Gamma com sítios invariantes (G+I) e o parâmetro Kimura-2,

como foi definido pelo BIC (Critério de Informação Bayesiana). Os *gaps* foram tratados como dados perdidos e as reamostragens foram realizadas usando 1000 repetições.

4.6. Diversidade microbiana dos consórcios

A diversidade microbiana foi inferida através de diferentes maneiras. Primeiramente, os dados do sequenciamento foram anotados para função e taxonomia com os bancos de dados SEED e RefSeq no servidor MG-RAST (Meyer et al., 2008). Além disso, a partir da montagem do metagenoma total de cada consórcio, foi utilizado o programa SSUITS, que, através do Barnnap, identificou e separou as sequências de RNA ribossomal. Essas sequências foram então mapeadas com Bowtie2, gerando um perfil de cobertura e esses dados foram então submetidos ao pipeline do SILVAngs Project (Quast et al., 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Montagem e identificação taxonômica dos genomas

Após o processo de montagem dos metagenomas, foram recuperados um total de 80 genomas (bins), sendo 5 referentes às cianobactérias hospedeiras e 75 relacionados às bactérias associadas. Dentre os consórcios, o da *Nostoc* sp. CENA67 foi no qual foi possível recuperar o maior número de genomas (24), seguido pelos consórcios da *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA303 (19 genomas), *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 (15 genomas), *C. raciborskii* CENA302 (13 genomas) e *Fischerella* sp. CENA161 (9 genomas).

A qualidade dos genomas recuperados é de grande importância para as próximas etapas, pois genomas contaminados, muito fragmentos ou muito incompletos podem atrapalhar a anotação funcional e a interpretação das potenciais interações que ocorrem nesses consórcios. Segundo Parks et al., 2015, a inferência de completude de genomas através da identificação de genes de cópia única gera alguns vieses na análise, podendo subestimar a completude e superestimar a contaminação de genomas muito fragmentados ou com baixa completude. Em virtude disso, apenas aqueles genomas com completude acima de 90% e contaminação inferior a 5%, estimados pelo programa CheckM, foram mantidos para as análises seguintes. Os valores de completude e contaminação de cada genoma estão especificados na tabela 2, ordenados de acordo com a maior completude dos genomas em cada consórcio. Diante disso, mantivemos 33 genomas considerados de alta qualidade: sete genomas do consórcio CENA67, quatro do CENA161, três do CENA302, 12 do CENA303 e sete do consórcio ITEP-024.

Entretanto, o alto número de genomas excluídos das análises seguintes nos fez pensar em qual seria a contribuição de cada genoma montado, levando em consideração o volume total de dados, e se a exclusão desses dados seria significativa para a compreensão dos metabolismos realizados pela comunidade do consórcio. Para tal, realizamos o mapeamento dos dados do sequenciamento contra os genomas, obtendo assim um percentual de contribuição de cada genoma sobre a comunidade (Figura 1). Para três consórcios, CENA161, CENA303 e ITEP-024, a soma das porcentagens da contribuição dos genomas com alta qualidade foram 98,66%, 96,98% e 98,88%, respectivamente. Entretanto, para os consórcios CENA67 e CENA302, a soma foi de 59,66% e 51,94%, respectivamente.

Figura 2 – Representação do percentual de cobertura de cada genoma em relação ao total de dados

No consórcio CENA67 esses valores baixos foram causados pela exclusão dos genomas CENA67_bin15, CENA67_bin7, CENA67_bin24 e CENA67_bin18 que contribuíram com, respectivamente, 28,87%; 3,51%, 2,73% e 2,09%. Entretanto, apresentaram valores de contaminação ou completude fora da margem considerada de qualidade (vide tabela 2). Já no consórcio CENA302, a exclusão dos genomas CENA302_bin9 (17,22%), CENA302_bin7 (14,58) e CENA302_bin2 (9,38) foi o que gerou a baixa porcentagem de representatividade dos dados dos genomas escolhidos para as próximas etapas. Em trabalhos com metodologias parecidas que buscavam a recuperação de genomas de bactérias associadas a cianobactérias, a proporção de genomas com alta qualidade também foi reduzida, obtendo uma porcentagem de aproximadamente 15% e 63% de genomas com completude acima de 90% e contaminação inferior a 5% (Li et al., 2018; Zhu et al., 2019). Ainda, em outros trabalhos, a recuperação de genomas de alta qualidade apresentou proporções ainda menores (Wilkins et al., 2019). Para tentar minimizar essa perda de informação, decidimos então fazer as anotações funcionais também nos dados brutos do sequenciamento, utilizando uma abordagem metagenômica.

Tabela 2 – Características de qualidade de todos os genomas reconstruídos nos cinco consórcios, organizados de acordo com completude e contaminação

Consórcio	Identificação da Bin	Marcador da linhagem	Completude	Contaminação
CENA67	CENA67_bin.24	k__Bacteria (UID203)	100	8,62
	CENA67_bin.23	o__Rhizobiales (UID3447)	100	0,84
	CENA67_bin.4	o__Rhizobiales (UID3654)	99,37	2,19
	CENA67_bin.19	o__Rhizobiales (UID3447)	99,01	0,4
	CENA67_bin.14	f__Rhizobiaceae (UID3563)	98,97	0,57
	CENA67_bin.16	o__Sphingomonadales (UID3310)	98,89	2,42
	CENA67_bin.1	o__Rhizobiales (UID3450)	98,05	1,43
	CENA67_bin.12	p__Cyanobacteria (UID2189)	97,78	0,44
	CENA67_bin.20	o__Rhizobiales (UID3642)	97,47	1,96
	CENA67_bin.18	g__Bradyrhizobium (UID3699)	93,53	6,45
	CENA67_bin.15	k__Bacteria (UID2565)	92,58	7,67
	CENA67_bin.7	k__Bacteria (UID3187)	88,5	1,04
	CENA67_bin.5	o__Rhizobiales (UID3642)	82,03	6,22
	CENA67_bin.21	k__Bacteria (UID203)	51,72	0
	CENA67_bin.22	k__Bacteria (UID203)	39,66	0
	CENA67_bin.8	k__Bacteria (UID203)	29,39	7,76
	CENA67_bin.9	k__Bacteria (UID203)	19,98	0
	CENA67_bin.3	k__Bacteria (UID203)	18,56	0

	CENA67_bin.17	k__Bacteria (UID203)	13,26	0
	CENA67_bin.13	k__Bacteria (UID203)	3,45	0
	CENA67_bin.6	root (UID1)	0	0
	CENA67_bin.2	root (UID1)	0	0
	CENA67_bin.11	root (UID1)	0	0
	CENA67_bin.10	root (UID1)	0	0
CENA161	CENA161_bin.5	f__Xanthomonadaceae (UID4214)	99,66	0,34
	CENA161_bin.6	o__Burkholderiales (UID4000)	99,53	0
	CENA161_bin.2	f__Moraxellaceae (UID4680)	97,19	1,74
	CENA161_bin.3	p__Cyanobacteria (UID2193)	96,99	0,72
	CENA161_bin.7	f__Enterobacteriaceae (UID5066)	96,76	0
	CENA161_bin.4	o__Burkholderiales (UID4105)	88,21	0,95
	CENA161_bin.1	k__Bacteria (UID203)	52,19	5,17
	CENA161_bin.9	k__Bacteria (UID203)	12,07	0
	CENA161_bin.8	k__Bacteria (UID203)	11,21	0
CENA302	CENA302_bin.13	o__Rhizobiales (UID3450)	100	1,24
	CENA302_bin.8	p__Cyanobacteria (UID2189)	99,07	0
	CENA302_bin.11	o__Rhizobiales (UID3654)	99,06	1,52
	CENA302_bin.6	o__Sphingomonadales (UID3310)	98,57	0,68
	CENA302_bin.2	f__Rhodocyclaceae (UID3972)	89,85	1,29
	CENA302_bin.5	f__Flavobacteriaceae (UID2817)	87,98	1,13
	CENA302_bin.9	o__Burkholderiales (UID4000)	86,56	2,75
	CENA302_bin.1	c__Alphaproteobacteria (UID3305)	66,77	2,48
	CENA302_bin.3	k__Bacteria (UID203)	64,29	1,72
	CENA302_bin.4	k__Bacteria (UID203)	61	9,48
	CENA302_bin.7	k__Bacteria (UID203)	53,68	0
	CENA302_bin.10	k__Bacteria (UID203)	1,72	0
	CENA302_bin.12	root (UID1)	0	0
CENA303	CENA303_bin.5	o__Rhizobiales (UID3450)	99,59	1,24
	CENA303_bin.1	o__Rhodospirillales (UID3754)	99,5	0,51
	CENA303_bin.8	p__Cyanobacteria (UID2189)	99,37	0,33
	CENA303_bin.6	o__Rhizobiales (UID3642)	99,37	0,63
	CENA303_bin.18	o__Rhizobiales (UID3654)	98,75	2,68
	CENA303_bin.12	c__Alphaproteobacteria (UID3305)	97,35	0,66
	CENA303_bin.10	o__Burkholderiales (UID4000)	95,45	1,17
	CENA303_bin.14	f__Rhodobacteraceae (UID3340)	94,28	0,71
	CENA303_bin.15	o__Cytophagales (UID2936)	94,2	0,96
	CENA303_bin.7	o__Burkholderiales (UID4001)	93,72	0,3
	CENA303_bin.13	o__Rhizobiales (UID3654)	92,69	1,72
	CENA303_bin.17	c__Deltaproteobacteria (UID3216)	92,47	3,71

	CENA303_bin.9	f__Rhodocyclaceae (UID3972)	90,41	1,55
	CENA303_bin.3	o__Rhizobiales (UID3447)	80,08	0,1
	CENA303_bin.4	k__Bacteria (UID203)	62,24	0
	CENA303_bin.16	k__Bacteria (UID2495)	47,65	0
	CENA303_bin.2	p__Bacteroidetes (UID2591)	40,91	0,1
	CENA303_bin.11	k__Bacteria (UID203)	16,14	0
	CENA303_bin.19	o__Rhodospirillales (UID3754)	9,06	0
ITEP-024	ITEP-24_bin.8	o__Rhizobiales (UID3654)	100	0
	ITEP-24_bin.3	p__Cyanobacteria (UID2189)	98,89	0
	ITEP-24_bin.10	c__Alphaproteobacteria (UID3305)	98,7	0,43
	ITEP-24_bin.9	o__Actinomycetales (UID1593)	98,23	0,51
	ITEP-24_bin.7	o__Rhizobiales (UID3654)	96,99	2,22
	ITEP-24_bin.13	o__Rhizobiales (UID3449)	96,22	0,97
	ITEP-24_bin.11	o__Sphingomonadales (UID3310)	93,54	0,77
	ITEP-24_bin.4	f__Rhodobacteraceae (UID3340)	90,82	0,58
	ITEP-24_bin.5	o__Rhizobiales (UID3654)	78,33	6,53
	ITEP-24_bin.14	k__Bacteria (UID203)	42,79	0,78
	ITEP-24_bin.1	k__Bacteria (UID203)	5,17	0
	ITEP-24_bin.6	root (UID1)	0	0
	ITEP-24_bin.2	root (UID1)	0	0
	ITEP-24_bin.15	root (UID1)	0	0
	ITEP-24_bin.12	root (UID1)	0	0

5.2. Padrão taxonômico dos genomas

Considerando-se os critérios de qualidade, os 33 genomas selecionados foram renomeados com a sigla MAG (*Metagenome-Assembled Genomes*) para diminuir as possíveis confusões causadas pelos números, e então submetidos à classificação e identificação taxonômica utilizando a plataforma GTDB-Tk, que classifica de acordo com média de identidade de nucleotídeos (ANI – average of nucleotide identity), na qual valores de identidade acima de 95% indicam a mesma espécie (Konstantidinis et al., 2004), e também de acordo com o posicionamento desses genomas em uma árvore filogenômica baseada em 120 marcadores filogenéticos. Dos 33 genomas (tabela 3), 12 (MAG1, MAG11, MAG15, MAG16, MAG17, MAG18, MAG19, MAG21, MAG22, MAG28, MAG31 e MAG32) foram classificados utilizando ambos os critérios, ANI e posicionamento. Os demais genomas foram classificados utilizando apenas o critério de posicionamento na árvore filogenômica (Apêndice A; Figura 3),

sendo que, através do GTDB-Tk, 11 genomas só conseguiram ser classificados em nível de família (MAG3, MAG4, MAG6, MAG8, MAG9, MAG14, MAG23, MAG24, MAG26, MAG27, MAG30). Provavelmente, esses genomas devem estar relacionados a gêneros que ainda não possuem genomas públicos disponíveis. De fato, após algumas análises complementares, verificamos que foi isso que aconteceu com os genomas MAG6, MAG7, MAG23 e MAG27.

Tabela 3 – Características dos genomas de alta qualidade presentes nos cinco consórcios. Sca. (número de scaffolds); GC (% de conteúdo GC); Comp. (% de completude); Cont (% de contaminação) e Cob (cobertura do genoma)

Origem	Genoma ID	Identificação taxonômica	Sca .	Tamanh o (Mb)	Gene (N°)	GC (%)	Comp (%)	Co nt (%)	Cob. (X)
CENA30 2	MAG1	<i>Bosea vaviloviae</i>	96	4688827	4441	66,9	99,0	1,5	2,4
	MAG2	<i>Aquamicrobium</i> sp.	43	6482196	6092	62,2	100	1,2	9,2
	MAG3	Sphingomonadaceae	11	2937085	2890	58,3	98,6	0,7	48,1
CENA30 3	MAG4	Ferrovibrionaceae	64	7507071	7200	68,0	99,5	0,5	36,1
	MAG5	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	233	3920844	3686	70,0	95,4	1,1	13,7
	MAG6	<i>Lacibacterium</i> sp.	198	4394569	4321	65,0	97,3	0,6	7,2
	MAG7	<i>Runella</i> sp.	353	4633124	3920	43,5	94,2	0,9	7,3
	MAG8	<i>Labilithrix</i> sp.	235	9402972	7971	67,7	92,4	3,7	12,7
	MAG9	Beijerinckiaceae	146	5115255	5003	64,4	98,7	2,7	9,9
	MAG10	<i>Aquamicrobium</i> sp.	27	6321693	5964	62,3	99,6	1,2	38,0
	MAG11	<i>Afipia broomae</i>	33	5110565	4900	61,1	99,4	0,6	13,7
	MAG12	<i>Polynucleobacter</i> sp.	6	1924315	1986	47,2	93,7	0,3	21,3
	MAG13	<i>Bosea</i> sp.	346	5711589	5579	67,1	92,7	1,7	6,5
	MAG14	Rhodobacteraceae	303	3680902	3586	63,4	94,3	0,7	8,7
	MAG15	<i>Mehtyloversatilis discipulorum</i>	281	3969502	3732	66,4	90,4	1,5	5,2
CENA16 1	MAG16	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	66	4578734	4338	38,2	97,2	1,7	59,3
	MAG17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	68	4869462	4461	66,0	99,6	0,3	73,9
	MAG18	<i>Achromobacter</i> sp.	48	6309232	5726	68,5	99,5	0	544,1
	MAG19	<i>Serratia nematodiphila</i>	13	4876915	4575	59,8	96,7	0	682,4
CENA67	MAG20	<i>Starkeya</i> sp.	90	7165503	6717	63,0	98,0	1,4	2,2
	MAG21	<i>Ensifer</i> sp.	9	5675454	5331	63,2	98,9	0,5	0,9

	MAG22	<i>Sphingomonas</i> sp.	118	4353711	4118	67,9	98,9	2,4	3,5
	MAG23	<i>Nordella oligomobilis</i>	18	7160514	6741	63,4	99,0	0,4	0,6
	MAG24	Xanthobacteraceae	49	8871098	8026	63,3	97,5	1,9	3,0
	MAG25	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	19	4390701	3966	62,2	100	0,8	1,3
	MAG26	Rhizobiaceae	31	6106265	5858	66,7	99,4	2,2	3,3
ITEP-024	MAG27	<i>Lacibacterium</i> sp.	78	3901078	3852	67,2	98,7	0,4	1,7
	MAG28	<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	148	3169934	3012	68,1	93,5	0,7	14,7
	MAG29	<i>Allorhizobium</i> sp.	104	4173778	4044	61,1	96,2	0,9	47,0
	MAG30	<i>Tabrizicola</i> sp.	334	3713404	3752	66,4	90,8	0,6	8,7
	MAG31	<i>Bosea</i> sp.	104	4699765	4444	67,9	97,0	2,2	12,8
	MAG32	<i>Methylobacterium organophilum</i>	99	7228417	6823	71,1	100	0	71,2
	MAG33	<i>Microbacterium</i> sp.	99	3183793	3054	69,9	98,2	0,5	12,5

Figura 3 - Árvore filogenômica com os 33 genomas montados, gerada com o programa GTDB-Tk indicando as classes ao qual pertencem

Um dos problemas em fazer a reconstrução de genomas usando abordagens metagenômicas é a dificuldade de incluir no genoma sequências como as do gene 16S RNAr. Utilizando o programa MetaBAT, que considera para o processo de *binning* apenas sequências maiores que 1500 pb, a inclusão dessas sequências se torna ainda mais difícil, já que elas costumam ter um tamanho inferior a 1500 pb. Entretanto, em alguns genomas ocorreu a inclusão dessas sequências, o que facilitou a identificação dos gêneros. As sequências de 16S retirados dos genomas MAG6 e MAG27, isolados dos consórcios CENA303 e ITEP-024, respectivamente, identificados pelo GTDB-Tk como Dongiaceae, mostraram valores de identidade de 96,6%, com cobertura de 95%, com a sequência de 16S da linhagem *Lacibacterium* sp. SS2-100 (KY012264) e 96% de identidade, com 89% de cobertura, com sequência de 16S da linhagem tipo do gênero. Já a sequência de 16S do genoma MAG8, recuperado do consórcio CENA303, apresentou identidade de 95%, com 100% de cobertura, com a *Labilithrix luteola* DSM 27648 (CP012333), e a sequência 16S do genoma MAG23, isolado do consórcio CENA67, apresentou identidade de 99%, com cobertura de 97%, com a linhagem *Nordella oligomobilis* N21 (NR 114615). A árvore filogenética construída utilizando as sequências com maiores valores de identidade (Figura 4) mostra os agrupamentos destas linhagens, indicando que os genomas realmente são pertencentes a estes gêneros. Para os gêneros *Lacibacterium* e *Nordella*, estes são os primeiros genomas montados, enquanto para o gênero *Labilithrix*, este é o segundo genoma a ser montado e, futuramente, disponibilizados nos bancos de dados (Apêndice B).

Figura 4 – Árvore filogenética do gene 16S RNAr extraído dos genomas MAG6, MAG8, MAG23 e MAG27, construída com método de método de máxima verossimilhança

No geral, a maioria dos genomas recuperados são pertencentes ao filo Proteobacteria (23 Alphaproteobacteria, 4 Betaproteobacteria, 3 Gammaproteobacteria e 1 Deltaproteobacteria), mas também foi recuperado 1 genoma do filo Bacteroidetes e mais 1 do filo Actinobacteria. A distribuição desses grupos variou bastante de acordo com a cianobactéria hospedeira (Figura 5).

Figura 5 – Riqueza de bactérias associadas em cada um dos cinco consórcios. Os 33 genomas foram montados e classificados em 6 classes/ordens

Os consórcios CENA67 e CENA302 apresentaram apenas bactérias da classe Alphaproteobacteria. Essa também foi a classe mais representada no consórcio ITEP-024, que também apresentou um representante do filo Actinobacteria (MAG33). O consórcio CENA161 apresentou apenas bactérias das classes Betaproteobacteria (MAG18) e Gammaproteobacteria (MAG16, MAG17 e MAG19). Já o CENA303 foi o consórcio que apresentou maior diversidade, incluindo bactérias das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria (MAG5, MAG 12 e MAG18) e Deltaproteobacteria (MAG8), além de uma bactéria do filo Bacteroidetes (MAG7).

Alphaproteobacteria é uma classe bastante diversa e essa diversidade também foi refletida nos genomas recuperados, com pelo menos 10 famílias: Beijerinckiaceae (MAG9), Bradyrhizobiaceae (MAG1, MAG11, MAG13 e MAG31), Ferrovibrionaceae (MAG4), Methylobacteriaceae (MAG32), Phyllobacteriaceae (MAG2 e MAG10), Rhizobiaceae (MAG21, MAG26 e MAG29), Rhodospirillaceae (MAG6 e MAG27), Rhodobacteraceae (MAG14 e MAG30), Shingomonadaceae (MAG3, MAG22) e Xanthobacteraceae (MAG20, MAG24 e MAG25). A reconstrução de genomas de bactérias associadas a cianobactérias não é ainda muito comum. Entretanto, Li et al., (2018) reportou a recuperação de genomas de bactérias associados a diferentes florações de cianobactérias do gênero *Microcystis*. Esses genomas eram de bactérias das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacteroidetes, sendo que Alphaproteobacteria foi o grupo taxonômico

mais abundante. Ainda, os gêneros *Bosea*, *Porphyrobacter*, *Hydrogenophaga* e as famílias Sphingomonadaceae e Xanthomonadaceae também foram reportados.

A maioria dos grupos presentes nos cinco consórcios são comumente encontrados em ecossistemas de água doce (Berg et al., 2009; Limei et al., 2009; Dziallas; Grossart, 2011; Shen et al., 2011; Shi et al., 2012) e alguns têm sido relatados com importantes funções quando associadas com cianobactérias. Dentro do filo de Proteobacteria, espécies de Sphingomonadales são capazes de degradar polissacarídeos, microcistina, hexaclorociclohexano e outras moléculas orgânicas (Valeria et al., 2006; Ho et al., 2007; Bala et al., 2010), por conta disso, tem se estudado sua capacidade de atuar em processos de biorremediação (Gan et al., 2015). Rhodobacterales, por sua vez, estão envolvidos na degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (Harwati et al., 2007; Brinkhoff et al., 2008). Xanthomonadaceae já foram descritas como degradadoras de petróleo (Chang; Zylstra, 2010). Já Bacteroidetes, que têm sido descrito como importantes e abundantes associados a cianobactérias, contribuem para a degradação de matéria orgânica de alto peso molecular (Cottrell; Kirchman, 2000). Chama a atenção, dentre os táxons identificados nos consórcios, a presença dos gêneros *Acinetobacter*, *Stenotrophomas* e *Serratia*, pertencentes à classe Gammaproteobacteria, que é conhecida pela capacidade patogênica de várias espécies, causando doenças inclusive em humanos (Paterson, 2006).

5.3. Diversidade taxonômica nos consórcios baseada no metagenoma e no gene 16S RNAr

O processo de montagem e recuperação de genomas nos consórcios mostrou muitos táxons de bactérias associados às cianobactérias, entretanto essa abordagem pode não revelar a diversidade real da comunidade. Para isso, utilizando duas diferentes abordagens, metagenômica e recuperação de sequências de 16S RNAr, tentamos maximizar a identificação dos microrganismos presentes nos consórcios. Inicialmente, por se tratar de cultivo de cianobactérias, cuja biomassa é majoritariamente de cianobactérias, esperávamos uma maior proporção de sequências associadas às cianobactérias. Entretanto, a anotação taxonômica no metagenoma realizada com o banco de dados RefSeq, no servidor MG-RAST, mostrou que, em quase todos os consórcios, a maior parte dos dados estavam associados à comunidade associada. No consórcio CENA67, 35,1% das sequências foram associadas ao filo Cyanobacteria, enquanto nos consórcios CENA161, CENA302, CENA302 e ITEP-024 esses valores foram de 20,6%, 25,2%, 46,2% e 58,6%, respectivamente (Figura 6A). Estes valores são diferentes dos

valores de cobertura obtidos pelo mapeamento das sequências (Figura 2). Entretanto, é importante lembrar que no mapeamento os próprios genomas foram utilizados como base, enquanto no servidor MG-RAST é utilizado um banco de dados, com diferentes genomas referências. Logo, os dois resultados não podem ser diretamente comparados.

Figura 6 – Afiliação da taxonomia a partir dos dados metagenômicos de acordo com filo (A) e classe (B). Apenas grupos com abundância maior que 1% foram representados

Em todos os consórcios, excluindo as cianobactérias, o filo mais abundante foi Proteobacteria, com porcentagens que variaram de 31% a 77,5%. Entretanto, suas subdivisões foram bastante distintas (Figura 6B). No consórcio CENA161, as classes mais abundantes foram Betaproteobacteria (41,41%), Gammaproteobacteria (33,34%) e Alphaproteobacteria (2,43%). Já no consórcio CENA302, a situação se inverte, com Alphaproteobacteria sendo o mais abundante, com 28,89%, seguido de Betaproteobacteria (26,39%) Gammaproteobacteria (4,41%), Actinobacteria (3,14%) e Sphingobacteria (2,55%). No consórcio CENA303 é possível ver uma maior diversidade de grupos com abundâncias mais significativas, como Alphaproteobacteria (19,98%), Betaproteobacteria (6,93%), Sphingobacteria (6,55%), Flavobacteria (6,55%), Cytophagia (3,42%). CENA67 apresenta a comunidade associada composta principalmente por Alphaproteobacteria (41,67%), Planctomycetacia (7,22%) e Betaproteobacteria (3,92%). Por fim, no consórcio ITEP-024, Alphaproteobacteria (34,42%) representa a maior parte da comunidade associada, acompanhada por uma pequena quantidade de Betaproteobacteria (1,75%), Gammaproteobacteria (1,62%) e Actinobacteria (1,57%).

As curvas de rarefação (Figura 7) calculadas para estes metagenomas pelo MG-RAST mostram-se próximas de atingir a assíntota, indicando que os esforços de amostragem e sequenciamento podem ser considerados adequados para os propósitos deste trabalho. Logares et al. (2014) demonstraram que a reconstrução e análise de sequências de 16S RNAr podem ser

consideradas equivalentes ao sequenciamento de produtos da amplificação do gene 16S, que é a abordagem mais comumente utilizada para o estudo de diversidade ambiental. Além disso, os bancos de dados de sequências do gene 16S são atualizados com maior frequência, contendo, inclusive, sequências de espécies recentemente descritas.

Após a montagem dos metagenomas, 63 sequências do gene 16S RNAr foram identificadas, sendo 15 sequências no consórcio CENA67, 9 sequências no CENA161, 11 no CENA302, 18 no consórcio CENA303 e, por fim, 10 sequências no consórcio ITEP-024. Em cada consórcio, uma das sequências foi relacionada ao gene 16S ribossomal da cianobactéria e, por conta disso, retirado das análises seguintes. O tamanho das sequências recuperadas variou de 885pb a 1532pb, com tamanho médio de 1386pb.

Figura 7 – Curvas de rarefação para cada um dos cinco consórcios gerada a através do servidor MG-RAST

As sequências de 16S RNAr foram classificadas em 41 gêneros, distribuídos em 5 filos e pelo menos 12 famílias de bactérias. Embora os filos identificados tenham sido os mesmos que aqueles identificados nos metagenomas, a proporção de cada um dentro da comunidade difere significativamente do resultado obtido com as sequências do gene 16S, como é possível observar nos gráficos de abundância relativa gerados pelo programa Krona (Figuras 8 a 12). O consórcio CENA67 apresentou 14 diferentes gêneros, sendo *Ensifer* (41%), *Gemmata* (23%), *Bosea* (16%) e *Afipia* (9%) os mais abundantes. Já o consórcio CENA161 apresentou 8 gêneros, com *Serratia* (58%), *Achromobacter* (30%) e *Acinetobacter* (9%) como os mais abundantes. O consórcio CENA302 teve também 8 gêneros representados, sendo *Blastomonas* (59%),

Mesorhizobium (14%), *Sedimibacterium* (9%) e uma bactéria não-cultivável (7%) os microrganismos mais abundantes. A comunidade com maior número de gêneros relatados foi mais uma vez a linhagem CENA303, com 17 gêneros, sendo *Taonella* (33%), *Hydrogenophaga* (11%), *Tabrizicola* (10%), *Mesorhizobium* (9%), *Terrimonas* (6%), *Runella* (6%) e *Polynuiceobacter* (5%) os gêneros mais abundantes. Ainda, no consórcio ITEP-024, dentre os 8 gêneros identificados, *Methylobacterium* (83%), *Bosea* (7%) e *Rhizobium* grupo (4%) foram os mais abundantes na comunidade.

Segundo Alvarenga (2015), a utilização de dados de 16S deve ser abordada com cautela, pois, como as sequências ribossomais estão representadas aleatoriamente no metagenoma, elas podem não refletir a comunidade real, diferentemente das análises do metagenoma. Além disso, diferentes organismos apresentam diferentes números de cópias de genes ribossomais, o que pode afetar o mapeamento e a presunção da abundância relativa. Entretanto, embora com abundâncias diferentes, muitos dos gêneros identificados na análise de 16S RNAr foram também relacionados aos genomas recuperados.

Figura 8 – Gráfico Krona com representação da relação entre taxonomia e abundância de cada sequência de 16S ribossomal obtida no consórcio *Nostoc* sp. CENA67

Figura 9 – Gráfico Krona com representação da relação entre taxonomia e abundância de cada sequência de 16S ribossomal obtida no consórcio *Fischerella* sp. CENA161

Figura 10 – Gráfico Krona com representação da relação entre taxonomia e abundância de cada sequência de 16S ribossomal obtida no consórcio *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA303

Figura 11 – Gráfico Krona com representação da relação entre taxonomia e abundância de cada sequência de 16S ribossomal obtida no consórcio *Cilindrospermopsis raciborskii* CENA302

Figura 12 – Gráfico Krona com representação da relação entre taxonomia e abundância de cada sequência de 16S ribossomal obtida no consórcio *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEO-024

Os dados da diversidade microbiana revelam que há muitos táxons vivendo aderidos ou na área de influência das cianobactérias, incluindo bactérias não cultiváveis, que podem ser novas espécies. Uma quantidade maior de gêneros foi encontrada através da análise de 16S, muitos destes em uma abundância baixa, de modo que se pode inferir que provavelmente essa análise permitiu acessar uma parte da comunidade rara, mas que pode desempenhar um papel importante no ecossistema. Embora existam poucos trabalhos que tenham avaliado a comunidade de bactérias associadas a cianobactérias, há relatos de isolamento de novas espécies de bactérias a partir de amostras de cultivo. Uma bactéria, *Hoeflea anabaenae* (Rhizobiales) foi isolada de uma linhagem de *Anabaena* sp. na qual o epibionte estava associado a uma célula de heterócito (Stevenson; Waterbury, 2006; Stevenson et al., 2011). Já Lima et al, (2014), conseguiu recuperar um genoma de *Rhodobacter* sp. do DNA extraído de culturas não axênicas da cianobactéria *Cyanobium* sp. Outros trabalhos, como o de Hube et al. (2009), estudando linhagens de *Nodularia harveyana* e *Oscillatoria brevis*, viram que a maioria das bactérias eram dos grupos Alphaproteobacteria, Bacteroidetes e Gammaproteobacteria, identificando os gêneros *Porphyrobacter*, *Roseobacter*, *Rhodobacter* e *Muricauda*. Grupos semelhantes de bactérias foram identificados em florações da cianobactéria *Nodularia spumigena* no mar Báltico (Tuomainen et al., 2006).

Já o grupo Betaproteobacteria foi encontrada em maior abundância na comunidade bacteriana associada a espécies de *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Bagatini et al., 2014), contrastando com os nossos resultados, que mostram Alphaproteobacteria como os mais abundantes na comunidade associada de *Cylindrospermopsis*. Um trabalho recente, utilizando linhagens de *Synechococcus* isoladas de diferentes lagos, com diferentes estados de eutrofização, apresentou espécies dos grupos Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Actinobacteria como os grupos dominantes (Zheng et al., 2018). Embora não dominantes, esses grupos apresentaram abundância significativa nas comunidades dos 5 consórcios estudados. Actinobacteria, que apareceu na comunidade associada dos consórcios CENA302, ITEP-024 e CENA67, já foi descrito ainda como um importante associado a cianobactéria *Nostoc commune*. Um estudo que investigou a diversidade de espécies desse grupo com cianobactéria verificou que de 70 clones, 45 estavam relacionados a 10 diferentes famílias de Actinobacteria, com maior abundância dos gêneros *Arthrobacter*, *Micrococcus* e *Pseudonocardia*. Entretanto, no consórcio *Nostoc* CENA67, o grupo Actinobacteria representou apenas 2,21% dos dados. Já Planctomycetes, significativamente presente no consórcio CENA67, foi descrito por Cai et al. (2013), como os membros dominantes em florações cianobacterianas no lago eutrófico Taihu,

apresentando muitas bactérias dos grupos Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides (CFB), Betaproteobacteria, e Gammaproteobacteria.

Embora o número amostral utilizado nesse trabalho seja considerado pequeno para afirmar se a estrutura da comunidade é influenciada pelo hospedeiro, os dados mostram que cada cianobactéria hospeda uma comunidade distinta. O gráfico de *fingerprint* criado a partir das sequências de 16S reconstruídos do metagenoma (Figura 13) mostra que, embora o filo Proteobacteria seja o predominante em cada comunidade, as famílias e gêneros são diferentes.

Figura 13 – *Fingerprint* de cada um dos cinco consórcios, mostrando abundância e composição, em nível de gênero (à esquerda) e filo (à direita)

Apenas o gênero *Bosea* foi presente na maioria dos consórcios, sendo ausente apenas no consórcio CENA161. Esse resultado é corroborado pelos resultados obtidos por Louati et al.

(2015), que mostra que a comunidade bacteriana varia de acordo com o gênero de cianobactéria. Bagatini et al. (2015) afirma ainda que quanto mais próximo filogeneticamente os hospedeiros, mais parecidas serão suas comunidades associadas, pois os exsudados liberados serão mais semelhantes, já que carregam estruturas metabólicas mais semelhantes.

5.4. Anotação funcional da comunidade bacteriana

A anotação funcional da comunidade microbiana dos consórcios foi realizada tanto a partir dos genomas montados, como dos dados metagenômicos. Utilizando o servidor RAST, que realiza anotação funcional automática, observou-se que a porcentagem de sequências identificadas e incluídas em subsistemas variou de 24% a 60% entre os genomas das bactérias associadas, sendo que apenas dois genomas (MAG7 e MAG8) tiveram menos de 40% dos genes categorizados pelo anotador automático. Devido ao grande volume de dados, a anotação funcional dos genomas focou na busca por metabolismos que possam, de alguma forma, auxiliar na interação com o hospedeiro, como metabolismo de nitrogênio e fósforo, além da potencial produção de metabólitos secundários, vitaminas, quelantes de metais, entre outros.

Todos os genomas anotados apresentaram genes para produção de vitaminas do complexo B, principalmente tiamina, também conhecida como vitamina B1, e genes de resistência a estresse oxidativo. Com exceção dos genomas MAG29, MAG31 e MAG33, associadas ao consórcio ITEP-024, todos os genomas possuem genes para produção de auxinas, hormônios que auxiliam no crescimento de plantas. Além disso, a produção de sideróforos foi observada em 14 genomas. Chamou a atenção o fato de que em todos os consórcios foi encontrada pelo menos uma bactéria com potencial produção de sideróforos. Com exceção da bactéria MAG25, todas as bactérias associadas dos consórcios CENA161 e CENA67 apresentaram genes para este metabolismo. No consórcio CENA302, a bactéria MAG2 apresentou genes para produção de sideróforos, enquanto na comunidade associada de CENA303, foram as bactérias MAG4, MAG10 e MAG13 que apresentaram os genes. A bactéria MAG29 foi a única do consórcio ITEP-024 que apresentou genes de sideróforos.

Além da anotação do servidor RAST, os genomas foram submetidos à busca por metabólitos secundários através do servidor AntiSMASH, que realiza a predição de agrupamentos gênicos utilizando um banco de dados curado. Foram identificados 202 clusters putativos, distribuídos em 20 diferentes categorias (tabela 4). as categorias mais encontradas foram bacteriocina, NRPS e terpeno. Os diferentes metabólitos secundários produzidos por

microrganismos podem ter importantes funções nas comunidades, desde captação de nutrientes até comunicação celular.

Tabela 4 – Agrupamentos de metabólitos secundários preditos nos genomas de bactérias associadas em cada consórcio

Categoria	CENA67	CENA161	CENA302	CENA303	ITEP-024
N-acil aminoácido	2	-	-	3	1
Arilpolieno	1	3	1	3	-
Bacteriocina	6	2	3	11	3
Betalactona	-	3	2	8	2
Butirolactona	-	-	-	1	-
Ectoína	3	1	-	1	-
Fosfonato	1	1	1	3	-
Furano	-	-	-	-	1
Homoserina lactona	8	-	-	3	7
Laçopectideo	2	1	-	-	-
Laderana	-	-	-	1	-
Lantipeptídeos	2	1	-	1	-
NRPS	10	6	2	13	5
Nucleosídeo	1	-	-	-	-
PKS-I	4	-	-	1	1
PKS-III	2	-	-	1	2
Resorcinol	-	1	1	1	-
Sideróforo	2	3	1	1	-
Terpeno	9	1	4	21	14
Thiopectideo	-	2	-	-	-

A disponibilização de carbono fixado via fotossintatos é o principal fator contribuinte das cianobactérias quando em interação com outros microrganismos. Em troca, as bactérias liberam componentes que estimulam o crescimento da cianobactéria (Cooper; Smith, 2015). Ferro e vitaminas são fatores limitantes para o crescimento microbiano e as cianobactérias precisam capturar do ambiente esses elementos para crescerem bem no ambiente. Croft et al (2006) observou que o aporte exógeno em organismos fotossintetizantes chega a 50% para

vitamina B12 e 20% para vitamina B1 (tiamina). A associação com bactérias capazes de produzir e liberar o excedente para a cianobactéria é, portanto, um fator importante para a manutenção da simbiose. A falta de ferro no ambiente é um fator que limita o crescimento das cianobactérias, uma vez que afeta a sua capacidade realizar fotossíntese e fixação de nitrogênio, dois processos realizados por metaloproteínas (Berman-Frank et al., 2001). Enquanto cianobactérias são pouco eficientes na produção de quelantes de ferro (nenhum das cianobactérias dos consórcios apresentam genes para produção de sideróforos), as bactérias da cianosfera podem produzir diferentes tipos de sideróforos. Associações entre cianobactérias e bactérias produtoras de sideróforos têm sido encontradas no ambiente, principalmente em ambiente mais oligotróficos e pobres em ferro, como os oceanos, onde florações de *Trichodesmium* tem sido relatada em associação a esse tipo de bactéria (Roe et al., (2012). Em ambientes de água doce, essa associação também tem sido relatada em linhagem de *Synechococcus* (Michel et al., 1998) e *Microcystis*, que obtém ferro por meio da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* (Liu et al., 2014).

Os metabólitos secundários encontrados nas bactérias associadas também podem servir como auxiliares nas interações com as cianobactérias. Os terpenos, por exemplo, classe de metabólitos mais encontrados nas bactérias estudadas, são moléculas derivadas de isoprenos que podem proporcionar características mecânicas necessárias a membranas celulares, ou serem secretados ou volatilizados. Os terpenos funcionam ainda como comunicadores celulares, diminuindo a competição entre as bactérias (Schwab et al., 2013; Schulz-Bohm et al., 2017). Semelhante aos terpenos, as bacteriocinas, bastante encontradas nas bactérias associadas, são peptídeos produzidos por bactérias capazes de inibir o crescimento de outras (Cotter et al., 2012). Por outro lado, compostos como homoserina lactona estão envolvidos na comunicação bacteriana e são uma das moléculas envolvidas no sistema de *quorum-sensing* bacteriano durante a colonização de um cianobionte (Sharif et al., 2008). De todo modo, os metabólitos encontrados nas bactérias associadas parecem ter o potencial de facilitar a formação e a manutenção da associação mutualísticas com as cianobactérias.

Embora os metabólitos secundários sejam fundamentais para o estabelecimento das associações, o metabolismo de macronutrientes como nitrogênio e fósforo são fundamentais para a sobrevivência da comunidade como um todo. Uma análise de enriquecimento funcional comparando a anotação funcional das cianobactérias e da comunidade associada, mostrou que os processos de fotossíntese (GO:0015979) e fixação de nitrogênio (GO:0009399) foram metabolismos encontrados exclusivamente nas cianobactérias, com exceção da cianobactéria CENA303. O metabolismo de nitrogênio foi anotado funcionalmente tanto através do

metagenoma no servidor MG-RAST, como nos genomas montados separadamente. A análise dos genomas mostrou que a função fixação de nitrogênio estava presente apenas nas cianobactérias, enquanto as funções utilização de alantoína, nitrilase, amidase e hidratase de ureia/nitrila e desnitrificação foram exclusivas às bactérias associadas. As funções de hidrólise de cianato, amonificação e assimilação de amônia foram presentes tanto nos genomas de cianobactérias, como das bactérias da cianosfera, sendo que apenas a função assimilação de amônia esteve presente em todos os 33 genomas anotados. A função estresse nitrosativo foi predominante na comunidade associada, embora a cianobactéria do consórcio ITEP-024 também tenha apresentado tal função.

A anotação do metagenoma mostrou que as funções amonificação, assimilação de amônia e fixação de nitrogênio foram as mais abundantes nos consórcios (Figura 14A), sendo que, assim como revelado pela anotação dos genomas, o consórcio CENA303 praticamente não apresenta sequências associadas ao metabolismo de fixação de nitrogênio. Além disso, o consórcio CENA303 apresenta uma maior proporção de sequências afiliadas ao metabolismo de assimilação de amônia. A inferência taxonômica a partir das sequências do metabolismo de fixação de nitrogênio em cada consórcio (Figura 14B) comprova que as cianobactérias são os principais fornecedores de nitrogênio assimilável para a comunidade. No consórcio CENA303, as poucas sequências associadas à fixação de nitrogênio foram afiliadas a Proteobacteria.

Em estudos anteriores, a potencial capacidade de fixação de nitrogênio por essas linhagens de cianobactérias já havia sido demonstrada. *Nostoc* sp. CENA67, *Fischerella* sp. CENA161, *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 e *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 apresentam agrupamento gênico para fixação de nitrogênio, sendo que a linhagem CENA161 apresenta ainda um agrupamento adicional que codifica para uma nitrogenase alternativa que utiliza vanádio como cofator. A linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA303 por sua vez, não possui a capacidade de diferenciar células vegetativas em heterócitos e nem possuem os genes necessário para formação da nitrogenase, enzima que catalisa a transformação de N₂ atmosférico em amônia (Schaker, 2012; Souza, 2016; Abreu et al., 2018).

Figura 14 – (A) Representação da porcentagem de sequências afiliadas aos diferentes sub-metabolismos de nitrogênio nos diferentes consórcios. (B) Afiliação taxonômica das sequências de fixação biológica de nitrogênio em cada um dos cinco consórcios

Era esperado, portanto, que em virtude da representatividade da biomassa cianobacteriana no consórcio, a contribuição destas para o fornecimento de nitrogênio ao sistema seria importante. Entretanto, foi inesperado a falta de genes de fixação de nitrogênio em microrganismos de gêneros conhecidos principalmente pela capacidade de realizar tal metabolismo, como por exemplo *Aquamicrobium*, *Ensifer*, *Hyphomicrobium*, *Stenoprophomonas* e *Allorhizobium* (Kloos et al., 1995; de Lajudie et al., 1998; Reinhardt et al., 2008; Wang et al., 2015). Estudando a comunidade associada de cianobactérias formadoras de floração, Zhu et al. (2019) viu coparticipação das cianobactérias e da comunidade de epibiontes, identificando genes de fixação apenas na cianobactéria fixadora de nitrogênio, no caso, *Dolichospermum flos-aquae*. Do mesmo modo, Li et al. (2018) não encontrou genes de fixação de nitrogênio na comunidade associada a colônias de *Microcystis*. Entretanto, assim como nesses trabalhos, nossos dados sugerem que há uma complementaridade no ciclo de nitrogênio entre a cianobactéria hospedeira e seus epibiontes.

Algumas bactérias também apresentaram o potencial para realizar desnitrificação, um metabolismo que acontece geralmente em altas concentrações de nitrogênio, mas em condições anóxicas. Logo, sendo o consórcio um ambiente oxidante, por conta do metabolismo da cianobactéria, mesmo com o potencial, esse metabolismo não deve estar ocorrendo. Resultado parecido foi encontrado em florações de cianobactérias do mar Báltico, um ambiente rico em nitrogênio, que mostrou a abundâncias de genes de desnitrificação, mas não foi detectada a atividade deste metabolismo (Tuoumainen et al., 2003).

Assim como foi realizado com o metabolismo de nitrogênio, foi feita a anotação funcional do metabolismo de fósforo. O resultado da anotação do metagenoma (Figura 15) mostra que o metabolismo de fosfato, transportadores de fosfato de alta afinidade e controle de

regulon PHO e utilização de alquil-fosfonato foram os mais abundantes na comunidade. A anotação dos genomas (Figura 16), além de mostrar resultado semelhante em relação aos metabolismos mais abundantes, indica que as cianobactérias têm principalmente genes para utilização de fontes de fósforo inorgânico, sendo as bactérias associadas, além de também conseguirem utilizar o fósforo inorgânico, apresentam genes para metabolismos de fosfonatos e fosfoenolpiruvato. A única cianobactéria que apresentou potencial para metabolismo de fósforo orgânico foi gênero *Cylindrospermopsis*, consórcios CENA302 e CENA303, que mostraram a capacidade de utilizar alquil-fosfonatos.

Figura 15 – Porcentagem dos sub-metabolismos de fósforo em cada um dos cinco consórcios

Figura 16 – Porcentagem da contagem de metabolismo de fósforo nos genomas montados das bactérias associadas e das cianobactérias

O acúmulo de fósforo por cianobactérias desempenha um importante papel na habilidade desses microrganismos de crescerem em ambientes oligotróficos e com baixa disponibilidade deste nutriente. O fósforo geralmente é estocado por cianobactérias na forma

de grânulos de polifosfatos (Lu et al., 2019). Entretanto, o acúmulo de fósforo inorgânico pelas cianobactérias torna esse elemento ainda mais limitante para os outros microrganismos, que desenvolvem diferentes formas para obtenção de fósforo, entre elas, a utilização de fósforos orgânicos. Quando em associação, cianobactérias e bactérias associadas podem trocar nutrientes. De fato, marcadores isotópicos indicam que pode ocorrer transferência de fósforo entre esses dois grupos, em ambas as direções, de modo que a comunidade associada pode ser vista como mais uma fonte de fósforo para seu crescimento e metabolismo (Jiang et al., 2007).

Além de trocar nutrientes, as cianobactérias liberam substâncias que podem servir como fonte de alimento para bactérias ou controlar o crescimento de outros organismos no seu entorno. Entre esses compostos liberados, as cianotoxinas podem servir como fonte de carbono e fósforo para a comunidade bacteriana associada. As cinco cianobactérias dos consórcios estudados já foram descritas como produtoras de diferentes moléculas bioativas, entre elas, toxinas. A *Fischerella* sp. CENA161, por exemplo, foi analisada pela sua capacidade de produzir microcistina e outras substâncias com ação antimicrobiana (Fiore et al., 2009; Heck et al., 2018). As duas *Cylindrospermopsis raciborskii* CENA302 e CENA303 também são capazes de produzir saxitonina, uma potente neurotoxina (Hoffi-Risetti et al., 2013; Abreu et al., 2018). A *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024 é conhecida pela sua capacidade de produção de espumigina e anabaenopeptina, que são inibidores de protease (Sanz et al., 2015; Lima et al., 2017) e de guanitoxina, um organofosforado com forte função neurotóxica (Lima, 2016; Fiore et al., 2020). A cianobactéria *Nostoc* sp. CENA67 também é capaz de produzir microcistina (Alvarenga, 2015).

Cianotoxinas podem ser uma fonte de energia e nutrientes para bactérias associadas e estudos já averiguaram a capacidade de diferentes linhagens microbianas degradarem essas moléculas, principalmente microcistina, mas, mesmo alguns dos genomas recuperados serem da família Sphingomonadaceae, especialmente o gênero *Sphingomonas*, os mais conhecidos degradadores de microcistina (Nybom et al., 2008; Hu et al., 2012; Bourne et al. 1996; Ishii et al., 2004; Valeria et al., 2006), genes para degradação dessa cianotoxina não foram encontrados nem nos genomas, nem nos dados metagenômicos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir da análise genômica das bactérias associadas nos cinco consórcios estudados sugerem que a comunidade é dependente, tanto em estrutura, quanto em função, da cianobactéria. O metabolismo de nitrogênio realizado pelas cianobactérias e pelas bactérias da cianosfera são distintos e complementares, uma vez que a cianobactéria controla as rotas de entrada de nutriente no sistema, por meio da fixação de nitrogênio, enquanto as bactérias da cianosfera controlam as rotas de saída, através de desnitrificação, por exemplo. A ausência de genes de fixação de nitrogênio nas bactérias associadas conhecidas como diazotróficas pode indicar uma possível redução de seus genomas causada pela eliminação de vias metabólicas custosas e desnecessárias, já que haveria o aproveitamento do nitrogênio disponibilizado pela cianobactéria. Já em relação ao metabolismo de fósforo, as cianobactérias apresentam maior capacidade de utilização de fósforo inorgânico, enquanto as bactérias associadas têm genes para consumo de fontes de fósforo orgânico. Além disso, a grande quantidade de metabólitos secundários potencialmente produzidos pelas bactérias da cianosfera podem atuar no estabelecimento e manutenção da associação com as cianobactérias. A utilização da abordagem de *binning* mostrou-se como um método satisfatório para o estudo de interações microbianas, permitindo ainda a recuperação de genomas ainda não descritos, como os dos gêneros *Lacibacterium* e *Nordella*. Os dados funcionais revelam o potencial de metabolismos que podem estar auxiliando na manutenção da simbiose entre as cianobactérias e bactérias da cianosfera e futuros experimentos ou bioensaios poderiam confirmar as interações aqui propostas.

REFERÊNCIAS

- A. HUBE. **Molecular Biological and Physiological Investigations of Heterotrophic Bacteria Associated with Marine Filamentous Cyanobacteria**. n. November, p. 1–97, 2009.
- ABREU, V.A.C.; POPIN, R.V.; ALVARENGA, D.O.; SCHAKER, P.D.C.; HOFF-RISSETI, 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**, 26(9):306, 2018.
- ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S. Cyanobacteria-bryophyte symbioses. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1047–1058, 2008.
- ADAMS, D.G. Symbiotic Interactions. In: WHITTON, B.A.; POTTS, M. **The ecology of Cyanobacteria**. Netherlands: Kluwer Academic, p. 523-561, 2000.
- ADAMS, D.G.; BERGMAN, B.; NIERZWICKI-BAUER, S.A.; DUGGAN, P.S.; RAI, A.N.; SCHÜSSLER, A. Cyanobacterial-plant symbioses. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Ed.). **The prokaryotes** 1. 3. ed. Heidelberg: Springer, p. 359-400, 2013.
- AHMADJIAN, V. **The lichen symbiosis**. John Wiley, New York, New York, USA, 1993.
- ALBERTSEN, M. et al. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 533–538, 2013.
- ALLEN, M.B. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 4, p. 1-4, 1968.
- ALLEN, M.B.; ARNON, D.I. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 30, p. 366372, 1955.
- ALNEBERG, J. et al. Binning metagenomic contigs by coverage and composition. **Nature Methods**, v. 11, n. 11, p. 1144–1146, 2014.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25:3389–3402, 2011.
- ALVARENGA, D. O.; FIORE, M. F.; VARANI, A. M. A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–16, 2017.
- ALVARENGA, DO. **Análise genômica e funcional da cianobactéria *Nostoc* sp. CENA67 e caracterização da sua comunidade microbiana associada**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. 2015
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCKIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, Irlanda, v. 181, p. 441-446, 2002.
- BAGATINI, I. L. et al. Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

BALA, K., SHARMA, P., LAL, R. *Sphingobium quisquiliarum* sp. nov., a hexachlorocyclohexane (HCH)-degrading bacterium isolated from an HCH-contaminated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60, 429–433, 2010.

BANKEVICH, A., NURK, S., ANTIPOV, D., GUREVICH, A. A., DVORKIN, M., KULIKOV, A. S., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J. Comput. Biol.** 19, 455–477, 2014.

BERG, K. A. et al. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. **ISME Journal**, v. 3, n. 3, p. 314–325, 2009.

BERMAN-FRANK, I., CULLEN, J.T., SHAKED, Y., SHERRELL, R.M., FALKOWSKI, P.G. Iron availability, cellular iron quotas, and nitrogen fixation in *Trichodesmium*. **Limnol Oceanogr** 46: 1249–1260, 2001.

BLANK, C.E., SÁNCHEZ-BARACALDO, P. Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria – a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. **Geobiology**, Oxford, v. 8, p. 1–23, 2010.

BOURNE, D.G., JONES, G.J., BLAKELEY, R.L., JONES, A., NEGRI, A.P., RIDDLES, P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.62, no.11, pp.4086–4094, 1996.

BRINKHOFF, T., GIEBEL, H.-A., SIMON, M. Diversity, ecology, and genomics of the roseobacter clade: a short overview. **Arch. Microbiol.** 189, 531–539, 2008.

BUCK, K. R.; BENTHAM, W. N. A novel symbiosis between a cyanobacterium, *Synechococcus* sp., an aplastidic protist, *Solenicola setigera*, and a diatom, *Leptocylindrus mediterraneus*, in the open ocean. **Marine Biology**, v. 132, n. 3, p. 349–355, 1998.

CAI, H. Y. et al. Analysis of the Attached Microbial Community on Mucilaginous Cyanobacterial Aggregates in the Eutrophic Lake Taihu Reveals the Importance of Planctomycetes. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 1, p. 73–83, 2013.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T.L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, p. 421, 2009.

CAPUTO, A., NYLANDER, J.A.A., FOSTER, R.A. The genetic diversity and evolution of diatom-diazotroph associations highlights traits favoring symbiont integration. **FEMS Microbiol. Lett.** 366:fny297, 2019.

CARPENTER, E.J. Marine cyanobacterial symbiosis. **Biol. Environ. Proc. R. Irish Acad.** 102B:15–18, 2002.

CASTENHOLZ, R. W. Ecology of blue-green algae in hot springs. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. (Ed.). **The biology of blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific Publication. p. 379-414, 1973.

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

CHANG, H.-K., ZYLSTRA, G. “Xanthomonads,” in **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, ed K. N. Timmis (Berlin; Heidelberg: Springer), 1805–1811, 2010.

- CHAPMAN, M.J.; MARGULIS, L. Morphogenesis by symbiogenesis. **International Microbiology**, Barcelona, v. 1, p. 319-326, 1998.
- CHOI, G.G.; BAE, M.S.; AHN, C.Y.; OH, H.M. Induction of axenic culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on antibiotic sensitivity of contaminating bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 87-92, 2008.
- COLE, J. K. et al. Phototrophic biofilm assembly in microbial-mat-derived unicyanobacterial consortia: Model systems for the study of autotroph-heterotroph interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–18, 2014.
- COOPER, M. B.; SMITH, A. G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 26, n. Figure 1, p. 147–153, 2015.
- CORNET, L. et al. Consensus assessment of the contamination level of publicly available cyanobacterial genomes. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–26, 2018.
- COTTER, P.D.; ROSS, R.P., HILL, C. "Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics?". **Nature Reviews Microbiology**. 11 (2): 95–105, 2012.
- COTTRELL, M. T., KIRCHMAN, D. L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the cytophaga-flavobacter cluster consuming low-and high-molecular-weight dissolved organic matter. **Appl. Environ. Microbiol.** 66, 1692–1697, 2000.
- CROFT, M.T., WARREN, M.J., SMITH, A.G.: Algae need their vitamins. **Eukaryot Cell**, 5:1175-1183, 2006.
- CULTURES, S. et al. **Crossm Dynamics of Heterotrophic Bacterial Assemblages within**. v. 84, n. 3, p. 1–16, 2018.
- DAL-FORNO, M. et al. Starting from scratch: Evolution of the lichen thallus in the basidiolichen Dictyonema (Agaricales: Hygrophoraceae). **Fungal Biology**, v. 117, n. 9, p. 584–598, 2013.
- DAVID L. PATERSON, The Epidemiological Profile of Infections with Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species, **Clinical Infectious Diseases**, V.43, Issue Supplement_2, p. S43–S48, 2006.
- DE LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 4, p. 1277–1290, 1 out. 1998.
- DEMBITSKY, V.M.; ŘEZANKA, T. Metabolites produced by nitrogen-fixing Nostoc species. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 50, p. 363-393, 2005.
- DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley. Archiv für Hydrobiologie, Supplementband, **Algological Studies**, Stuttgart, v. 83, p. 197-206, 1996.
- DRÖGUE, J., MCHARDY, A. C. Taxonomic binning of metagenome samples generated by next-generation sequencing technologies. **Brief. Bioinform.** 13, 646–655, 2012.
- Dziallas, C., and Grossart, H.-P. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Environ. Microbiol.** 13, 1632–1641, 2011.

ESCALERA, L. et al. Cyanobacterial Endosymbionts in the Benthic Dinoflagellate *Sinophysis canaliculata* (Dinophysiales, Dinophyceae). **Protist**, v. 162, n. 2, p. 304–314, 2011.

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

FIGLIORE, M.F.; HONDA, R.Y. Fixação do N₂ por cianobactérias. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. (Ed.). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p. 69-95, 2008.

FIGLIORE, M.F., LIMA, S.T., CARMICHAEL, W.W., MCKINNIE, S.M.K., CHEKAN, J.R., MOORE, B.S. Guanitoxin, re-naming a cyanobacterial organophosphate toxin. **Harmful Algae**, v. 92, p. 101737, 2020.

FISCHER, W.W. et al. Evolution of oxygenic photosynthesis. **Annu. Rev. Earth Planet. Sci.** 44, 647–683, 2016.

FOSTER, R. A. et al. Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. **ISME Journal**, v. 5, n. 9, p. 1484–1493, 2011.

FOSTER, R. A.; CARPENTER, E. J.; BERGMAN, B. Unicellular cyanobionts in open ocean dinoflagellates, radiolarians, and tintinnids: Ultrastructural characterization and immunolocalization of phycoerythrin and nitrogenase. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 2, p. 453–463, 2006.

FOSTER, R. A.; COLLIER, J. L.; CARPENTER, E. J. Reverse transcription PCR amplification of cyanobacterial symbiont 16S rRNA sequences from single non-photosynthetic eukaryotic marine planktonic host cells. **Journal of Phycology**, v. 42, n. 1, p. 243–250, 2006.

FOSTER, R. A.; GOEBEL, N. L.; ZEHR, J. P. Isolation of *Calothrix rhizosoleniae* (cyanobacteria) strain SC01 from *Chaetoceros* (bacillariophyta) spp. diatoms of the subtropical North Pacific Ocean. **Journal of Phycology**, v. 46, n. 5, p. 1028–1037, 2010.

FOSTER, R. A.; O'MULLAN, G. D. **Nitrogen-Fixing and Nitrifying Symbioses in the Marine Environment**. **Nitrogen in the Marine Environment**, p. 1197–1218, 2008.

FOSTER, R. A.; ZEHR, J. P. Diversity, Genomics, and Distribution of Phytoplankton-Cyanobacterium Single-Cell Symbiotic Associations. **Annual Review of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 435–456, 2019.

GÓMEZ, F., LÓPEZ-GARCIA, P., MOREIRA, D. Molecular phylogeny of dinophysoid dinoflagellates: the systematic position of *Oxyphysis oxytoxoides* and the *Dinophysis hastata* group (Dinophysales, Dinophyceae). **J. Phycol.** 47:393–406, 2011.

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

GRANT, M. A. A. et al. Direct exchange of vitamin B 12 is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal-bacterial cocultures. **ISME Journal**, v. 8, n. 7, p. 1418–1427, 2014.

GUREVICH, A., SAVELIEV, V., VYAHHI, N., TESLER, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics** 29, 1072–1075, 2013.

- HARWATI, T. U., KASAI, Y., KODAMA, Y., SUSILANINGSIH, D., WATANABE, K. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. **Microb. Environ.** 22, 412–415, 2007.
- HAVENS, K.E. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. **Adv. Exp. Med. Biol.** 619, 733–747, 2008.
- HECK, K. et al. Biosynthesis of microcystin hepatotoxins in the cyanobacterial genus *Fischerella*. *Toxicon*, v. 141, p. 43–50, 2018.
- HERRERO, A.; PICOSI, S.; FLORES, E. Gene expression during heterocyst differentiation. **Advances in Botanical Research**, London, v. 65, p. 281–329, 2013.
- HO, L., HOEFEL, D., SAINT, C. P., NEWCOMBE, G. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter. **Water Res.** 41, 4685–4695, 2007.
- HOFF-RISSETI, C.E., DÖRR, F.A., SCHAKER, P.D.C., PINTO, E., WERNER, V.R., FIORE, M.F. Cylindrospermopsin and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. **Plos One**, v. 8, p. e74238, 2013.
- HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, P. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 265–278, 2001.
- HU, L., ZHANG, F., LIU, C., WANG, M. Biodegradation of microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. **Energy Procedia**, vol. 16, pp. 2054–2059, 2012.
- ISHII, H., NISHIJIMA, M., ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. **Water Research**, vol.38, no.11, pp. 2667–2676, 2004.
- JANSON, S. et al. Host specificity in the *Richelia*-diatom symbiosis revealed by hetR gene sequence analysis. **Environmental microbiology**, v. 1, n. 5, p. 431–438, 1999.
- JIANG, L. et al. Quantitative studies on phosphorus transference occurring between *Microcystis aeruginosa* and its attached bacterium (*Pseudomonas* sp.). **Hydrobiologia**, v. 581, n. 1, p. 161–165, 2007.
- JØRGENSEN, B. B.; COHEN, Y.; REVSBECH, N. P. Transition from Anoxygenic to Oxygenic Photosynthesis in a *Microcoleus chthonoplastes* Cyanobacterial Mat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 408–417, 1986.
- KAJITANI, R., TOSHIMOTO, K., NOGUCHI, H., TOYODA, A., OGURA, Y., OKUNO, M., et al. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. **Genome Res.** 24, 1384–1395, 2014.
- KANG, D. D. et al. MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. **PeerJ**, v. 2015, n. 8, p. 1–15, 2015.
- KARA, E.L., HANSON, P.C., HU, Y.H., WINSLOW, L., MCMAHON, K.D. A decade of seasonal dynamics and co-occurrences within freshwater bacterioplankton communities from eutrophic Lake Mendota, WI, USA. **ISME J** 7, 680–684, 2013.
- KLOOS, K. et al. DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of

Hyphomicrobium in a sewage treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 18, n. 3, p. 205–213, 1 nov. 1995.

KROMKAMP, J. C. et al. Resistance to burial of cyanobacteria in stromatolites. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 48, n. 2, p. 123–130, 2007.

LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M., SALZBERG, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biol.** 10:R25, 2009.

LARKIN, M.A.,BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHEMA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0, **Bioinformatics**, Volume 23, Issue 21, 1 November 2007, Pages 2947–2948

LI, Q. et al. A large-scale comparative metagenomic study reveals the functional interactions in six bloom-forming Microcystis-epibiont communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, 2018.

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

LIMA, A. R. J. et al. Draft genome sequence of the Brazilian *Cyanobium* sp. strain CACIAM 14. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, p. 2–3, 2014.

LIMA, DO **Biossíntese do organofosforado anatoxina-a(s) pela cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024**. 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. 2016

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

LIMEI, S., YUANFENG, C., HUALIN, Y., PENG, X., PENG, L., LINGDONG, K., et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria. **J. Environ. Sci.** 21, 1581–1590, 2009.

LIU, Z.Z., ZHU, J.P., LI, M., XUE, Q.Q., ZENG, Y., WANG, Z.P. Effects of freshwater bacterial siderophore on *Microcystis* and *Anabaena*. **Biol. Control** 78, 42–48, 2014.

LOGARES, R., SUNAGAWA, S., SALAZAR, G., CORNEJO-CASTILLO, F.M., FERRERA, I., SARMENTO, H., HINGAMP, P., OGATA, H., de, VARGAS, C., LIMA-MENDEZ, G., RAES, J., POULAIN, J., JAILLON, O., WINCKER, P., KANDELS-LEWIS, S., KARSENTI, E., BORK, P. ACINAS, S.G. Using mitags to explore microbial communities. **Environ Microbiol**, 16: 2659-2671, 2014.

LOUATI, I., PASCAULT, N., DEBROAS, D., BERNARD, C., HUMBERT, J.F. et al. Structural diversity of bacterial communities associated with bloom-forming freshwater cyanobacteria differs according to the cyanobacterial genus. **PLoS One**;10:e0140614, 2015.

LÜCKING, R., LAWREY, J.D., SIKAROODI, M. et al. Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous Cyanobacteria. **Am J Bot** 96:1409–1418, 2009.

MANDE, S. S., MOHAMMED, M. H., GHOSH, T. S. Classification of metagenomic sequences: methods and challenges. **Brief. Bioinform.** 13, 669–681, 2012.

MEDEMA, M.H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M.A.; WEBER, T.; TAKANO, E.; BREITLING, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, p. W339-W346, 2011.

MEEKS, J. C.; ELHAI, J. Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 94–121, 2002.

- MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 386, 2008.
- MICHEL, K., EXSS-SONNE, P., SCHOLTEN-BECK, G., KAHMANN, U., RUPPEL, H.G., PISTORIUS, E.K. Immunocytochemical localization of IdiA, a protein expressed under iron or manganese limitation in the mesophilic cyanobacterium *Synechococcus* PCC 6301 and the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongates*. **Planta** 205: 73–81, 1998.
- MOISANDER, P. H. et al. **Broaden the Oceanic N₂ Fixation Domain**. v. 1512, n. 2010, 2014.
- NAGARKAR, S., WILLIAMS, G. A., SUBRAMANIAN, G., SAHA, S. K. Cyanobacteria-dominated biofilms: a high-quality food resource for intertidal grazers. **Hydrobiologia** 512:89–95, 2004.
- NIELSEN, H. B., ALMEIDA, M., JUNCKER, A. S., RASMUSSEN, S., LI, J., SUNAGAWA, S., et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. **Nat. Biotechnol.** 32, 822–828, 2014.
- NIU, Y., SHEN, H., CHEN, J., XIE, P., YANG, X., TAO, M. et al. Phytoplankton community succession shaping bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. **Water Res.** 45, 4169–4182, 2011.
- NORRIS, R.E. 1961. **Observations on phytoplankton organisms collected on the NZOI Pacific Cruise, September 1958**. N. Z. J. Sci. 4:162–68, 1961.
- NYBOM, S. M.K., SALMINEN, S. J., MERILUOTO, J. A.O. Removal of microcystin-LR by strains of metabolically active probiotic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, vol.270, no. 1, pp.27–33, 2007.
- NYBOM, S. M.K., SALMINEN, S. J., MERILUOTO, J. A.O. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. **Toxicon**, vol.52, no.2, pp. 214–220, 2008.
- OTTEN, T.G., PAERL, H.W. Phylogenetic inference of colony isolates comprising seasonal microcystis blooms in Lake Taihu, China. **Microb. Ecol.** 62, 907–918, 2011.
- PAERL, H. W.; PINCKNEY, J. L.; STEPPE, T. F. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: Examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 11–26, 2000.
- PARKS, D. H. et al. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 10, p. 996, 2018.
- PARKS, D. H. et al. CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 2015.
- RAI, A.N., BERGMAN, B., AND RASMUSSEN, U. 2002. **Cyanobacteria in symbiosis**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 2002.
- REINHARDT, E.L., RAMOS, P.L., MANFIO, G.P., BARBOSA, H.R., PAVAN, C., MOREIRA-FILHO, C.A. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. **Braz J Microbiol.** 2008;39(3):414–422.

- RIKKINEN, J. Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. In P. Hallenbeck (Ed.), **Modern topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects** (pp. 243-294). London: Springer International Publishing AG, 2017.
- RIKKINEN, J. **Cyanolichens. Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 973–993, 2015.
- ROE, K. L. et al. Acquisition of iron by *Trichodesmium* and associated bacteria in culture. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1681–1695, 2012.
- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M.A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, Oxford, v. 16, p. 944-945, 2000
- SANZ, M., ANDREOTE, A.P.D., FIORE, M.F., DÖRR, F.A., PINTO, E. Structural Characterization of New Peptide Variants Produced by Cyanobacteria from the Brazilian Atlantic Coastal Forest Using Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. **Marine Drugs**, v. 13, p. 3892-3919, 2015.
- SCHMIEDER, R., EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics** 27, 863–864, 2011.
- SCHULZ-BOHM, K., MARTÍN-SÁNCHEZ, L., GARBEVA, P. Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. **Front Microbiol.**;8:2484, 2017.
- SCHWAB, W., FUCHS, C. HUANG, F.-C. Transformation of terpenes into fine chemicals. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 115: 3-8, 2013.
- Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics** 30, 2068–2069, 2014.
- SENA, L.; ROJAS, D.; MONTIEL, E.; GONZÁLES, H.; MORET, J.; NARANJO, L. A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 27, p. 1045-1053, 2008.
- SHARIF, D. I. et al. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeothoece* PCC6909. **ISME Journal**, v. 2, n. 12, p. 1171–1182, 2008.
- SHEN, H. et al. Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. **Freshwater Biology**, v. 56, n. 6, p. 1065–1080, 2011.
- SHI, L., CAI, Y., KONG, F., YU, Y. Specific association between bacteria and buoyant *Microcystis* colonies compared with other bulk bacterial communities in the eutrophic Lake Taihu, China. **Environ. Microbiol. Rep.** 4, 669–678, 2012a.
- SKULBERG, O. M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. In: YÜRÜM, Y. (Ed.). **Hydrogen energy system. Production and utilization of hydrogen and future aspects**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 95-110, 1995..
- SOURNIA, A. Les cyanophycees dans le plancton marin. **Ann. Biol.** 9:63–76, 1970.
- SPLITT, S. D.; RISSER, D. D. The non-metabolizable sucrose analog sucralose is a potent inhibitor of hormogonium differentiation in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 2, p. 137–147, 2016.

STAL, L. J.; MOEZELAAR, R. Fermentation in cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 179–211, 1997.

STAL, L.J. Coastal microbial mats: the physiology of a small-scale ecosystem. **S Afr J Bot** 67:399–410, 2011.

STAL, LS, BOLHUIS, H, CRETOIU, MS. Phototrophic microbial mats. In P. HALLENBECK (Ed.), **Modern topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects** (pp. 295-318). London: Springer International Publishing AG, 2017

STEVENSON, B. S.; WATERBURY, J. B. Isolation and identification of an epibiotic bacterium associated with heterocystous *Anabaena* cells. **Biological Bulletin**, v. 210, n. 2, p. 73–77, 2006.

STEVENSON, B.S., SUFLITA, M.T., STAMPS, B.W., MOORE, E.R.B., JOHNSON, C.N., LAWSON P.A. *Hoeflea anabaenae* sp. nov., an epiphytic symbiont that attaches to the heterocysts of a strain of *Anabaena*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology** vol. 61 issue 10, p: 2439-2444, 2011.

TAKAHASHI, O.; MAYAMA, S.; MATSUOKA, A. Host-symbiont associations of polycystine *Radiolaria*: Epifluorescence microscopic observation of living *Radiolaria*. **Marine Micropaleontology**, v. 49, n. 3, p. 187–194, 2003.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., & KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, 30(12), 2725–2729, 2013.

THOMPSON, A. et al. Genetic diversity of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria UCYN-A and its prymnesiophyte host. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 3238–3249, 2014.

TSCHERMAK-WOESS, E. The algal partner. In: GALUN M (ed) **CRC handbook of lichenology**, vol I. CRC Press, Boca Raton, pp 39–92, 1988.

TUOMAINEN, J. et al. Community structure of the bacteria associated with *Nodularia* sp. (cyanobacteria) aggregates in the Baltic Sea. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 3, p. 513–522, 2006.

USHER, K. M.; BERGMAN, B.; RAVEN, J. A. Exploring Cyanobacterial Mutualisms. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, n. 1, p. 255–273, 2007.

VALERIA, A. M., RICARDO, E. J., STEPHAN, P., ALBERTO, W. D. Degradation of microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from san roque reservoir (Córdoba–Argentina). **Biodegradation** 17, 447–455, 2006.

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

VOYTSEKHOVICH, A. A.; MIKHAILUK, T. I.; DARYENKO, T. Lichen photobionts. 1: biodiversity, ecophysiology and co-evolution with the mycobiont. **Phycology**, v. 21, n. 1, p. 3–26, 2011.

VOYTSEKHOVICH, A. A.; MIKHAILYUK, T. I.; DARIENKO, T. M. Lichen photobionts. 2: Origin and correlation with mycobiont. **Algologia**, v. 21, n. 2, p. 151–177, 2011.

Wang, X., Jin, D., Zhou, L., Zhang, Z. Draft Genome Sequence of *Aquamicrobium defluvii* Strain W13Z1, a Psychrotolerant Halotolerant Hydrocarbon-Degrading Bacterium. **Genome Announc.** ;3(4):e00984-15, 2015.

WEBER, T.; BLIN, K.; DUDELA, S.; KRUG, D.; KIM, H.U.; BRUCCOLERI, R.; LEE, S.Y.; FISCHBACH, M.A.; MULLER, R.; WOHLLEBEN, W.; BREITLING, R.; TAKANO, E.; MEDEMA, M.H. antiSMASH 3.0: a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, p. W237-243, 2015.

WILKINS, L. G. E. et al. Metagenome-assembled genomes provide new insight into the microbial diversity of two thermal pools in Kamchatka, Russia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

WILSON, S.T., AYLWARD, F.O., RIBALET, F., BARONE, B., CASEY, J.R., et al. Coordinated regulation of growth, activity and transcription in natural populations of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacterium *Crocospaera*. **Nat. Microbiol.** 2:17118, 2017.

WORM, J.; SØNDERGAARD, M. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 14, n. 1, p. 19–28, 1998.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. London: Chapman & Hall, p. 43-86, 1992.

ZEHR, J. P. et al. Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. **Science**, v. 322, n. 5904, p. 1110–1112, 2008.

ZEHR, J. P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 162–173, 2011.

ZHENG, Q., WANG, Y., XIE, R., LANG, A.S., LIU, Y., LU, J., JIAO, N. Dynamics of Heterotrophic Bacterial Assemblages within *Synechococcus* Cultures. **Applied and environmental microbiology**, 84(3), e01517-17, 2018.

ZHU, C. M. et al. Alternate succession of aggregate-forming cyanobacterial genera correlated with their attached bacteria by co-pathways. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 867–879, 2019.

ZHUBANOVA, A. A. et al. Construction of cyanobacterial-bacterial consortium on the basis of axenic cyanobacterial cultures and heterotrophic bacteria cultures for bioremediation of oil-contaminated soils and water ponds. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, n. 4, p. 555–562, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Árvore filogenômica construída pelo programa GTDB-Tk utilizada como base para a inferência taxonômica. A primeira árvore mostra a árvore completa, mas, para facilitar a visualização, ela foi subdividida em partes.

Tree scale: 0.1