

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

Taxonomia, genômica e potencial funcional da cianobactéria *Oxynema* sp.  
CENA135

**Gladys Angélica Apaza Castillo**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia  
Agrícola

Piracicaba  
2020

Gladys Angélica Apaza Castillo  
Bacharela em Ciências Biológicas

Taxonomia, genômica e potencial funcional da cianobactéria *Oxynema* sp. CENA135

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia  
Agrícola

Piracicaba  
2020

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

Apaza-Castillo, Gladys Angélica

Taxonomia, genômica e potencial funcional da cianobactéria *Oxy0nema* sp.  
CENA135 / Gladys Angélica Apaza Castillo - - Piracicaba, 2020.

121 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Manguezal 2. Filogenômica 3. Bioinformática 4. Produtos naturais 5.  
Cianosfera I. Título

## DEDICATÓRIA

*A mis padres, Alfonso y Basilia, por todo el apoyo y amor incondicional*

A

*Mis hermanos y cuñadas,  
aunque seamos diferentes la tierra nos atrae con la misma gravedad.*

A

*Mis siempre pequeños sobrinos, Oscar, Janice, Maryori, Xiomara, John e Jahir  
cuyas sonrisas contagiadas alegran mi corazón y ruidos interrumpen mi tranquilidad.*

A

*Mis tios, Alicia y Martin,  
quienes en mis memorias viven y me enseñaron que la felicidad no se mide con monedas.*

A

*Mis padrinos, Elsa y Bautista, y mi prima Vanessa,  
mi maestra de infancia, por todos los cuidados y atenciones recibidas.*

A

*Mi familia en general,  
a quienes seria difícil enlistar porque solo sus nombres llenarian esta pagina  
pero saben que fueron, son y serán esenciales en mi vida.*

A

*Mis tutores/amigos, Guido y Miriam,  
por la motivación de recorrer varios kilometros  
y gracias a ello conocer parte de la pintoresca cultura brasileira.*

**A TODOS,  
DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli de Fátima Fiore, pela confiança, orientação e a oportunidade de pertencer ao seu grupo de pesquisa

Aos Prof. Dr. Luis Henrique Zanini Branco, o Prof. Dr. Diego Mauricio Riano Pachón e o Prof. Dr. Ernani Pinto Junior por seus ensinamentos, apoio e suporte durante a realização deste estudo.

Aos membros do laboratório de Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Universidade de São Paulo - Sede São Paulo, e em especial a Fernanda Rios Jacinavicius pela guia, ensinamentos e disponibilidade na realização de análises.

Às funcionárias do laboratório Ana Paula Dini Andreote e Renata Beatriz Cruz, pelas distintas atividades que realizam no laboratório e ainda assim me forneceram apoio.

Aos colegas do laboratório, amigos, com todo carinho e gratidão para Bruno Evangelista de Souza, Taiane Fernanda Barradas, Andrews Delbaje, Caroline Rosa de Carvalho e Rafael Barty Dextro. Em especial para Juliana dos Santos Costa e Thierry Alexandre Pellegrinetti pelo companherismo e o suporte em momentos cinzentos.

A nossa Pós-doutoranda Simone Cotta e às estagiárias Julia Polezi Formagio e Lara Losovoi pela ajuda recebida.

Ao pesquisador Danilo Alvarenga pelos conselhos fornecidos

A Guilherme K. Hosaka, pelo amor, amizade, companhia, ensinamentos, apoio inestimável durante minha formação, e pelo Pisco. A sua família pelas atenções recebidas e as sempre interessantes conversas culturais.

A Rodolfo Silva e Fernando Matias, pela amizade, apoio e aventuras neste lindo país.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Serviço da Pós-Graduação, em especial a Maria Solizete Granzol Silva e Alexandre Joviniano dos Santos, por todo o auxílio e orientação fornecida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

*Algumas batalhas são vencidas com espadas e lanças,  
outras com papel e caneta!*

Game of thrones

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. Taxonomia do gênero <i>Oxynema</i> .....	15
2.2. Cianobactérias do manguezal.....	17
2.3. Metabólitos secundários em cianobactérias do manguezal.....	19
2.4. Sideróforos.....	23
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Origem e condições de cultivo da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135.....	31
4.2. Purificação da cultura.....	31
4.3. Caracterização morfológica.....	32
4.4. Produção de biomassa e lavagem de células para extração de DNA.....	33
4.5. Extração de DNA total, preparo da biblioteca genômica e sequenciamento.....	34
4.6. Montagem do genoma e análise de qualidade das sequências.....	34
4.7. Filogenômica.....	35
4.8. Filogenia do gene 16S RNAr.....	35
4.9. Análises das estruturas secundárias do espaço intergênico 16S-23S.....	36
4.10. Anotação de genes e potenciais agrupamentos gênicos.....	37
4.11. Detecção das bactérias da cianosfera.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Caracterização morfológica.....	39
5.2. Montagem do genoma, análise de qualidade das sequências.....	42
5.3. Filogenômica.....	47
5.4. Filogenia do gene 16S RNAr.....	50
5.5. Análises das estruturas secundárias do espaço intergênico 16S-23S.....	54
5.6. Anotação funcional do genoma de <i>Oxynema</i> sp. CENA135.....	57
5.7. Detecção de potenciais agrupamentos gênicos em <i>Oxynema</i> sp. CENA135.....	60
5.8. Detecção de bactérias da cianosfera.....	77
6. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES.....	115
ANEXO.....	121

## RESUMO

### **Taxonomia, genômica e potencial funcional da cianobactéria *Oxynema* sp. CENA135**

*Oxynema* é um gênero derivado do polifilético *Phormidium*, cujas poucas espécies registradas foram encontradas em ambientes de manguezal, marinhos, ou com alto teor de sal. As informações taxonômica e genômica, são quase inexistentes para o gênero, com algumas exceções de sequências de 16S RNAr e ITS 16S-23S disponíveis nos bancos de dados. Estudos anteriores realizados com a cianobactéria isolada do manguezal Brasileiro *Oxynema* sp. CENA135 mostraram o seu potencial em sintetizar sideróforos, hidrocarbonetos alifáticos, substâncias anticancerígena e antimicrobiana, além de sua eficácia na degradação de alguns tipos de corantes têxteis. Neste trabalho, a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 foi analisada sob uma abordagem polifásica (morfologia, hábitat, filogenômica, filogenia do gene de 16S RNAr e estrutura secundária do ITS 16S-23S), incluindo a busca de genes ou agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de produtos naturais e a detecção de bactérias associadas. Após a caracterização morfológica usando microscopia óptica e de varredura, realizou-se o sequenciamento genômico de uma biblioteca “mate pair” na plataforma HiSeq (Illumina). Este é o primeiro genoma do gênero *Oxynema* e, portanto, para a montagem foi usado o método de novo que resultou em 11 sequências contíguas em um tamanho total de 6,2 Mpb, com N50 de 3.591.108 pb, percentual G:C de 51,6% e cobertura média de 190x. O programa checkM estimou uma alta integridade do genoma (99,29%) e poucas contaminações (1,22%). A mineração do genoma revelou um potencial para biorremediação pela presença de genes envolvidos na resistência de cobre, cobalto, zinco, cádmio, mercúrio e detoxificação de arsênio, bem como a possível participação da enzima lacase na descolorização de corantes têxteis. Além disso, foram anotados agrupamentos gênicos potencialmente ligados à biossíntese e transporte do sideróforo schizokinen, bacteriocinas e um pigmento terpeno. Outros agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de metabólitos de interesse industrial como hidrocarbonetos alcanos, cianoficina e polihidroxialcanoatos foram identificados. Alguns genes anotados com função de exportação de sideróforos e antibióticos, um precursor de bacteriocina e o agrupamento gênico da bacteriocina LAP foram encontrados em ilhas genômicas preditas, sugerindo um possível fenômeno de transferência horizontal conferindo mecanismos de resistências. Algumas sequências contaminantes foram recuperadas e identificadas como pertencentes ao filo Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria). Sequências dos taxons de Alphaproteobacteria, especificamente da ordem Rhizobiales apresentaram regiões codificantes envolvidos em funções semelhantes e complementares a *Oxynema*. As análises morfológicas e das estruturas secundárias D1-D1' e BoxB quando comparadas com a da linhagem tipo (*O. thaianum* CCALA 960) sugerem uma nova espécie. Esse estudo contribui para a sistemática do filo Cyanobacteria e para o conhecimento do potencial da linhagem na síntese de produtos naturais.

Palavras-chave: Manguezal, Filogenômica, Bioinformática, Produtos naturais, Cianosfera



## ABSTRACT

### Taxonomy, genomics and functional potential of the cyanobacteria *Oxynema* sp.

#### CENA135

*Oxynema* is a derivated genus from the polyphyletic *Phormidium* and with few registered species, which were found in mangroves, marine or high salinity environments. The taxonomic and genomic informations are almost nonexistent for this genus, with a few exceptions of 16S rRNA and 16S-23S ITS sequences available at databases. Previous studies performed with *Oxynema* sp. CENA135 isolated from a Brazilian mangrove showed its potential to synthesize siderophores, aliphatic hydrocarbons, anticancer and antibiotic substances, besides its effective degradation of some types of textile dyes. In this work, the strain *Oxynema* sp. CENA135 was analyzed under a polyphasic approach (morphology, habitat, phylogenomics, phylogeny of the 16S rRNA gene and secondary structure of 16S-23S ITS), including the search for genes or gene clusters related to the biosynthesis of natural products and the detection of associated bacteria. After morphological characterization using an optic and a scanning microscopes, the genomic sequencing was performed from a mate pair library at the HiSeq (Illumina) platform. This is the first genome of the genus *Oxynema* and, therefore, for its assembly it was used a *de novo* method resulting in 11 scaffolds in a total size of 6.2 Mbp, with N50 of 3,591,108 pb, GC content of 51.6% and average coverage of 190x. The checkM software estimated a high completeness of the genome (99.29%) and few contaminations (1.22%). Genome mining revealed a biorremediation potential due to the presence of genes related to resistance of copper, zinc, cobalt, cadmium and mercury, arsenic detoxification, as well as a possible participation of the laccase enzyme in the decoloration of textile dyes. Furthermore, gene clusters potentially linked to the biosynthesis and transport of the schizokinen siderophore, bacteriocins and a terpene pigment were annotated. Other gene clusters involved in the synthesis of metabolites with industrial interest, such as alkane hydrocarbons, cyanophycin and polyhydroxyalkanoates were identified. Some of the annotated genes with antibiotic and siderophore exportation functions, a bacteriocin precursor and a bacteriocin LAP gene cluster were found at predicted genomic islands, suggesting a possible horizontal transfer phenomenon conferring resistance mechanisms. Contaminating sequences were recovered and identified as belonging to the Proteobacteria Phylum (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria). Sequences from Alphaproteobacteria taxa, specifically of the order Rhizobiales, showed coding regions related to similar and complementary functions of *Oxynema*. Analyzes of the morphology and secondary structures D1-D1' and BoxB compared to the type strain (*O. thaianum* CCALA 960) suggest a new species. This study contributes to the systematic of the Cyanobacteria Phylum and to the knowledge of the potential of this strain to synthesizes natural products.

Keywords: Mangrove, Phylogenomics, Bioinformatics, Natural products, Cyanosphere

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filamentos dos morfotipos descritos no gênero <i>Oxynema</i> .....	17
Figura 2. Biossíntese de peptídeos ribossômicos sintetizados e pós-traduzidos, a partir do peptídeo precursor (Modificado de Arnison et al., 2013).....	22
Figura 3. Esquema do fluxo do sideróforo schizokinen e o mecanismo de internalização do ferro na cianobactéria heterocitada <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	26
Figura 4. Estruturas dos sideróforos schizokinen e sinechobactina do tipo NIS hidroxamato.....	27
Figura 5. Localização geográfica da origem da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135, no manguezal da Ilha do Cardoso, Estado de São Paulo, Brasil. ....	31
Figura 6. Microfotografias de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, em cultura não axênica.....	40
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Oxynema</i> sp. CENA135, em cultura não axênica...	40
Figura 8. Qualidade Phred das bases por leitura do sequenciamento da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135 .....	42
Figura 9. Proporção de leituras emparelhadas e mapeadas do sequenciamento Hiseq para a montagem primária de Spades (a), e sua distribuição por grupo taxonômico no nível de filo (b). A afiliação taxonômica de cada sequência montada foi determinada por similaridade blastn (e-value 3) no GenBank do NCBI. os gráficos de bolhas mostram a distribuição das sequências de acordo com a proporção GC e a cobertura base (c). Nesse caso, os círculos são proporcionais ao comprimento das sequências e coloridos por grupo taxonômico. Os histogramas mostram o tamanho acumulado das sequências em cada filo pela proporção GC (localização superior) e cobertura (localizado à direita). as legendas contêm o número de sequências, tamanho em Mpb e N50 do lado do filo. ....	44
Figura 10. Proporção de leituras emparelhadas e mapeadas do sequenciamento Hiseq para a montagem primária de Platanus (a), e sua distribuição por grupo taxonômico no nível de filo (b). A afiliação taxonômica de cada sequência montada foi determinada por similaridade blastn (e-value 3) no GenBank do NCBI. os gráficos de bolhas mostram a distribuição das sequências de acordo com a proporção GC e a cobertura base (c). Nesse caso, os círculos são proporcionais ao comprimento das sequências e coloridos por grupo taxonômico. Os histogramas mostram o tamanho acumulado das sequências em cada filo pela proporção GC (localização superior) e cobertura (localizado à direita). as legendas contêm o número de sequências, tamanho em Mpb e N50 do lado do filo. ....	45
Figura 11. Estimativa percentual de buscas identificados no genoma da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135, correspondente a 826 grupos completos de cópia única (821) e duplicados (5), 4 grupos fragmentados e 4 grupos ausentes.....	47
Figura 12. Posição evolutiva da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135 no filo Cyanobacteria. Os valores de reamostragem (Bootstrap) foram indicados em uma escala de 0 a 1. A classificação taxonômica no nível de ordem foi designada de acordo com a taxonomia proposta por Komárek et al. (2014) utilizada no NCBI (Primeira coluna) e a taxonomia do GTDB (Segunda coluna). ....	49
Figura 13. Detalhe do clado do gênero <i>Oxynema</i> . A árvore de máxima verossimilhança (MV) baseou-se em sequências parciais do gene 16S RNAr e a topologia foi validada por inferência bayesiana (IB). Apenas os valores de reamostragem maiores a 70% para o método MV e de 0,7 de probabilidade a posteriori para IB são indicados nos nós. A linhagem de estudo <i>Oxynema</i> sp. CENA135 está exibida em negrito.....	50

- Figura 14. Relação filogenética do gênero *Oxynema* com outras taxas da ordem Oscillatoriales. A árvore de máxima verossimilhança (MV) baseou-se em sequências parciais do gene 16S RNAr e a topologia foi validada por inferência bayesiana (IB). Apenas os valores de reamostragem maiores a 50% para o método MV e de 0,6 de probabilidade a posteriori para IB são indicados nos nós. (\*) Representa valores inferiores e (-) valores ausentes. Os círculos pretos mostram as espécies tipo dos gêneros cianobacterianos. O clado A é o mais próximo para *Oxynema*, na qual agrupa-se a polifilética *Oscillatoria acuminata* PCC 6304 em concordância com a filogenômica. O próximo gênero com genoma disponível é *Planktothricoides* representado por *P. Raciborskii* do clado B. O tradicional *Phormidium* e *Lyngbya martensiana* agrupam em um clado C distante do clado *Oxynema*..... 53
- Figura 15. Estruturas secundárias dos domínios D1-D1' das sequências do espaço intergênico 16S-23S.. ..... 56
- Figura 16. Estruturas secundárias dos domínios BoxB das sequências do espaço intergênico 16S-23S.. ..... 56
- Figura 17. Subsistemas dos rascunhos montados da linhagem *Oxynema* sp. CENA135..... 58
- Figura 18. Organização gênica do agrupamento presumidamente responsável da biossíntese e transporte do sideróforo schizokinen no genoma de *Oxynema* sp. CENA135, em referência aos agrupamentos gênicos de schizokinen em *Nostoc* sp. PCC 7120 e de rhizobactina em *Sinorhizobium meliloti* 1021. 62
- Figura 19. Gene possivelmente envolvido na biossíntese de PRPT tipo LAP em *Oxynema* sp. CENA135. Esquema inferido em Bagel. .... 66
- Figura 20. Genes possivelmente envolvidos na biossíntese de PRPT tipo laço-peptídeo em *Oxynema* sp. CENA135. Esquema inferido em Bagel..... 68
- Figura 21. Genes possivelmente envolvidos na biossíntese de PRPT tipo sactipeptídeo em *Oxynema* sp. CENA135. Esquema inferido em Bagel..... 69
- Figura 22. Organização gênica do agrupamento presumidamente envolvido na biossíntese de hidrocarbonetos alcanos em *Oxynema* sp. CENA135. A sintenia de vários agrupamentos cianobacterianos indica a essencialidade dos genes Aar e Ado na síntese de alcanos..... 72
- Figura 23. Organização gênica do agrupamento presumidamente envolvido na biossíntese e degradação do polímero cianoficina em *Oxynema* sp. CENA135, em referência aos agrupamentos gênicos na cianobactéria não-diazotrófica *Synechocystis* sp. PCC 6803 e a diazotrófica *Nostoc* sp. PCC 7120... 74
- Figura 24. Organização gênica do agrupamento presumidamente envolvido na biossíntese de polihidroxicanoatos (PHAs) em *Oxynema* sp. CENA135, em referência ao agrupamento gênico da linhagem produtora *Synechocystis* sp. PCC 6803. .... 75
- Figura 25. Abundância relativa dos táxons pertencentes ao filo Proteobacteria associados a *Oxynema* sp. CENA135. A divisão taxonômica no nível de classe está indicada no círculo interno e no nível de ordem no círculo externo. .... 78
- Figura 26. Comparativa funcional de *Oxynema* sp. CENA135 e as bactérias associadas da ordem Rhizobiales. Os subsistemas estão classificados de acordo com o servidor Rast na categoria Polímeros Derivados de Ácidos Graxos (A), Hormônios Vegetais (B), Adquisição e Metabolismo de Ferro (C), Resistência a Antibióticos e Compostos Tóxicos (D) e Vias Periféricas para Catabolismo de Compostos Aromáticos (E). .... 82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das sequências de 16S RNAr das linhagens comparadas na matriz de similaridade com seus respectivos números de acesso e país de procedência. ....	36
Tabela 2. Relação de sequências de ITS 16S-23S da linhagem em estudo e das linhagens descritas do gênero <i>Oxynema</i> disponíveis na base de dados do genbank NCBI até dezembro 2019. ....	37
Tabela 3. Comparação morfométrica da linhagem CENA135 com as espécies descritas no gênero <i>Oxynema</i> . ....	41
Tabela 4. Estimativa e análise de qualidade das montagens individuais e consensus do sequenciamento da linhagem <i>Oxynema</i> sp. CENA135. ....	46
Tabela 5. Similaridade do gene de 16S RNAr das linhagens pertencentes ao gênero <i>Oxynema</i> , baseado em 1064 nucleotídeos. Porção superior contém os valores percentuais de similaridade e a porção inferior o número de nucleotídeos divergentes. Valores inferiores a 99% são exibidos em negrita. ....	51
Tabela 6. Tamanho em nucleotídeos das regiões do ITS 16S-23S das linhagens descritas no gênero <i>Oxynema</i> e a espécie <i>Oxynema thaianum</i> . ....	54
Tabela 7. Similaridade das regiões D1-D1' e Box B do ITS 16S-23S. Porção superior contém os valores percentuais de similaridade e a porção inferior o número de nucleotídeos divergentes. ....	55
Tabela 8. Agrupamentos gênicos preditos no genoma da <i>Oxynema</i> sp. CENA135. ....	61
Tabela 9. Estimativas das sequências de bactérias do filo Proteobacteria associadas a <i>Oxynema</i> sp. CENA135, divididas por táxons no nível de classe e ordem. ....	77
Tabela 10. Similaridade BLAST de sequências parciais de marcadores filogenéticos encontrados na cianosfera, em relação a microrganismos depositados na base de dados GenBank. ....	80



## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias pertencem a um grupo antigo de bactérias fotossintéticas que remontam a 3.500 milhões de anos, de morfologia altamente variável e com capacidades fisiológicas distintas que favorecem sua sobrevivência em uma ampla faixa de habitats, incluindo regiões extremas. Toda sua história evolutiva está refletida nos seus genomas, cujos sequenciamentos estão sendo facilitados pelo rápido desenvolvimento de tecnologias. Isto tem desencadeado um aumento de genomas disponíveis nas bases de dados, os quais são frequentemente utilizados na análise evolutiva e na busca de agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de produtos naturais.

A taxonomia das cianobactérias têm sido bastante conturbada e atualmente várias propostas de classificação estão baseadas na filogenia de genomas (LANG; DARLING; EISEN, 2013; KOMÁREK et al., 2014; WALTER, JULINE M et al., 2017; WALTER, JULINE M. et al., 2017; PARKS et al., 2018; YOKONO; SATOH; TANAKA, 2018). Embora esse método confira resolução na identificação dos táxons, a dependência da diversidade, quantidade e qualidade dos genomas têm limitado a designação de gênero e espécie; em especial para táxons pouco estudados ou gêneros novos. Anteriormente, sequências parciais do gene 16S RNAr dentre outros marcadores moleculares filogenéticos (tais como ITS 16S-23S, *rpoB*, *gyrB*) foram amplamente usados para identificação de cianobactérias e apenas em altos níveis taxonômicos como ordem, família e gênero (SHARIATMADARI et al., 2017). Por exemplo, as sequências de ITS 16S-23S RNAr são usualmente usadas como ferramentas para identificação de espécies e subespécies bacterianas (ITEMAN et al., 2000; JENG et al., 2001; NAKANISHI et al., 2005; WANG et al., 2008; RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011; MARTIJN et al., 2019).

A classificação moderna utiliza informações genéticas que estão nos genomas e, portanto, são obtidas por sequenciamento. Entretanto, por muito tempo, os dados morfológicos, de ultraestrutura, ecologia e fisiologia forneceram a base das primeiras revisões taxonômicas do filo e formaram os pilares na sistemática de cianobactérias. A junção desses critérios taxonômicos tradicionais e as análises moleculares foi denominada de abordagem polifásica (VANDAMME et al., 1996; KOMAREK, 2006; KOMÁREK et al., 2014; PALINSKA; SUROSZ, 2014; KOMÁREK, 2016, 2018). Continuamente, novos gêneros são incorporados ao filo seguindo a taxonomia polifásica moderna (CHATCHAWAN et al., 2012; STOYANOV et al., 2014; MARTINS; BRANCO, 2016; BUCH; MARTINS; BRANCO, 2017; MARTINS; MACHADO-DE-LIMA; BRANCO, 2019), assim como, várias novas linhagens tipos são

denominadas (RAMOS; MORAIS; VASCONCELOS, 2017). No entanto, a taxonomia das cianobactérias continua sendo aperfeiçoada na tentativa de encontrar a melhor abordagem, inclusive com discussões sobre os critérios evolutivos baseados unicamente nos genomas e a abordagem polifásica, na qual a filogenômica está incluída.

Os genomas cianobacterianos também são constantemente estudados devido ao potencial destes organismos como fonte de produtos naturais, dentre eles as atividades antimicrobianas, citotóxicas, antioxidantes, entre outras (DEMAY et al., 2019). Além disso, as cianobactérias mostram potencial como fertilizantes do solo (SINGH et al., 2016), componentes de biocombustíveis e polímeros de relevância industrial (BALAKRISHNA PILLAI; KUMARAPILLAI, 2017; DU; LI; ZHOU, 2019b; KUDO; HAYASHI; ARAI, 2019), e na produção de quelantes de metais com atrativo interesse para a medicina e biorremediação (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2018; ARSTOL; HOHMANN-MARRIOTT, 2019).

Uma abordagem de bioinformática para a descoberta dessas moléculas é a mineração genômica (MACHADO; TUTTLE; JENSEN, 2017), a qual torna possível vincular produtos naturais conhecidos a agrupamentos de genes biossintéticos (BGC), ou direcioná-los para codificar novas substâncias, ou derivados dentro de classes estruturais de interesse (DITTMANN et al., 2015; MACHADO; TUTTLE; JENSEN, 2017).

Estudos têm relatado que as cianobactérias da ordem Oscillatoriales produzem o maior número de famílias de metabólitos, seguidas das linhagens pertencentes a ordem Nostocales (DEMAY et al., 2019). No entanto, existem vários membros de Oscillatoriales pouco explorados, com gêneros novos sem genomas representativos (*Oxynema*, *Laspinema*, *Koinonema*, *Sodalinema*, *Ammasolinea*, *Pycnacronema*, entre outras) ou com escassos sequenciamentos de espécies.

A linhagem CENA135 pertencente ao gênero *Oxynema* têm sido associada a produção de diversos produtos naturais e inclusa em algumas análises filogenéticas baseadas em um gene, porém estudos envolvendo este gênero são escassos. O presente estudo forneceu o primeiro genoma do gênero, vinculando os metabólitos relatados em trabalhos anteriores a agrupamentos gênicos do seu genoma, além de fornecer informação sobre as bactérias associadas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Taxonomia do gênero *Oxynema*

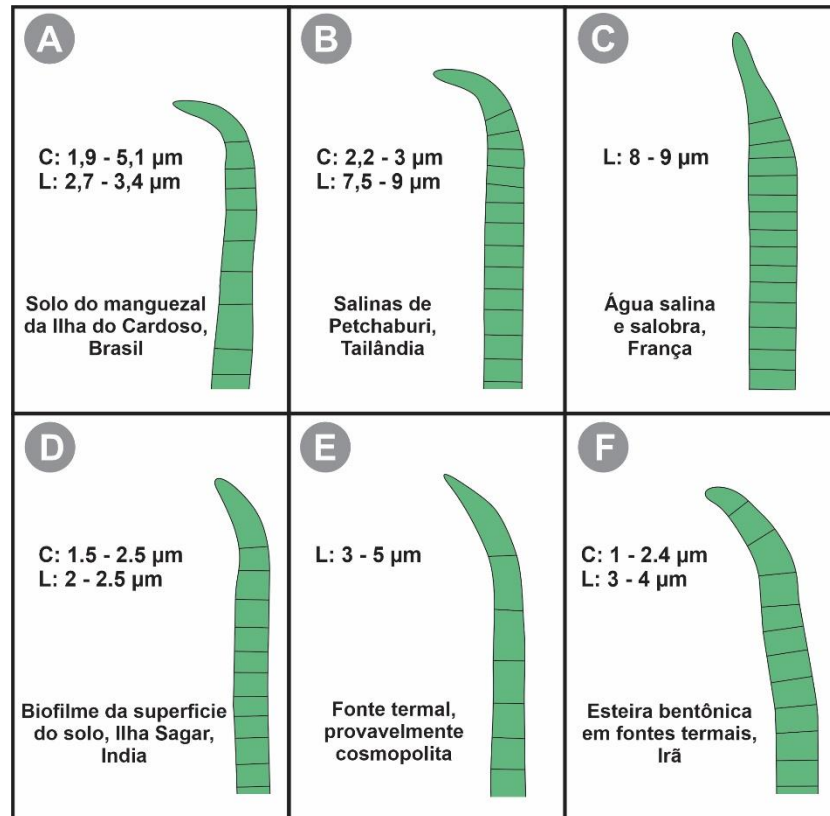
Ao longo dos últimos 40 anos, grandes avanços na área de estudos taxonômicos de cianobactérias foram realizados devido ao aumento do número de linhagens em cultivos e de dados de sequências de DNA disponíveis. A taxonomia atual do filo inclui análises moleculares, critérios clássicos de morfologia, ultraestrutura, bioquímica, ecofisiologia e habitat e o estudo polifásico tem sido adotado com o uso combinado desses critérios taxonômicos (VANDAMME et al., 1996; KOMAREK, 2006; PALINSKA; SUROSZ, 2014; KOMÁREK, 2016, 2018). A determinação da posição filogenética de um gene marcador ou genoma tem sido comumente adotado como o primeiro passo para o processo de classificação (STRUNECKY; ELSTER; KOMAREK, 2011). Vários representantes, de grupos complexos e taxonomicamente problemáticos em cianobactérias, como o grupo LPP (*Lyngbya*, *Plectonema* e *Phormidium*) (*sensu* Rippka et al. 1979), foram bastante discutidos e revisados com este método, gerando-se táxons novos e recategorizações nas revisões taxonômicas mais atualizadas.

Uma das mais robustas revisões da ordem Oscillatoriales foi elaborada por Komárek & Anagnostidis (2005) utilizando critérios filogenéticos e tradicionais na classificação. Nesse estudo, as cianobactérias do tradicional e polifilético gênero *Phormidium* Kützing ex Gomont (1892) foram divididas de I a VIII grupos taxonômicos apenas baseados na morfologia da célula apical dos tricomas e em alguns casos de acordo ao hábitat. Este gênero *Phormidium* Kützing ex Gomont (1892) foi usado no passado para abranger morfotipos amplamente distribuídos (CASTENHOLZ et al., 2001; MARQUARDT; PALINSKA, 2007). Por exemplo, o grupo I estava formado por morfotipos com células apicais apontadas e de afinamento aguçado, no qual o nicho ecológico também desempenhou um caráter distintivo, pois as espécies desse grupo foram registradas de habitats halofílicos, com menor frequência em fontes termais e solo com maior teor de sal. A heterogeneidade do gênero foi comprovada em vários relatos (STRUNECKY; ELSTER; KOMAREK, 2011; CASAMATTA et al., 2012; HASLER et al., 2014; MALONE et al., 2015; MARTINS; BRANCO, 2016; BUCH; MARTINS; BRANCO, 2017; MARTINS; MACHADO-DE-LIMA; BRANCO, 2019), reforçando questões sobre a fragilidade dos dados morfológicos na delimitação da taxa (MARTINS; BRANCO, 2016). Vários gêneros já tem sido derivados do gênero *Phormidium*, entre eles, o novo gênero *Oxynema* foi separado do grupo I (CHATCHAWAN et al., 2012) de acordo à filogenia do gene de 16S RNAr, com a primeira linhagem descrita *Oxynema thaianum* CCALA960, isolada de



um ambiente hipersalino na província de Petchaburi, Tailândia, (CHATCHAWAN et al. 2012). As espécies *Phormidium lloydianum* (syn. *Oscillatoria lloydiana*) e *Phormidium acuminatum* (syn. *Oscillatoria acuminata*), sendo esta última uma cianobactéria termal, foram relatadas como *Oxynema lloydianum* e *Oxynema acuminatum*, devido à proximidade morfológica das exsiccatas (Coleção das cryptogames no Herbarium MNHN Paris - PC) com a holótipo *O. thaianum* CCALA960 (Chatchawan et al., 2012). Não obstante, a cianobactéria *Oscillatoria acuminata* PCC 6304 (RIPPKA AND HERDMANN, 1992) foi separada em um clado externo do novo gênero *Oxynema*, mantendo sua nomenclatura no GenBank do Centro Nacional para a Informação Biotecnológica (NCBI).

O gênero *Oxynema* está situada na família Microcoleaceae, ordem Oscillatoriales e filo Cyanobacteria (KOMÁREK, KAŠTOVSKÝ, MAREŠ, & JOHANSEN, 2014). As espécies registradas na AlgaeBase (GUIRY & GUIRY, 2019) e CyanoDB (HAUER & KOMÁREK, 2019) para o gênero são *O. thaianum*, *O. acuminatum*, *O. lloydianum* e *O. aestuarii*; esta última foi introduzida apenas como sugestão de nova espécie. Em geral, as citações do gênero estão ligadas a estudos taxonômicos (BHUVANESHWARI, DEVIRAM, UMA, & PRABAHARAN, 2016; CHAKRABORTY et al., 2018; CHATCHAWAN et al., 2012) ou descritos em levantamentos ecológicos (HOKMOLLAHI, RIAHI, SOLTANI, SHARIATMADARI, & MEYBODI, 2017; RAMOS et al., 2017; RAMOS et al., 2018), dos quais ainda são pouco frequentes. Uma linhagem relacionada devido a sua proximidade filogenética é a CENA135 (CHATCHAWAN et al., 2012), encontrada no solo próximo à floresta do manguezal da Ilha do Cardoso, São Paulo-Brasil (RIGONATO, 2010). Inicialmente, a CENA135 foi identificada como *Phormidium* baseada nas características autapomórficas do grupo I do gênero (GENUÁRIO, 2010). O estudo de Silva-Stenico et al. (2012) mostrou que apesar de estarem vagamente relacionados, a linhagem do manguezal brasileiro agrupou em um ramo interno com *Phormidium pseudopristleyi* ANT.ACEV5.3 da Antártica embora o valor de reamostragem ter sido de apenas 58%. Dessa maneira, a sequência do gene 16S RNAr da linhagem foi depositada no Genbank (NCBI) nomeada como *Phormidium* sp. CENA135 (nº de acesso HQ730084). Posteriormente, a análise filogenética de Chatchawan et al. (2012) mostrou um clado bem suportado, formado pela linhagem *O. thaianum* CCALA 960 do novo gênero *Oxynema* e a referida linhagem CENA135, cujas sequências do gene de 16S RNAr apresentaram 98,8% de identidade entre si (SILVA et al., 2014). Com o que a linhagem foi renomeada a *Oxynema* sp. CENA135, sem identificação ao nível de espécie até o momento. Esquemas representativos das atuais espécies do gênero *Oxynema* e a linhagem CENA135 observam-se na Figura 1.



**Figura 1.** Filamentos dos morfotipos descritos no gênero *Oxynema*. **A.** *Oxynema* sp. CENA135 (*Phormidium* sp. CENA135). **B.** *Oxynema thaianum* CCALA960, linhagem tipo do gênero. **C.** *Oxynema lloydianum* Chatchawan, Komárek, Strunecky, Smarda & Peerapornpisal 2012 (*Oscillatoria lloydiana* Gomont 1899). **D.** *Oxynema aestuarii* Chakraborty & Mukherjee 2018. **E.** *Oxynema acuminatum* Chatchawan, Komárek, Strunecky, Smarda & Peerapornpisal 2012 (*Oscillatoria acuminata* Gomont 1899) sensu Anagnostidis 1961. **F.** *Laspinema thermalis* Heidari & Hauer 2018, espécie mais próxima do gênero *Oxynema*.

## 2.2. Cianobactérias do manguezal

Os manguezais são ecossistemas costeiros de transição entre terra, mar e rios; encontrados em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; GHIZELINI; MENDONÇA-HAGLER; MACRAE, 2012). No Brasil, os manguezais ocuparam áreas de aproximadamente 9900 km<sup>2</sup> em 2018, do qual 85% da cobertura está distribuído nos estados do Maranhão, Pará, Amapá e Bahia (DINIZ et al., 2019). No entanto, dos primeiros levantamentos de diversidade que abrangeram identificações de cianobactérias em manguezais brasileiros foram realizados no litoral do estado de São Paulo (BRANCO et al., 1991, 1996, 1997; GENUÁRIO, 2010). Entre eles, os principais manguezais estudados são o manguezal da Ilha de Cardoso, um ambiente conservado e protegido do desenvolvimento e impactos antropogênicos, e o manguezal de Bertioga, referida como uma

área que foi submetida a um derramamento de óleo em outubro de 1983 (RIGONATO et al., 2013). Usando a abordagem polifásica na determinação taxonômica de cianobactérias coletadas do solo, água e amostras periféricas em ambos ecossistemas, Silva et al. (2014) atingiram a identificação de 50 linhagens cultiváveis dos gêneros *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Cyanobacterium*, *Clorogloea*, *Leptolyngbya*, *Phormidium*, *Nostoc* e *Microchaete*, incluindo linhagens do gênero *Nodosilinea* e *Oxynema* sp. CENA135, derivados por filogenia. Em filosfera de plantas, as ordens predominantes foram Nostocales e Oscillatoriales (RIGONATO et al., 2012), das quais *Phyllonema*, *Foliisarcina* e *Kryptousia* foram derivadas como gêneros novos (ALVARENGA et al., 2016, 2017).

Os manguezais representam um ecossistema complexo e dinâmico de condições severas como alta salinidade temperatura, sedimentação, marés extremas e solos anaeróbios turvos (THOMPSON et al., 2013; GENUÁRIO et al., 2019). Os gradientes de salinidade, estabelecidos por inundações e variações das marés, influenciaram fortemente a composição da comunidade de cianobactérias nos sedimentos de ambos manguezais (RIGONATO et al., 2013). As variações na disponibilidade de oxigênio nos sedimentos dos manguezais, promovidas pelo regime das marés, também ocasionam que as transformações dos compostos e a ciclagem de nutrientes sejam adaptadas às mudanças do oxigênio (ANDREOTE et al., 2012), o qual é frequentemente reduzido pelas imensas quantidades de matéria orgânica provenientes do mangue. Em consequência, outros nutrientes, em especial nitrogênio (N) e fósforo (P), nem sempre disponíveis para todos os organismos, são encontrados em baixa concentração (DUARTE et al., 2012). Possíveis relações mutualistas entre microrganismos e plantas do manguezal foram sugeridas ante a colonização das raízes de mangue pela bactéria fixadora de N<sub>2</sub>, *Marinobacterium mangrovicola*, em um processo estimulado pela falta de uma fonte externa de carbono (ALFARO-ESPINOZA; ULLRICH, 2015). Rigonato et al. (2018) observaram uma correlação positiva da estrutura da comunidade entre bactérias e cianobactérias diazotróficas, sugerindo a importância funcional desse filo como fixadores de nitrogênio em solos de manguezais. Outro mecanismo utilizado por cianobactérias e algumas bactérias heterotróficas é a acumulação de polímeros ricos em nitrogênio como cianoficina (WATZER; FORCHHAMMER, 2018; ZHANG; YANG, 2019).

As cianobactérias também resultaram ser relevantes para recuperação de manguezais degradados, como bioestimulantes ou na biorremediação (ALVARENGA et al., 2015), na descolorização de corantes têxteis (SILVA-STENICO et al., 2012; DELLAMATRICE et al., 2017) e como promotoras do crescimento de plantas (SINGH, 2014b).

### 2.3. Metabólitos secundários em cianobactérias do manguezal

As cianobactérias são uma fonte prolífica de metabólitos secundários, também denominados produtos naturais, com estruturas químicas complexas e atividades biológicas variadas (DITTMANN et al., 2015). Estas moléculas tem, geralmente, baixo peso molecular e não são consideradas essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução normal de um organismo, porém, capacitam ao organismo produtor a sobreviver à competição entre espécies, fornecem mecanismos defensivos contra o estresse e facilitam os processos reprodutivos (MANDAL; RATH, 2015).

Vários produtos naturais de distintas classes já foram relatados em isolados cianobacterianos de manguezais. Compostos voláteis como ácidos, álcoois, aldeídos graxos, ésteres, cetonas e hidrocarbonetos alifáticos foram detectados em extratos das cianobactérias do manguezal brasileiro *Cyanobium* sp. CENA178, *Cyanobium* sp. CENA181, *Nostoc* sp. CENA175 e *Oxynema* sp. CENA135 (ARMSTRONG et al., 2019). Adicionalmente, diversos testes comprovaram a atividade antifúngica e antimicrobiana de cianobactérias do manguezal. Inclusive análises contra patógenos humanos e de plantas foram realizadas obtendo resultados positivos (SAKTHIVEL; KATHIRESAN, 2012; SILVA et al., 2014; DUPERRON et al., 2019). Outro assunto que mobiliza particularmente a atenção é o potencial anticancerígeno de algumas linhagens destes ambientes. Recentemente, espécies de *Oxynema*, *Nodosilinea*, *Chlorogloea*, *Cyanobium*, e *Halotia* (SHISHIDO et al., 2019) revelaram atividade contra leucemia mielóide aguda (LMA) induzindo apoptose ou morte celular, entre elas, a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 e *Cyanobium* sp. CENA154 tinham manifestado anteriormente atividade antitumoral contra carcinoma do cólon (CT-26) (SILVA-STENICO et al., 2013).

Em contraste, as cianobactérias também podem ter um impacto nocivo para a saúde humana e animal, podendo liberar uma variedade de metabólitos tóxicos, denominados cianotoxinas (SCIUTO; MORO, 2015). Cianobactérias isoladas de esteiras e pneumatóforos de mangues no Mar Vermelho da Arábia Saudita, foram detectadas causando toxicidade em *Artemia salina* (MOHAMED; AL-SHEHRI, 2015). Este estudo também detectou, nas leituras de espectrometria de massas, cianotoxinas tipo microcistina nos extratos cianobacterianos de *Aphanothece elabens*, *Leptolyngbya tenuis*, *Oscillatoria tenuis* e *Calothrix breviarticulata*; além de saxitoxina nos extratos de *Lyngbya majuscula*, *Leptolyngbya tenuis* e *Oscillatoria accuminata*.

Grande parte da diversidade química dos produtos naturais observada na natureza é atribuída às vias biossintéticas versáteis de peptídeo sintase não-ribossômica (NRPS) e policetídeo sintase (PKS) (WELKER; DÖHREN, VON, 2006; HERDMAN et al., 2013; WANG et al., 2014). Aproximadamente o 70% de genomas de cianobactérias codificam por agrupamentos de genes NRPS ou PKS (HERDMAN et al., 2013; CALTEAU et al., 2014). De outro lado, os peptídeos ribossômicos sintetizados e pós-traduzidos (RiPPs), também são denominados de produtos naturais do peptídeo ribossômico (PNPRs). Esta classe de produtos naturais expandiram-se rapidamente nos últimos anos, destacando por sua potente atividade antibiótica, assim como co-fatores, moléculas de sinalização, compostos anticancerígenos, anti-HIV e toxinas (HUDSON; MITCHELL, 2018). Em cianobactérias, os metabólitos mais representativos das vias RiPPs são as microviridinas e as cianobactinas. No entanto, a maioria dos produtos finais de vias RiPPs são atualmente desconhecidos (CALTEAU et al., 2014; DITTMANN et al., 2015) e a identificação de novas famílias, com poucos membros para construir um modelo estatisticamente representativo e a anotação dos peptídeos precursores frequentemente curtos a partir de dados genômicos, é um desafio constante na era genômica (HETRICK; DONK, VAN DER, 2017).

Metabólitos sintetizados por outras vias também são distribuídos nos genomas de cianobactérias, sendo que uma ampla gama de alcaloides, terpenos e hidrocarbonetos derivados de ácidos graxos também são descritos em literatura. Um exemplo clássico é o alcaloide saxitoxina, denominados como venenos paralisantes tipo neurotoxina (HACKETT et al., 2013; DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013; LOPES et al., 2015).

### **2.3.1. Biossíntese de Peptídeos Não Ribossomais**

Os peptídeos não ribossômicos e policetídeos são sintetizados em grandes complexos enzimáticos não ribossomais peptídeos sintetase (NRPS) e policetídeo sintase (PKS), respectivamente (MARTÍNEZ-NÚÑEZ; LÓPEZ, 2016). Os complexos enzimáticos NRPS e PKS são similares em sua lógica bioquímica. Uma linha de montagem NRPS ou PKS consiste em vários módulos, com cada módulo responsável pela seleção e adição de um único substrato ao alongamento da cadeia de moléculas. A ordem dos módulos geralmente dita a sequência de cadeia peptídica ou policetídica, e é referida como a regra de co-linearidade. Dentro de cada módulo existem séries de domínios, cada um responsável por uma reação enzimática específica (MICALLEF et al., 2015).

Os NRPSs são geralmente definidos como enzimas modulares múltiplas (WANG, FEWER, HOLM, ROUHIAINEN, & SIVONEN, 2014). O módulo básico de NRPS é constituído por um domínio de adenilação (A) responsável pela seleção do substrato, uma proteína transportadora peptídica (PCP) que amarra o substrato ao complexo enzimático e um domínio de condensação (C) para catalisar a formação da ligação peptídica e alongamento da cadeia (MICALLEF et al., 2015). No entanto, enzimas NRPS não modulares são encontradas em vias biossintéticas de sideróforos (WANG et al., 2014).

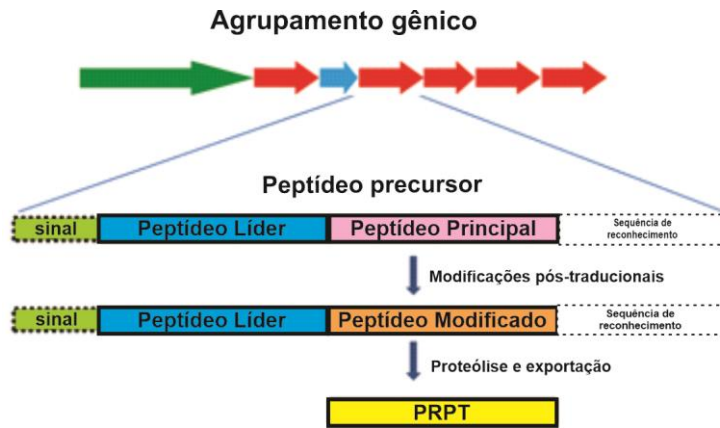
Análogo ao NRPS, um módulo PKS mínimo consiste em um domínio de aciltransferase (AT), proteína transportadora de acila (ACP) e domínio de cetossintase (KS), respectivamente. As PKSs podem diferir na organização de domínios catalíticos, com o que estão atualmente divididos em três tipos. PKSs Tipo I são enzimas multilaminadas grandes usando uma estratégia modular, com cada módulo sendo composto de domínios catalíticos responsáveis pelo reconhecimento, ativação e condensação de acil-CoA. Os sítios catalíticos de PKS tipo II e tipo III estão organizados em proteínas separadas (Wang et al., 2014). Embora os genes PKS tipo I sejam comuns entre as cianobactérias, os genes de PKS tipo II e III foram raramente identificados (MICALLEF et al., 2015).

Existem metabólitos híbridos obtidos da combinação modular de NRPS e PKS, por exemplo a microcistina-LR é biossintetizada usando multi-enzimas dos módulos NRPS e PKS e tem potencial como substância principal para o tratamento do câncer devido à sua citotoxicidade (KULTSCHAR; LEWELLYN, 2018). Nesse sentido um determinado número de agrupamentos de genes biossintéticos híbridos de NRPS/PKS também foram identificados em sequenciamento de genomas completos (MICALLEF et al., 2015).

### **2.3.2. Biossíntese de Peptídeos Ribossômicos Modificados Pós-traducionalmente**

Ao contrário dos peptídeos não ribossômicos, que exigem grandes complexos enzimáticos multimodulares para incorporar aminoácidos não proteogênicos no componente peptídico, os RiPPs são capazes de acessar um grau semelhante de diversidade química através de extensas modificações pós-traducionais de um peptídeo precursor sintetizado no ribossomo (MCINTOSH; DONIA; SCHMIDT, 2009; STRIEKER; TANOVIĆ; MARAHIEL, 2010; ORTEGA; DONK, VAN DER, 2016). O peptídeo possui uma sequência líder de peptídeo anexada ao terminal-N do peptídeo principal, que participa no reconhecimento de muitas das enzimas de modificação pós-traducionais, assim também, de um segmento denominado de peptídeo principal ou região central que será transformado no produto natural (ARNISON et

al., 2013) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). No processo de modificação do peptídeo principal, as regiões adjacentes incluindo a líder são removidas para revelar o produto final (ORTEGA; DONK, VAN DER, 2016).



**Figura 2.** Biossíntese de peptídeos ribossômicos sintetizados e pós-traduzidos, a partir do peptídeo precursor (modificado de Arnison et al., 2013).

As modificações pós-traducionais envolvem especialmente resíduos de cistinas (Cys), na qual a química do enxofre converte os tiois de cisteínas em dissulfetos (ciclotídeos, conopeptídeos, lanthipeptídeos, cianobactinas, lassopeptídeos, sactipeptídeos e glicocinas), tioéteres (lanthipeptídeos, sactipeptídeos, faloidinas, alguns tiopeptídeos), tiazol (peptídeos, cianobactídeos, licopeptídeos e glicocinas) e sulfóxidos (lanthipeptídeos, amatoxinas) (ARNISON et al., 2013).

Bacteriocinas é um termo utilizado para abranger todos os peptídeos antimicrobianos secretados sintetizados no ribossomo. Neste caso, os genes para a modificação e exportação estão localizados próximos ao gene precursor da bacteriocina, seguidos de transportadores como transportadores ABC e exportadores dependentes de sec que são utilizados para a secreção (KUMARIYA et al., 2019).

Usualmente, os metabólitos secundários tipo bacteriocinas são sequências de comprimento curto (20 a 60 aminoácidos), catiônicos e hidrofóbicos, capazes de inibir tanto a deterioração dos alimentos quanto as bactérias patogênicas do grupo Gram-negativo e Gram-positivo, fornecendo assim uma nova estratégia de defesa (NES; HOLO, 2000; WALSH et al., 2015; KUMARIYA et al., 2019). Devi e Halami (2013) atribuíram a transferência natural dos genes envolvidos para a produção de bacteriocinas entre microrganismos, por encontrar-se operons gênicos associados a plasmídeos ou outros elementos genéticos móveis.

De acordo com a classificação comumente empregada, as bacteriocinas são agrupadas em três classes. As bacteriocinas de classe I tipicamente compreendem de 19 a 50 aminoácidos e são extensivamente modificadas após a tradução, por exemplo, temos a lantionina,  $\beta$ -metilantionina, desidrobutirina, desidroalanina, labirintina, sendo a nisina a mais popular do grupo (PARADA et al., 2007; LAY et al., 2016; KUMARIYA et al., 2019). Assim mesmo, esta é subdividida nas classes Ia (lantibióticos), Ib (labirintopeptinas), Ic (sactibióticos) (Cuozzo et al. 2001; Kumariya et al., 2019), Id (peptídeos lineares contendo azol, LAPs), Ie (glicocinas) e If (laço-peptídeos) (EGAN et al., 2018). A classe II contém pequenos peptídeos estáveis ao calor, não modificados, e pode ser subdividida em IIa (bacteriocinas do tipo pediocina), IIb (bacteriocinas não modificadas com dois peptídeos), IIc (bacteriocinas circulares) e IId (bactérias-iocinas não modificadas, lineares, do tipo não-pediocina) (Belgismia et al., 2011; Drider, Fimland, Hechard, McMullen, & Prevost, 2006; Kumariya et al., 2019; Opegård et al., 2007). A classe III é conformada pelas bacteriocinas grandes e lábeis ao calor, como a colina produzida por *E. coli*, helveticina M e J, produzida por linhagens de *Lactobacillus*, além de e enterolisina de *Enterococcus faecalis* (NILSEN; NES; HOLO, 2003; SUN et al., 2018; KUMARIYA et al., 2019).

#### 2.4. Sideróforos

Em um ambiente dinâmico como o manguezal, os microrganismos são expostos continuamente a mudanças em fontes de carbono, pH (influenciado pelo fluxo das marés) e troca de metais (especialmente ferro) (BOTO; WELLINGTON, 1988; ROBERTSON; PHILLIPS, 1995). No sedimento, uma combinação de altas concentrações de carbono orgânico e de nutrientes com altas taxas de rotatividade microbiana e baixa porosidade, impedem as trocas gasosas. Isto aumenta a demanda biológica de oxigênio (DBO) nas camadas de sedimentos subterrâneos e, consequentemente, aumenta a demanda de ferro inorgânico (AMIN, 2010; SINHA; PARLI, 2020). A demanda de ferro é muito maior nas cianobactérias fotossintéticas do que nas bactérias não fotossintéticas, devido ao seu uso na cadeia de transporte de elétrons durante a fotossíntese. As cianobactérias requerem 10 vezes mais ferro do que bactérias de tamanho celular semelhante para manter a atividade fotossintética (RAVEN; EVANS; KORB, 1999; SHCOLNICK et al., 2009; JIANG et al., 2015). Estas condições de baixas concentrações de ferro, além de alterações no pH, influenciaram o crescimento e a produção de sideróforos em alguns isolados bacterianos de sedimentos (SINHA; PARLI, 2020).



Os sideróforos são ligantes de baixo peso molecular (20–2000 Da) amplamente distribuídos em bactérias, fungos e plantas gramíneas para solubilizar e internalizar ferro, devido a sua afinidade pelo ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (KRAEMER; CROWLEY; KRETZSCHMAR, 2006; HIDER; KONG, 2010; AHMED; HOLMSTRÖM, 2014; GAONKAR, 2015). Em relação aos sideróforos bacterianos, são divididos em quatro tipos baseados nos ligantes primários, doadores de oxigênio que ligam o ferro (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2018). Estes são os hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos (MATZANKE, 1991), e os tipos mistos dos principais grupos funcionais, por exemplo a pioverdina (CORNELIS, 2010).

#### **2.4.1. Biossíntese de sideróforos**

Em geral, os sideróforos são sintetizados dentro da célula e secretados no ambiente como compostos livres de ferro. Uma vez ligados pelo ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), eles são absorvidos para o citosol da célula usando uma variedade de sistemas de absorção (WINKELMANN, 2002; CARROLL; MOORE, 2018). Em cianobactérias, a biossíntese de sideróforos têm sido obtida em três vias distintas. Entre elas, duas vias são dependentes de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS); das quais a via NRPS é conhecida por utilizar os domínios de adenilação, transportador peptídico e condensação para catalizar ligações entre monômeros de aminoácidos que são a base da molécula do sideróforo (MISHRA et al., 2018). As NRPSs são acompanhadas por poliketídios sintase (PKSs) que são conhecidas por catalisar a condensação de grupos carboxilato (STAUNTON; WEISSMAN, 2001). Nesta via híbrida, as duas classes principais diferem no número de unidades de proteína; enquanto os PKS do tipo I são enzimas multifuncionais, os PKS do tipo II são feitos de enzimas separadas com funções únicas (SHEN, 2003). A diferença das anteriores, a via NIS é independente de NRPS, sendo identificada em *Escherichia coli* e *Sinhorhizobium meliloti* sintetizando sideróforos de tipo hidroxamato aerobactin e rhizobactin 1021 (CHALLIS, 2005; MISHRA et al., 2018). De Lorenzo et al. (1986) relataram as proteínas IucA e IucC, como enzimas sintetases da via NIS, durante a biossíntese de aerobactinas. As enzimas sintetases do NIS são responsáveis por uma única reação enzimática e normalmente funcionam para condensar ácido cítrico, ou aderente, com um grupo amina ou álcool. Todas as sintetases NIS caracterizadas possuem um domínio conservado IucA-IucC quelante de ferro no N-terminal e um domínio (FhuF) C-terminal relacionado ao transporte ou metabolismo do ferro (CARROLL; MOORE, 2018). Assim, enquanto as outras duas vias de síntese são importantes para os sideróforos do tipo hidroxamato e catecolato, o NIS só foi demonstrado para os sideróforos laterais do tipo hidroxamato (KRANZLER et al.,

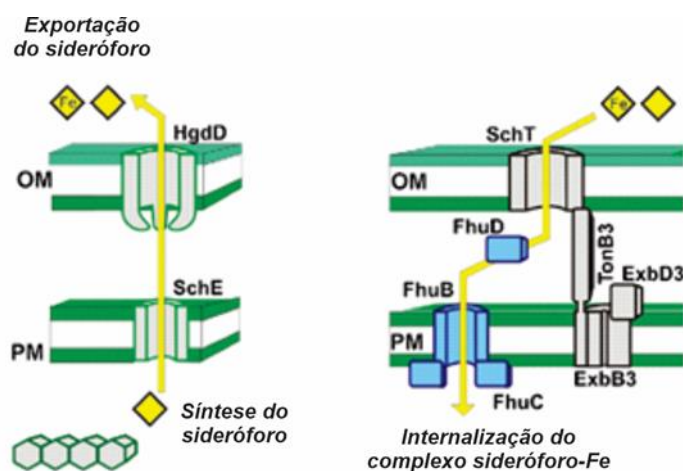
2013; ARSTOL; HOHMANN-MARRIOTT, 2019), podendo ser encontrados no sobrenadante das culturas de cianobactérias em crescimento (WILHELM; TRICK, 1994).

#### 2.4.2. Transporte do ferro

A importação de sideróforos carregados de ferro é semelhante entre muitas bactérias. O transporte do complexo sideróforo-ferro para o espaço periplásmico é possibilitado pelas proteínas receptoras, transportadoras dependentes de TonB (TBDT) localizadas na membrana externa. Os TBDTs consistem em um domínio  $\beta$ -barril e um domínio “plug” no interior do barril, que atua em conjunto com uma caixa TonB no lado periplásmico (NOINAJ et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2018; ARSTOL; HOHMANN-MARRIOTT, 2019). A energia para transporte é derivada da força motriz do próton e é mediada pela associação de TonB com as proteínas da membrana interna ExbB e ExbD, formando um complexo TonB-ExbB-ExbD (ARSTOL; HOHMANN-MARRIOTT, 2019). Hipotetiza-se que as proteínas ExbB e ExbD utilizam o potencial eletroquímico da membrana interna para energizar TonB e proporcionar uma mudança conformacional no receptor de membrana externa do sideróforo (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; BALHESTEROS; CAULOBACTER; CAULOBACTER, 2014). No periplasma, o sideróforo-ferro é transferido através de proteínas transmembrana, transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003; CARROLL; MOORE, 2018; GONZÁLEZ et al., 2018). Um mecanismo semelhante é empregado por bactérias Gram-positivas, mas sem as proteínas receptoras e TonB (CARROLL; MOORE, 2018). Uma vez no citosol, o ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é reduzido a ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por uma enzima ferro-reductase, a qual é liberada do sideróforo devido à pouca afinidade de quelação (WINKELMANN, 2002; CARROLL; MOORE, 2018).

Em *Escherichia coli*, a exportação do sideróforo enterobacterina envolveu diferentes mecanismos (GONZÁLEZ et al., 2018), compreendendo uma proteína canal TolC da membrana externa (BLEUEL et al., 2005) e vários transportadores da membrana interna, incluindo a proteína EntS da superfamília MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (FURRER et al., 2002) e as proteínas de transporte AcrB, AcrD, AcrEF, MdtABC e MdtEF da superfamília de Divisão celular, de Nodulação, de Resistência (RND) (HORIYAMA; NISHINO, 2014). Os sistemas de exportação são pouco conhecidos em cianobactérias. Apenas um único sistema de exportação de sideróforos nas cianobactérias foi caracterizado em *Anabaena* sp. PCC 7120 (NICOLAISEN et al., 2010) (Figura 3). Este organismo foi estudado pela biossíntese do

sideróforo hidroxamato schizokinen, cuja exportação através da membrana interna foi associada à proteína SchE (all4025) de domínio MFS, e da membrana externa à proteína do tipo TolC, denominado hgdD (alr2887) (NICOLAISEN et al., 2010). O gene hgdD também é necessário para a secreção de proteínas e glicolípídios durante o desenvolvimento de heterócitos e exportação de metabólitos secundários/ antibióticos (MALDENER; HANNUS; KAMMERER, 2003; MOSLAVAC et al., 2007; HAHN et al., 2012; GONZÁLEZ et al., 2018).

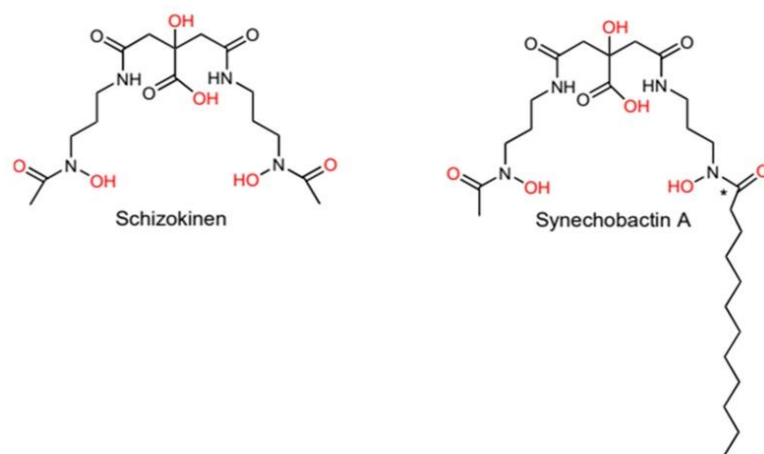


**Figura 3.** Esquema do fluxo do sideróforo schizokinen e o mecanismo de internalização do ferro na cianobactéria heterocitada *Nostoc* sp. PCC 7120. O gene SchT codifica a proteína receptora do sideróforo e o sistema FhuBCD codifica os transportadores ABC. Modificado de Kransler et al. (2013).

### 2.4.3. Sideróforos hidroxamatos

Os sideróforos do tipo hidroxamato são derivados do ácido cítrico e do quelato de ferro por meio de dois grupos  $\alpha$ -hidroxamato e um grupo  $\alpha$ -hidroxi-carboxilato (KRANZLER et al., 2013). Duas estruturas de sideróforo hidroxamato foram determinadas em cianobactérias, schizokinen (NICOLAISEN et al., 2008) e sinechobactina (ITO; BUTLER, 2005) (Figura 4), estruturalmente semelhantes a outros sideróforos do tipo di-hidroxamato, como a rizobactina 1021 e a aerobactina (ARSTOL; HOHMANN-MARRIOTT, 2019). Schizokinen foi relatado em algumas linhagens de água doce *Nostoc* sp. PCC 6411 e 7120 (CARROLL; MOORE, 2018), porém foi inicialmente caracterizado na bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium* (MULLIS; POLLACK; NEILANDS, 1971). A synechobactina foi elucidada bioquimicamente a partir do meio de cultura da cianobactéria marinha *Synechococcus* sp. PCC 7002 e

classificadas com base em diferenças da cadeia de ácidos graxos ligado ao segundo grupo  $\alpha$ -hidroxamato (ITO; BUTLER, 2005). Atualmente, o agrupamento gênico de sinechobactina não foi definido, existindo apenas uma sugestão de Arstol (2017).



**Figura 4.** Estruturas dos sideróforos schizokinen e sinechobactina do tipo NIS hidroxamato.



### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é caracterizar taxonomicamente a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 e identificar possíveis agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de metabólitos secundários e sideróforos no genoma dessa linhagem isolada de uma amostra de solo de manguezal da Ilha do Cardoso, além de analisar sua estreita relação com as bactérias associadas em cultura.

#### **Objetivos específicos:**

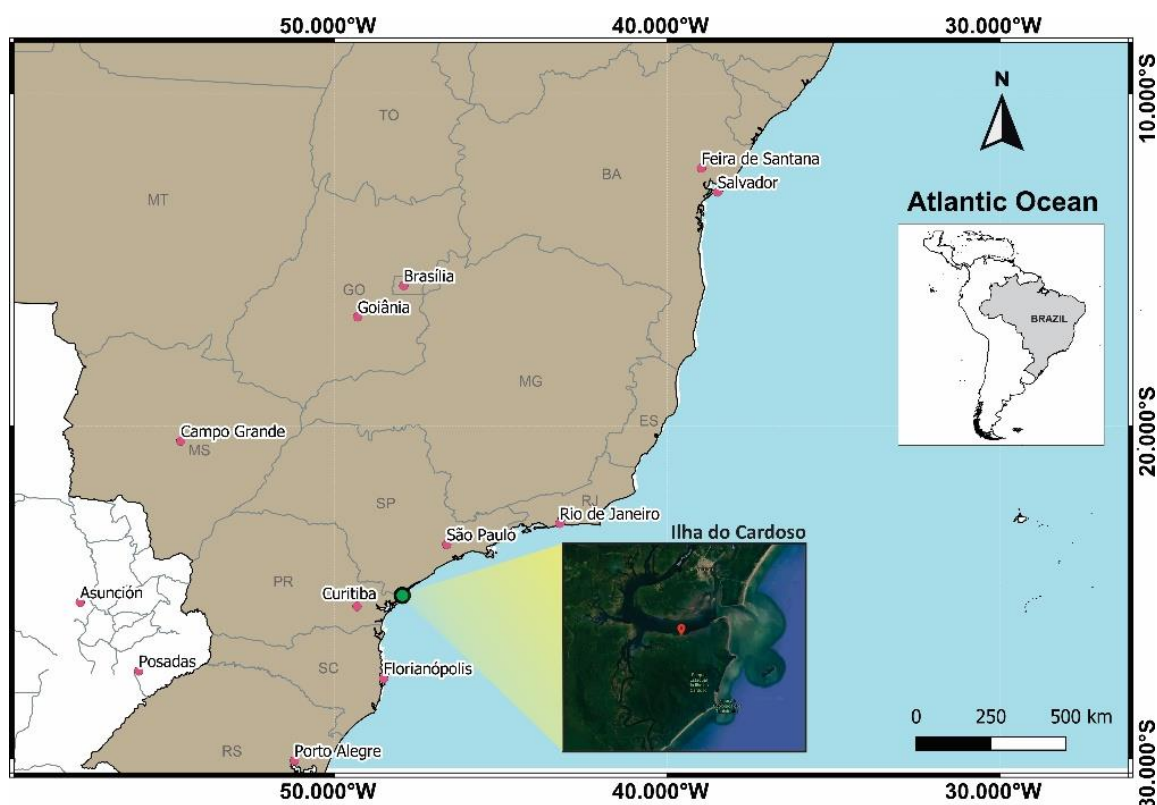
- I. Caracterizar a morfologia da cianobactéria *Oxynema* sp. CENA135;
- II. Sequenciar, montar e analisar o genoma da linhagem;
- III. Avaliar a posição evolutiva da linhagem no filo Cyanobacteria, através de análises de filogenia do gene 16S RNAr, filogenômica e o espaço intergênico 16S-23S.
- IV. Avaliar agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de metabólitos secundários e sideróforos;
- V. Identificar as bactérias associadas à *Oxynema* sp. CENA135;
- VI. Comparar possíveis funções entre a linhagem cianobacteriana e as bactérias associadas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Origem e condições de cultivo da linhagem *Oxynema* sp. CENA135

A linhagem *Oxynema* sp. CENA135 foi isolada de uma amostra de solo de manguezal coletada em 20 de abril de 2006 na Ilha do Cardoso, cidade de Cananéia, SP (25°05'02"S, 47°57'42"W). A linhagem desde então foi mantida na Coleção de Culturas de Cianobactérias do CENA/USP em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido ASN III (Apêndice A), à temperatura de 21 °C ± 1 °C, sob luz fluorescente (40-50 μmol fótons•μm<sup>-2</sup>•s<sup>-1</sup>), umidade 40±5 % com ciclo claro/escuro de 14/10h.



**Figura 5.** Localização geográfica da origem da linhagem *Oxynema* sp. CENA135, no manguezal da Ilha do Cardoso, estado de São Paulo, Brasil.

### 4.2. Purificação da cultura

O processo de purificação consistiu em reduzir a abundância da comunidade de bactérias associada à linhagem em estudo. Desse modo, lavagens foram realizadas conforme o descrito por Heck et al. (2016), sendo que o processo de centrifugação foi substituída pela filtração a vácuo. Para tal, uma alíquota de 2 mL da cultura foi homogeneizada e transferida



para uma membrana de filtro de nitrocelulose (8 µm). Em seguida, as células foram lavadas adicionando-se: 20 mL de água ultrapura, 5 mL de Extran® (Merck, Darmstadt, Germany) 0,1%, 20 mL de solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 5 mM pH 8) e 5 mL de NaCl 0,9%. Posteriormente, as células foram transferidas com o auxílio de uma espátula para tubos Eppendorf contendo 1 ml de meio ASN III. Um inóculo foi selecionado e estriado em meio sólido ASN III, e o restante foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido ASN III. A cultura em meio sólido foi utilizada para visualizar bactérias cultiváveis associadas à cianobactéria e a cultura do meio líquido para a próxima lavagem. Lavagens sucessivas foram realizadas, com intervalo de 15 dias até que não se observasse mais crescimento das bactérias cultiváveis.

### **4.3. Caracterização morfológica**

#### **4.3.1. Microscopia de luz**

Espécimes provenientes das culturas em meio líquido ASN III foram microscopicamente examinadas pelo Prof. Luis H. Z. Branco do Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas (BETA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - campus de São José do Rio Preto. As massas macroscópicas formadas foram observadas em microscópio estereoscópico (Zeiss 47 50 52) para registro das características gerais. Os filamentos foram estudados individualmente em microscópio fotônico Olympus BX53 com contraste de interferência diferencial (DIC) e fotografados com câmera digital DP 71 e sistema de análise de imagem cellSens. Os caracteres diacríticos utilizados na avaliação morfológica e estudo taxonômico foram: estrutura do filamento, forma das células apicais, presença/ausência e forma da bainha mucilaginosa, forma e dimensões celulares, constrição da parede celular, presença/ausência e disposição de grânulos, presença ou ausência e disposição de aerótopos. O sistema de classificação utilizado foi o de Hoffmann et al. (2005) modificado por Komarek (2006) e a identificação específica foi baseada na literatura relacionada à taxonomia do gênero. Adicionalmente, as características morfológicas da linhagem de estudo foram comparadas com a informação morfológica das linhagens descritas para o gênero (SILVA, 2010; CHATCHAWAN et al., 2012; BHUVANESHWARI et al., 2016; CHAKRABORTY et al., 2018).

#### **4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura**

As amostras de cultura das cianobactérias foram separadas em frascos eppendorfs de 1.5 ml e transferidas a pequenas lamínulas circulares, as quais foram previamente aderidas com poli-L-Lisina por 20 minutos. O excesso do líquido foi retirado de cada lamínula após 30 minutos, e adicionado o fixador Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, Formaldeído 2,5%, tampão cacodilato 0,05 M, CaCl 20,001 M), por 4 horas a 5°C. Em seguida, o material biológico fixado foi desidratado com álcool etílico em concentrações crescentes, 30% por 10 minutos; 50% por 10 minutos; 70% por 10 minutos; 90% por 10 minutos e três vezes em etanol 100% por 10 minutos. As amostras desidratadas foram secas ao ponto crítico no aparelho automático Leica EM CPD 300. Após a secagem foi realizada a montagem das lamínulas nos stubs, onde foram primeiramente envolvidos em papel alumínio, coladas com fita de carbono e identificadas. A metalização foi feita no Sputter SCD 050 e posteriormente foi armazenado em sílica gel até sua utilização. A amostra foi visualizada e fotografada em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

#### **4.4. Produção de biomassa e lavagem de células para extração de DNA**

Para a produção de biomassa para extração de DNA genômico, 1 mL da cultura purificada foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido ASN III. As condições de cultivo foram as mesmas aplicadas na coleção de culturas, durante 60 dias.

A lavagem das células foi realizada anteriormente à extração de DNA genômico, a fim de retirar as bactérias remanescentes. Dessa maneira, as células contidas no frasco de cultivo (50 mL) foram concentradas por centrifugação (9000 rpm, 10 min, 22 °C), em seguida o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, 50 mL de água ultrapura foram adicionados ao pélete, o qual foi homogeneizado e centrifugado (9000 rpm, 10 min, 22 °C) e o sobrenadante foi descartado repetindo o processo mais duas vezes. As células foram ressuspensas em 50 mL de Extran 0,1%), homogeneizadas, centrifugadas (5000 rpm, 10 min, 22 °C) e o sobrenadante foi descartado. O pélete foi ressuspensado em 50 ml de solução de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 5 mM pH 8 e 60% Etanol), homogeneizado e centrifugado (7000 rpm, 10 min, 22 °C); em seguida o sobrenadante foi descartado, repetindo essa ressuspensão por mais duas vezes. Por último, 50 mL de NaCl 0,9% foi adicionado ao pélete e a mistura foi homogeneizada, centrifugada (9000 rpm, 10 min, 22°C). O pélete obtido foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (8 µm) acoplada no filtro a vácuo. Consecutivamente foi aplicado 5 ml de Extran 0,1% e 20 ml de NaCl 0,9%. Após este processo,

as células foram recuperadas da superfície da membrana de filtro e mantidas em tubo com 10 mL de NaCl 0,9% a 21°C, até o momento da extração de DNA total.

#### **4.5. Extração de DNA total, preparo da biblioteca genômica e sequenciamento**

O DNA genômico foi extraído com o kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% (m/v) e a quantificação foi realizada com o fluorômetro (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Technologies™, EUA). Aproximadamente 4 µg de DNA foi utilizado para o preparo de bibliotecas genômicas “mate pair” de 8 kb no Centro de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e à Agroenergia, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP, utilizando o kit Nextera Mate Pair Library Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). O sequenciamento foi realizado na plataforma HiSeq 2500 (Illumina) com leituras de até 2x100 pb, segundo instruções do fabricante.

#### **4.6. Montagem do genoma e análise de qualidade das sequências**

A qualidade das leituras obtidas no sequenciamento genômico na plataforma HiSeq foi verificada e gráficos de análise foram gerados com o programa FastQC 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Por conseguinte, os adaptadores foram removidos com o programa NxTrim 0.4.3 (O'CONNELL et al., 2015). Nesta etapa, também foi utilizado o Cutadapt 1.18 (MARTIN, 2011) para remover sequências com phred quality score <33, sequências com tamanho menor de 30 pb e sequências repetitivas.

As leituras remanescentes após a filtragem foram montadas individualmente com os softwares SPAdes 3.13.0 (BANKEVICH et al., 2012) e Platanus 1.2.4 (KAJITANI et al., 2014). Em seguida, o programa BlobTools v1.0.1 (LAETSCH; BLAXTER, 2017) foi utilizado para anotação taxonômica da montagem, mapeamento e visualização de sequências contaminantes, permitindo a filtragem com a ferramenta Pullseq 1.0.2 (<https://github.com/bcthomas/pullseq>). Adicionalmente, uma terceira montagem foi gerada por metaSPAdes (NURK et al., 2017) e as sequências obtidas foram agrupadas pelo software MetaBAT2 2.12.1 (KANG et al., 2019) com base no genoma ao qual pertencem em um processo conhecido como *binning* (URITSKIY; DIRUGGIERO, 2019). Para tal, o CheckM 1.0.13 (PARKS et al., 2015) forneceu uma anotação taxonômica e estimativas de contaminação das *bins* formadas. Finalmente, as três montagens foram combinadas com o software Metassembler 1.5 (WENCES; SCHATZ, 2015).

Os programas Platanus e SSPACE 2.0 (Boetzer et al., 2011) foram utilizados para o fechamento de lacunas no genoma. Os resultados das montagens foram avaliados com QUAST 5.0.2 (GUREVICH et al., 2013), obtendo-se estimativas da integridade e contaminação com o CheckM. Em complementação da avaliação de integridade foi utilizado o programa BUSCO 3.0 (SIMÃO et al., 2015) para controle de qualidade do genoma gerado.

#### **4.7. Filogenômica**

A posição evolutiva da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 no filo Cyanobacteria foi determinada pela construção de uma árvore filogenômica, usando o programa GTDBtk v1.0.0 (CHAUMEIL et al., 2019). O programa utilizou o Prodigal (HYATT et al., 2010) na predição de genes e o HMMER (EDDY, 2011) para identificar 120 genes marcadores bacterianos (PARKS et al., 2018) usando os modelos ocultos de Markov (perfil HMMs). A maioria dos genes marcadores com um domínio em comum foram alinhados e concatenados gerando um único alinhamento de sequência múltipla (MSA). O concatenado foi filtrado para aproximadamente 5.000 aminoácidos, e utilizado pelo pplacer (MATSEN; KODNER; ARMBRUST, 2010) para inferir a posição do genoma na árvore de referência GTDB-Tk. A árvore de referência foi composta pelos genes marcadores concatenados de 230 genomas cianobacterianos, disponíveis na Database de Taxonomia de Genomas (GTDB) (PARKS et al., 2018) e construída no método de Máxima Verossimilhança, modelo evolutivo WAG + GAMMA e enraizada com o grupo externo *Gloeobacter violaceus*, usando o FastTree v2.1.7 (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010). A classificação taxonômica foi atribuída baseada no recente sistema GTDB. Para tal, o GTDB-Tk designou a classificação do genoma de estudo em relação a um genoma de referência, de acordo com a divergência evolutiva relativa (RED) e a identidade média de nucleotídeos (ANI), calculadas com PhyloRank (<https://github.com/dparks1134/PhyloRank/>) e FastANI (JAIN et al., 2018), respectivamente. O equivalente na classificação tradicional de cianobactérias utilizado no NCBI foi proporcionado para fines comparativos.

#### **4.8. Filogenia do gene 16S RNAr**

Os genes 16S e 23S RNAr foram localizados no genoma da *Oxynema* sp. CENA135 usando o barnap ([Shttps://github.com/tseemann/baRNArp](https://github.com/tseemann/baRNArp)). A identidade do gene de 16S RNAr do genoma e a sequência do mesmo disponível no GenBank (NCBI), da ainda nomeada como

*Phormidium* sp. CENA135 (N° de acesso HQ730084.1), foi verificada com o programa BLAST 2.8.1+ (CAMACHO et al., 2009). A homologia das cópias do gene foi verificada de igual forma.

Na filogenia do gene de 16S RNAr, a sequência completa do gene obtida do genoma, sequências de alta similaridade identificadas com BLASTN (disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e múltiplas sequências de cianobactérias disponíveis na database do NCBI foram alinhadas usando o programa MAFFT v7 (KATOHI; ROZEWICKI; YAMADA, 2019). O resultado do alinhamento foi inserido no programa MEGA X (KUMAR et al., 2018) para predição do melhor modelo de substituição, utilizando o General Time Reversible (GTR) com distribuição Gama e sites invariantes (G+I). O estudo filogenético baseou-se na construção da árvore filogenética com os métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB), usando como grupo externo a linhagem *Synechococcus elongatus* PCC 6301. A árvore de Máxima Verossimilhança foi gerada com o MEGAX a partir da reamostragem (bootstrap) de 1000 replicações e n° de categorias para distribuição gama=6. A Inferência Bayesiana foi calculada com o programa MrBayes v.3.2.1 (RONQUIST et al., 2012) para duas corridas de 5.000.000 gerações em quatro Markov Chain Monte Carlo (MCMC), n° de tipos de substituição=6, n° de categorias para distribuição gama=6, frequência de amostragem=100, descartando as primeiras 5.000 gerações (*burn-in*) cujo valor foi verificado com o programa Tracer v.1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018). As árvores filogenéticas foram visualizadas com a ferramenta online ITOL 5.3 (LETUNIC; BORK, 2019) (<https://itol.embl.de/itol.cgi>).

A matriz de similaridade entre a sequência da linhagem CENA135 e sequências agrupadas foi estimada no BioEdit v. 7.2.5 (HALL, 1999). As sequências estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação das sequências de 16S RNAr das linhagens comparadas na matriz de similaridade com seus respectivos números de acesso e país de procedência.

<b>Linhagem</b>	<b>N° de acesso</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>País de origem</b>
<i>Oxynema</i> sp. CENA135	-	1486	Brasil
<i>Oxynema thaianum</i> CICALA 960	NR_125585.1	1152	Tailândia
<i>Oxynema thaianum</i> BDU 70493	KX452362.1	1354	Índia
<i>Oxynema thaianum</i> BDU 91992	KX452363.1	1382	Índia
<i>Oxynema thaianum</i> BDU 10251	KX452361.1	1335	Índia
<i>Oxynema thaianum</i> BDU 120161	KX452364.1	1362	Índia
<i>Oxynema aestuarii</i> AP17	MG694263.1	1387	Índia
<i>Oxynema aestuarii</i> AP24	MG694265.1	1369	Índia

#### 4.9. Análises das estruturas secundárias do espaço intergênico 16S-23S

A sequência do espaçador interno (ITS) 16S – 23S RNAr obtida do genoma da linhagem CENA135 e sequências disponíveis no NCBI de três linhagens do gênero *Oxynema*, incluindo a linhagem tipo *O. thaianum* CCALA 960, foram analisadas para inferir variabilidade intragenérica. As informações referentes aos tamanhos das sequências e o número de acesso das linhagens estão fornecidos na Tabela 2. Os domínios conservados do ITS foram identificados usando a combinação do alinhamento Clustal em MAFFT v.7 e alinhamento manual utilizando as estruturas secundárias. Os genes de RNAt identificados foram confirmados no tRNAscan-SE (LOWE; CHAN, 2016). As sequências das regiões da ITS foram comparadas, gerando as estruturas secundárias no M-fold v.3.6 (ZUKER, 2003).

**Tabela 2.** Relação de sequências de ITS 16S-23S da linhagem em estudo e das linhagens descritas do gênero *Oxynema* disponíveis na base de dados do GenBank NCBI até dezembro 2019.

<b>Linhagem</b>	<b>Nº de acesso</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>Oxynema</i> sp. CENA135	-	446	O presente estudo
<i>Oxynema thaianum</i> CCALA 960	MG825656.1	547	Chatchawan <i>et al.</i> (2012)
<i>Oxynema</i> sp. AP17	MG694266.1	543	Chakraborty <i>et al.</i> (2018)
<i>Oxynema</i> sp. AP24	MG694268.1	541	Chakraborty <i>et al.</i> (2018)

#### 4.10. Anotação de genes e potenciais agrupamentos gênicos

A anotação automática das sequências obtidas foi realizada pelo servidor RAST (AZIZ et al., 2008) com a plataforma do SEED (OVERBEEK et al., 2014) e pelo software Prokka 1.13. Complementarmente, as anotações automáticas de genes contidos em agrupamentos gênicos foram detectadas no antiSMASH 2.0 (BLIN et al., 2013) (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>) e para peptídeos de origem ribossomal foi utilizado BAGEL4 (HEEL, VAN et al., 2018). As anotações automáticas dos agrupamentos gênicos foram curadas utilizando Artemis v18.0 (CARVER et al., 2012). Genes e sequências de aminoácidos selecionados, quando necessário, foram comparados com BLAST ao banco de dados do GenBank (NCBI) ou elaborados manualmente. Os domínios e famílias proteicas foram determinadas com o InterProScan (JONES et al., 2014) e CDART (GEER, 2002).

#### 4.11. Detecção das bactérias da cianosfera

As sequências de nucleotídeos geradas e removidas da montagem do genoma da CENA135 foram aproveitadas da montagem obtida com o software SPAdes. O programa

Platanus foi utilizado para o fechamento de lacunas, enquanto a avaliação das sequências foi realizada com o QUAST, e a análise de qualidade com o CheckM. O perfil taxonômico da comunidade bacteriana da cianosfera foi gerado com a base de dados RefSeq (e-value 5, 60% de identidade) disponibilizada no MG-RAST e visualizadas no Krona. A anotação de genes marcadores filogenéticos foi obtida com os programas Prodigal e Barnap dentro do pacote do Prokka, com a intenção de identificar táxons bacterianos na cianosfera por similaridade BLAST dos genes com a base de dados GenBank/NCBI. Finalmente, a anotação funcional do táxon mais abundante foi atribuída em subsistemas do RAST/SEED.

## 5. RESULTADOS E DISCUSÃO

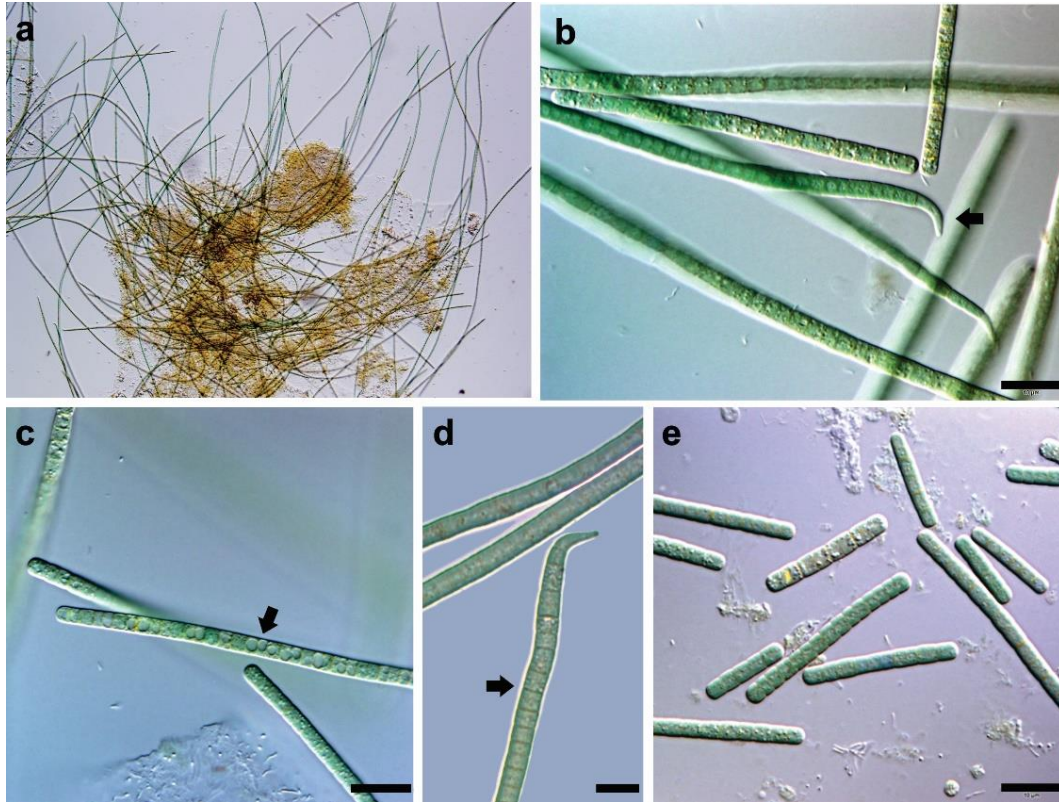
### 5.1. Caracterização morfológica

A morfologia da linhagem CENA135 ajustou-se à descrição do gênero *Oxynema* feita por Chatchawan et al. (2012), separado do grupo I do gênero *Phormidium* (Komárek & Anagnostidis, 2005).

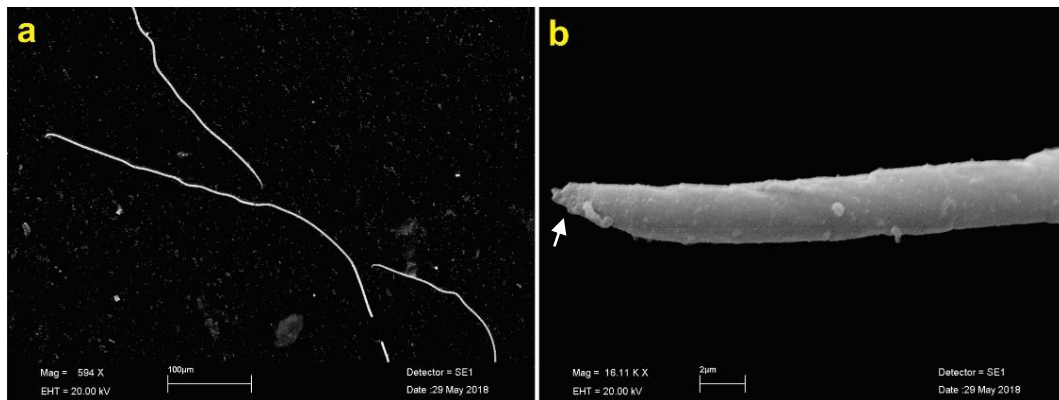
A linhagem apresentou massas macroscópicas azul-esverdeadas com crescimento em forma de esteiras aderidas à superfície dos frascos de cultivo e microscopicamente consistiu de tricomas emaranhados, retos ou levemente flexíveis, atenuados, contraídos nas paredes transversais (Figura 6a, 7a); células de 1,9 - 5,1  $\mu\text{m}$  de comprimento (3,3  $\mu\text{m}$  em média) e 2,7 - 3,4  $\mu\text{m}$  de largura (3,1  $\mu\text{m}$  em média), razão comprimento / largura das células de 0,6 a 1,1; conteúdo celular azul-esverdeado e com menor frequência verde-azeitona, granuloso, às vezes vacuolizado (Figura 6c); células apicais maduras pontiagudas, geralmente dobradas, com 3,2-8,7  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figura 6b, 7b); bainha de mucilagem firmemente ligada (Figura 6d). Os tricomas dividiram-se em hormogonia (Figura 6e) e foram intensivamente moveis.

As características morfológicas da CENA135 e os morfotipos descritos para *Oxynema* foram comparados na Tabela 3, observou-se diferenças principalmente na morfologia das células. A proporção da largura e comprimento da linhagem de estudo diferiu em quase a metade da proporção da linhagem tipo *Oxynema thaianum* CCALA 960 (CHATCHAWAN et al., 2012), porém foi levemente maior que as linhagens *Oxynema* sp. AP17 e AP24 (CHAKRABORTY et al., 2018) e as linhagens BDU (120161, 70493, 91992 e 10251) para *O. thaianum* (BHUVANESHWARI et al., 2016). Outra característica distintiva foi a presença de paredes transversais na porção da célula apical em *O. thaianum* CCALA 960, a qual não foi observada nas outras linhagens. A forma pontiaguda e afinada da célula apical foi uma característica autapormórfica do gênero *Oxynema* (CHATCHAWAN et al., 2012) assim como foi diacrítica na formação do “Grupo I- Phormidium” (Komárek & Anagnostidis, 2005), embora esse grupo abrangiu espécies de diferentes habitats como *P. lloydianum* (= *Oscillatoria lloydiana*) encontrada em localidades salinas, *P. janthiphorum* (= *Oscillatoria janthiphora*) e *P. acuminatum* (= *Oscillatoria acuminata*) em fontes termais, minerais ou sulfuretos (Komárek & Anagnostidis, 2005). Na revisão do gênero *Oxynema*, as espécies *P. lloydianum* e *P. acuminatum* foram inclusas como *O. lloydianum* e *O. acuminatum*, respectivamente (CHATCHAWAN et al., 2012).





**Figura 6.** Microfotografias de *Oxy nema* sp. CENA135, em cultura não axênica **a.** Tricomas emaranhados (100x) **b.** Filamentos, detalhe na célula apical pontiaguda **c.** Vacúolos presentes em células maduras **d.** bainha de mucilagem colorido com nanquim **e.** Hormogônios. Escala=10  $\mu$ m.



**Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura de *Oxy nema* sp. CENA135, em cultura não axênica **a.** Filamentos **b.** célula apical, detalhe de bainha firmemente ligada.

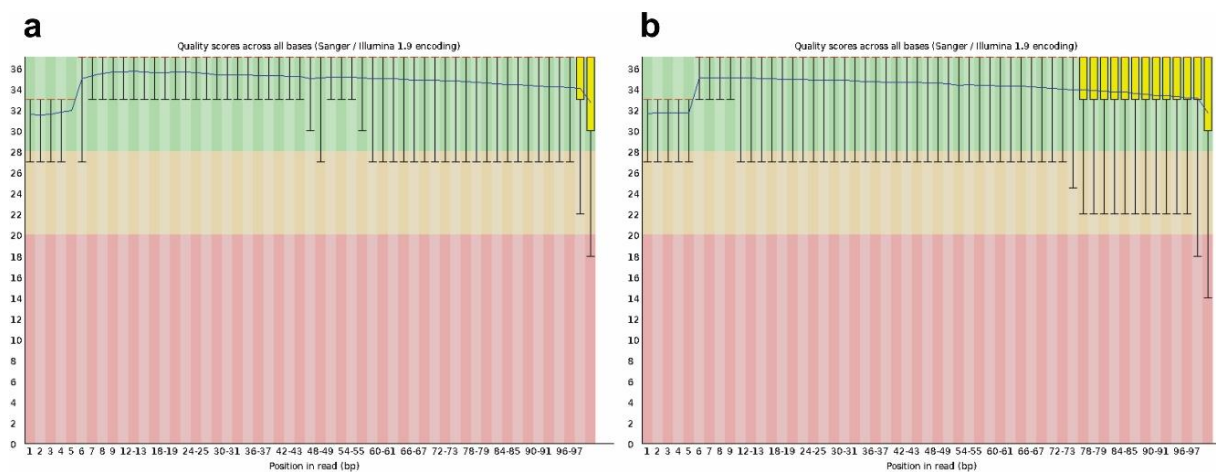
**Tabela 3.** Comparação morfológica da linhagem CENA135 com as espécies descritas no gênero *Oxynema*.

<b>Espécie</b>	<i>Oxynema</i> sp.	<i>Oxynema thaianum</i>	<i>Oxynema thaianum</i>	<i>Oxynema thaianum</i>	<i>Oxynema thaianum</i>	<i>Oxynema thaianum</i>	<i>Oxynema aestuarii</i>
<b>Linhagem</b>	CENA 135	CCALA 960	BDU 120161	BDU 70493	BDU 91992	BDU 10251	AP17 e AP24
<b>Tricoma</b>	Solitário, reto ou ligeiramente flexionado, atenuado nas extremidades	Solitário, reto, ligeiramente curvado nas extremidades	Solitário, reto, ligeiramente curvado nas extremidades	Solitário, reto com célula apical curvada	Solitário, reto com célula apical ligeiramente curvada	Solitário, reto com célula apical curvada	Solitário, reto, ligeiramente curvado nas extremidades
<b>Bainha</b>	Firmemente ligada	Facultativa, fluída, raramente observado	Facultativa e Fluída	Facultativa	Facultativa e fluída	Não observada	Bem definida, firmemente ligada
<b>Largura da Célula</b>	2,7 – 3,4 µm	7,5 – 9 µm	2 – 2,6 µm	2 µm	2 – 2,4 µm	2 – 2,8 µm	2,0 – 2,5 µm
<b>Comprimento da Célula</b>	1,9 – 5,1 µm	2,2 – 3 µm	2 - 3 µm	2 - 3 µm	1,8 – 2,1 µm	2 – 3,6 µm	1,5 – 2,5 µm
<b>Forma</b>	Tendência a ser isodiamétrica, principalmente vezes mais curto que largo	Raramente isodiamétrica, principalmente mais curto que largo	Tendência a ser isodiamétrica, algumas vezes mais longo que largo	Raramente isodiamétrica, principalmente mais longo que largo	Raramente isodiamétrica, principalmente mais curto que largo	Tendência a ser isodiamétrica, algumas vezes mais longo que largo	Tendência a ser isodiamétrica, algumas vezes mais curto que largo
<b>Célula Apical</b>	Alongada e pontiaguda, geralmente curvadas, sem caliptra	Alongada, pontiaguda com paredes transversais presentes, sem caliptra	Extremamente alongada, pontiaguda e curvada, sem caliptra	Alongada e pontiaguda, sem caliptra	Pouco alongada e pontiaguda, sem caliptra	Alongada e pontiaguda, sem caliptra	Alongada, pontiaguda sem paredes transversais, sem caliptra
<b>Constricção na parede celular</b>	Ligeiramente constringido na parede transversal	Ligeiramente constringido na parede transversal	Ligeiramente constringido na parede transversal	Ligeiramente constringido na parede transversal	Ligeiramente constringido na parede transversal	Constringido na parede transversal	Ligeiramente constringido na parede transversal
<b>Motilidade</b>	Movimento deslizante intensivo	Movimento deslizante	Movimento deslizante restrito	Movimento deslizante restrito	Movimento deslizante restrito	Movimento deslizante restrito	Movimento deslizante
<b>Habitat</b>	Solo de manguezal / Ilha do Cardoso-Brasil	Salinas de Petchaburi / Tailândia	Salinas de Arambol/ Índia	Água estagnada de ambiente costeiro/ Índia	Aderida na superfície de embarcações / Índia	Água estagnada de ambiente costeiro/ Índia	Biofilmes da superfície de solo / Manguezal de Sundarbans-Índia

Os habitats das linhagens associadas a *Oxynema* também foram variáveis, porém mantiveram uma relação de alta salinidade. A linhagem de estudo CENA135 foi isolada do Manguezal da Ilha do Cardoso localizada no estado de São Paulo, Brasil, no solo próximo à floresta. Ecologicamente, as mais próximas com a linhagem de estudo foram as linhagens (AP17 e AP24) coletadas do manguezal de Sundarbans, Índia, em biofilmes da superfície de solo, e são as mais recentes em ser integradas no gênero com a sugestão da espécie *Oxynema aestuarii*. Por outro lado, as linhagens BDU foram encontradas em ambientes marinhos da Índia (BHUVANESHWARI et al., 2016): a BDU 70493 em água estagnada na praia de Kovalam, região de Chennai na Baía de Bengala; a BDU 91992 encontrava-se aderida na superfície de embarcações no mar da Arábia; a BDU 10251 de águas estagnadas em Vedaranyam de Tamil Nadu. A diferença das outras linhagens, a BDU 120161 ocorreu em solo lamoso das salinas de Arambol. De ambiente semelhante, a linhagem tipo *O. thaianum* CCALA960 foi encontrada nas salinas de Petchaburi, Tailândia, em tapetes de solo salgado úmido ou, às vezes, no fundo em águas rasas e foi relacionada à espécie halófito *P. lloydianum*, porém mostraram algumas diferenças morfológicas (CHATCHAWAN et al., 2012).

## 5.2. Montagem do genoma, análise de qualidade das sequências

O sequenciamento do genoma da *Oxynema* sp. CENA135 na plataforma HiSeq gerou um total de 58.351.984 leituras, em aproximadamente 14 GB de dados com alta qualidade (Figura 8).



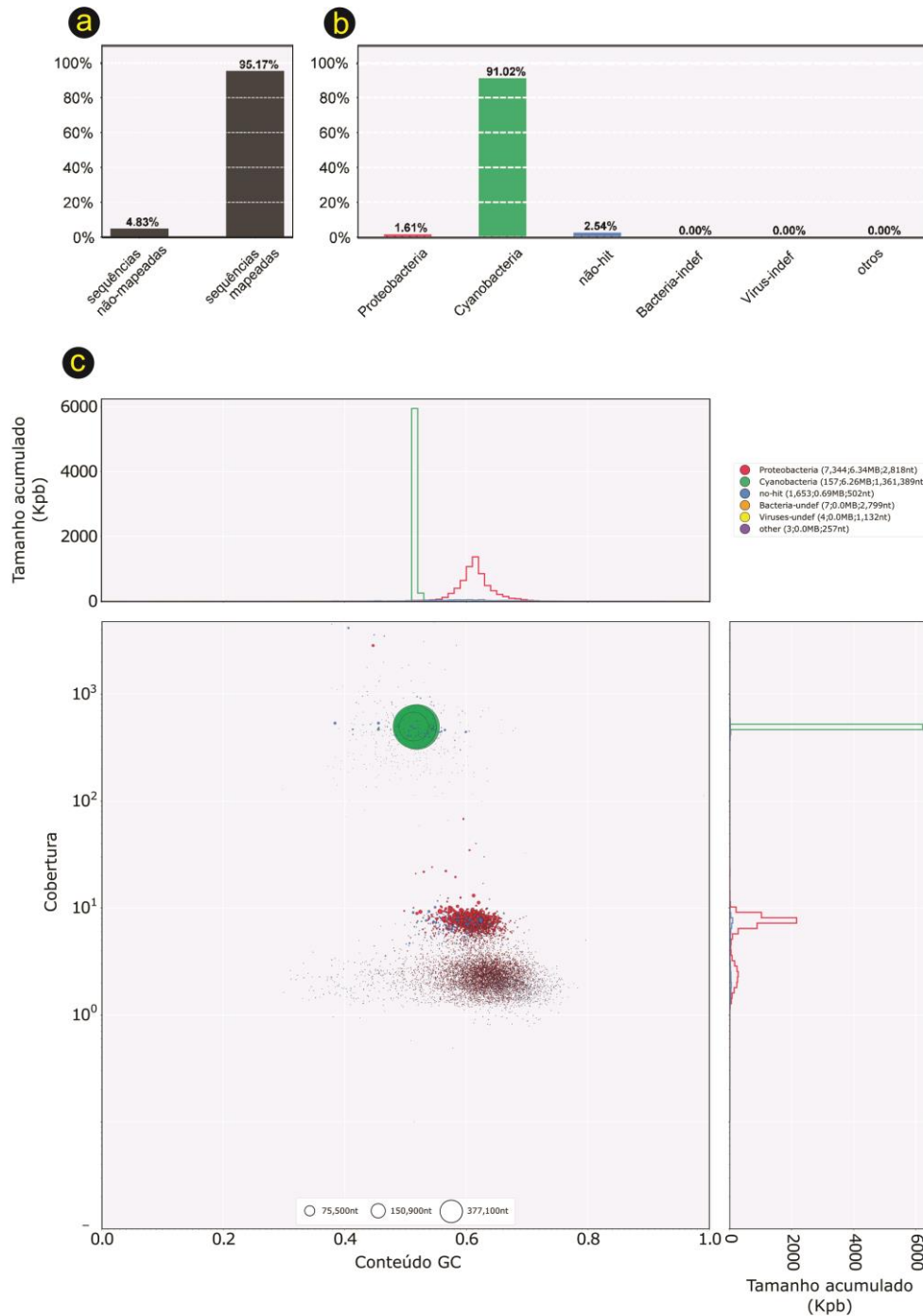
**Figura 8.** Qualidade Phred das bases por leitura do sequenciamento da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 **a.** leituras de R1 **b.** leituras de R2

Após a remoção dos adaptadores e leituras com qualidade Phred inferior a 33, conservou-se um total de 37.947.836 leituras em aproximadamente 8,2 GB de dados. O comprimento das leituras oscilou entre 30 a 101 pares de bases com percentual GC médio de 51%.

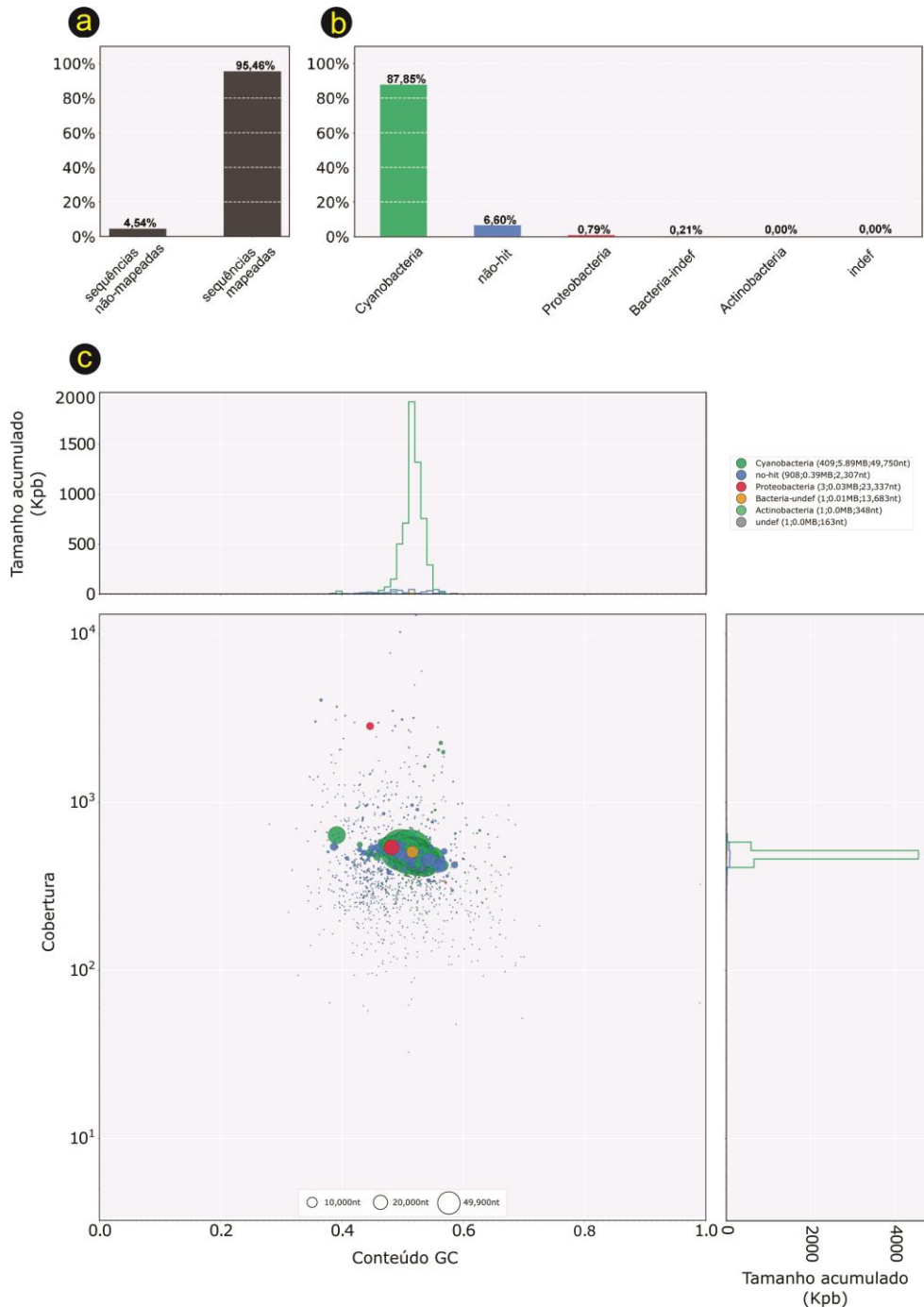
As sequências resultantes da montagem das leituras foram geradas por três montadores primários (Spades, Platanus e pelo método de *binning*) para a obtenção de um genoma final consenso. Antes do aprimoramento das montagens realizou-se uma visualização preliminar das sequências correspondentes a cianobactérias e microrganismos contaminantes. Para tal, cada sequência das montagens primárias de Spades (Montagem1) e Platanus (Montagem 2) foram afiliadas a um grupo taxonômico (Figura 9 e 10) utilizando Blobtools.

Em ambos casos, o particionamento taxonômico facilitou a filtragem das sequências cianobacterianas, visto que a inclusão inadvertida de leituras de sequências contaminantes pode resultar em uma montagem incorreta, reduções na qualidade geral da montagem ou até mesmo a atribuição de material genético não alvo para o genoma alvo (KUMAR, JONES, KOUTSOVOULOS, CLARKE, & BLAXTER, 2013).

De acordo com Cornet, Meunier et al. (2018), mais do 5% dos conjuntos de genomas publicados de cianobactérias estão altamente contaminados por DNA contaminante. A obtenção de DNA cianobacteriano sem sequências contaminantes é, portanto, uma tarefa desafiadora, devido a sua estreita relação com comunidades bacterianas na natureza (CORNET; BERTRAND; et al., 2018). Essas associações limitam o axenismo das culturas, e a maioria dos esforços de isolamento resulta em culturas unicianobacterianas contendo vários microrganismos em consórcio (ALVARENGA; FIORE; VARANI, 2017).



**Figura 9.** Proporção de leituras emparelhadas e mapeadas do sequenciamento HiSeq para a montagem primária de Spades **(a)**, e sua distribuição por grupo taxonômico no nível de filo **(b)**. A afiliação taxonômica de cada sequência montada foi determinada por similaridade BLASTN (e-value 3) no GenBank do NCBI. Os gráficos de bolhas mostram a distribuição das sequências de acordo com a proporção GC e a cobertura base **(c)**. Nesse caso, os círculos são proporcionais ao comprimento das sequências e coloridos por grupo taxonômico. Os histogramas mostram o tamanho acumulado das sequências em cada filo pela proporção GC (localização superior) e cobertura (localizado à direita). As legendas contêm o número de sequências, tamanho em Mpb e N50 do lado do filo.



**Figura 10.** Proporção de leituras emparelhadas e mapeadas do sequenciamento HiSeq para a montagem primária de *Platanus* (a), e sua distribuição por grupo taxonômico no nível de filo (b). A afiliação taxonômica de cada sequência montada foi determinada por similaridade BLASTN (e-value 3) no GenBank do NCBI. Os gráficos de bolhas mostram a distribuição das sequências de acordo com a proporção GC e a cobertura base (c). Nesse caso, os círculos são proporcionais ao comprimento das sequências e coloridos por grupo taxonômico. Os histogramas mostram o tamanho acumulado das sequências em cada filo pela proporção GC (localização superior) e cobertura (localizado à direita). As legendas contêm o número de sequências, tamanho em Mpb e N50 do lado do filo.

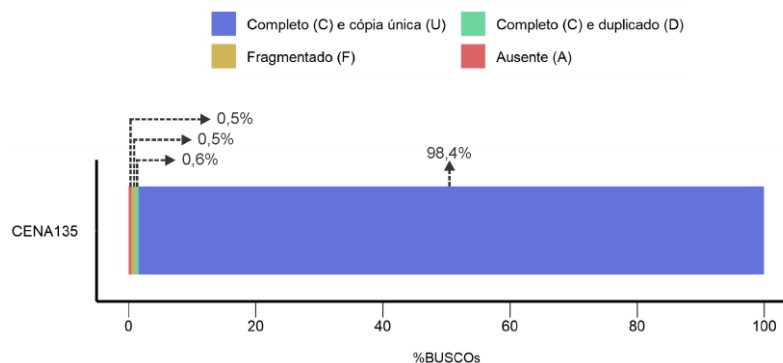
Pelo método de binning, formou-se dois bins, pertencentes a Cyanobacteria e Rhizobiales. A bin de Cyanobacteria foi recuperada baseada na integridade de 98,4%, sendo considerada como a terceira montagem. Por outro lado, a integridade da bin Rhizobiales foi de 76,7%, motivo pelo qual não foi considerado seu aproveitamento.

Dado que os três métodos de montagem parecem ter suas próprias estratégias e limitações, o *draft* do genoma da linhagem CENA135 resultou do consenso utilizando como montagem principal a obtida de Spades; cujos dados estimados após o fechamento de lacunas estão resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Estimativa e análise de qualidade das montagens individuais e consensus do sequenciamento da linhagem *Oxynema* sp. CENA135.

	Montagem 1	Montagem 2	Montagem 3	Consensus
Programa	Spades	Platanus	MetaSpades +MetaBAT2	Metassembler
Nº de contigs	155	265	10	11
Tamanho total (pb)	6.268.060	6.032.431	6.260.271	6.241.108
Maior contig (pb)	3.591.057	1.218.266	2.735.654	3.591.108
(G+C)%	51.60	51.64	51,61	51.60
N50	3.591.057	431.201	927.442	3.591.108
L50	1	5	2	1
Integridade (%)	99,29	98,11	98,35	99,29
Contaminação (%)	1,45	1,69	3,73	1,22

A montagem consenso constou de 11 sequências contíguas em um tamanho total de 6,2 Mpb, com N50 de 3.591.108 pb, percentual G:C de 51,6% e cobertura média de 190x. Embora o genoma não tenha sido “fechado”, a integridade das sequências atingiu 99,3% na análise do CheckM; valor que foi validado com o 99% de integridade obtido a partir de 834 grupos de genes ortólogos de cópia única, nomeados BUSCOs (Figura 11)



**Figura 11.** Estimativa percentual de BUSCOs identificados no genoma da linhagem *Oxytoma* sp. CENA135, correspondente a 826 grupos completos de cópia única (821) e duplicados (5), 4 grupos fragmentados e 4 grupos ausentes.

O genoma da cianobactéria do manguezal brasileiro *Oxytoma* sp. CENA135 é o primeiro registrado para o gênero até o momento. Entretanto, a ausência de mais genomas do mesmo gênero impossibilita realizar estimativas de genômica comparativa. Porém, fornecerá informação base para futuros estudos do táxon.

### 5.3. Filogenômica

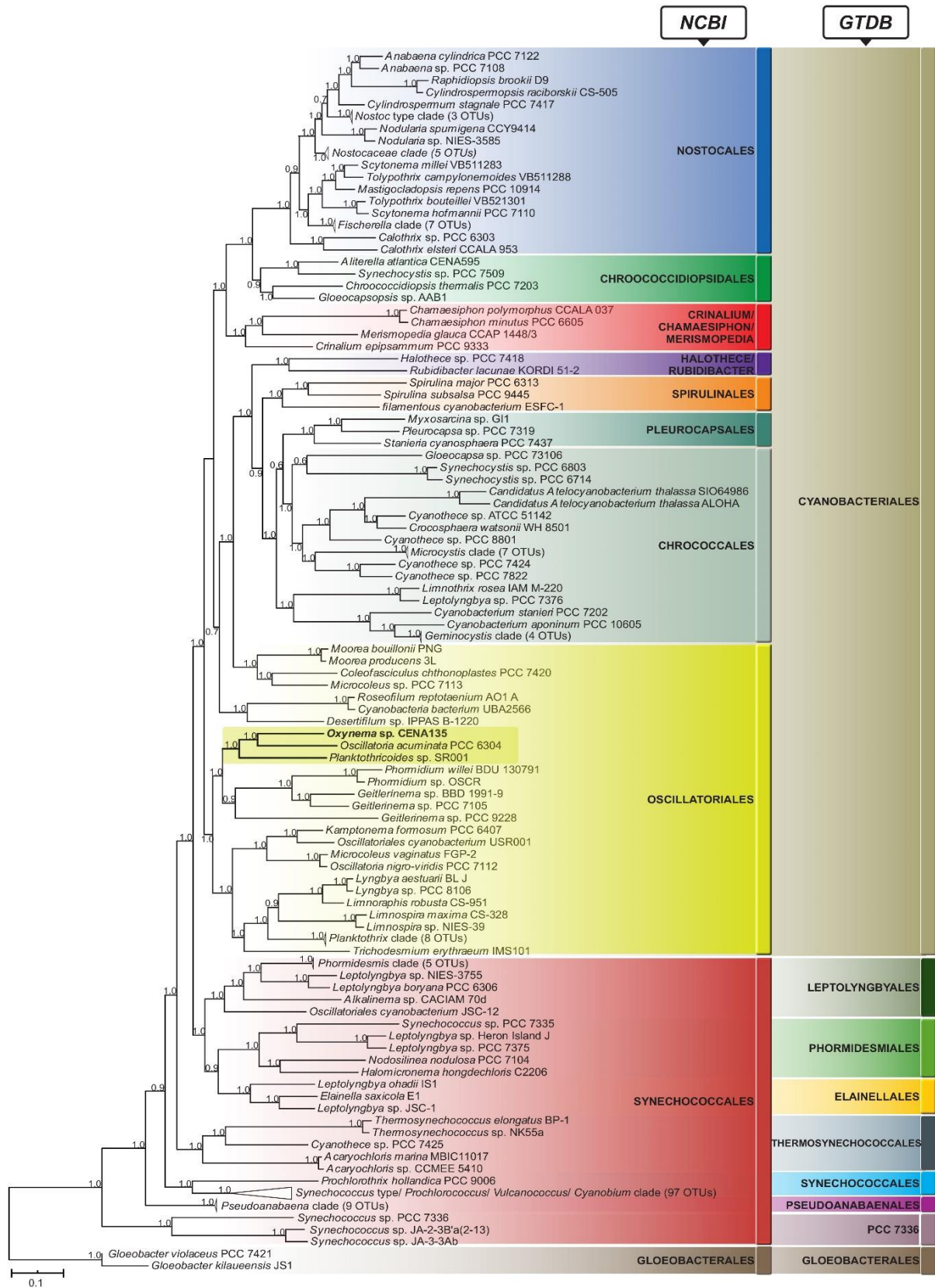
Na árvore filogenômica de Máxima Verossimilhança (Figura 12) obtido do GTDBtk, a linhagem do manguezal brasileiro *Oxytoma* sp. CENA135 agrupou-se em um clado com a extremófila *Oscillatoria acuminata* PCC 6304 (Nº de acesso GCA\_000317105.1) encontrada em águas termais dos Estados Unidos. Ambas cianobactérias formaram um clado maior com *Planktothricoides* sp. SR001 (Nº de acesso GCA\_001276715.1), isolada do reservatório de água doce localizada em Cingapura, com um valor de reamostragem de 100%. O fato de encontrar agrupamentos tão próximos de espécies de ambientes bastante divergentes, pode estar associado ao limitado número de táxons com genomas sequenciados e disponíveis nos bancos de dados são insuficientes.

O recente sistema taxonômico de bactérias e arqueias do GTDB tem sido baseado somente na filogenia do genoma, removendo os grupos polifiléticos e normalizando as classificações taxonômicas usando critérios de divergência evolutiva relativa e ANI para estabelecer classificações taxonômicas (PARKS et al., 2018, 2019). O ANI representa a identidade nucleotídica média de todos os genes ortólogos compartilhados entre dois genomas, embora sua estimativa não representa estritamente a relação evolutiva do genoma central, já que os genes ortólogos podem variar amplamente entre pares de genomas comparados (JAIN



et al., 2005). No entanto, foi considerada uma medida robusta da distância genética e evolutiva, de forte correlação com a similaridade da sequência do gene 16S RNAr e a taxa de mutação do genoma (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005). Um suporte adicional ao uso do ANI, foi a estreita relação com os valores obtidos de hibridação DNA-DNA (GORIS et al., 2007), considerado o método padrão por décadas (CHO; TIEDJE, 2001; MURRAY et al., 2001; KANG et al., 2007; GORIS et al., 2007). Por tanto, o ANI foi amplamente aceito para circunscrever espécies (CHUN et al., 2018; CIUFO et al., 2018; COIL et al., 2019; CHAUMEIL et al., 2019). Em geral, o raio de circunscrição ANI definido para separação de espécies é de 95%, embora tenha algumas exceções de 97% a fim de excluir algumas espécies de *Shigella* do gênero *Escherichia*. Para o ANI inter-espécie entre os representantes mais próximos de um gênero tem sido observado uma distribuição de 78 a 95% (PARKS et al., 2019). Baseados nessa estimativa, o genoma de *Oscillatoria acuminata* PCC 6304 utilizado como referência da *Oxynema* sp. CENA135 pelo programa GTDBtk, mostrou grande distância evolutiva da linhagem de estudo com um ANI de 76,63%, evidenciando a falta de genomas sequenciados de gêneros mais próximos. O sistema então infere que o genoma da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 posiciona-se na ordem Cyanobacteriales, sem conseguir uma classificação mais específica devido à falta de um genoma de referência mais próximo.

Em contrapartida do esquema anterior, o sistema tradicional de classificação do filo Cyanobacteria proposto por Komárek et al. (2014), posicionou o genoma da CENA135 no gênero *Oxynema* da ordem Oscillatoriales. O NCBI adotou este sistema exclusivo para a taxonomia do filo, onde os critérios citomorfológicos e ecológicos foram consistentes no mais possível com a filogenômica. A combinação desses critérios é nomeada de abordagem polifásica, na qual a avaliação genética formaria a base (KOMÁREK, 2016). Durante bastante tempo o gene de 16S RNAr tem sido essa base genética e, em muitos casos, permitiu a demarcação de táxons em espécies distintas, mas suas limitações em vários grupos resultaram no uso continuado da hibridação DNA-DNA. Já com os avanços bioinformáticos e o *next generation sequencing* (NGS), a incorporação da genômica na taxonomia e sistemática das bactérias e arqueias aumentam a credibilidade da taxonomia na era genômica (CHUN; RAINEY, 2014). Dessa forma, o estudo polifásico abrange continuas adaptações de acordo com as novas descobertas e com a introdução de novas metodologias (KOMÁREK, 2018). Um recente exemplo da avaliação polifásica no contexto genômico foi o novo gênero *Elainella* derivado de *Pseudophormidium* (JAHODÁŘOVÁ et al., 2018).



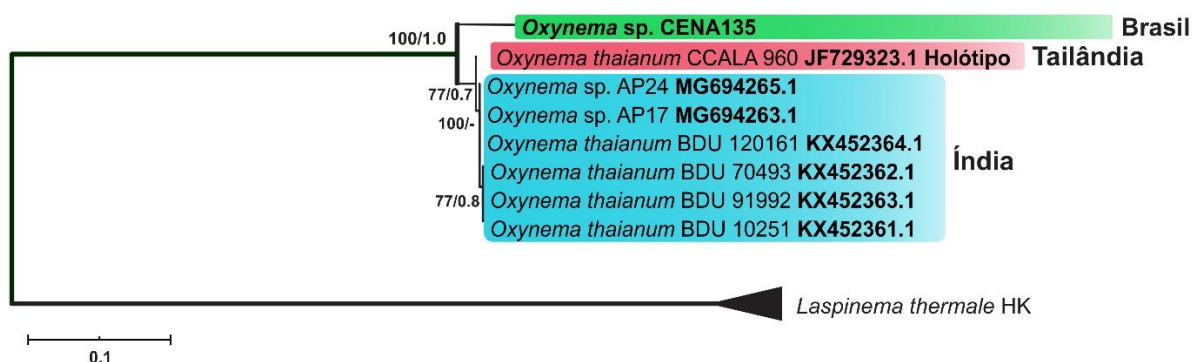
**Figura 12.** Posição evolutiva da linhagem *Oxytoma* sp. CENA135 no filo Cyanobacteria. Os valores de reamostragem (*bootstrap*) foram indicados em uma escala de 0 a 1. A classificação taxonômica no nível de ordem foi designada de acordo com a taxonomia proposta por Komárek et al. (2014) utilizada no NCBI (Primeira coluna) e a taxonomia do GTDB (Segunda coluna).

#### 5.4. Filogenia do gene 16S RNAr

O genoma da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 apresentou cinco cópias idênticas da região contígua do gene 16S RNAr, espaçador intergênico (ITS) e o gene 23S RNAr. O gene 16S RNAr é um marcador molecular tradicionalmente utilizado na filogenética bacteriana (YARZA et al., 2014; KOMÁREK, 2018). Embora o operon 16S-ITS-23S RNAr tenha sido proposto para uma identificação confiável de bactérias, a falta de sequências da referida região nos bancos de dados limita sua utilização, razão pela qual a árvore filogenética baseou-se apenas na sequência do gene 16S RNAr. Sendo que primeiro, verificou-se a confiabilidade de uma cópia do gene obtida do genoma com 100% de similaridade para a sequência de 16S RNAr disponível na database do NCBI (Nº de acesso HQ730084), da anteriormente identificada como *Phormidium* sp. CENA135.

As árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de MV e IB, apesar de não serem idênticas, mostraram topologia semelhante. Motivo pelo qual a árvore de MV foi gerada apresentando os valores de reamostragem respectivos e os valores de probabilidade da IF.

Na filogenia, a linhagem brasileira *Oxynema* sp. CENA135 agrupou-se com as linhagens asiáticas de *Oxynema* formando um clado bem suportado e restrito do gênero. A análise MV dividiu o clado em três sub-clados em concordância com o país de procedência das linhagens (Figura 13). Inclusive, a análise MV e IB mostraram que o sub-clado da Índia apresentou um ramo interno composto pelas linhagens de ambiente marinho separado das linhagens isoladas de salinas (BDU 120161) e do manguezal (AP24 e AP17).



**Figura 13.** Detalhe do clado do gênero *Oxynema*. A árvore de Máxima Verossimilhança (MV) baseou-se em sequências parciais do gene 16S RNAr e a topologia foi validada por inferência Bayesiana (IB). Apenas os valores de reamostragem maiores a 70% para o método MV e de 0,7 de probabilidade a posteriori para IB são indicados nos nós. A linhagem de estudo *Oxynema* sp. CENA135 está exibida em negrito.

A análise de similaridade feita por BLASTN revelou que a sequência de 1152 pb do gene de 16S RNAr da linhagem holótipo *O. thaianum* CCALA 960 (N° de acesso NR\_125585.1) teve uma alta similaridade (98,7%) com a sequência de 1486 pb do gene de 16S RNAr da CENA135, mas apenas uma cobertura de 77%, faltando a parte inicial da sequência (aproximadamente 334 pb). Os bancos de dados contêm sequências incompletas que dificultam a reconstrução da história evolutiva da linhagem. Portanto, a matriz de similaridade foi gerada com base apenas na região consenso (1064 pb) entre as sequências de 16S RNAr das linhagens do clado. Dessa forma, as oito linhagens agrupadas apresentaram similaridade variável de 98,5 a 100%, para uma fração de 1064 nucleotídeos do 16S RNAr com uma divergência de até 16 nucleotídeos (Tabela 5), superando à taxa mínima ( $\geq 94,5\%$ ) para diferenciação de gêneros de acordo com Yarza et al. (2014). Em suporte dos dados avaliados, confirma-se que a linhagem CENA135 corresponde ao gênero *Oxynema*, sendo coerente com as análises prévias de Chatchawan et al. (2012) e Silva et al. (2014).

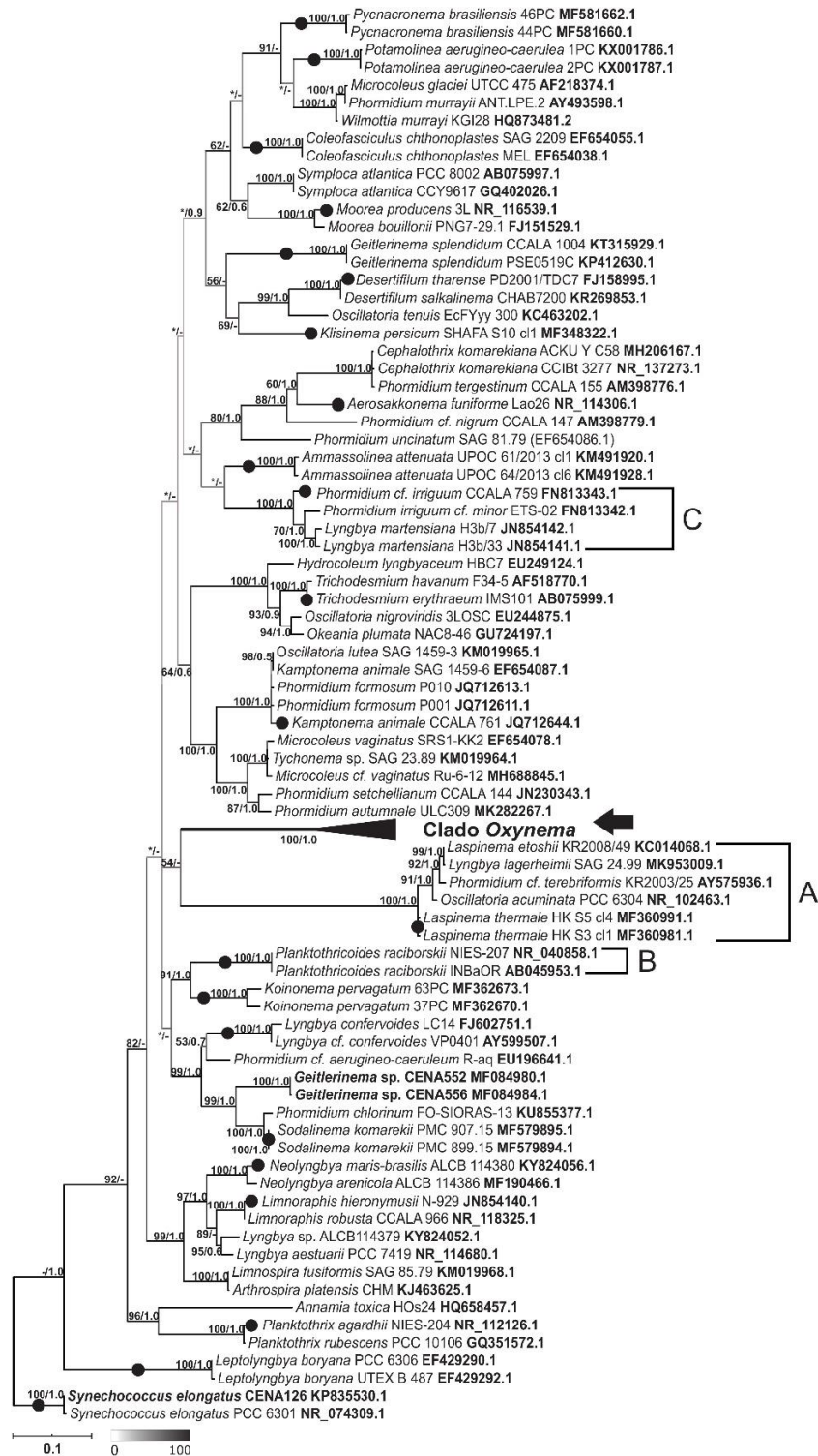
**Tabela 5.** Similaridade do gene de 16S RNAr das linhagens pertencentes ao gênero *Oxynema*, baseado em 1064 nucleotídeos. Porção superior contém os valores percentuais de similaridade e a porção inferior o número de nucleotídeos divergentes. Valores inferiores a 99% são exibidos em negrita

Linhagem	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>Oxynema</i> sp. CENA135		98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,5
2. <i>Oxynema thaianum</i> CCALA 960	13		100	100	100	99,9	99,9	99,6
3. <i>Oxynema</i> sp. AP24	13	0		100	100	99,9	99,9	99,6
4. <i>Oxynema</i> sp. AP17	13	0	0		100	99,9	99,9	99,6
5. <i>Oxynema thaianum</i> BDU 120161	13	0	0	0		99,9	99,9	99,6
6. <i>Oxynema thaianum</i> BDU 70493	13	1	1	1	1		100	99,7
7. <i>Oxynema thaianum</i> BDU 91992	13	1	1	1	1	0		99,7
8. <i>Oxynema thaianum</i> BDU 10251	16	4	4	4	4	3	3	

Na visualização mais ampla da árvore filogenética (Figura 14), a sequência do gene 16S claramente divide *Oxynema* do clado irmão (A) compartilhando menos de 92% de identidade. A espécie mais próxima foi *Laspinema thermale* do novo gênero *Laspinema*, recentemente separado de *Phormidium* Kützing ex Gomont (1892) baseado na exsicata da linhagem HK S5, a qual apresentou células apicais cônicas e arredondadas contrárias a *Oxynema* (Heidari et al., 2018). A proximidade da linhagem polifilética *Oscillatoria acuminata* PCC 6304 (ISHIDA, 2001), basônimo de *Phormidium acuminatum*, guarda relação com a filogenômica descrita anteriormente. No entanto, a revisão de Chatchawan et al. (2012)

reclassifica esta espécie como *Oxynema acuminatum* baseado apenas em semelhanças morfológicas das exsicatas, porém a baixa similaridade de 91,37% com *Oxynema* sp. CENA135 e diferença na típica forma da célula apical do gênero sugerem que não pertence a *Oxynema*. Por outro lado, o clado B agrupou a espécie *Planktothricoides raciborskii*, cujo único genoma disponível (*Planktothricoides* sp. SR001) esteve bem relacionado à linhagem de estudo de acordo com a filogenômica, embora a distância genética foi mais aprofundada na filogenia do 16S RNAr.

As análises MV e IB do gene 16S RNAr, corroboraram a notável separação do clado *Oxynema* do verdadeiro clado *Phormidium*. O tradicional grupo VIII de *Phormidium* (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005) foi representado por a espécie *P. irrigum* (Linhagem CICALA 759 e cf. minor ETS-02), proposto por Sciuto et al. (2012), em vez da espécie *P. lucidum* conhecida apenas por ilustração. A cianobactéria *P. irrigum* tem representado o gênero em estudos onde vários novos gêneros foram derivados (MARTINS et al., 2019).



**Figura 14.** Relação filogenética do gênero *Oxyneima* com outras taxas da ordem Oscillatoriales. A árvore de Máxima Verossimilhança (MV) baseou-se em sequências parciais do gene 16S RNAr e a topologia foi validada por inferência Bayesiana (IB). Apenas os valores de reamostragem maiores a 50% para o método MV e de 0,6 de probabilidade a posteriori para IB são indicados nos nós. (\*) representa valores inferiores e (-) valores ausentes. Os círculos pretos mostram as espécies tipo dos gêneros cianobacterianos. O clado A é o mais próximo para *Oxyneima*, na qual agrupa-se a polifilética *Oscillatoria acuminata* PCC 6304 em concordância com a filogenômica. O próximo gênero com genoma disponível é *Planktothricoides* representado por *P. raciborskii* do clado B. O tradicional *Phormidium* e *Lyngbya martensiana* agrupam em um clado C distante do clado *Oxyneima*.



### 5.5. Análises das estruturas secundárias do espaço intergênico 16S-23S

O ITS 16S-23S da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 consistiu de 447 nucleotídeos, sendo mais curto que a linhagem de referência *O. thaianum* CCALA 960 com 477 nucleotídeos e as *Oxynema* sp. AP17 e AP24, ambas com 480 nucleotídeos. Estas duas últimas foram sugeridas como uma nova espécie e identificadas como *O. aestuarii* por Chakraborty et al. (2018). Em resumo, o grupo apresentou 14 regiões (Tabela 6) de acordo com Itemam et al. (2000). Dessas regiões foram identificados 2 genes RNA transportadores para Ileucina e Alanina, 4 regiões idênticas e outras 8 com um histórico evolutivo de substituições de base única e múltiplas deleções.

**Tabela 6.** Tamanho em nucleotídeos das regiões do ITS 16S-23S das linhagens descritas no gênero *Oxynema* e a espécie *Oxynema thaianum*.

Região	Líder	D1-D1'	D2 +espaçador	D3 +espaçador	tRNA-Ile	V2	tRNA-Ala	Espaçador Pre-Box B	Box B	Espaçador Pós-Box B	Box A	D4	V3	D5+espaçador
<i>Oxynema thaianum</i> CCALA 960	6	61	47	16	73	11	72	46	55	17	12	6	17	17
<i>Oxynema</i> sp. CENA135	6	62	47	16	73	11	72	33	37	17	12	6	17	17
<i>Oxynema</i> sp. AP17	6	62	47	16	73	11	72	48	55	17	12	6	17	17
<i>Oxynema</i> sp. AP24	6	62	47	16	73	11	72	48	55	17	12	6	17	17

No entanto, as duas sequências de ITS 16S-23S da linhagem tipo *O. thaianum* CCALA 960 (Nº de acesso MG825656 e JF729323) disponíveis no GenBank (NCBI) não foram idênticas (Apêndice B). A ITS com Nº de acesso MG825656 apresentou 25 substituições de base e 1 inserção, quando comparada com a se ITS com Nº de acesso JF729323, ocorrendo em sua maioria na primeira metade da sequência. Esta divergência nas ITS foi relacionada a erros na sequência da MG825656, principalmente evidenciado na sequência da hélice basal TCTC-3'do domínio D1-D1', a qual não concordava com seu equivalente altamente conservado entre cianobactérias GGTC-3' (ITEMAN et al., 2000). Razão pela qual, optou-se por utilizar a sequência ITS com Nº de acesso JF729323, conseguindo identificar só as quatro primeiras regiões D1-D1', D2, D3 e o gene RNA transportador para Ileucina, por ser uma sequência incompleta. As 10 regiões restantes foram necessariamente identificadas a partir da sequência

ITS com N° de acesso MG825656. No entanto, sugere-se a posterior revisão desta sequência devido as suas particularidades.

Nas regiões não idênticas, a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 mostrou sete substituições em D2, uma substituição em Pós-Box B e uma deleção no final da ITS, a qual contém a região D5; quando comparadas com as sequências das outras linhagens. Essa divergência da linhagem foi mais evidente na Pre-BoxB, provavelmente devido à deleção contígua de 15 nucleotídeos e até 9 casos de substituição. Ademais, várias diferenças foram observadas na estrutura primária das regiões D1-D1' e Box B, representadas na Tabela 7. Na qual, a espécie *Oxynema thaianum*, representada pela linhagem CCALA960, mostrou baixa identidade com a linhagem CENA135.

A estrutura secundária da D1-D1' foi conservada em todas as linhagens, porém, a *Oxynema* sp. CENA135 apresentou até 13 substituições quando comparados com as linhagens AP17 e AP24 (Figura 15), gerando uma inclinação na bolha terminal. A configuração da hélice Box B foi bem variável entre as linhagens (Figura 16), assim a deleção de 18 nucleotídeos contíguos e 5 substituições originaram a perda de um abaulamento bilateral para a linhagem de estudo.

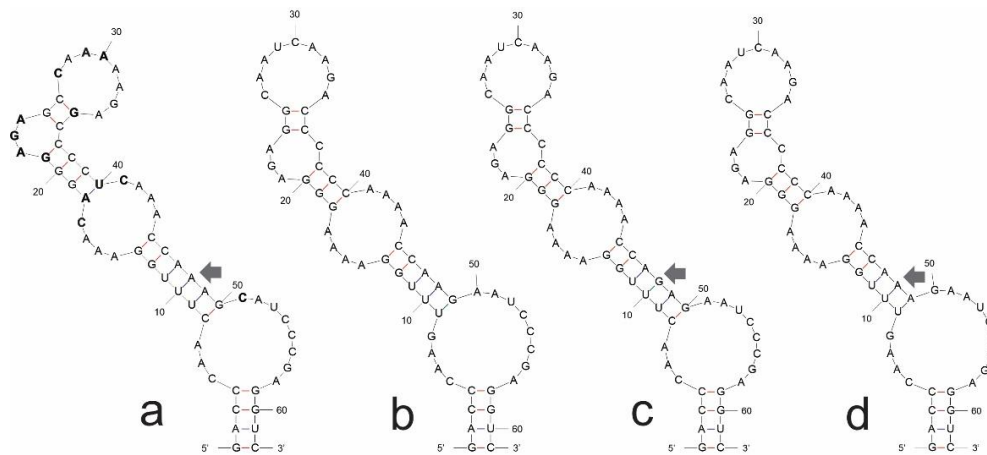
**Tabela 7.** Similaridade das regiões D1-D1' e Box B do ITS 16S-23S. Porção superior contém os valores percentuais de similaridade e a porção inferior o número de nucleotídeos divergentes.

Região	Linhagem	1	2	3	4
<b>D1-D1'</b>	1. <i>Oxynema thaianum</i> CCALA 960		75,8	96,7	98,3
	2. <i>Oxynema</i> sp. CENA135	15		77,4	77,4
	3. <i>Oxynema</i> sp. AP17	2	14		96,7
	4. <i>Oxynema</i> sp. AP24	1	14	2	
<b>BoxB</b>	1. <i>Oxynema thaianum</i> CCALA 960		56,3	92,7	92,7
	2. <i>Oxynema</i> sp. CENA135	24		58,1	58,1
	3. <i>Oxynema</i> sp. AP17	4	23		100
	4. <i>Oxynema</i> sp. AP24	4	23	0	

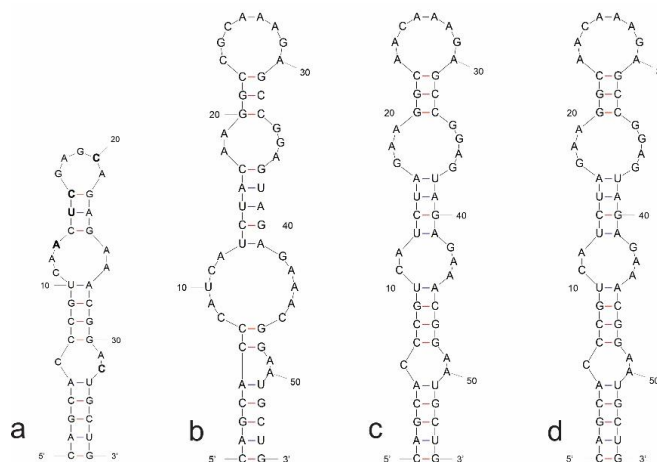
A sequência ITS 16S-23S é frequentemente utilizado em cianobactérias na determinação de espécies, sendo as estruturas secundárias das hélices D1-D1', Box B e V3 as mais comparadas (BOYER, FLECHTNER, & JOHANSEN, 2001; CAIRES et al., 2018; JOHANSEN et al., 2011; MARTINS & BRANCO, 2016). No presente estudo, somente duas destas regiões (D1-D1' e Box B) foram informativas para os membros do gênero *Oxynema*,



cujas estruturas secundárias foram congruentes com o obtido por Chakraborty et al. (2018). Entanto, as diferenças observadas na Pre-Box B forneceram informação importante nas estimativas de similaridade. Desse modo, as linhagens de espécie indeterminada avaliadas diferiram da espécie *Oxynema thaianum* (Linhagem tipo CCALA960). O estudo prévio de Martins et al. (2019), delimitou-se a separação das espécies *Pynacronema brasiliensis* da *P. rubrum* com similaridade menor a 85% nos domínios D1-D1' e Box B. Portanto, a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 poderia representar uma nova espécie do gênero *Oxynema*, de acordo com as análises moleculares realizadas neste trabalho, suportada pelas grandes diferenças morfológicas e ecológicas da linhagem em relação a espécie *Oxynema thaianum*.



**Figura 15.** Estruturas secundárias dos domínios D1-D1' das sequências do espaço intergênico 16S-23S. **a.** *Oxynema* sp. CENA135 **b.** *Oxynema thaianum* CCALA960 **c.** *Oxynema* sp. AP17 **d.** *Oxynema* sp. AP24. A inserção de nucleotídeos está indicada com uma seta.



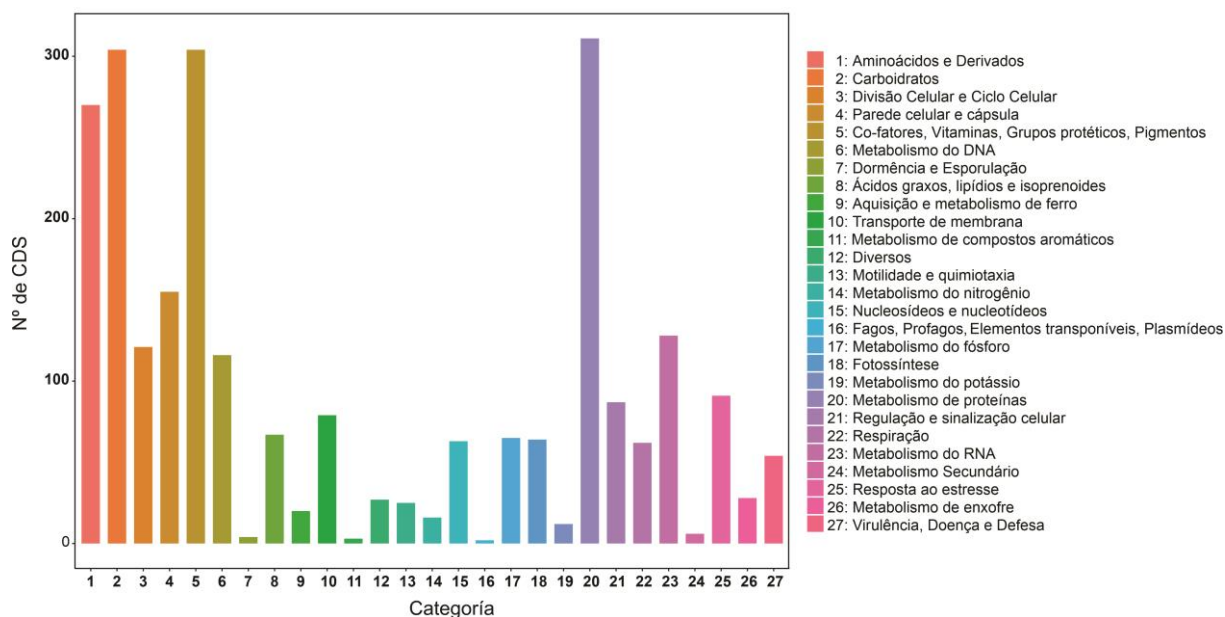
**Figura 16.** Estruturas secundárias dos domínios BoxB das sequências do espaço intergênico 16S-23S. **a.** *Oxynema* sp. CENA135 **b.** *Oxynema thaianum* CCALA960 **c.** *Oxynema* sp. AP17 **d.** *Oxynema* sp. AP24. A inserção de nucleotídeos está indicada com uma seta.

### 5.6. Anotação funcional do genoma de *Oxynema* sp. CENA135

O genoma da *Oxynema* sp. CENA135 constou de 4846 genes preditos, 10 RNAs ribossômicos (RNAr) e 76 RNAs transportadores (RNAt) de acordo com a predição do Prokka. Aproximadamente 46% desses genes codificaram para proteínas hipotéticas ou de funções desconhecidas.

Os genomas procariotos representam uma fonte atrativa de produtos naturais, e, portanto, diferentes métodos de prospecção são aplicados visando principalmente novas descobertas ou a correlação de espécies na síntese de metabólitos secundários. A mineração do genoma utilizando ferramentas bioinformáticas usualmente é o primeiro passo na busca de agrupamentos gênicos biossintéticos conhecidos além de genes potenciais contornando a estrutura de novas vias biossintéticas. Este processo é dependente de bancos de dados de proteínas públicos que são uma parte crucial dos estudos biológicos modernos (OMEERSHFFUDIN; KUMAR, 2019), embora ainda uma grande fração corresponde a proteínas que são designadas a funções hipotéticas. Existem vários métodos in silico disponíveis para as previsões funcionais de proteínas hipotéticas, no entanto estas previsões devam ser comprovadas ainda mais pela análise experimental (SIVASHANKARI; SHANMUGHAVEL, 2006; BENSO et al., 2013; IJAQ et al., 2015).

O servidor RAST forneceu uma visão panorâmica da funcionalidade gênica de *Oxynema*, resultando na identificação 6006 regiões codificantes (CDS). Entre os quais, unicamente 30% foi classificado em 375 subsistemas conhecidos (Figura 17) e o 70% restante foi ligado a processos biológicos ainda desconhecidos.



**Figura 17.** Subsistemas dos rascunhos montados da linhagem *Oxynema* sp. CENA135.

Muitas cianobactérias liberam vários tipos de substâncias biologicamente ativas, como proteínas, vitaminas, carboidratos, aminoácidos, polissacarídeos e fito-hormônios que funcionam como moléculas elicitoras para promover o crescimento das plantas e ajudá-las para combater o estresse biótico e abiótico (SINGH, 2014a). Em congruência, a abundância de CDS nas categorias de aminoácidos e derivados (1); carboidratos (2); parede celular e cápsula (4); co-fatores, vitaminas, grupos protéticos e pigmentos (5); e metabolismo de proteínas (20), foram notáveis no genoma.

Genes envolvidos na biossíntese de auxinas foram detectados na categoria de metabólitos secundários (24). Outra cianobactéria do manguezal, *Phormidium* Sp. MI405019 isolada da rizosfera, também foi observada produzindo o fito-hormônio auxina, ácido indol-3-acético (IAA) em análises de FT-IR e FPLC (BOOPATHI et al., 2013). A relação de ambos microrganismos pertencerem a ambientes de solo ou sedimento próximos a plantas, poderia explicar a capacidade gênica de produzir este tipo de metabólitos. Vários gêneros de cianobactérias já foram relatados como produtores de uma ampla gama de produtos químicos como auxinas, giberelinas e citocininas com efeitos promotores de crescimento em plantas (ALVARENGA, RIGONATO, BRANCO, & FIORE, 2015; TSAVKELOVA, KLIMOVA, CHERDYNTSEVA, & NETRUSOV, 2006).

Na categoria de virulência, doenças e defesa (27), encontraram-se várias regiões codificantes associadas à resistência de antibióticos e compostos tóxicos. Durante a prospecção,

foram observados quadros de leitura abertos (ORFs) que codificariam enzimas envolvidas na resistência de metais pesados como cobre, cobalto, zinco, cádmio, mercúrio e arsênio.

Em um sistema biológico equilibrado, o cobre, zinco e cobalto são microelementos essenciais que participam da fisiologia celular (HUERTAS et al., 2014). Esta homeostase de metais é especialmente importante nas cianobactérias, já que a fotossíntese impõe uma alta demanda de metais como cofatores de várias proteínas (MERCHANT; HELMANN, 2012). No entanto, o cádmio, mercúrio e arsênio não tem uma função biológica, sendo tóxicas em todos os organismos. Uma barreira biológica contra a entrada desses metaloides tóxicos na cadeia alimentar é representada pelas cianobactérias, desencadeando mecanismos de defesa para enfrentar a toxicidade do metal (CASSIER-CHAUVAT; CHAUVAT, 2016).

Genes que participam em mecanismos de sequestro por metalotioneínas, redução de íons metálicos tóxicos em formas menos tóxicas ou biodisponíveis e transporte ativo foram consistentes com os genes identificados no genoma da linhagem. Entretanto, no genoma também foram encontrados genes associados à transformação de arsênio (arsR, arsB e arsC) que reduziriam o arsênio de uma forma tóxica (arsenato, AsV) a outra ainda mais tóxica (arsenito, AsIII), porém este mecanismo poderia ser compensado com a presença do gene arsM (Apêndice D), o qual foi ligado à detoxificação de arsenito como doadores de metil na formação do composto volátil trimetilarsina (YIN et al., 2011; MARAPAKALA et al., 2015). Dessa forma, a linhagem poderia ser uma candidata promissora na biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados.

O potencial da *Oxynema* sp. CENA135 na biorremediação foi testada anteriormente. O estudo de Silva-Stenico et al. (2012), mostrou que a linhagem do manguezal foi capaz de remover os corantes têxteis amarelo palanil 3G, amarelo indantireno 5GF e o índigo BANN 30 que foi completamente degradado. Outras linhagens como *Phormidium autumnale* UTEX1580 (SILVA-STENICO et al., 2012; DELLAMATRICE et al., 2017) e *Leptolyngbya* sp. CENA134 (SILVA-STENICO et al., 2012) também tem sido capazes de remover os mesmos tipos de corantes, que representam às classes azoide (amarelo palanil), antraquinoide (amarelo indantireno) e indigoide (índigo). Apesar dos corantes serem extensivamente utilizados na indústria têxtil, farmacêutica, alimentar e em cosméticos, pouco se sabe do mecanismo gênico de degradação em cianobactérias. Robinson et al. (2001) demonstrou que *Oscillatoria* sp. reduziu com sucesso corantes azo através da enzima azoredutase. Esta enzima catalisa a clivagem redutiva das ligações azo ( $-N = N-$ ) para produzir aminas aromáticas incolores (CLAUS; GUILLOU; ELLERO-SIMATOS, 2016; ZAHRAN et al., 2019). Porém, sequências

que codifiquem para putativos de azoreductase não foram encontradas no genoma, sugerindo que a degradação dos corantes azoide pode estar acontecendo por outra via.

Uma alternativa na biorrediação de corantes são as lacases bacterianas, enzimas oxireductases multicobre (MCOs) envolvidas na degradação de lignina, pigmentação, produção de melanina e resistência ao revestimento de esporos (HULLO et al., 2001; MAYER; STAPLES, 2002; CAMARERO et al., 2005; AFREEN et al., 2017). Recentemente, comprovou-se que a enzima lacase de *Spirulina platensis* CFTRI usando o substrato ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] pode ser eficiente na descolorização de corantes antraquinoides (AFREEN et al., 2017). Algumas lacases de *Streptomyces* foram relacionados à descoloração e desintoxicação de corantes índigo (DUBÉ et al., 2008; BLÁNQUEZ et al., 2019) e azoides (BLÁNQUEZ et al., 2019), melhorando os resultados de acordo ao substrato. Numa abordagem da biologia sintética, a linhagem recombinante de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (NSII-CotA) para expressão heteróloga da lacase (CotA) de *Bacillus subtilis*, industrialmente relevante, foi capaz de descolorir as três classes de corantes (LIANG et al., 2018). Nesse contexto, realizou-se a busca BLAST no genoma da *Oxynema* sp. CENA usando o gene CotA de *B. Subtilis*. Uma sequência de 497 aminoácidos foi similar (29%) a lacase CotA, compreendendo três domínios catalíticos da família cupredoxina. Esta nova lacase de *Oxynema* sp. CENA135 poderia estar envolvida na remoção de corantes têxteis avaliados por Silva-Stenico et al. (2012).

### **5.7. Detecção de potenciais agrupamentos gênicos em *Oxynema* sp. CENA135**

A busca de agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de metabólitos secundários, foi realizada por meio das ferramentas bioinformáticas antiSMASH e BAGEL4. Entre eles, o antiSMASH detectou cinco agrupamentos de tipo sideróforo (1), bacteriocin (2), LAP (1) e terperno. Em adição, o BAGEL4 detectou dois agrupamentos que poderiam estar envolvidos com a síntese de laço-peptídeo e sactipeptídeo. Os agrupamentos gênicos detectados estão resumidos na Tabela 8.

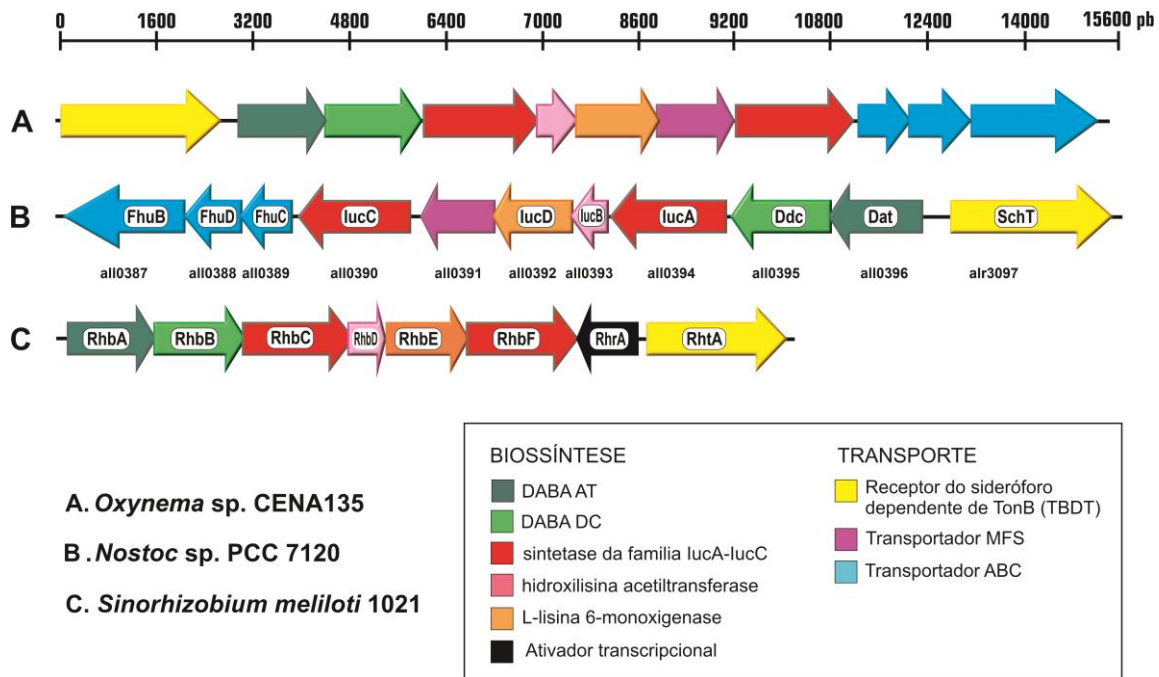
**Tabela 8.** Agrupamentos gênicos preditos no genoma da *Oxynema* sp. CENA135.

Nº	Tamanho (pb)	Categoria	Agrupamento mais similar	Genes Similares - Microrganismo
1	7787	Bacteriocina	não identificado	80% - <i>Calothrix</i> sp. PCC 6303
2	10234	Bacteriocina	não identificado	57% - <i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304
3	16805	Laço-peptídeo	não identificado	-
4	22211	LAP	não identificado	3% - <i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> ATCC 27496
5	19723	Sactipeptídeo	não identificado	-
6	16840	Sideróforo	não identificado	100% - <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
7	20933	Terperno	não identificado	57% - <i>Oscillatoria acuminata</i> PCC 6304

A prospeção manual do genoma revelou outros três agrupamentos gênicos relacionados à síntese de polímeros e hidrocarbonetos. De forma geral, todos os agrupamentos gênicos detectados e genes potenciais foram divididos em categorias para um melhor entendimento. Em referência a estudos que relacionaram a linhagens com a produção de cianotoxinas, adicionou-se uma categoria de toxinas no estudo.

### 5.7.1. Sideróforo e sistemas de exportação

Um agrupamento de 11 genes foi identificado para biossíntese do sideróforo hidroxamato tipo schizokinen e internalização do sideróforo ligado ao ferro (Figura 18).



**Figura 18.** Organização gênica do agrupamento presumidamente responsável da biossíntese e transporte do sideróforo schizokinen no genoma de *Oxytyma* sp. CENA135, em referência aos agrupamentos gênicos de schizokinen em *Nostoc* sp. PCC 7120 e de rhizobactina em *Sinorhizobium meliloti* 1021.

Na montante, localizou-se o gene receptor que codificaria a proteína responsável pelo transporte do sideróforo hidroxamato ligado ao ferro, através da membrana externa. Em vista de existir vários tipos de receptores para sideróforos hidroxamatos, a sequência de aminoácidos deduzida para este gene foi comparada com os transportadores putativos dos sideróforos schizokinen (alr3097, SchT) de *Nostoc* sp. PCC 7120 (NICOLAISEN et al., 2008) e rhizobactina 1021 (RhtA) localizado no plasmídeo pSymA de *Sinorhizobium meliloti* 1021 (LYNCH et al., 2001), além de aerobactina (IutA) de *E. coli* (LORENZO, DE et al., 1986). Em resultado, o gene receptor da *Oxytyma* sp. CENA135 foi 51% similar ao gene SchT de schizokinen, quando comparado com RhtA (28%) de rhizobactina1021 e IutA (31%) de aerobactina.

No sideróforo schizokinen de *Nostoc* sp. PCC 7120, a expressão de SchT foi induzida sob limitação de ferro (NICOLAISEN et al., 2008) e regulada directamente pelo gene FurA, um homólogo do regulador da captação férrica (Fur) em bactérias heterotróficas (GONZÁLEZ et al., 2010). A proteína transportadora do sideróforo é dependente de TonB (TBBDT) e localiza-se na membrana externa, reconhecendo o sideróforo carregado do ferro e translocando este complexo até o periplasma em um processo de transporte ativo dependente do Sistema TonB-ExbB-ExbD (JIANG et al., 2015; GONZÁLEZ et al., 2018; ARSTOL; HOHMANN-

MARRIOTT, 2019). Os genes que codificam para TonB-ExbB-ExbD foram identificados adjacentes ao agrupamento gênico, fato não observado nos agrupamentos das linhagens comparadas, e portanto, uma vantagem no seu sequenciamento por métodos menos abrangentes.

Sequencialmente ao gene receptor foram localizados outros dois genes, Dat e Ddc, que codificariam para as enzimas L-2,4-diaminobutirato:2-cetoglutarato 4-aminotransferase (DABA AT) e L-2,4-diaminobutirato decarboxilase (DABA DC). Os genes envolvidos na biosíntese do sideróforo (IucABCD) foram colindantes a Dat e Ddc. Entre eles, os genes IucA e Iuc C são o núcleo sintético do sideróforo, entretanto o gene IucB codificaria a proteína hidroxilisina acetiltransferase e o gene IucD codificaria a L-lisina 6-monooxigenase. Um gene adicional da superfamília MFS, o qual age como transportador secundário, localizou-se entre os genes IucC e IucD similarmente ao agrupamento gênico de schizokinen em *Nostoc* sp. PCC 7120, e foi ausente nos agrupamentos de rhizobactina 1021 e aerobactina. Finalizando o agrupamento, posicionaram-se os genes FhuBCD que codificariam para o sistema de transporte ABC do sideróforo ligado ao ferro do periplasma ao citoplasma.

Todos os genes envolvidos na biosíntese e o transporte interno mostraram uma similaridade  $\geq 50\%$  às proteínas putativas identificadas para o sideróforo schizokinen em *Nostoc* sp. PCC 7120.

As enzimas DABA AT e DABA DC foram identificadas na produção de 1,3-diaminopropano em *Acinetobacter baumannii* (IKAI; YAMAMOTO, 1997) e em *Vibrio cholerae* (LEE; YEH, 2009). Estes genes também foram encontrados no agrupamento gênico da rhizobactina 1021 de *Sinorhizobium meliloti* (LYNCH et al., 2001; BURRELL et al., 2012). Burrell et al. (2012) demonstraram bioquimicamente a necessidade de 1,3-diaminopropano na biosíntese do sideróforo independente a complexos enzimáticos NRPS em *Anabaena variabilis*, e portanto, a necessidade de um módulo biossintético DABA AT / DABA DC no agrupamento gênico. Na cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC 7002, conhecida pela biosíntese de sideróforos tipo Sinechobactina A-C (ITO; BUTLER, 2005), a enzima DABA AT foi codificada pelo gene SidA e a enzima DABA DC foi codificada pelo gene SidB, de acordo com o agrupamento gênico hipotetizado para este sideróforo (ARSTOL, 2017). Os sideróforos tipo schizokinen são considerados estruturalmente similares a sinechobactina, cuja derivação é dada pela substituição dos ácidos hidroxâmicos por uma longa cadeia de ácidos graxos (ITO; BUTLER, 2005). Esta adição dos ácidos graxos foi designada ao papel hipotético do gene SidH do sideróforo sinechobactina em *Synechococcus* sp. PCC 7002 (ARSTOL, 2017). Na linhagem *Oxynema* sp. CENA135 não foi identificado o gene da derivação de



sinechobactina no agrupamento do sideróforo, pelo que o agrupamento do sideróforo encontrado corresponderia a schizokinen. Esta análise gênica responderia o observado por Silva (2010), na qual a leitura da Resonância Magnética Nuclear (RMN) obtida para linhagem identifica um sideróforo parecido a sinechobactina mas não idêntico.

O sistema de exportação do sideróforo não foi definido para a linhagem. O único modelo de exportação de sideróforos em cianobactérias foi descrito para o tipo schizokinen da *Nostoc* sp. PCC 7120, envolvendo um transportador putativo dependente de TolC (all4025, gene SchE), localizado na membrana interna e que participaria da secreção dos sideróforos. Em adição, outro gene que codifica uma proteína  $\beta$ -barril da família TolC localizada na membrana externa (all2887, gene HgdD) completaria o processo de secreção (NICOLAISEN et al., 2010). Baseados nesse modelo, realizou-se a busca dos genes no genoma da *Oxynema*, identificando um transportador transmembrana da família proteica TolC similar (54%) à ORF all2887 (HgdD) e localizado adjacente a duas ORFs envolvidas na translocação de cobre. Entretanto, um transportador da superfamília MFS foi associada com baixa similiaridade (24%) à ORF all4025 (SchE). Interessantemente, também foi identificado um transportador da família MFS, que codificaria o exportador putativo de enterobactin (EntS), inserto na ilha genômica de resistência N<sup>o</sup>9 predita em Islandviewer para linhagem (Apêndice E) e, por tanto, provalmente ganho por transferência de outro organismo .

Na exportação do sideróforo enterobactina de *E. coli*, o transporte do sideróforo ao periplasma foi mediado por proteínas da superfamília MFS, localizadas na membrana interna (FURRER; SANDERS; MCINTOSH, 2002), enquanto a secreção no meio externo foi dependente de proteínas do tipo TolC (BLEUEL et al., 2005). O homólogo cianobacteriano da proteína tipo TolC codificada pelo gene HgdD foi denominado como proteína de deposição do heterócito glicolipídica D e está envolvida na secreção de proteínas, ácidos graxos (MOSLAVAC et al., 2007), metabólitos secundários tipo antibióticos (HAHN et al., 2012), além do sideróforo schizokinen (NICOLAISEN et al., 2010). Nesse contexto, sugere-se que a ORF identificada no genoma da *Oxynema* sp. CENA135 é homóloga ao gene HgdD da *Nostoc* sp. PCC 7120 e participaria da exportação do sideróforo schizokinen. Porém, a proximidade desse gene com um transportador putativo de cobre (PacS) gerou várias interrogantes sobre a ligação do sideróforo e o cobre. Nicolaisen et al. (2010) demonstraram que em condições de alta concentração de cobre e baixa concentração de ferro, o esquizokinen complexa o cobre e, portanto, o ferro não pode ser transportado com eficiência. Recentemente, verificou-se que o sideróforo yersiniabactina produzido por *E. coli* uropatogênica ligava-se a íons de cobre durante

infecções humanas como medida de proteção ante toxicidade do cobre (KOH; HENDERSON, 2015).

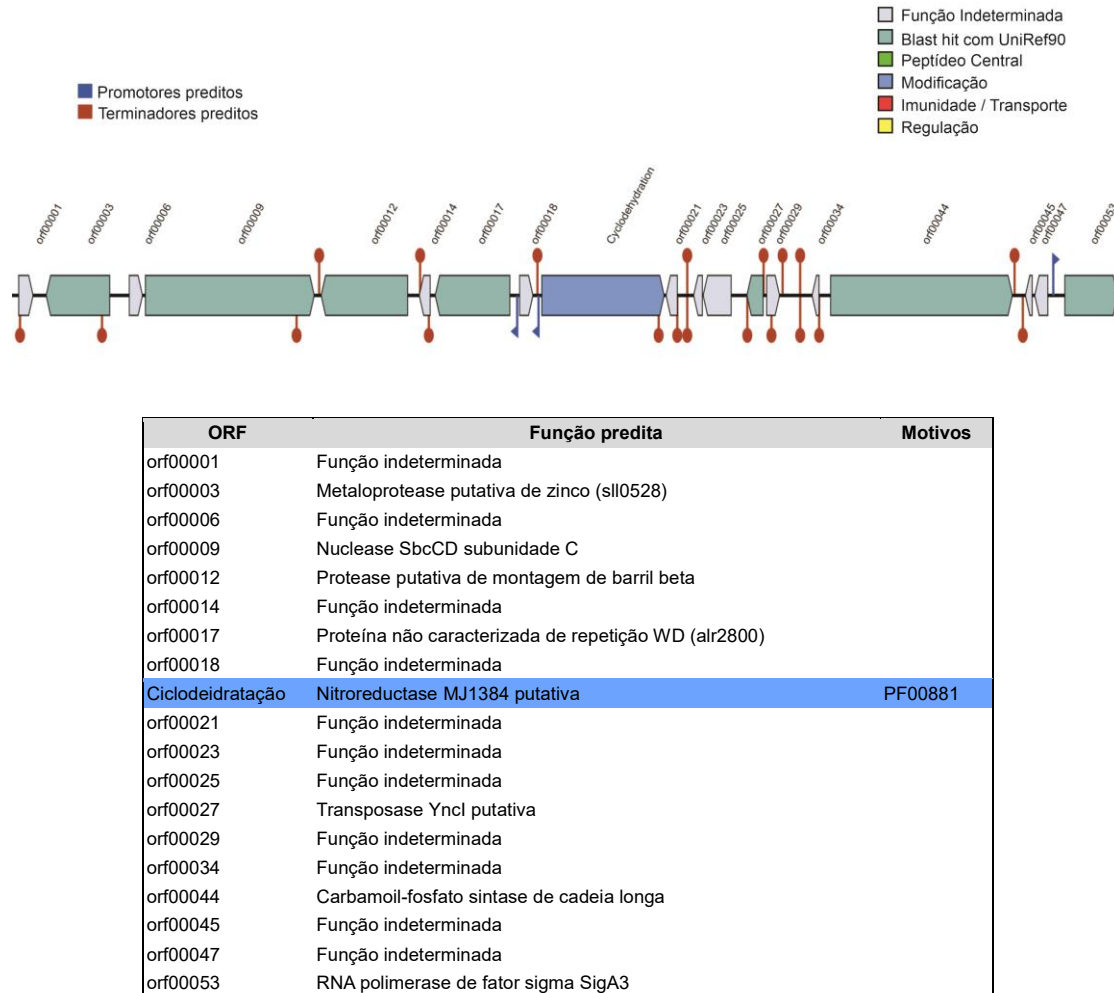
### **5.7.2. Peptídeos de origem ribossômica**

A busca de potenciais agrupamentos gênicos através dos programas AntiSMASH e Bagel, resultou em um total de cinco agrupamentos gênicos envolvidos na síntese de bacteriocinas como produtos naturais do peptídeo ribossômico modificados pós-traducionalmente (PRPTs), dos quais nenhum correspondia a agrupamentos gênicos já relatados anteriormente. Apesar que muitos genes possivelmente associados à maquinaria biossintética tenham codificado para proteínas hipotéticas, entre algumas com funções desconhecidas, genes precursores entre outros responsáveis pela modificação pós-traducional e transporte, foram detectados e curados manualmente. Nesse contexto, dois agrupamentos gênicos de 7,8 Kb e 10,2 Kb de comprimento, envolvidos na síntese de bacteriocinas, foram detectados exclusivamente em AntiSMASH as quais foram denominadas de bacteriocina-a e bacteriocina-b, respectivamente. Cada agrupamento contém seis genes e um peptídeo precursor. Os peptídeos precursores constaram de 69 para bacteriocina-a e de 77 aminoácidos para bacteriocina-b, e um domínio conservado Nif11.

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos naturais que apenas recentemente foram explorados no tratamento e prevenção de infecções microbianas (DICKS; STADEN, VAN; KLUMPERMAN, 2017). Em frequência, numerosos agrupamentos gênicos codificando para bacteriocinas putativas são detectadas em cianobactérias. O estudo de Wang et al. (2011) revelou que pode existir mais de um gene precursor participando da síntese de uma bacteriocina, já que foram detectados 290 precursores no total de 145 agrupamentos preditos, com um rango de comprimento de 28 a 164 aminoácidos. A proteína codificada pelo gene precursor podem ser membros da família de peptídeos líderes da hidratase nitrílica (NHLP) ou da família N11P, a qual é anotada como proteínas fixadoras de nitrogênio Nif11 (HAFT; BASU; MITCHELL, 2010).

O agrupamento gênico de outra bacteriocina foi classificado ao tipo LAP, devido à detecção de um gene que codificaria uma sequência de 736 aminoácidos, putativa de nitroreductase MJ1384 com função de ciclodeidratação. O inferido agrupamento de 22 Kpb de

comprimento também envolve proteínas putativas com atividade protease, polimerase e transposase (Figura 19).



**Figura 19.** Gene possivelmente envolvido na biosíntese de PRPT tipo LAP em *Oxynema* sp. CENA135. Esquema inferido em BAGEL.

Os LAPs são peptídeos lineares contendo azol da classe Id de bacteriocinas, que se distinguem por conter uma variedade de anéis heterocíclicos de tiazol e (metil) oxazol derivados de resíduos de cisteína, serina e treonina por meio da ciclodeidratação dependente de ATP e subsequente desidrogenação dependente de mononucleotídeos de flavina (MELBY; NARD; MITCHELL, 2011; ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016; EGAN et al., 2018). Alguns dos antibióticos mais relevantes são a estreptolisina S, microcina B17 e plantazolicina, cujos agrupamentos gênicos completos ainda não foram detectados em cianobactérias.

Na biossíntese de microcina B17 de *E. coli* e estreptolisina S do patógeno *Streptococcus pyogenes*, os genes que codificam para a ciclodeidratase são McbB/McbD e SagC/SagD, e para

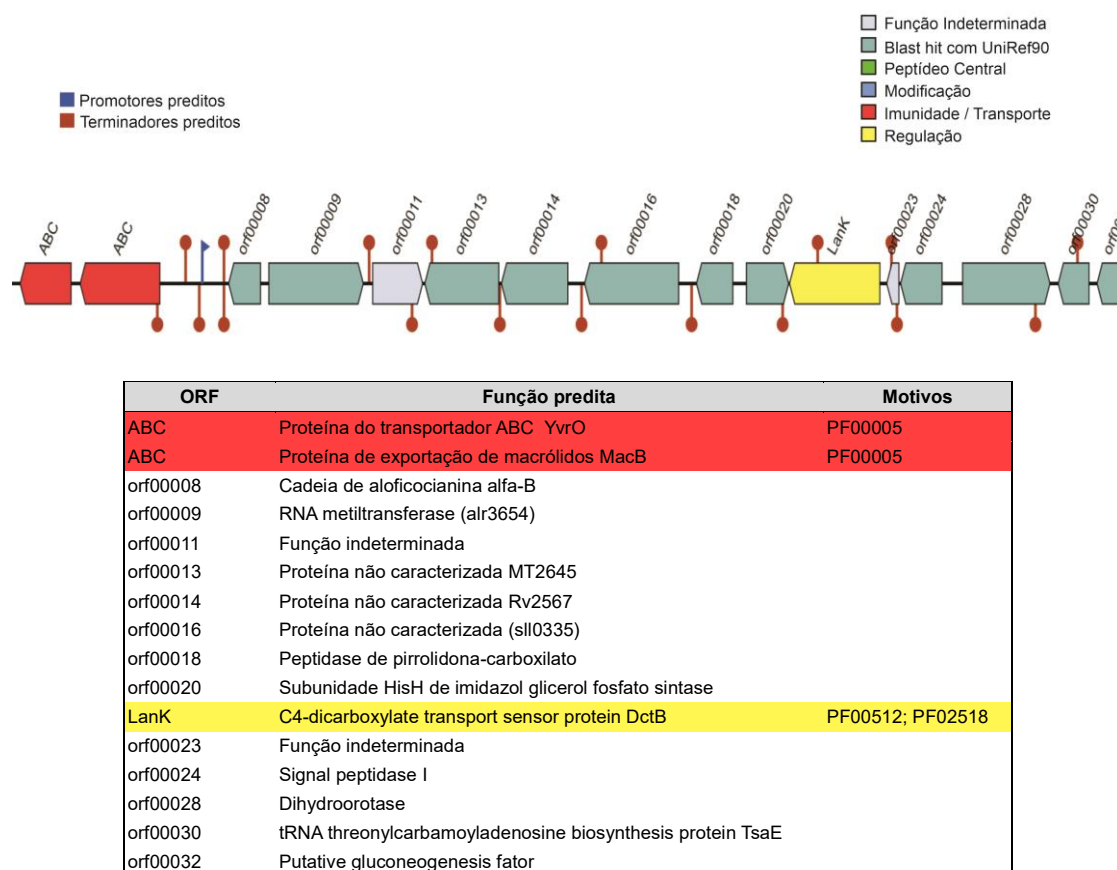
desidrogenase são McbC e SagB, respectivamente, embora mostrem baixa similaridade (LEE et al., 2008). Entre elas, SagD com domínio conservado YcaO ciclodeidratase e dependente de ATP, ativa o esqueleto de amida durante as ciclodeidratações (DUNBAR; MELBY; MITCHELL, 2012). Análogos do SagCD em outros grupos de genes frequentemente encontram-se fundidos como uma única proteína (ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016).

Interessantemente, a sequência da proteína putativa de nitroreductase MJ1384 no genoma da *Oxynema* sp. CENA135 mostrou tanto o domínio conservado YcaO da ciclodeidratase como o domínio da enzima mcbC desidrogenase. Após de verificar a similaridade da proteína através do algoritmo SmartBLAST do NCBI, encontrou-se similaridades inferiores a 31% com apenas três proteínas da família de SagB/ThcOx de *Sulfolobus acidocaldarius* (Nº de acesso WP\_011277427.1), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Nº de acesso NP\_252632.1) e *Microcystis aeruginosa* (Nº de acesso WP\_012266495.1), e com uma proteína de YcaO ciclodeidratase de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Nº de acesso WP\_010876618.1). Este resultado, sugere que a proteína identificada no hipotético agrupamento gênico do antibiótico LAP na linhagem *Oxynema* sp. CENA135 desenvolveria ambos processos em conjuntos, no entanto, não foi possível atribuir funções às ORFs adjacentes para uma melhor inferência.

O agrupamento gênico do antibiótico LAP localizou-se na ilha genômica 1 predita no genoma da *Oxynema*, atribuindo a função de resistência. Da mesma forma, o gene precursor da bacteriocina-a localizou-se na ilha genômica 9 (Apêndice E). Genes envolvidos na síntese de bacteriocinas já foram relatados em elementos genéticos móveis. A distribuição do gene ISLp11 e regiões de mobilização em plasmídeos da pediocina foram detectados entre bactérias do ácido láctico (LAB), sugerindo uma possível transferência de todo o operon da pediocina entre as LAB (MARREC, LE et al., 2000; PETROVIC; NIKSIC; BRINGEL, 2006; REENEN, VAN; ZYL, VAN; DICKS, 2006; DEVI; HALAMI, 2013).

Os agrupamentos gênicos das bacteriocinas laço-peptídeo e sactipeptídeo foram preditas exclusivamente em BAGEL. Os laço-peptídeos são notavelmente resistentes a proteases, ao calor e agentes desnaturantes, e essa alta estabilidade e suas atividades biológicas têm atraído muito interesse (ARNISON et al., 2013; ALLEN et al., 2016), variando desde atividades antimicrobianas como citrocina de *Citrobacter pasteurii* (CHEUNG-LEE et al., 2019) a atividades anticancerígenas de ulleungdina isolada de *Streptomyces* sp. KCB13F003 (SON et al., 2018). A biossíntese dos peptídeos laço requer uma enzima laço ciclase (proteína C) homóloga à asparagina sintase e uma peptidase líder (proteína B) homóloga à transglutaminase (ALLEN et al., 2016). No nível estrutural mais básico, eles consistem em um anel de

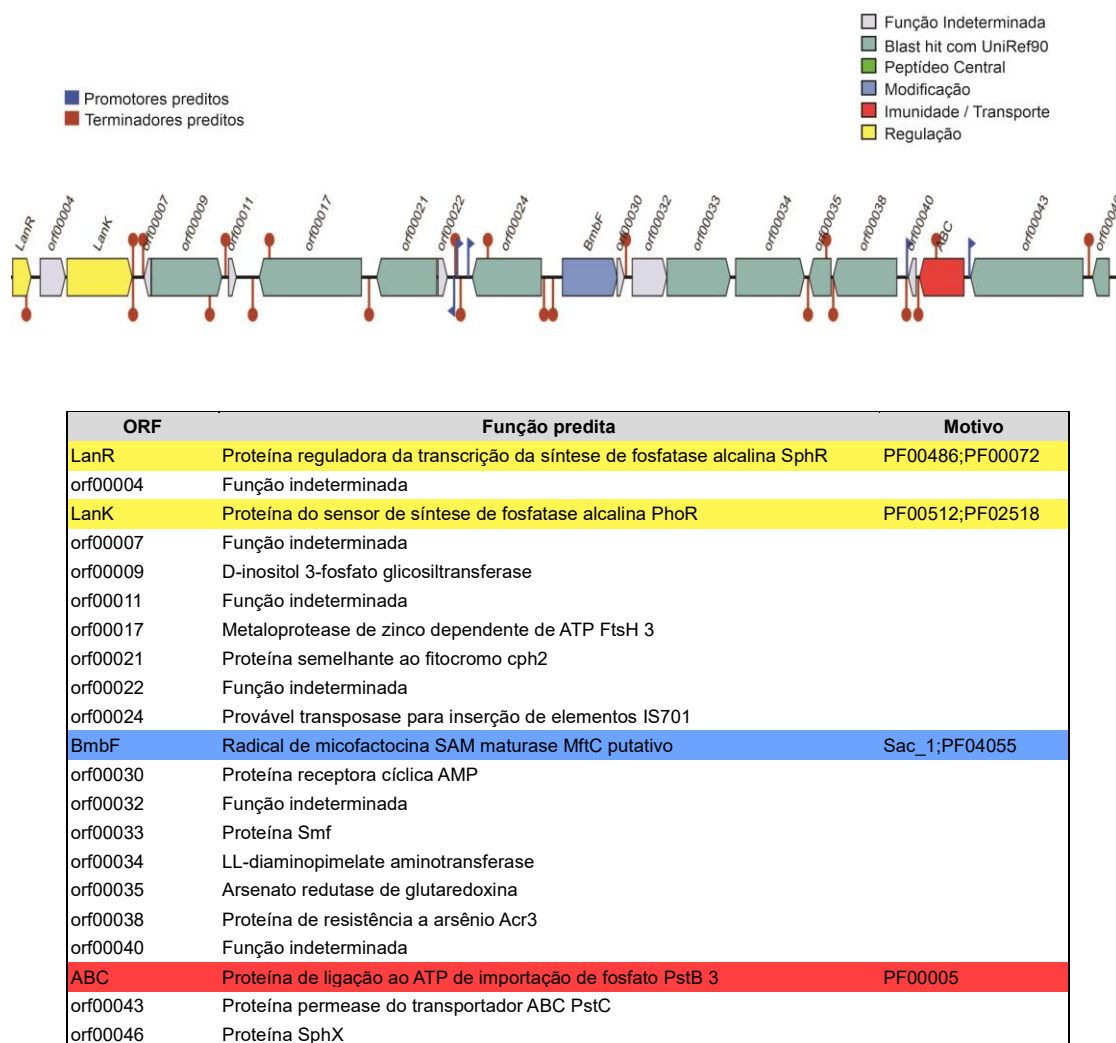
macrolactama composto por sete a nove resíduos e uma cauda peptídica C-terminal linear (HEGEMANN et al., 2015). No agrupamento possivelmente envolvido na síntese de laço-peptídeo em *Oxytnema* não foram determinados com exatidão os genes que codificariam a proteína C e B, porém detectou-se genes que codificariam para transportadores de macrólidos, peptidases, o gene regulador LanK que codificaria a proteína quinase, entre outros genes sem participação determinada (Figura 20).



**Figura 20.** Genes possivelmente envolvidos na biossíntese de PRPT tipo laço-peptídeo em *Oxytnema* sp. CENA135. Esquema inferido em BAGEL.

Ao contrário do agrupamento gênico de laço-peptídeo, no agrupamento da bacteriocina tipo sactipeptídeo foram detectados genes que participariam da modificação, transporte e regulação deste antibiótico. Entre eles, genes que codificariam para uma proteína recombinante de S-adenosilmetionina (rSAM-SeCys) identificada como micofactocina SAM maturase MftC e a proteína receptora cíclica de AMP dependente de quinase, localizaram-se adjacentes (Figura 21). Os genes do sistema regulador de dois componentes, lanR e lanK, que codificariam um regulador de resposta e histidina quinase de forma similar a bacteriocinas tipo lantibióticos (MARSH et al., 2010; DRAPER et al., 2015; FIELD et al., 2015; EGAN et al., 2018). Entretanto,

os genes que codificariam para transportadores ABC do sistema de transporte de fosfato Pst também participariam da internalização de arsênio V (Apêndice D).



**Figura 21.** Genes possivelmente envolvidos na biossíntese de PRPT tipo sactipeptídeo em *Oxytyma* sp. CENA135. Esquema inferido em BAGEL.

A proteína rSAM-SeCys foi determinante na predição de agrupamentos gênicos de sactipeptídeos durante a mineração genômica de bactérias ruminais (AZEVEDO et al., 2015). Nas modificações pós-traducionais participariam das ligações intramoleculares entre o enxofre de cisteína e  $\alpha$ -carbono de outro resíduo (ARNISON et al., 2013).

Em cianobactérias comumente são detectadas PRPTs de tipo cianobactinas e microviridinas, porém de acordo à prospecção realizada neste estudo não foram encontrados os agrupamentos gênicos que envolvam sua síntese.

Estudos *in vitro* comprovaram a atividade antimicrobiana da linhagem *Oxynema* sp. CENA135 contra a bactéria entérica *Salmonella typhimurium* (SILVA et al., 2014) e o potencial para inibir células do câncer de cólon (CT26), além de atividade moderada contra células cancerígenas do pulmão (3LL) (SILVA-STENICO et al., 2013). Recentemente, a linhagem CENA135 foi detectada induzindo apoptoses à linha celular MOLM-13 da leucemia mieloide aguda (LMA) (SHISHIDO et al., 2019). Em vista que metabólitos secundários de origem ribossômico estariam envolvidos a atividades relacionadas, os agrupamentos gênicos preditos no estudo poderiam estar sintetizando metabólitos responsáveis da atividade antimicrobiana e/ou anticancerígena da linhagem.

### 5.7.1. Hidrocarbonetos derivados de ácidos graxos

As cianobactérias produzem hidrocarbonetos alcanos e alcenos com 13 a 17 carbonos de comprimento (SCHIRMER et al., 2010; TAN et al., 2011; WANG; LIU; LU, 2013; SHAKEEL et al., 2015; XIE et al., 2017; KUDO; HAYASHI; ARAI, 2019), que estão naturalmente acumulados nas membranas tilacóides e citoplasmáticas provavelmente induzindo flexibilidade durante a divisão celular, o crescimento, e a associação eficiente de proteínas solúveis ligadas à membrana (LEA-SMITH et al., 2016). Os alcanos são os principais componentes da gasolina, diesel e combustível de aviação (SCHIRMER et al., 2010; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2017). A capacidade inerente de fazer fotossíntese e fácil manipulação genética, convetem às cianobactérias candidatas promissoras na produção de biocombustíveis (WANG; LIU; LU, 2013). Entanto múltiplos estudos visam melhorar o baixo rendimento de produção das cianobactérias.

A via biossintética de alcanos em cianobactérias foi proposta por Schirmer et al. (2010), mediante a coexpressão das orf1593 (Ado) e orf1594 (Aar) de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 em *E. coli*. A via consiste em uma proteína transportadora acil-ACP redutase (Aar) e uma aldeído descarbonilase (Ado), que em conjunto convertem intermediários do metabolismo de ácidos graxos em alcanos e alcenos (SCHIRMER et al., 2010).

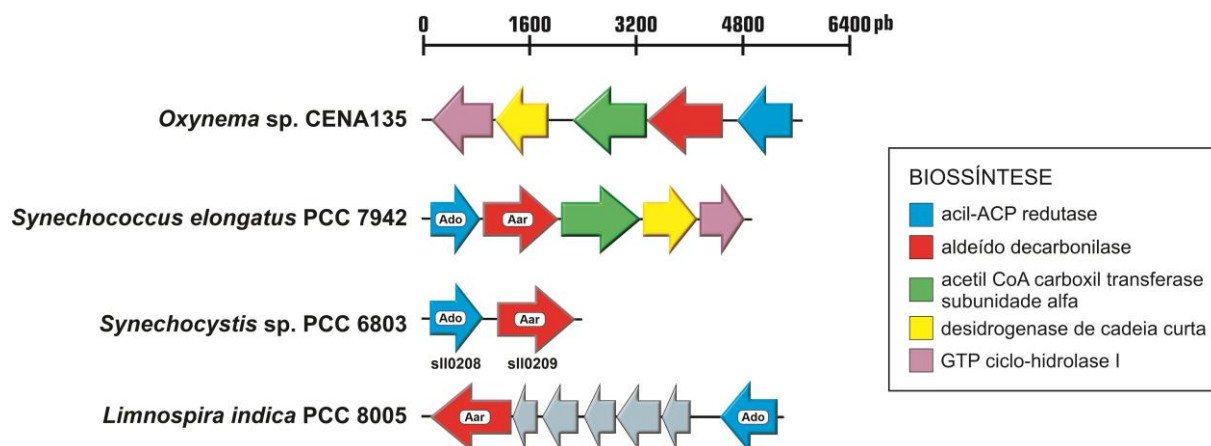
Na linhagem CENA135, o agrupamento gênico envolveu duas ORFs homólogas aos genes Aar e Ado que codificariam para proteínas putativas de acil-ACP redutase e aldeído descarbonilase. As proteínas foram altamente similares, 67% e 73% com as sequências Aar<sub>syn7942</sub> (ORF 1594) e Ado<sub>syn7942</sub> (ORF 1593), respectivamente, da *Synechococcus elongatus*

PCC 7942, linhagem de referência nas análises in silico e experimentais para produção de hidrocarbonetos alcanos.

A proteína acil-ACP redutase é a chave da biossíntese de hidrocarbonetos nas cianobactérias e substituições de aminoácidos simples no gene Aar da *Synechococcus* sp. PCC 7336 incrementaram 70 vezes a produção de hidrocarbonetos, especialmente pentadecano, quando co-expressos com Ado em *E. coli* (KUDO; HAYASHI; ARAI, 2019). Recentemente, a via olefina sintase (OLS) foi descrita em *Synechococcus* sp. PCC 7002, envolvendo a modular policetídeo sintase (PKS) para produzir o terminal alceno (MENDEZ-PEREZ; BEGEMANN; PFLEGER, 2011). Não obstante, vários genomas de cianobactérias foram relatados codificando as vias Aar/Ado ou OLS, mas nunca os dois juntos no mesmo táxon. Coates et al. (2014) indicaram que a produção de hidrocarbonetos é um fenômeno universal nas cianobactérias, e por tanto, todas têm a capacidade produção a partir de ácidos graxos, mas nem todas conseguem isso pela mesma via metabólica, incluindo vias ainda desconhecidas. Uma análise filogenética baseada no operon Aar e Ado de 181 genomas cianobacterianos, revelou que esses genes têm uma evolução semelhante à evolução de cianobactérias, sugerindo que ambos genes poderiam ser conservados no filo (Anexo A). A diferença da via OLS, a qual poderia ser adquirida por transferência horizontal (COATES et al., 2014).

Sequencialmente a estes genes, três genes codificariam para três sequências putativas de acetil-CoA carboxil transferase subunidade alfa (EC 6.4.1.2) (AccA), uma desidrogenase de cadeia curta e GTP ciclo-hidrolase I (EC 3.5.4.16). Estas enzimas putativas foram observadas adjacentes ao operon biosintético (Aar/Ado), variando a sintenia dos agrupamentos gênicos para síntese de alcanos em cianobactérias (Figura 22).





**Figura 22.** Organização gênica do agrupamento presumidamente envolvido na biossíntese de hidrocarbonetos alcanos em *Oxyinema* sp. CENA135. A sintenia de vários agrupamentos cianobacterianos indica a essencialidade dos genes Aar e Ado na síntese de alcanos.

A superexpressão de *accA* em *Synechocystis* levou a um aumento da produção de hidrocarbonetos, particularmente do heptadecano (TAN et al., 2011). A linhagem *Oxyinema* sp. CENA135 foi detectada produzindo o composto heptadecano no perfil volátil de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, juntamente com 2-hexadeceno (ARMSTRONG et al., 2019). No entanto, o gene *AccA* possui um sítio próprio de início da transcrição (SIT) identificado em várias linhagens cianobacterianas, semelhante à separação transcricional de Aar/Ado e possivelmente indicando um regulamento independente (KLAHN et al., 2014). Entanto, a enzima desidrogenase de cadeia curta pertenceu à família SDR de oxidoredutases dependentes de NAD ou NADP, similar a 3-oxoacil- ACP redutase (EC 1.1.1.100) que também participa de da biossíntese de ácidos graxos, congruente com o relatado por KLAHN et al. (2014). Finalmente, a participação do gene para GTP ciclohidrolase I na via biossintética é ainda desconhecida.

### 5.7.2. Polímeros de interesse biotecnológico

Um total de dois agrupamentos gênicos foram identificadas para síntese dos polímeros cianoficina e poli-hidroxicanoatos.

A cianoficina é um biopolímero atraente, com propriedades químicas e materiais adequadas para aplicações industriais nas áreas de alimentos, medicamentos, cosméticos, nutrição e agricultura (FROMMEYER; WIEFEL; STEINBÜCHEL, 2016; TSENG; FANG;

CHEN, 2016; NAUSCH et al., 2016; NAUSCH; BROER, 2017; ARAHAL et al., 2018; DU; LI; ZHOU, 2019a). Cianoficina (ácido multi-L-arginil-poli-L-aspartico) é uma poliamida de reserva rica em nitrogênio/ carbono, distribuída em várias linhagens de cianobactérias e algumas bactérias heterotróficas (WATZER; FORCHHAMMER, 2018), e estrategicamente armazenada durante a noite (LI et al., 2001; MONTI; LUBENSKY; WOLDE, 2018). Este polímero se acumula de maneira evidente sob condições de crescimento desequilibradas, incluindo fase estacionária, estresse leve ou limitação de nutrientes como sulfato, fosfato ou potássio (WATZER et al., 2015; WATZER; FORCHHAMMER, 2018).

A biossíntese é de origem não ribossômica e consiste na regulação do gene cianoficina sintetase (CphA1) a partir dos aminoácidos aspartato e arginina, em uma reação dependente de ATP (ZIEGLER et al., 1998; RICHTER et al., 1999; HEJAZI et al., 2002; WATZER; FORCHHAMMER, 2018; ZHANG; YANG, 2019). A clivagem intracelular da cianoficina a dipeptídeos de  $\beta$ -Asp-Arg é catalizada pelo gene CphB que codifica a cianoficinase, uma enzima hidrolizante encontrada em *Synechocystis* sp. PCC 6803 (RICHTER et al., 1999).

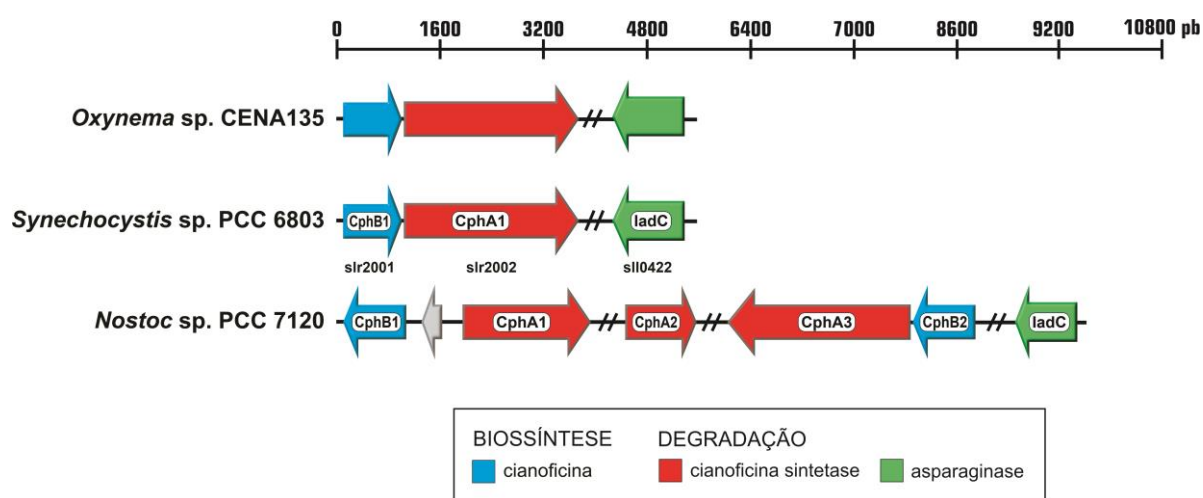
No genoma de *Oxynema*, o agrupamento gênico que envolve a síntese e degradação de cianoficina foi composto por duas ORFs que codificariam a cianoficina sintetase (CphA) e cianoficinase (CphB). Em frequência, ambos genes são detectados adjacentes nos genomas das cianobactérias biossintetizantes (Figura 22).

Na montante, localizou-se a primeira ORF putativa de CphB, que codificaria uma sequência de 287 aminoácidos mostrando 66% de similaridade para cianoficinase (slr2001) da *Synechocystis* sp. PCC 6803. A segunda ORF putativa de CphA codificaria uma sequência de 903 aminoácidos com 72% de similaridade para cianoficina sintetase (slr2002) da mesma linhagem modelo.

As cianobactérias não diazotróficas, como *Oxynema*, geralmente apresentam um único tipo de cianoficina sintetase (CphA1) (WATZER; FORCHHAMMER, 2018). No entanto, um ou vários genes adicionais de CphA e CphB, podem ser encontrados nas cianobactérias fixadoras de nitrogênio desempenhando um papel importante no metabolismo do nitrogênio durante a fixação de  $N_2$  (KLEMKE et al., 2016). Um exemplo pode ser observado no genoma de *Nostoc* sp. PCC 7120 (Figura 22).

Em adição à degradação feita por CphB, a mobilização total da cianoficina envolve a clivagem do dipeptídeo beta-aspartil-arginina em aspartato e arginina realizada pela isoaspartil dipeptidase, relacionada às asparaginases do tipo vegetal (HEJAZI et al., 2002; FLORES; ARÉVALO; BURNAT, 2019). A enzima asparaginase da cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (slr0422), bem como *Nostoc* sp. PCC 7120 (all3922) demonstraram ser sequencialmente

similares à primeira asparaginase clonada de plantas (WATZER; FORCHHAMMER, 2018) e capazes de hidrolizar dipeptídeo beta-aspartil-arginina (HEJAZI et al., 2002). Recentemente, homólogos do referido gene foram denominados IadA em *E. coli* e IadC para as cianobactérias (FLORES; ARÉVALO; BURNAT, 2019). Uma sequência homóloga de 65% de similaridade à ORF sll0422 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 e de 73% de similaridade à ORF all3922 de *Nostoc* sp. PCC 7120, também foi detectada na *Oxynema* sp. CENA135 (Figura 23), provavelmente desenvolvendo as mesmas funções que suas homólogas.

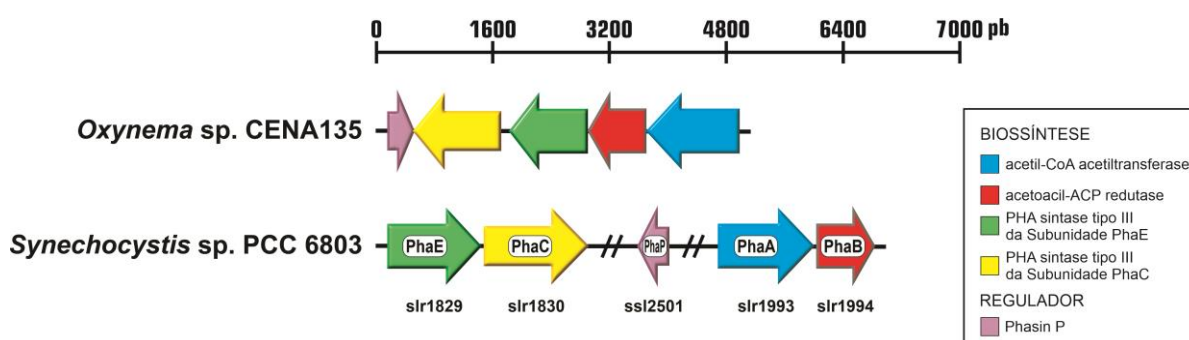


**Figura 23.** Organização gênica do agrupamento presumidamente envolvido na biossíntese e degradação do polímero cianoficina em *Oxynema* sp. CENA135, em referência aos agrupamentos gênicos na cianobactéria não-diazotrófica *Synechocystis* sp. PCC 6803 e a diazotrófica *Nostoc* sp. PCC 7120.

Outro polímero de com grande atenção biotecnológica é o poli-hidroxialcanoato (PHA). Considerados dos bioplásticos mais promissores devido à sua semelhança ao polipropileno derivado do petróleo (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013; MOŽEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016) e sua natureza biodegradável (Balakrishna & Kumarapillai, 2017).

Inúmeras bactérias heterotróficas, e um grupo de cianobactérias biosintetizam PHAs como compostos intracelulares de armazenamento de carbono e energia, acumulados em forma de grânulos insolúveis no citoplasma das células (TROSCHL et al., 2018), até ser utilizados quando o suprimento de carbono for limitado (TARONCHER-OLDENBURG; NISHINA; STEPHANOPOULOS, 2000). Consequentemente, os microrganismos produtores de PHA residem em vários nichos ecológicos expostos natural ou acidentalmente a alta matéria orgânica ou condições limitadas de crescimento (BERLANGA et al., 2006; MUHAMMADI et al., 2015), como o manguezal.

O agrupamento gênico para síntese de PHA na linhagem CENA135, envolveu quatro ORFs que codificariam para putativas de acetil-CoA acetiltransferase da família Thiolase (EC 2.3.1.9) (PhaA), acetoacil-ACP redutase (EC 1.1.1.36) (PhaB) da família desidrogenase-redutases de cadeia curta (SDRs), e as polimerases PHA sintase tipo III da Subunidade PhaE e Subunidade PhaC (Figura 24). As quatro sequências localizaram-se adjacentes na junsante do agrupamento. Entretanto, na montante foi identificada uma sequência putativa de Phasin PhaP, proteína que regularia a relação superfície-volume dos grânulos de PHB (HAUF et al., 2015).



**Figura 24.** Organização gênica do agrupamento presumidamente envolvido na biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) em *Oxytyma* sp. CENA135, em referência ao agrupamento gênico da linhagem produtora *Synechocystis* sp. PCC 6803.

As sequências putativas da biossíntese do polímero foram comparadas por similaridade BLAST com as proteínas putativas PhaA<sub>syn6803</sub> (slr1993), PhaB<sub>syn6803</sub> (slr1994), a polimerase sintetizada por PhaE<sub>syn6803</sub> (slr1829) e PhaC<sub>syn6803</sub> (slr1830) da linhagem modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803. As altas similaridades obtidas (PhaA com 72%, PhaB com 76%, PhaE com 42% e PhaC com 74%), e concordância nos domínios conservados, permitiram verificar a homologia dos genes. Do mesmo modo, a proteína putativa de PhaP foi similar (51%) a PhaP<sub>syn6803</sub> (ssl2501) da linhagem modelo.

Na biossíntese de PHA, a PHA sintase é a principal enzima polimerizante que determina o tipo de PHA a ser produzido pelo microrganismo (Singh & Mallick, 2017). Para tal, o agrupamento corresponderia à síntese de PHAs classe III. O poli-hidroxi-butilato (PHB) é o representante mais importante da classe III dos PHAs (MARKL; GRÜNBICHLER; LACKNER, 2019), formado a partir do precursor acetil CoA e a participação das três enzimas descritas acima (Koller, 2018). Algumas revisões assomem que os genes PhaABCE participam da síntese do tipo PHB (oldenberg), porém o modelo biossintético de PHBs ainda é bastante discutido (CARPINE et al., 2018).

### 5.7.3. Cianotoxinas

As toxinas de cianobactérias constituem uma importante fonte de produtos naturais encontradas em ambientes aquáticos (CARMICHAEL, 1997). Alguns estudos encontraram genes em *Oxynema*, que participam na síntese de cianotoxinas tipo saxitoxinas e microcistinas (VAZ, 2014; SILVA et al., 2014). Visando essa possibilidade, realizou-se a busca de genes envolvidos à síntese de cianotoxinas nas sequências montadas do genoma, comparando a homologia dos genes candidatos por análise de domínios conservados.

As saxitoxinas e análogos são neurotoxinas, comumente associadas a florações de cianobactérias, às "marés vermelhas" causadas por florações de dinoflagelados marinhos e como agente ativo em venenos de moluscos paralíticos (WESTRICK et al., 2010; CUSICK; SAYLER, 2013; LOPES et al., 2015; HE et al., 2016). A sequência completa (~35 kb) do agrupamento gênico da biossíntese STX codifica 26 proteínas (sxtA-sxtZ) na linhagem *Cylindrospermopsis raciborskii* T3, cianobactéria produtora da toxina STX (KELLMANN et al., 2008). Essencialmente, oito proteínas codificadas por esses genes (sxtA, sxtG, sxtB, sxtD, sxtS, sxtU, sxtH/T e sxtI) parecem estar envolvidas diretamente na síntese de STX (KELLMANN et al., 2008; PEARSON et al., 2010; HACKETT et al., 2013). Entre eles, os genes sxtI e sxtA foram detectados por sequenciamento de produtos de PCR, sugerindo a síntese da saxitoxina pela linhagem (VAZ, 2014; SILVA et al., 2014). No entanto, somente os genes sxtH/sxtT, sxtW e sxtO, que codificam para fenilpropionato de dioxigenase, ferredoxina 4-Fe e 4-S e adenililsulfato quinase (KELLMANN et al., 2008), mostraram semelhança com algumas sequências do genoma. A predição funcional da ORF mostrou que a sequência aparentemente homóloga a ferredoxina 4-Fe e 4-S (sxtW) estaria ligada ao transporte de elétrons no fotosistema I.

Por outro lado, microcistinas (MC) estão entre as cianotoxinas hepatotóxicas mais difundidas em águas doces (BURATTI et al., 2017). O sistema sintetase de MC é codificado por dois operons transcritos em *M. aeruginosa*, mcyABC e mcyDEFGHIJ, a partir de um promotor bidirecional central localizado entre mcyA e mcyD (TILLET et al., 2000; DITTMANN; FEWER; NEILAN, 2013; BOUAÏCHA et al., 2019), com variações entre taxóns. Na linhagem *Oxynema*, também foram detectados os genes mcyA (SILVA et al., 2014) e mcyG (VAZ, 2014) a partir de PCR e sequenciamento. Em contraste, sequências homólogas dos genes referidos não foram identificadas no genoma, sendo detectado apenas uma sequência com domínio conservado das metiltransferases, similar (45%) à sequência codificada por mcyJ da *Fischerella* sp. CENA161, anteriormente descrita por Heck et al. (2018). Os resultados foram

coerentes com análises de espectrometria de massas (ES/ES) realizados na linhagem, dando um resultado negativo para microcistina (SILVA-STENICO et al., 2013; VAZ, 2014).

## 5.8. Detecção de bactérias da cianosfera

### 5.8.1. Composição da cianosfera

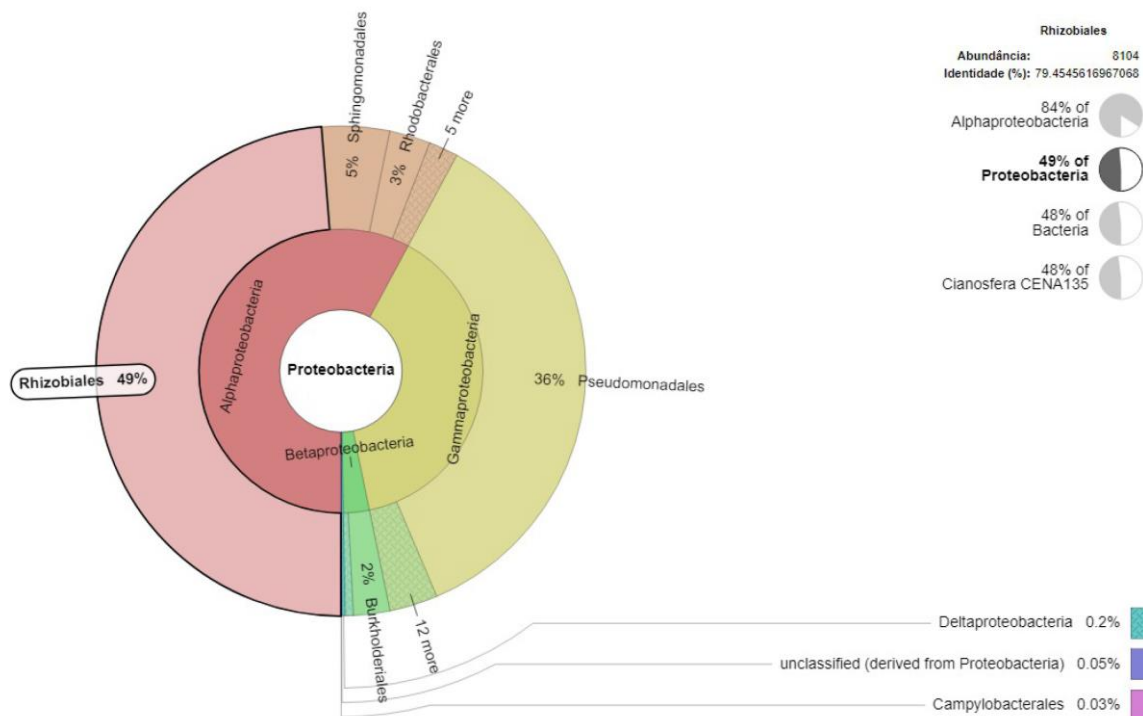
Muitas cianobactérias são circundadas por três camadas mucilaginosas externas de natureza polisacarídea, como a bainha, a capsula e polisacarídeos solúveis (LI; HARDING; LIU, 2001). Em ambientes naturais, os exopolissacarídeos são constantemente colonizados por bactérias e podem originar biofilmes e esteiras microbianas, onde autotróficos e heterotróficos encontram diversas oportunidades de interação (COLE et al., 2014). A interface de interação em comunidades dominadas por cianobactérias foi nomeada de cianosfera, em analogia das rizosferas e filosferas de plantas (Alvarenga et al., 2017)

Com a finalidade de conhecer que microrganismos conformam a cianosfera da cianobactéria do manguezal brasileiro *Oxynema* sp. CENA135 e ainda persistentes aos tratamentos de purificação e lavagem pre-extração do DNA genômico, um total de 7083139 pb em 8042 sequências não cianobacterianas de percentual GC  $63 \pm 5$  %, e recuperadas da montagem em Spades, foram tratados como dados metagenômicos. Uma prévia identificação taxonômica das sequências foi realizada em Blobtools com base de dados nr (*e-value* 5), cujas estimativas por táxon do filo Proteobacteria estão resumidas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Estimativas das sequências de bactérias do filo Proteobacteria associadas a *Oxynema* sp. CENA135, divididas por táxons no nível de classe e ordem.

<b>Táxon</b>	<b>Tamanho total (pb)</b>	<b>Nº de sequências</b>	<b>(G+C) %</b>
<b>Alphaproteobacteria</b>			
Rhizobiales	5341671	2106	60.77
Sphingomonadales	287252	1109	65.09
Rhodobacterales	2343	8	60.78
Caulobacterales	8385	26	60.51
<b>Gammaproteobacteria</b>			
Pseudomonadales	1301384	4371	61.47
Enterobacterales	6097	17	55.44
Alterobacterales	4189	16	51.78
Xanthomonadales	2343	8	60.78
<b>Betaproteobacteria</b>			
Burkholderiales	39985	93	60.33

Em complemento, um perfil taxonômico das sequências foi atingida com a base de dados curada RefSeq (*e-value* 5) do servidor MG-RAST e representadas na Figura 25.



**Figura 25.** Abundância relativa dos táxons pertencentes ao filo Proteobacteria associados a *Oxytoma* sp. CENA135. A divisão taxonômica no nível de classe está indicada no círculo interno e no nível de ordem no círculo externo.

Contudo, já que o que enfoque do estudo foi o genoma da *Oxytoma* e não o sequenciamento das comunidades bacterianas da cianosfera, estes dados representam apenas uma parte da comunidade total.

O 99% das sequências recuperadas corresponderam ao filo Proteobacteria, o qual em sua grande maioria pertenciam às classes Alphaproteobacteria (58%) e Gammaproteobacteria (39%), além de Betaproteobacteria (3%) como o grupo menor. A ordem Rhizobiales foi o grupo mais abundante da classe Alphaproteobacteria e também da cianosfera com 49%. Seguidos das ordens Sphingomonadales (5%), Rhodobacterales (3%) e Caulobacterales (1%). A classe Gammaproteobacteria foram principalmente representadas por bactérias da ordem Pseudomonadales (36%), o segundo grupo mais abundante da cianosfera, e das ordens Enterobacterales, Alteromonadales e Xanthomonadales que atingiram ao menos 1% na abundância do filo Proteobacteria. Nessa condição, a classe Betaproteobacteria foi representada por bactérias da ordem Burkholderiales com 3%.

A distribuição taxonômica e a frequência das associações cianobactéria-bactéria podem ser influenciadas por fatores abióticos, incluindo nutrientes, condições de luz e temperatura, pH e salinidade, além de fatores bióticos (DZIALLAS; GROSSART, 2011, 2012; WOODHOUSE et al., 2018). Uma comparação em culturas de cianobactérias revelou que as comunidades microbianas associadas às linhagens heterocitadas fixadoras de nitrogênio, *Aphanizomenon* e *Dolichospermum* em meio de cultura Z8X sem nitrato, e as linhagens não heterocitadas, *Planktothrix* e *Microcystis* em meio de cultura Z8, variaram na composição e por sua capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono (ZHU et al., 2016). Estas associações específicas de espécies entre cianobactérias e bactérias tinham sido demonstradas em culturas de *Microcystis aeruginosa*, observando que a estrutura da cianosfera foi mais ou menos conservada entre culturas de *M. aeruginosa* que com outras culturas de cianobactérias (SHI et al., 2009). Os microrganismos identificados na cianosfera provavelmente refletem o resultado de uma série de interações entre a linhagem cianobacteriana e os microrganismos remanescentes selecionados pelas condições e procedimentos da cultura, além de mecanismos de competição (ALVARENGA, 2015).

Grande parte das publicações referentes à diversidade de bactérias associadas foram descritas para cianobactérias formadoras de florações, e portanto, o estatuto de conhecimento para a cianosfera de outras linhagens é limitado.

O presente estudo apresentou uma breve informação sobre a comunidade bacteriana associada a *Oxynema* sp. CENA135, a qual foi dominada por Rhizobiales e Pseudomonadales. Adicionalmente, linhagens do gênero *Agrobacterium* e *Rhizobium* da ordem Rhizobiales, e do gênero *Pseudomonas* pertencente à ordem Pseudomonadales, foram inferidas com base na similaridade BLAST de marcadores moleculares bacterianos encontrados entre as sequências da cianosfera e a base de dados GenBank do NCBI (Tabela 10).



**Tabela 10.** Similaridade BLAST de seqüências parciais de marcadores filogenéticos encontrados na cianosfera, em relação a microrganismos depositados na base de dados GenBank.

Gene marcador	Tamanho (pb)	Microrganismo mais próximo	Cobertura (%)	Identidade (%)
16S	936	<i>Rhizobium rosettiformans</i> W3 (NR_116445.1)	99	100
16S-ITS-23S	3366	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01 (CP045854.1)	100	98
23S	980	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01 (CP045854.1)	100	100
23S	1160	<i>Pseudomonas</i> sp. phDV1 (CP031606.1)	100	100
dnaK	1914	<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06 (CP016499.1)	100	95
ftsA	1332	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01 (CP045854.1)	100	94
gyrB	849	<i>Agrobacterium</i> sp. MA01 (CP045854.1)	100	90
recA	329	<i>Agrobacterium</i> sp. RAC06 (CP016499.1)	100	84

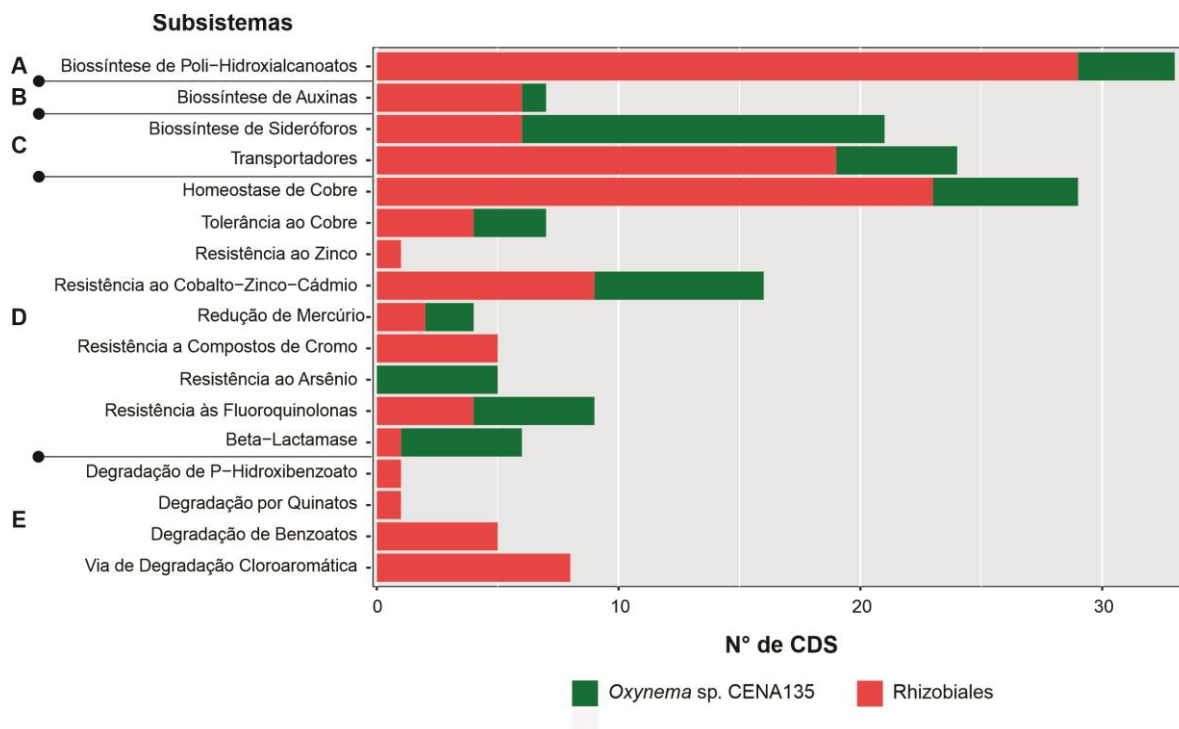
A linhagem *Oxynema* não possui heterócito, célula especializada na fixação biológica de nitrogênio atmosférico, porém, curiosamente encontrou-se intimamente relacionada com as bactérias diazotróficas do gênero *Agrobacterium* e *Rhizobium*, conhecidas por fixar nitrogênio em ambientes naturais, além do gênero *Pseudomonas*. Recentemente, algumas espécies deste último gênero foram descritas como potenciais fixadoras de N<sub>2</sub> em ambientes marinhos (DANG et al., 2013). Em manguezais, bactérias fixadoras de nitrogênio, como membros dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium* e *Klebsiella*, foram isoladas dos sedimentos, rizosfera e superfícies radiculares de várias espécies (SAHOO; DHAL, 2009). Em culturas, dentro de OTUs dominantes de bactérias associadas às cianobactérias *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Planktothrix* e *Microcystis*, foram identificadas OTUs pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Pseudomonas*, semelhante a OTUs de ambientes com alto conteúdo de matéria orgânica, incluindo a rizosfera (ZHU et al., 2016). Não obstante, as atividades específicas na troca de carbono e nitrogênio entre as cianobactérias e bactérias associadas às diferentes espécies, são amplamente desconhecidas, fazendo interessante trabalhos do metabolismo do nitrogênio entre bacterias diazotróficas associadas a cianobactérias não fixadoras em ambientes do manguezal.

Uma observação destacada foi a similaridade 100% de um gene de DNAr 23S, encontrado entre as sequências da cianosfera de *Oxynema*, com a linhagem *Pseudomonas* sp. PhDV1, sugerindo a presença de uma linhagem similar. Em particular, esta bactéria tem habilidade para degradar hidrocarbonetos aromáticos como fenol, tolueno, o-cresol, naftaleno e 1,2,3-trimetilbenzeno, a qual foi comprovada por análise de espectrometria de massas, proteômica em coerência com sua estrutura gênica (POLYMENAKOU; STEPHANOU, 2005; XIE et al., 2019). Diversos isolados de *Pseudomonas* foram ligados à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em estudos anteriores (WU et al., 2018; NZILA, 2018). Além da sua capacidade degradativa, a associação de *Pseudomonas* sp. GM41 à cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC 6803 potencializou o aumento na biomassa da cianobactéria em até 8 vezes, e em até 12 vezes com a adição de hexadecano em 35 dias de crescimento (ABED, 2010).

Na cianosfera, as bactérias intimamente associadas às cianobactérias provavelmente consomem nutrientes liberados, e ao mesmo tempo podem produzir vitaminas e outros fatores úteis para o crescimento das cianobactérias, além de auxiliar na ciclagem de CO<sub>2</sub> e fosfato ou na redução dos níveis de O<sub>2</sub> para processos sensíveis ao oxigênio, como a fixação de nitrogênio (PAERL, 1996; EILER; BERTILSSON, 2004; CUMMINGS et al., 2016).

### **5.8.2. Comparação funcional entre *Oxynema* sp. CENA135 e bactérias associadas**

Rhizobiales foi o grupo mais abundante entre as bactérias associadas a *Oxynema* sp. CENA135. A análise funcional dos rascunhos genômicos deste grupo foi realizada no servidor RAST, obtendo um total de 343 subsistemas conhecidos em uma cobertura de apenas o 27%. Por outro lado, não foi possível a análise nos outros grupos devido à baixa quantidade de informação recuperada. Entretanto, Rhizobiales mostrou regiões codificantes (CDS) envolvidos em funções semelhantes e complementares a *Oxynema* (Figura 26).



**Figura 26.** Comparativa funcional de *Oxytyma* sp. CENA135 e as bactérias associadas da ordem Rhizobiales. Os subsistemas estão classificados de acordo com o servidor RAST na categoria Polímeros derivados de ácidos graxos (A), Hormônios vegetais (B), aquisição e metabolismo de ferro (C), Resistência a antibióticos e compostos tóxicos (D) e Vias periféricas para catabolismo de compostos aromáticos (E).

Genes envolvidos na biossíntese de poliésteres tipo polihidroxicanoatos (PHAs) e auxinas também foram detectados nas Rhizobiales. Os PHAs são compostos de armazenamento de carbono e energia, que ganharam popularidade como 'polímeros verdes', devido a suas propriedades semelhantes a polipropileno ou poliestireno derivados do petróleo e a completa biodegradabilidade no ambiente (Balakrishna & Kumarapillai, 2017). Alguns consórcios microbianos já foram avaliados com a intenção de atingir uma produção estável de polihidroxibutiratos (tipo de PHAs), como por exemplo a cianobactéria *S. elongatus* CscB e a bactéria heterotrófica *Halomonas boliviensis* (WEISS; YOUNG; DUCAT, 2017). De outro lado, a biossíntese de auxinas e também giberelinas são os mecanismos mais comumente relatados em bactérias (Chanway, 2002), devido ao potencial dos fitormônios para melhorar o crescimento das plantas. A promoção do crescimento radicular é uma característica de Rhizobiales em *Arabidopsis thaliana* (GARRIDO-OTER et al., 2018).

Em relação à aquisição e metabolismo de ferro, observou-se que tanto a cianobactéria *Oxytyma* como Rhizobiales mostraram CDS envolvidos na biossíntese de sideróforos. Após a curadoria manual, somente a cianobactéria hospederira apresentou genes envolvidos na biossíntese de sideróforo tipo hidroxamato. No entanto, três genes (FhuA, PupA e PfeA) que

codificariam para putativos de proteínas receptoras de sideróforos foram detectados entre as sequências de Rhizobiales.

A sequência de 716 aminoácidos codificada por FhuA foi 97% similar a uma proteína receptora de *Agrobacterium albertimagni*, disponível no GenBank (N° de acesso WP\_006726458.1). Esta multifuncional proteína fhuA, participou da internalização do sideróforo tipo hidroxamato vicibactina em várias linhagens de *Rhizobium leguminosarum* (STEVENS et al., 1999; YEOMAN et al., 2000; KHANAL, 2018), ferricromo e o antibiótico albomicina, além de conferir sensibilidade para a colicina M, a microcina J25 e os fagos T1, T5,  $\phi$ 80 e UC-1 em *Escherichia coli* (BÖS & BRAUN, 2006; BRAUN ET AL., 1998; BRAUN, 1995; ENDRISS, BRAUN, KILLMANN, & BRAUN, 2003). De forma semelhante a *R. leguminosarum* e *E. coli*, genes homólogos FhuBCD do sistema de transporte ABC e FhuF, envolvido na remoção de ferro de alguns sideróforos do tipo hidroxamato (MATZANKE et al., 2004), foram detectados para Rhizobiales da cianosfera.

Enquanto às sequências de 202 e 332 aminoácidos codificadas respectivamente pelos genes PupA e PfeA foram altamente similares (>96%) a proteínas receptoras de *Agrobacterium*. O gene PupA foi descrito por primeira vez como receptor do sideróforo fluorescente pseudobactina férrica 358 da bactéria *Pseudomonas putida* WCS358 (BITTER et al., 1991). Entretanto, o gene PfeoA age como receptor do sideróforo enterobactina tipo catecolato, típico de *Pseudomonas aeruginosa* (MOYNIÉ et al., 2019).

A relação de genes envolvidos na recepção e internalização de sideróforos encontrados nas sequências de Rhizobiales e o fato de que possivelmente não apresentem genes próprios envolvidos na biossíntese destes quelantes de ferro, sugerem que o grupo das Rhizobiales poderiam ser capazes de adquirir ferro mediante a internalização de sideróforos sintetizados por outros microrganismos, como pseudomonadales e inclusive a cianobactéria hospedeira.

A estrutura gênica de resistência a antibióticos e compostos tóxicos, como metais pesados, foi semelhante entre a cianobactéria estudada e as rhizobiales associadas. Com exceção do agrupamento para resistência e detoxificação de arsênio somente identificado no genoma da *Oxynema*, e os genes envolvidos na resistência a compostos de cromo detectados nas Rhizobiales.

Em contraste, genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos foram exclusivos do grupo associado. Algumas espécies de cianobactérias são capazes de crescer na presença de poluentes industriais e simultaneamente remover hidrocarbonetos aromáticos (SUNDARAM; SOUMYA, 2011), por exemplo a cianobactéria marinha *Phormidium valderianum*, que removeu fenol por atividade das enzimas lacase e polifenol oxidase

(SHASHIREKHA; UMA; SUBRAMANIAN, 1997); *Anabaena* foi relacionada à transformação de 2,4,6-trinitrotolueno (PAVLOSTATHIS; JACKSON, 2002) e antraceno (PATEL; KUMAR; KHAN, 2015); entre outras cianobactérias dos gêneros *Agmenellum*, *Aphanocapsa*, *Coccochloris*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Phormidium*, incluindo *Anabaena*, foram relatadas transformando naftaleno (CERNIGLIA; BAALEN, VAN; GIBSON, 1980; CERNIGLIA; GIBSON; BAALEN, VAN, 1980; KUMAR; MURALITHARAN; THAJUDDIN, 2009). As cianobactérias se tornaram um dos hospedeiros mais atraentes para a produção biotecnológica, devido ao seu metabolismo intensivo, alta capacidade proliferativa e relativa facilidade de manipulação genética (ŻYSZKA-HABERECHT; NIEMCZYK; LIPOK, 2019).

Em outros casos, as cianobactérias hospedeiras podem estimular a atividade catalítica de hidrocarburos aromáticos das bactérias associadas. Dado o exemplo de *Pseudomonas*, anteriormente descrita por seu potencial na biodegradação, a qual foi levemente estimulada pelos exsudatos de *Pseudanabaena* PP16 (KIRKWOOD; NALEWAJKO; FULTHORPE, 2006) na remoção do fenol. A exclusividade na degradação de hidrocarbonetos por microrganismos da cianosfera foi demonstrada em *Phormidium animale*, isolado de tapetes contaminados de petróleo sem capacidade degradativa para estes compostos (CHAILLAN et al., 2006). Aparentemente a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos é realizada de maneira eficiente quando as cianobactérias e bactérias associadas interagem em consorcio (ICHOR; GBERIKON; NEVKAA, 2016). A competição por recursos e a cooperação para a redução de poluentes entre essas duas guildas de microrganismos, determinaria o sucesso da engenharia do consórcio e, ao mesmo tempo, aproveitar o potencial biotecnológico dos parceiros (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2011).

## 6. CONCLUSÕES

- A abordagem polifásica sugere que a linhagem *Oxynema* sp. CENA135 é uma nova espécie do gênero, entretanto, mais genomas necessitam ser sequenciados e disponibilizados para uma confirmação mais precisa.
- O genoma da linhagem brasileira *Oxynema* sp. CENA135 é o primeiro do gênero e a mineração por genes e agrupamentos gênicos envolvidos na biossíntese de produtos naturais mostrou o potencial dessa linhagem para a produção de diversos metabólitos bioativos e na biorremediação. Com a obtenção desse genoma, observou-se que os relatos da literatura indicando o potencial da *Oxynema* sp. CENA135 em sintetizar microcistinas e saxitoxinas, os quais foram baseados em sequenciamento a partir de PCR, não se sustentam, uma vez que foram identificados somente fragmentos de alguns genes dessas toxinas.
- A maioria das sequências da comunidade bacteriana associada à cianobactéria em cultura correspondeu às ordens Rhizobiales e Pseudomonadales. Uma comparação funcional entre os membros do grupo predominante Rhizobiales e a cianobactéria *Oxynema*, evidenciou que ambos apresentam genes envolvidos na síntese de alguns metabólitos similares. Outra observação é a possível complementariedade de função entre a cianobactéria e as Rhizobiales associadas. Verificou-se que a CENA135 apresenta o agrupamento gênico da biossíntese de sideróforo, enquanto as Rhizobiales possuem genes potencialmente envolvidos com a síntese de proteínas receptoras e transportadoras de sideróforos. As Rhizobiales também exibem genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos, o que não foi observado na cianobactéria hospedeira, evidenciando um possível mecanismo de proteção para a linhagem CENA135.



## REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M. Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 58–64, 2010. Elsevier.
- AFREEN, S.; SHAMSI, T. N.; BAIG, M. A.; AHMAD, N.; FATIMA, S.; QURESHI, M. I.; HASSAN, M. I.; FATMA, T. A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. (E. A. Permyakov, Ed.) **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175144, 2017. Public Library of Science.
- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014. John Wiley and Sons Ltd.
- ALFARO-ESPINOZA, G.; ULLRICH, M. S. Bacterial N<sub>2</sub>-fixation in mangrove ecosystems: insights from a diazotroph-mangrove interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 445, 2015. Frontiers Research Foundation.
- ALLEN, C. D.; CHEN, M. Y.; TRICK, A. Y.; LE, D. T.; FERGUSON, A. L.; LINK, A. J. Thermal Unthreading of the Lasso Peptides Astexin-2 and Astexin-3. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 11, p. 3043–3051, 2016. American Chemical Society.
- ALVARENGA, D. O. DE. **Análise genômica e funcional da cianobactéria Nostoc sp. CENA67 e caracterização da sua comunidade microbiana associada**, 2015. Tese de doutorado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Univeridade de São Paulo, Piracicaba.
- ALVARENGA, D. O.; FIORE, M. F.; VARANI, A. M. A Metagenomic Approach to Cyanobacterial Genomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–16, 2017.
- ALVARENGA, D. O.; RIGONATO, J.; HENRIQUE ZANINI BRANCO, L.; SOARES MELO, I.; FATIMA FIORE, M. *Phyllonema aviceniicola* gen. nov., sp. nov. and *Foliisarcina bertiogensis* gen. nov., sp. nov., epiphyllic cyanobacteria associated with *Avicennia schaueriana* leaves. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 689–700, 2016.
- ALVARENGA, D.; RIGONATO, J.; BRANCO, L. H. Z.; FIORE, M. F. Cyanobacteria in mangrove ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 4, p. 799–817, 2015. Kluwer Academic Publishers.
- ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2939–2951, 2016. Springer Verlag.
- AMIN, S. **The role of siderophores in algal-bacterial interactions in the marine environment**, 2010. These. University of California, San Diego.



- ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C. F.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; MELO, I. S. DE. The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. (A. M. Ibekwe, Ed.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38600, 2012. Public Library of Science.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 215–237, 2003. Elsevier.
- ARAHAL, D. R.; LUCENA, T.; RODRIGO-TORRES, L.; PUJALTE, M. J. *Ruegeria denitrificans* sp. nov., a marine bacterium in the family Rhodobacteraceae with the potential ability for cyanophycin synthesis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 2515–2522, 2018.
- ARMSTRONG, L.; VAZ, M. G. M. V.; GENUÁRIO, D. B.; FIORE, M. F.; DEBONSI, H. M. Volatile Compounds Produced by Cyanobacteria Isolated from Mangrove Environment. **Current Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 575–582, 2019. Springer New York LLC.
- ARNISON, P. G.; BIBB, M. J.; BIERBAUM, G.; BOWERS, A. A.; BUGNI, T. S.; BULAJ, G.; CAMARERO, J. A.; DONK, W. A. VAN DER; et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, n. 1, p. 108–160, 2013.
- ARSTOL, E. **Iron Uptake in the Cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC7002**, 2017. Norwegian University of Science and Technology Department.
- ARSTOL, E.; HOHMANN-MARRIOTT, M. F. Cyanobacterial Siderophores—Physiology, Structure, Biosynthesis, and Applications. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 281, 2019. MDPI AG.
- AZEVEDO, A. C.; BENTO, C. B. P.; RUIZ, J. C.; QUEIROZ, M. V.; MANTOVANI, H. C. Distribution and Genetic Diversity of Bacteriocin Gene Clusters in Rumen Microbial Genomes. (H. Nojiri, Ed.) **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7290–7304, 2015.
- AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MCNEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.
- BALAKRISHNA PILLAI, A.; KUMARAPILLAI, H. K. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Recent trends in production and applications. **Recent advances in Applied Microbiology**. p.19–53, 2017. Springer Singapore.
- BALHESTEROS, H.; CAULOBACTER, E. M.; CAULOBACTER, E. M. **Caracterização do papel de dois fatores sigma de função extracitoplasmática da família FecI em *Caulobacter crescentus***, 2014. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.;

- PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.
- BENSO, A.; CARLO, S. DI; UR REHMAN, H.; POLITANO, G.; SAVINO, A.; SURAVAJHALA, P. A combined approach for genome wide protein function annotation/prediction. **Proteome Science**, v. 11, n. Suppl 1, p. S1, 2013. BioMed Central Ltd.
- BERLANGA, M.; MONTERO, M. T.; HERNÁNDEZ-BORRELL, J.; GUERRERO, R. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. **Internal Microbiology**, v. 9, p. 95–102, 2006.
- BHUVANESHWARI, T.; DEVIRAM, G. V. N. S.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Validation of Selected Oscillatoriales from Various Indian Coasts through Phenetic and 16S rRNA Gene. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 944–952, 2016.
- BITTER, W.; MARUGG, J. D.; WEGER, L. A. DE; TOMMASSEN, J.; WEISBEEK, P. J. The ferric-pseudobactin receptor PupA of *Pseudomonas putida* WCS358: homology to TonB-dependent *Escherichia coli* receptors and specificity of the protein. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 647–655, 1991.
- BLÁNQUEZ, A.; RODRÍGUEZ, J.; BRISSOS, V.; MENDES, S.; MARTINS, L. O.; BALL, A. S.; ARIAS, M. E.; HERNÁNDEZ, M. Decolorization and detoxification of textile dyes using a versatile *Streptomyces* laccase-natural mediator system. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 913–920, 2019. Elsevier B.V.
- BLEUEL, C.; GROSSE, C.; TAUDTE, N.; SCHERER, J.; WESENBERG, D.; KRAUSS, G. J.; NIES, D. H.; GRASS, G. TolC Is Involved in Enterobactin Efflux across the Outer Membrane of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6701–6707, 2005. American Society for Microbiology Journals.
- BLIN, K.; MEDEMA, M. H.; KAZEMPOUR, D.; FISCHBACH, M. A.; BREITLING, R.; TAKANO, E.; WEBER, T. antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. W204–W212, 2013.
- BOETZER, M.; HENKEL, C. V.; JANSEN, H. J.; BUTLER, D.; PIROVANO, W. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. **Bioinformatics**, v. 27, n. 4, p. 578–579, 2011.
- BOOPATHI, T.; BALAMURUGAN, V.; GOPINATH, S.; SUNDARARAMAN, M. Characterization of IAA Production by the Mangrove Cyanobacterium *Phormidium* sp. MI405019 and Its Influence on Tobacco Seed Germination and Organogenesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 4, p. 758–766, 2013. Springer.
- BÖS, C.; BRAUN, V. Specific in vivo thiol-labeling of the FhuA outer membrane ferrichrome transport protein of *Escherichia coli* K-12: evidence for a disulfide bridge in the predicted gating loop. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 2, p. 311–319, 2006. Oxford University Press (OUP).

- BOTO, K. G.; WELLINGTON, J. T. Seasonal variations in concentrations and fluxes of dissolved organic and inorganic materials in a tropical, tidally-dominated, mangrove waterway\*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 50, p. 151–160, 1988.
- BOUAÏCHA, N.; MILES, C. O.; BEACH, D. G.; LABIDI, Z.; DJABRI, A.; BENAYACHE, N. Y.; NGUYEN-QUANG, T. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. **Toxins**, v. 11, n. 12, p. 714, 2019. MDPI AG.
- BOYER, S. L.; FLECHTNER, V. R.; JOHANSEN, J. R. Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 6, p. 1057–1069, 2001.
- BRAUN, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 295–307, 1995. No longer published by Elsevier.
- BUCH, B.; MARTINS, M. D.; BRANCO, L. H. Z. A widespread cyanobacterium supported by polyphasic approach: proposition of *Koinonema pervagatum* gen. & sp. nov. (Oscillatoriales) 1. (M. Vis, Ed.) **Journal of Phycology**, v. 53, n. 5, p. 1097–1105, 2017.
- BURATTI, F. M.; MANGANELLI, M.; VICHI, S.; STEFANELLI, M.; SCARDALA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1049–1130, 2017. Springer Verlag.
- BURRELL, M.; HANFREY, C. C.; KINCH, L. N.; ELLIOTT, K. A.; MICHAEL, A. J. Evolution of a novel lysine decarboxylase in siderophore biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 2, p. 485–499, 2012. John Wiley & Sons, Ltd.
- CAIRES, T. A.; MATTOS LYRA, G. DE; HENTSCHEKE, G. S.; GUSMÃO PEDRINI, A. DE; SANT'ANNA, C. L.; CASTRO NUNES, J. M. DE. *Neolyngbya* gen. nov. (Cyanobacteria, Oscillatoriaceae): A new filamentous benthic marine taxon widely distributed along the Brazilian coast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 120, n. June 2017, p. 196–211, 2018. Elsevier.
- CALTEAU, A.; FEWER, D. P.; LATIFI, A.; COURSIN, T.; LAURENT, T.; JOKELA, J.; KERFELD, C. A.; SIVONEN, K.; PIEL, J.; GUGGER, M. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.
- CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009.
- CAMARERO, S.; IBARRA, D.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1775–1784, 2005. American Society for Microbiology.

- CARMICHAEL, W. W. The Cyanotoxins. **Advances in Botanical Research**, v. 27, p. 211–256, 1997. Academic Press.
- CARPINE, R.; RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; HELLINGWERF, K. J.; POLLIO, A.; SALATINO, P.; MARZOCHELLA, A. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production by *Synechocystis* PCC6803 from CO<sub>2</sub>: Model development. **Algal Research**, v. 29, p. 49–60, 2018. Elsevier B.V.
- CARROLL, C. S.; MOORE, M. M. Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 4, p. 356–381, 2018. Informa Healthcare USA, Inc.
- CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012.
- CASAMATTA, D.; STANIĆ, D.; GANTAR, M.; RICHARDSON, L. L. Characterization of *Roseofilum reptotaenium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. et sp. nov. isolated from Caribbean black band disease. **Phycologia**, v. 51, n. 5, p. 489–499, 2012.
- CASSIER-CHAUVAT, C.; CHAUVAT, F. Genomics of the Resistance to Metal and Oxidative Stresses in Cyanobacteria. **Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria**. v. 2, p.1154–1164, 2016. Hoboken, NJ, USA: Wiley Blackwell.
- CASTENHOLZ, R. W.; WILMOTTE, A.; HERDMAN, M.; RIPPKA, R.; WATERBURY, J. B.; ITEMAN, I.; HOFFMANN, L. Phylum BX. Cyanobacteria. In: Springer (Ed.); **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. p.473–599, 2001. New York, NY: Springer New York.
- CERNIGLIA, C. E.; BAALEN, C. VAN; GIBSON, D. T. Metabolism of Naphthalene by the Cyanobacterium *Oscillatoria* sp., Strain JCM. **Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 485–494, 1980. Microbiology Society.
- CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T.; BAALEN, C. VAN. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. **Journal of General Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 495–500, 1980. Microbiology Society.
- CHAILLAN, F.; GUGGER, M.; SALIOT, A.; COUTÉ, A.; OUDOT, J. Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. **Chemosphere**, v. 62, n. 10, p. 1574–1582, 2006. Pergamon.
- CHAKRABORTY, S.; MARUTHANAYAGAM, V.; ACHARI, A.; MAHANSARIA, R.; PRAMANIK, A.; JAISANKAR, P.; MUKHERJEE, J. *Oxynema aestuarii* sp. nov. (Microcoleaceae) isolated from an Indian mangrove forest. **Phytotaxa**, v. 374, n. 1, p. 24, 2018.
- CHALLIS, G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBioChem**, v. 6, p. 601–611, 2005.

- CHATCHAWAN, T.; KOMÁREK, J.; STRUNECKÝ, O.; ŠMARDA, J.; PEERAPORNPIHAL, Y. *Oxynema*, a New Genus Separated from the Genus *Phormidium* (Cyanophyta). **Cryptogamie, Algologie**, v. 33, n. 1, p. 41–59, 2012.
- CHAUMEIL, P.-A.; MUSSIG, A. J.; HUGENHOLTZ, P.; PARKS, D. H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. (J. Hancock, Ed.) **Bioinformatics**, p. 1–3, 2019.
- CHEUNG-LEE, W. L.; PARRY, M. E.; JARAMILLO CARTAGENA, A.; DARST, S. A.; LINK, A. J. Discovery and structure of the antimicrobial lasso peptide citrocin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 17, p. 6822–6830, 2019.
- CHO, J.-C.; TIEDJE, J. Bacterial Species Determination from DNA-DNA Hybridization by Using Genome Fragments and DNA Microarrays. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 8, p. 3677–3682, 2001.
- CHUN, J.; OREN, A.; VENTOSA, A.; CHRISTENSEN, H.; ARAHAL, D. R.; COSTA, M. S. DA; ROONEY, A. P.; YI, H.; XU, X.-W.; MEYER, S. DE; TRUJILLO, M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018.
- CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 2, p. 316–324, 2014.
- CIUFO, S.; KANNAN, S.; SHARMA, S.; BADRETDIN, A.; CLARK, K.; TURNER, S.; BROVER, S.; SCHOCH, C. L.; KIMCHI, A.; DICUCCIO, M. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 2386–2392, 2018. Microbiology Society.
- CLAUS, S. P.; GUILLOU, H.; ELLERO-SIMATOS, S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 2, n. 1, p. 16003, 2016. Nature Publishing Group.
- COATES, R. C.; PODELL, S.; KOROBAYNIKOV, A.; LAPIDUS, A.; PEVZNER, P.; SHERMAN, D. H.; ALLEN, E. E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Characterization of Cyanobacterial Hydrocarbon Composition and Distribution of Biosynthetic Pathways. (B. Xu, Ed.) **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85140, 2014.
- COIL, D. A.; JOSPIN, G.; DARLING, A. E.; WALLIS, C.; DAVIS, I. J.; HARRIS, S.; EISEN, J. A.; HOLCOMBE, L. J.; O'FLYNN, C. Genomes from bacteria associated with the canine oral cavity: A test case for automated genome-based taxonomic assignment. (G. Moreno-Hagelsieb, Ed.) **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0214354, 2019.
- COLE, J. K.; HUTCHISON, J. R.; RENSLOW, R. S.; KIM, Y.-M.; CHRISLER, W. B.; ENGELMANN, H. E.; DOHNALKOVA, A. C.; HU, D.; METZ, T. O.; FREDRICKSON, J. K.; LINDEMANN, S. R. 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, 2014. Frontiers Research Foundation.

- CORNELIS, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1637–1645, 2010. Springer.
- CORNET, L.; BERTRAND, A. R.; HANIKENNE, M.; JAVAUX, E. J.; WILMOTTE, A.; BAURAIN, D. Metagenomic assembly of new (sub)polar Cyanobacteria and their associated microbiome from non-axenic cultures. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 9, 2018.
- CORNET, L.; MEUNIER, L.; VLIERBERGHE, M. VAN; LÉONARD, R. R.; DURIEU, B.; LARA, Y.; MISZTAK, A.; SIRJACOBS, D.; JAVAUX, E. J.; PHILIPPE, H.; WILMOTTE, A.; BAURAIN, D. Consensus assessment of the contamination level of publicly available cyanobacterial genomes. (F. Rodriguez-Valera, Ed.) **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200323, 2018.
- CUMMINGS, S. L.; BARBÉ, D.; LEO, T. F.; KOROBAYNIKOV, A.; ENGENE, N.; GLUKHOV, E.; GERWICK, W. H.; GERWICK, L. A novel uncultured heterotrophic bacterial associate of the cyanobacterium *Moorea producens* JHB. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 198, 2016. BioMed Central Ltd.
- CUSICK, K.; SAYLER, G. An Overview on the Marine Neurotoxin, Saxitoxin: Genetics, Molecular Targets, Methods of Detection and Ecological Functions. **Marine Drugs**, v. 11, n. 12, p. 991–1018, 2013. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- DANG, H.; YANG, J.; LI, J.; LUAN, X.; ZHANG, Y.; GU, G.; XUE, R.; ZONG, M.; KLOTZ, M. G. Environment-Dependent Distribution of the Sediment nifH -Harboring Microbiota in the Northern South China Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 121–132, 2013. American Society for Microbiology.
- DELLAMATRICE, P. M.; SILVA-STENICO, M. E.; MORAES, L. A. B. DE; FIORE, M. F.; MONTEIRO, R. T. R. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 25–31, 2017. Elsevier Editora Ltda.
- DEMAY, J.; BERNARD, C.; REINHARDT, A.; MARIE, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. **Marine Drugs**, 30. May. 2019. MDPI AG.
- DEVI, S. M.; HALAMI, P. M. Detection of mobile genetic elements in pediocin PA-1 like producing lactic acid bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 555–561, 2013.
- DICKS, L. M. T.; STADEN, A. D. P. VAN; KLUMPERMAN, B. Bacteriocins and Nanotechnology. **Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection**. p.267–288, 2017. Elsevier.
- DINIZ, C.; CORTINHAS, L.; NERINO, G.; RODRIGUES, J.; SADECK, L.; ADAMI, M.; SOUZA-FILHO, P. Brazilian Mangrove Status: Three Decades of Satellite Data Analysis. **Remote Sensing**, v. 11, n. 7, p. 808, 2019. MDPI AG.
- DITTMANN, E.; FEWER, D. P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 23–43, 2013. John Wiley & Sons, Ltd.

- DITTMANN, E.; GUGGER, M.; SIVONEN, K.; FEWER, D. P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 642–652, 2015. Elsevier Ltd.
- DRAPER, L. A.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Lantibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 2, p. 171–191, 2015.
- DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; MCMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564–582, 2006. American Society for Microbiology.
- DU, J.; LI, L.; ZHOU, S. Microbial production of cyanophycin: From enzymes to biopolymers. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107400, 2019a.
- DU, J.; LI, L.; ZHOU, S. Microbial production of cyanophycin: From enzymes to biopolymers. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107400, 2019b. Elsevier.
- DUARTE, R. T. D.; NÓBREGA, F.; NAKAYAMA, C. R.; PELLIZARI, V. H. Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology. **International Journal of Astrobiology**, v. 11, n. 4, p. 325–333, 2012.
- DUBÉ, E.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; DANEALD, C.; BEAUREGARD, M. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 4, p. 597–603, 2008. Springer.
- DUNBAR, K. L.; MELBY, J. O.; MITCHELL, D. A. YcaO domains use ATP to activate amide backbones during peptide cyclodehydrations. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 6, p. 569–575, 2012.
- DUPERRON, S.; BENIDDIR, M. A.; DURAND, S.; LONGEON, A.; DUVAL, C.; GROS, O.; BERNARD, C.; BOURGUET-KONDRACKI, M.-L. New Benthic Cyanobacteria from Guadeloupe Mangroves as Producers of Antimicrobials. **Marine Drugs**, v. 18, p. 16, 2019. MDPI AG.
- DZIALLAS, C.; GROSSART, H.-P. Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. **Marine Biology**, v. 159, n. 11, p. 2389–2398, 2012. Springer.
- DZIALLAS, C.; GROSSART, H. P. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1632–1641, 2011. John Wiley & Sons, Ltd.
- EDDY, S. R. Accelerated Profile HMM Searches. (W. R. Pearson, Ed.) **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 10, p. e1002195, 2011.
- EGAN, K.; FIELD, D.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D.; HILL, C. In silico Prediction and Exploration of Potential Bacteriocin Gene Clusters Within the Bacterial Genus *Geobacillus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2116, 2018. Frontiers Media S.A.

- EILER, A.; BERTILSSON, S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1228–1243, 2004. John Wiley & Sons, Ltd.
- ENDRISS, F.; BRAUN, M.; KILLMANN, H.; BRAUN, V. Mutant Analysis of the Escherichia coli FhuA Protein Reveals Sites of FhuA Activity. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 16, p. 4683–4692, 2003. American Society for Microbiology Journals.
- FIELD, D.; COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bioengineering of the model lantibiotic nisin. **Bioengineered**, v. 6, n. 4, p. 187–192, 2015. Taylor and Francis Inc.
- FLORES, E.; ARÉVALO, S.; BURNAT, M. Cyanophycin and arginine metabolism in cyanobacteria. **Algal Research**, v. 42, p. 101577, 2019. Elsevier.
- FROMMEYER, M.; WIEFEL, L.; STEINBÜCHEL, A. Features of the biotechnologically relevant polyamide family “cyanophycins” and their biosynthesis in prokaryotes and eukaryotes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 153–164, 2016.
- FURRER, J. L.; SANDERS, D. N.; HOOK-BARNARD, I. G.; MCINTOSH, M. A. Export of the siderophore enterobactin in Escherichia coli: Involvement of a 43 kDa membrane exporter. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1225–1234, 2002. John Wiley & Sons, Ltd.
- FURRER, J. L.; SANDERS, D. N.; MCINTOSH, M. A. Export of the siderophore enterobactin in Escherichia coli: involvement of a 43 kDa membrane exporter. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1225–1234, 2002.
- GAONKAR, T. Eubacterial Siderophores and Factors Modulating Their Production. In: S. Borkar (Ed.); **Bioprospects of Coastal Eubacteria**. p.1–294, 2015. Cham: Springer International Publishing.
- GARRIDO-OTER, R.; NAKANO, R. T.; DOMBROWSKI, N.; MA, K. W.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 1, p. 155–167.e5, 2018. Cell Press.
- GEER, L. Y. CDART: Protein Homology by Domain Architecture. **Genome Research**, v. 12, n. 10, p. 1619–1623, 2002. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- GENUÁRIO, D. B. **Cianobactérias em ecossistemas de manguezais: isolamento, morfologia e diversidade genética**, 2010. Dissertação de mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; SANTOS, S. N.; KAVAMURA, V. N.; MELO, I. S. Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments. In: S. Das; H. R. Dash (Eds.); **Microbial Diversity in the Genomic Era**. 1st ed., p.265–284, 2019. Elsevier.
- GHIZELINI, A. M.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; MACRAE, A. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments: a mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1242–1254, 2012. SBM.



- GONZÁLEZ, A.; BES, M. T.; BARJA, F.; PELEATO, M. L.; FILLAT, M. F. Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 Reveals New Targets for This Regulator Involved in Photosynthesis, Iron Uptake and Cellular Morphology. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 11, p. 1900–1914, 2010. Oxford Academic.
- GONZÁLEZ, A.; FILLAT, M. F.; BES, M.-T.; PELEATO, M.-L.; SEVILLA, E. The Challenge of Iron Stress in Cyanobacteria. **Cyanobacteria**, 2018. InTech.
- GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T.; VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81–91, 2007.
- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QCAST: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 2013.
- HACKETT, J. D.; WISECAVER, J. H.; BROSNAHAN, M. L.; KULIS, D. M.; ANDERSON, D. M.; BHATTACHARYA, D.; PLUMLEY, F. G.; ERDNER, D. L. Evolution of Saxitoxin Synthesis in Cyanobacteria and Dinoflagellates. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 1, p. 70–78, 2013.
- HAFT, D. H.; BASU, M. K.; MITCHELL, D. A. Expansion of ribosomally produced natural products: a nitrile hydratase- and Nif11-related precursor family. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 70, 2010.
- HAHN, A.; STEVANOVIC, M.; MIRUS, O.; SCHLEIFF, E. The TolC-like Protein HgdD of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 Is Involved in Secondary Metabolite Export and Antibiotic Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 41126–41138, 2012. American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, , n. 41, p. 95–98, 1999.
- HASLER, P.; DVORAK, P.; POULICKOVA, A.; CASAMATTA, D. A. A novel genus *Ammassolinea* gen. nov. (Cyanobacteria) isolated from sub-tropical epipelagic habitats. **Fottea**, v. 14, n. 2, p. 241–248, 2014.
- HAUF, W.; WATZER, B.; ROOS, N.; KLOTZ, A.; FORCHHAMMER, K. Photoautotrophic Polyhydroxybutyrate Granule Formation Is Regulated by Cyanobacterial Phasin PhaP in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. (M. J. Pettinari, Ed.) **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 13, p. 4411–4422, 2015. American Society for Microbiology.
- HE, X.; LIU, Y.-L.; CONKLIN, A.; WESTRICK, J.; WEAVERS, L. K.; DIONYSIOU, D. D.; LENHART, J. J.; MOUSER, P. J.; SZLAG, D.; WALKER, H. W. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. **Harmful Algae**, v. 54, p. 174–193, 2016. Elsevier B.V.
- HECK, K.; ALVARENGA, D. O.; SHISHIDO, T. K.; VARANI, A. M.; DÖRR, F. A.; PINTO, E.; ROUHIAINEN, L.; JOKELA, J.; SIVONEN, K.; FIORE, M. F. Biosynthesis of microcystin hepatotoxins in the cyanobacterial genus *Fischerella*. **Toxicon**, v. 141, p. 43–50, 2018.

- HECK, K.; SILVA, G.; OLIVEIRA, D.; GOMES, M.; VIEIRA, M.; MELLO, A. DE; FÁTIMA, M. Evaluating methods for purifying cyanobacterial cultures by qPCR and high-throughput Illumina sequencing: Evaluating methods for purifying cyanobacterial cultures by qPCR and high-throughput Illumina sequencing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 129, n. August, p. 55–60, 2016. Elsevier B.V.
- HEEL, A. J. VAN; JONG, A. DE; SONG, C.; VIEL, J. H.; KOK, J.; KUIPERS, O. P. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W278–W281, 2018.
- HEGEMANN, J. D.; ZIMMERMANN, M.; XIE, X.; MARAHIEL, M. A. Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 7, p. 1909–1919, 2015. American Chemical Society.
- HEIDARI, F.; ZIMA, J.; RIAHI, H.; HAUER, T. New simple trichal cyanobacterial taxa isolated from radioactive thermal springs. **Fottea**, v. 18, n. 2, p. 137–149, 2018. Fottea.
- HEJAZI, M.; PIOTUKH, K.; MATTOW, J.; DEUTZMANN, R.; VOLKMER-ENGERT, R.; LOCKAU, W. Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases. **Biochemical Journal**, v. 364, n. 1, p. 129–136, 2002. Portland Press Ltd.
- HERDMAN, M.; KERFELD, C. A.; SHIH, P. M.; DAVENPORT, K. W.; WOYKE, T.; FEWER, D. P.; LAURENT, T.; RUBIN, E. M.; LATIFI, A.; AXEN, S. D.; GUGGER, M.; EISEN, J. A.; TALLA, E.; CALTEAU, A.; TANDEAU DE MARSAC, N.; SIVONEN, K.; NOLAN, M.; COURSIN, T.; CAI, F.; WU, D.; HAN, C. S.; GOODWIN, L.; RIPPKA, R. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 1053–1058, 2013.
- HETRICK, K. J.; DONK, W. A. VAN DER. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural product discovery in the genomic era. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 36–44, 2017.
- HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 637, 2010.
- HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAS. System of cyanoprokaryotes ( cyanobacteria ) – state in 2004. **Algological Studies**, v. 117, p. 95–115, 2005.
- HOKMOLLAHI, F.; RIAHI, H.; SOLTANI, N.; SHARIATMADARI, Z.; MEYBODI, M. H. H. A taxonomic study on non-heterocystous filamentous cyanoprokaryotes from soil of Yazd province, Iran **Iranian Journal of Botany**, 2017.
- HORIYAMA, T.; NISHINO, K. AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in Escherichia coli. (A. Cloeckaert, Ed.) **PLoS ONE**, v. 9, p. e108642, 2014. Public Library of Science.
- HUDSON, G. A.; MITCHELL, D. A. RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 61–69, 2018. Elsevier Current Trends.

- HUERTAS, M.; LÓPEZ-MAURY, L.; GINER-LAMIA, J.; SÁNCHEZ-RIEGO, A.; FLORENCIO, F. Metals in Cyanobacteria: Analysis of the Copper, Nickel, Cobalt and Arsenic Homeostasis Mechanisms. **Life**, v. 4, n. 4, p. 865–886, 2014.
- HULLO, M.-F.; MOSZER, I.; DANCHIN, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. CotA of *Bacillus subtilis* Is a Copper-Dependent Laccase. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5426–5430, 2001. American Society for Microbiology Journals.
- HYATT, D.; CHEN, G.; LOCASCIO, P. F.; LAND, M. L.; LARIMER, F. W.; HAUSER, L. J. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 119, 2010.
- ICHOR, T.; GBERIKON, G. M.; NEVKAA, D. Biodegradation of Phenanthrene by a Consortium of Aerobic Heterotrophic Bacteria and Cyanobacteria in Petroleum Hydrocarbon Polluted Brackish Water of Bodo Creek. **Microbiology Journal**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2016. Science Alert.
- IJAQ, J.; CHANDRASEKHARAN, M.; PODDAR, R.; BETHI, N.; SUNDARARAJAN, V. S. Annotation and curation of uncharacterized proteins- challenges. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 119, 2015. Frontiers Media S.A.
- IKAI, H.; YAMAMOTO, S. Identification and analysis of a gene encoding L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4-aminotransferase involved in the 1,3-diaminopropane production pathway in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 16, p. 5118–5125, 1997. American Society for Microbiology.
- ISHIDA, T. Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 1, p. 79–82, 2001.
- ITEMAN, I.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N.; HERDMAN, M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF180968 and AF180969 for ITS-L and ITS-S, respective. **Microbiology**, v. 146, n. 6, p. 1275–1286, 2000.
- ITO, Y.; BUTLER, A. Structure of synechobactins , new siderophores of the marine cyanobacterium. **Limnol. Oceanogr**, v. 50, n. 6, p. 1918–1923, 2005.
- JAHOĐÁŘOVÁ, E.; DVOŘÁK, P.; HAŠLER, P.; HOLUŠOVÁ, K.; POULÍČKOVÁ, A. *Elainella* gen. nov.: a new tropical cyanobacterium characterized using a complex genomic approach. **European Journal of Phycology**, v. 53, n. 1, p. 39–51, 2018. Taylor & Francis.
- JAIN, C.; RODRIGUEZ-R, L. M.; PHILLIPPY, A. M.; KONSTANTINIDIS, K. T.; ALURU, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**, v. 102, p. 5114, 2005.
- JENG, R. S.; SVIRCEV, A. M.; MYERS, A. L.; BELIAEVA, L.; HUNTER, D. M.; HUBBES, M. The use of 16S and 16S–23S rDNA to easily detect and differentiate common Gram-negative orchard epiphytes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 1, p. 69–77, 2001. Elsevier.

- JIANG, H.-B.; LOU, W.-J.; KE, W.-T.; SONG, W.-Y.; PRICE, N. M.; QIU, B.-S. New insights into iron acquisition by cyanobacteria: an essential role for ExbB-ExbD complex in inorganic iron uptake. **The ISME Journal**, v. 9, n. 2, p. 297–309, 2015. Nature Publishing Group.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, L.; CABALLERO, A.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; SEGURA, A. Microbial alkane production for jet fuel industry: motivation, state of the art and perspectives. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 103–124, 2017. John Wiley and Sons Ltd.
- JOHANSEN, J. R.; KOVACIK, L.; CASAMATTA, D. A.; IKOVÁ, K. F.; KAŠTOVSKÝ, J. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). **Nova Hedwigia**, v. 92, n. 3, p. 283–302, 2011.
- JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H.-Y.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; QUINN, A. F.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; YONG, S.-Y.; LOPEZ, R.; HUNTER, S. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014.
- KAJITANI, R.; TOSHIMOTO, K.; NOGUCHI, H.; TOYODA, A.; OGURA, Y.; OKUNO, M.; YABANA, M.; HARADA, M.; NAGAYASU, E.; MARUYAMA, H.; KOHARA, Y.; FUJIYAMA, A.; HAYASHI, T.; ITOH, T. Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. **Genome Research**, v. 24, n. 8, p. 1384–1395, 2014.
- KANG, C. H.; NAM, Y. DO; CHUNG, W. H.; QUAN, Z. X.; PARK, Y. H.; PARK, S. J.; DESMONE, R.; WAN, X. F.; RHEE, S. K. Relationship between genome similarity and DNA-DNA hybridization among closely related bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 945–951, 2007.
- KANG, D. D.; LI, F.; KIRTON, E.; THOMAS, A.; EGAN, R.; AN, H.; WANG, Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. **PeerJ**, v. 7, n. 7, p. e7359, 2019.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**. v. 40, p.81–251, 2001. Academic Press.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 2019.
- KELLMANN, R.; MIHALI, T. K.; JEON, Y. J.; PICKFORD, R.; POMATI, F.; NEILAN, B. A. Biosynthetic Intermediate Analysis and Functional Homology Reveal a Saxitoxin Gene Cluster in Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 13, p. 4044–4053, 2008. American Society for Microbiology.
- KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 103–111, 2018. Elsevier GmbH.

- KHANAL, S. **Identification of “fluA” Like Genes in Rhizobium leguminosarum ATCC 14479 and its Role in Vicibactin Transport and Investigation of Heme Bound Iron Uptake System**, 2018. Electronic Theses and Dissertations. Paper 3354. <https://dc.etsu.edu/etd/3354>.
- KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z.-B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1407–1424, 2013. Springer Verlag.
- KIRKWOOD, A. E.; NALEWAJKO, C.; FULTHORPE, R. R. The Effects of Cyanobacterial Exudates on Bacterial Growth and Biodegradation of Organic Contaminants. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 1, p. 4–12, 2006. Springer.
- KLAHN, S.; BAUMGARTNER, D.; PFREUNDT, U.; VOIGT, K.; SCHÄFFNER, V.; STEGLICH, C.; HESS, W. R. Alkane Biosynthesis Genes in Cyanobacteria and Their Transcriptional Organization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2, n. JUL, 2014. Frontiers Media S.A.
- KLEMKE, F.; NÜRNBERG, D. J.; ZIEGLER, K.; BEYER, G.; KAHMANN, U.; LOCKAU, W.; VOLKMER, T. CphA2 is a novel type of cyanophycin synthetase in N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria. **Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 526–536, 2016. Microbiology Society.
- KOH, E.-I.; HENDERSON, J. P. Microbial Copper-binding Siderophores at the Host-Pathogen Interface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 18967–18974, 2015. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
- KOMÁREK, J. Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. **ALGAE**, v. 21, n. 4, p. 349–375, 2006.
- KOMÁREK, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria : principles and applications A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria : principles and applications. **European Journal of Phycology**, v. 51, n. 3, p. 346–353, 2016. Taylor & Francis.
- KOMÁREK, J. Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system. **Hydrobiologia**, v. 811, p. 7–17, 2018.
- KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MARES, J.; JOHANSEN, J. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, p. 295–335, 2014.
- KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, v. 86, p. 295–335, 2014.
- KONSTANTINIDIS, K.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 102, p. 2567–2572, 2005.
- KRAEMER, S. M.; CROWLEY, D. E.; KRETZSCHMAR, R. Geochemical Aspects of Phytosiderophore-Promoted Iron Acquisition by Plants. **Advances in Agronomy**, v. 91, p. 1–46, 2006. Academic Press.

- KRANZLER, C.; RUDOLF, M.; KEREN, N.; SCHLEIFF, E. Iron in Cyanobacteria. **Genomics of Cyanobacteria**. v. 65, p.57–105, 2013.
- KUDO, H.; HAYASHI, Y.; ARAI, M. Improving hydrocarbon production by engineering cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 291, 2019. BioMed Central Ltd.
- KULTSCHAR, B.; LLEWELLYN, C. Secondary Metabolites in Cyanobacteria. In: Ramasamy Vijayakumar and Suresh S.S. Raja (Ed.); **Secondary Metabolites - Sources and Applications**. 5th ed., v. 7, p.43936, 2018. IntechOpen.
- KUMAR, M. S.; MURALITHARAN, G.; THAJUDDIN, N. Screenng of a hypersaline cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: Naphthalene and anthracene. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 12, p. 1863–1866, 2009. Springer.
- KUMAR, S.; JONES, M.; KOUTSOVOULOS, G.; CLARKE, M.; BLAXTER, M. Blobology: exploring raw genome data for contaminants, symbionts and parasites using taxon-annotated GC-coverage plots. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. November, p. 1–12, 2013.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. (F. U. Battistuzzi, Ed.)**Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- KUMARIYA, R.; GARSA, A. K.; RAJPUT, Y. S.; SOOD, S. K.; AKHTAR, N.; PATEL, S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 171–177, 2019. Academic Press.
- LAETSCH, D. R.; BLAXTER, M. L. BlobTools: Interrogation of genome assemblies. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1287, 2017.
- LANG, J. M.; DARLING, A. E.; EISEN, J. A. Phylogeny of Bacterial and Archaeal Genomes Using Conserved Genes: Supertrees and Supermatrices. (P. J. Planet, Ed.)**PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62510, 2013. Public Library of Science.
- LAY, C. LE; DRIDI, L.; BERGERON, M. G.; OUELLETTE, M.; FLISS, I. Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 169–175, 2016. Microbiology Society.
- LEA-SMITH, D. J.; ORTIZ-SUAREZ, M. L.; LENN, T.; NÜRNBERG, D. J.; BAERS, L. L.; DAVEY, M. P.; PAROLINI, L.; HUBER, R. G.; COTTON, C. A. R.; MASTROIANNI, G.; BOMBELLI, P.; UNGERER, P.; STEVENS, T. J.; SMITH, A. G.; BOND, P. J.; MULLINEAUX, C. W.; HOWE, C. J. Hydrocarbons Are Essential for Optimal Cell Size, Division, and Growth of Cyanobacteria. **Plant Physiology**, v. 172, n. 3, p. 1928–1940, 2016.
- LEE, S. W.; MITCHELL, D. A.; MARKLEY, A. L.; HENSLER, M. E.; GONZALEZ, D.; WOHLRAB, A.; DORRESTEIN, P. C.; NIZET, V.; DIXON, J. E. Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 15, p. 5879–5884, 2008. National Academy of Sciences.

- LEE, T. M.; YEH, H. C. Applying remote sensing techniques to monitor shifting wetland vegetation: A case study of Danshui River estuary mangrove communities, Taiwan. **Ecological Engineering**, v. 35, p. 487–496, 2009.
- LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W256–W259, 2019. Oxford University Press.
- LI, H.; SHERMAN, D.; BAO, S.; SHERMAN, L. Pattern of cyanophycin accumulation in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing cyanobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 1–2, p. 9–18, 2001. Springer.
- LI, P.; HARDING, S. E.; LIU, Z. Cyanobacterial Exopolysaccharides: Their Nature and Potential Biotechnological Applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 18, n. 1, p. 375–404, 2001. Taylor & Francis Group.
- LIANG, Y.; HOU, J.; LIU, Y.; LUO, Y.; TANG, J.; CHENG, J. J.; DAROCH, M. Textile Dye Decolorizing *Synechococcus* PCC7942 Engineered With CotA Laccase. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 95–95, 2018. Frontiers Media SA.
- LOPES, I. K. C.; BARROS, M. U. G.; PESTANA, C. J.; CAPELO NETO, J. Prevalence of paralytic shellfish poison-producing *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Brazilian semi-arid reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 27, n. 2, p. 238–246, 2015. Sociedade Brasileira de Limnologia.
- LORENZO, V. DE; BINDEREIF, A.; PAW, B. H.; NEILANDS, J. B. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 165, n. 2, p. 570–578, 1986. American Society for Microbiology (ASM).
- LOWE, T. M.; CHAN, P. P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W54–W57, 2016.
- LYNCH, D.; O'BRIEN, J.; WELCH, T.; CLARKE, P.; O CUIV, P.; CROSA, J. H.; O'CONNELL, M. Genetic Organization of the Region Encoding Regulation, Biosynthesis, and Transport of Rhizobactin 1021, a Siderophore Produced by *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 8, p. 2576–2585, 2001. American Society for Microbiology Journals.
- MACHADO, H.; TUTTLE, R. N.; JENSEN, P. R. Omics-based natural product discovery and the lexicon of genome mining. **Current Opinion in Microbiology**, v. 39, p. 136–142, 2017. Elsevier Current Trends.
- MALDENER, I.; HANNUS, S.; KAMMERER, M. Description of five mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst differentiation and identification of the transposon-tagged genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 205–213, 2003. Elsevier.
- MALONE, C. F. DA S.; RIGONATO, J.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L.; WILMOTTE, A.; FIORE, M. F.; SANT'ANNA, C. L. *Cephalothrix* gen. nov. (Cyanobacteria): towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 2993–3007, 2015.

- MANDAL, S.; RATH, J. Secondary Metabolites of Cyanobacteria and Drug Development. **Extremophilic Cyanobacteria For Novel Drug Development**, SpringerBriefs in Pharmaceutical Science & Drug Development. p.1–11, 2015. Springer, Cham: Springer International Publishing.
- MARAPAKALA, K.; PACKIANATHAN, C.; AJEES, A. A.; DHEEMAN, D. S.; SANKARAN, B.; KANDAVELU, P.; ROSEN, B. P. A disulfide-bond cascade mechanism for arsenic(III) S -adenosylmethionine methyltransferase. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 71, n. 3, p. 505–515, 2015. International Union of Crystallography.
- MARKL, E.; GRÜNBIHLER, H.; LACKNER, M. Cyanobacteria for PHB Bioplastics Production: A Review. **Algae**, 2019. IntechOpen.
- MARQUARDT, J.; PALINSKA, K. A. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus Phormidium (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 5, p. 397–413, 2007.
- MARREC, C. LE; HYRONIMUS, B.; BRESSOLLIER, P.; VERNEUIL, B.; URDACI, M. C. Biochemical and Genetic Characterization of Coagulin, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins, Produced by *Bacillus coagulans* I4. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5213–5220, 2000. American Society for Microbiology (ASM).
- MARSH, A. J.; O’SULLIVAN, O.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D.; HILL, C. In silico analysis highlights the frequency and diversity of type 1 lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 679, 2010.
- MARTIJN, J.; LIND, A. E.; SCHÖN, M. E.; SPIERTZ, I.; JUZOKAITE, L.; BUNIKIS, I.; PETTERSSON, O. V.; ETTEMA, T. J. G. Confident phylogenetic identification of uncultured prokaryotes through long read amplicon sequencing of the 16S-ITS-23S rRNA operon. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 2485–2498, 2019.
- MARTÍNEZ-NÚÑEZ, M. A.; LÓPEZ, V. E. L. Y. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, n. 1, p. 13, 2016. Springer International Publishing.
- MARTINS, M. D.; BRANCO, L. H. Z. Potamolinea gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria): a phylogenetically and ecologically coherent cyanobacterial genus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3632–3641, 2016.
- MARTINS, M. D.; MACHADO-DE-LIMA, N. M.; BRANCO, L. H. Z. Polyphasic approach using multilocus analyses supports the establishment of the new aerophytic cyanobacterial genus *Pycnacronema* (Coleofasciculaceae, Oscillatoriales). (P. Gabrielson, Ed.) **Journal of Phycology**, v. 55, n. 1, p. 146–159, 2019.
- MATSEN, F. A.; KODNER, R. B.; ARMBRUST, E. V. pplacer: linear time maximum-likelihood and Bayesian phylogenetic placement of sequences onto a fixed reference tree. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 538, 2010. BioMed Central Ltd.



- MATZANKE, B. F.; ANEMÜLLER, S.; SCHÜNEMANN, V.; TRAUTWEIN, A. X.; HANTKE, K. FhuF, Part of a Siderophore–Reductase System †. **Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1386–1392, 2004.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 1. Jul. 2002. Pergamon.
- MCINTOSH, J. A.; DONIA, M. S.; SCHMIDT, E. W. Ribosomal peptide natural products: bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 4, p. 537, 2009. NIH Public Access.
- MELBY, J. O.; NARD, N. J.; MITCHELL, D. A. Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 369–378, 2011.
- MENDEZ-PEREZ, D.; BEGEMANN, M. B.; PFLEGER, B. F. Modular Synthase-Encoding Gene Involved in  $\alpha$ -Olefin Biosynthesis in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4264–4267, 2011. American Society for Microbiology (ASM).
- MERCHANT, S. S.; HELMANN, J. D. Elemental Economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. **Advances in Microbial Physiology**, v. 60, p. 91–210, 2012.
- MICALLEF, M. L.; D'AGOSTINO, P. M.; AL-SINAWI, B.; NEILAN, B. A.; MOFFITT, M. C. Exploring cyanobacterial genomes for natural product biosynthesis pathways. **Marine Genomics**, v. 21, p. 1–12, 2015.
- MOHAMED, Z. A.; AL-SHEHRI, A. M. Biodiversity and toxin production of cyanobacteria in mangrove swamps in the Red Sea off the southern coast of Saudi Arabia. **Botanica Marina**, v. 58, n. 1, p. 23–34, 2015.
- MONTI, M.; LUBENSKY, D. K.; WOLDE, P. R. TEN. Theory of circadian metabolism. **bioRxiv**, p. 1–17, 2018.
- MOSLAVAC, S.; NICOLAISEN, K.; MIRUS, O.; DEHNI, F. AL; PERNIL, R.; FLORES, E.; MALDENER, I.; SCHLEIFF, E. A TolC-Like Protein Is Required for Heterocyst Development in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7887–7895, 2007. American Society for Microbiology (ASM).
- MOYNIÉ, L.; MILENKOVIC, S.; MISLIN, G. L. A.; GASSER, V.; MALLOCI, G.; BACO, E.; MCCAUGHAN, R. P.; PAGE, M. G. P.; SCHALK, I. J.; CECCARELLI, M.; NAISMITH, J. H. The complex of ferric-enterobactin with its transporter from *Pseudomonas aeruginosa* suggests a two-site model. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3673, 2019. Nature Publishing Group.
- MOŹEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271–282, 2016. Elsevier GmbH.

- MUHAMMADI; SHABINA; AFZAL, M.; HAMEED, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 8, n. 3–4, p. 56–77, 2015. Taylor and Francis Ltd.
- MULLIS, K. B.; POLLACK, J. R.; NEILANDS, J. B. Structure of Schizokinen, an Iron-Transport Compound from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**, v. 10, p. 4894–4898, 1971.
- MURRAY, A. E.; LIES, D.; LI, G.; NEALSON, K.; ZHOU, J.; TIEDJE, J. M. DNA/DNA hybridization to microarrays reveals gene-specific differences between closely related microbial genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 17, p. 9853–9858, 2001.
- NAKANISHI, S.; KUWAHARA, T.; NAKAYAMA, H.; TANAKA, M.; OHNISHI, Y. Rapid species identification and partial strain differentiation of *Clostridium butyricum* by PCR using 16S-23S rDNA intergenic spacer regions. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 7, p. 613–621, 2005.
- NAUSCH, H.; BROER, I. Cyanophycinase CphE from *P. alcaligenes* produced in different compartments of *N. benthamiana* degrades high amounts of cyanophycin in plant extracts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2397–2413, 2017. Springer Verlag.
- NAUSCH, H.; HAUSMANN, T.; PONNDORF, D.; HÜHNS, M.; HOEDTKE, S.; WOLF, P.; ZEYNER, A.; BROER, I. Tobacco as platform for a commercial production of cyanophycin. **New Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 842–851, 2016. Elsevier B.V.
- NES, I. F.; HOLO, H. Peptides from Lactic Acid. **Biopolymers**, v. 55, p. 50–61, 2000.
- NICOLAISEN, K.; HAHN, A.; VALDEBENITO, M.; MOSLAVAC, S.; SAMBORSKI, A.; MALDENER, I.; WILKEN, C.; VALLADARES, A.; FLORES, E.; HANTKE, K.; SCHLEIFF, E. The interplay between siderophore secretion and coupled iron and copper transport in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1798, n. 11, p. 2131–2140, 2010. Elsevier.
- NICOLAISEN, K.; MOSLAVAC, S.; SAMBORSKI, A.; VALDEBENITO, M.; HANTKE, K.; MALDENER, I.; MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E.; SCHLEIFF, E. Alr0397 Is an Outer Membrane Transporter for the Siderophore Schizokinen in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 22, p. 7500–7507, 2008. American Society for Microbiology (ASM).
- NILSEN, T.; NES, I. F.; HOLO, H. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2975–2984, 2003. American Society for Microbiology.
- NOINAJ, N.; GUILLIER, M.; BARNARD, T. J.; BUCHANAN, S. K. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 43–60, 2010.

- NURK, S.; MELESHKO, D.; KOROBAYNIKOV, A.; PEVZNER, P. A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 2017.
- NZILA, A. Current Status of the Degradation of Aliphatic and Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Thermophilic Microbes and Future Perspectives. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 12, p. 2782, 2018. MDPI AG.
- O'CONNELL, J.; SCHULZ-TRIEGLAFF, O.; CARLSON, E.; HIMS, M. M.; GORMLEY, N. A.; COX, A. J. NxTrim: optimized trimming of Illumina mate pair reads: Table 1. **Bioinformatics**, v. 31, n. 12, p. 2035–2037, 2015.
- OMEERSHFFUDIN, U. N. M.; KUMAR, S. In silico approach for mining of potential drug targets from hypothetical proteins of bacterial proteome. **International Journal of Molecular Biology**, v. 4, n. 4, p. 145–152, 2019. MedCrave Group, LLC.
- OPPEGÅRD, C.; ROGNE, P.; EMANUELSEN, L.; KRISTIENSEN, P. E.; FIMLAND, G.; NISSEN-MEYER, J. The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 210–219, 2007.
- ORTEGA, M. A.; DONK, W. A. VAN DER. New Insights into the Biosynthetic Logic of Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Natural Products. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 1, p. 31–44, 2016. Elsevier Ltd.
- OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D206–D214, 2014.
- PAERL, H. W. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. **Phycologia**, v. 35, n. sup6, p. 25–35, 1996. Taylor & Francis.
- PALINSKA, K. A.; SUROSZ, W. Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. **Hydrobiologia**, v. 740, n. 1, p. 1–11, 2014.
- PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 512–542, 2007. Tecpar.
- PARKS, D. H.; CHUVOCHINA, M.; CHAUMEIL, P.-A.; RINKE, C.; MUSSIG, A. J.; HUGENHOLTZ, P. Selection of representative genomes for 24,706 bacterial and archaeal species clusters provide a complete genome-based taxonomy. **bioRxiv**, p. 771964, 2019.
- PARKS, D. H.; CHUVOCHINA, M.; WAITE, D. W.; RINKE, C.; SKARSHEWSKI, A.; CHAUMEIL, P.-A.; HUGENHOLTZ, P. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 10, p. 996–1004, 2018. Nature Publishing Group.
- PARKS, D. H.; IMELFORT, M.; SKENNERTON, C. T.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 2015.

- PATEL, J. G.; KUMAR, J. I. N.; KHAN, S. R. Consequences of Environmentally Hazardous Polycyclic Aromatic Hydrocarbon- Anthracene Treatment on Cyanobacteria. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 381–386, 2015. Nepal Journals Online (JOL).
- PAVLOSTATHIS, S. G.; JACKSON, G. H. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene in a continuous-flow *Anabaena* sp. system. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 1699–1706, 2002. Elsevier Ltd.
- PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1650–1680, 2010. MDPI AG.
- PETROVIC, T.; NIKSIC, M.; BRINGEL, F. Strain typing with ISLp11 in lactobacilli. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, n. 1, p. 1–10, 2006.
- POLYMENAKOU, P. N.; STEPHANOU, E. G. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonad*. **Biodegradation**, v. 16, n. 5, p. 403–413, 2005. Springer.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. (A. F. Y. Poon, Ed.) **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological Research**, v. 166, n. 2, p. 99–110, 2011. Urban & Fischer.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. (E. Susko, Ed.) **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018.
- RAMOS, V. M. C.; CASTELO-BRANCO, R.; LEÃO, P. N.; MARTINS, J.; CARVALHAL-GOMES, S.; SOBRINHO DA SILVA, F.; MENDONÇA FILHO, J. G.; VASCONCELOS, V. M. Cyanobacterial Diversity in Microbial Mats from the Hypersaline Lagoon System of Araruama, Brazil: An In-depth Polyphasic Study. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1233, p. 1–16, 2017.
- RAMOS, V.; MORAIS, J.; CASTELO-BRANCO, R.; PINHEIRO, Â.; MARTINS, J.; REGUEIRAS, A.; PEREIRA, A. L.; LOPES, V. R.; FRAZÃO, B.; GOMES, D.; MOREIRA, C.; COSTA, M. S.; BRÛLE, S.; FAUSTINO, S.; MARTINS, R.; SAKER, M.; OSSWALD, J.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. M. Cyanobacterial diversity held in microbial biological resource centers as a biotechnological asset: the case study of the newly established LEGE culture collection. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1437–1451, 2018. Journal of Applied Phycology.
- RAMOS, V.; MORAIS, J.; VASCONCELOS, V. M. A curated database of cyanobacterial strains relevant for modern taxonomy and phylogenetic studies. **Scientific Data**, v. 4, p. 170054, 2017. Nature Publishing Groups.

- RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, p. 111–150, 1999. Springer Netherlands.
- REENEN, C. A. VAN; ZYL, W. H. VAN; DICKS, L. M. T. Expression of the Immunity Protein of Plantaricin 423, Produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and Analysis of the Plasmid Encoding the Bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7644–7651, 2006. American Society for Microbiology (ASM).
- RICHTER, R.; HEJAZI, M.; KRAFT, R.; ZIEGLER, K.; LOCKAU, W. Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin). Molecular cloning of the gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression in *Escherichia coli*, and biochemical characterization of . **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 1, p. 163–169, 1999. John Wiley & Sons, Ltd.
- RIGONATO, J. **Diversidade de Cianobactérias em Manguezais do Estado de S**, 2010. Tese de doutorado, Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- RIGONATO, J.; ALVARENGA, D. O.; ANDREOTE, F. D.; DIAS, A. C. F.; MELO, I. S.; KENT, A.; FIORE, M. F. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 2, p. 312–322, 2012.
- RIGONATO, J.; KENT, A. D.; ALVARENGA, D. O.; ANDREOTE, F. D.; BEIRIGO, R. M.; VIDAL-TORRADO, P.; FIORE, M. F. Drivers of cyanobacterial diversity and community composition in mangrove soils in south-east Brazil. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 1103–1114, 2013.
- RIGONATO, J.; KENT, A. D.; GUMIERE, T.; BRANCO, L. H. Z.; ANDREOTE, F. D.; FIORE, M. F. Temporal assessment of microbial communities in soils of two contrasting mangroves. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 87–96, 2018. Sociedade Brasileira de Microbiologia.
- ROBERTSON, A. I.; PHILLIPS, M. J. Mangroves as filters of shrimp pond effluent: predictions and biogeochemical research needs. **Hydrobiologia**, v. 295, p. 311–321, 1995. Kluwer Academic Publishers.
- ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 247–255, 2001. Elsevier Science Ltd.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. VAN DER; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.
- SAHOO, K.; DHAL, N. K. **Potential microbial diversity in mangrove ecosystems:A review**. 2009.
- SAKTHIVEL, K.; KATHIRESAN, K. Antimicrobial activities of marine cyanobacteria isolated from mangrove environment of south east coast of India. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 147–156, 2012.

- SCHIRMER, A.; RUDE, M. A.; LI, X.; POPOVA, E.; CARDAYRE, S. B. DEL. Microbial Biosynthesis of Alkanes. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 559–562, 2010.
- SCIUTO, K.; ANDREOLI, C.; RASCIO, N.; ROCCA, N. LA; MORO, I. Polyphasic approach and typification of selected Phormidium strains (Cyanobacteria). **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 357–374, 2012.
- SCIUTO, K.; MORO, I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. **Biodivers Conserv**, v. 24, p. 711–738, 2015.
- SHAKEEL, T.; FATMA, Z.; FATMA, T.; YAZDANI, S. S. Heterogeneity of Alkane Chain Length in Freshwater and Marine Cyanobacteria. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. MAR, 2015. Frontiers Media S.A.
- SHARIATMADARI, Z.; MOHARREK, F.; RIAHI, H.; HEIDARI, F.; ASLANI, E. Efficiency of partial 16S rRNA gene sequencing as molecular marker for phylogenetic study of cyanobacteria, with emphasis on some complex taxa. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 61, n. 1, p. 59–68, 2017.
- SHASHIREKHA, S.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Phenol degradation by the marine cyanobacterium Phormidium valderianum BDU 30501. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 130–133, 1997.
- SHCOLNICK, S.; SUMMERFIELD, T. C.; REYTMAN, L.; SHERMAN, L. A.; KEREN, N. The Mechanism of Iron Homeostasis in the Unicellular Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803 and Its Relationship to Oxidative Stress. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 2045–2056, 2009.
- SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 285–295, 2003.
- SHI, L.; CAI, Y.; YANG, H.; XING, P.; LI, P.; KONG, L.; KONG, F. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with Microcystis aeruginosa and other cyanobacteria. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1581–1590, 2009. Elsevier.
- SHISHIDO, T. K.; POPIN, R. V.; JOKELA, J.; WAHLSTEN, M.; FIORE, M. F.; FEWER, D. P.; HERFINDAL, L.; SIVONEN, K. Dereplication of Natural Products with Antimicrobial and Anticancer Activity from Brazilian Cyanobacteria. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 12, 2019. MDPI AG.
- SILVA-STENICO, M. E.; VIEIRA, F. D. P.; GENUÁRIO, D. B.; SILVA, C. S. P.; MORAES, L. A. B.; FIORE, M. F. Decolorization of Textile Dyes by Cyanobacteria. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 10, p. 1863–1870, 2012.
- SILVA-STENICO, M.; KANENO, R.; ZAMBUZI, F.; VAZ, M.; ALVARENGA, D.; FIORE, M. Natural Products from Cyanobacteria with Antimicrobial and Antitumor Activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n. 9, p. 820–828, 2013.
- SILVA, C. S. P. DA. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais.** [tese], 2010. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- SILVA, C. S. P.; GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; FIORE, M. F. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 100–112, 2014.
- SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, 2015.
- SINGH, A. K.; MALLICK, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 20, 2017. Oxford Academic.
- SINGH, J. S.; KUMAR, A.; RAI, A. N.; SINGH, D. P. Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 529, 2016. Frontiers Research Foundation.
- SINGH, S. A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1221–1244, 2014a.
- SINGH, S. A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1221–1244, 2014b. Blackwell Publishing Ltd.
- SINHA, A. K.; PARLI, B. V. Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: A microcosm study. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 524, n. July 2019, p. 151290, 2020. Elsevier.
- SIVASHANKARI, S.; SHANMUGHAVEL, P. Functional annotation of hypothetical proteins – A review. **Bioinformatics**, v. 1, n. 8, p. 335–338, 2006. Biomedical Informatics.
- SON, S.; JANG, M.; LEE, B.; HONG, Y.-S.; KO, S.-K.; JANG, J.-H.; AHN, J. S. Ulleungdin, a Lasso Peptide with Cancer Cell Migration Inhibitory Activity Discovered by the Genome Mining Approach. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 10, p. 2205–2211, 2018.
- STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 380–416, 2001.
- STEVENS, J. B.; CARTER, R. A.; HUSSAIN, H.; CARSON, K. C.; DILWORTH, M. J.; JOHNSTON, A. W. B. The fhu genes of *Rhizobium leguminosarum*, specifying siderophore uptake proteins: fhuDCB are adjacent to a pseudogene version of fhuA. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 593–601, 1999. Society for General Microbiology.
- STOYANOV, P.; MOTEN, D.; MLADENOV, R.; DZHAMBAZOV, B.; TENEVA, I. Phylogenetic Relationships of Some Filamentous Cyanoprokaryotic Species. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 10, p. EBO.S13748, 2014.
- STRIEKER, M.; TANOVIĆ, A.; MARAHIEL, M. A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 2, p. 234–240, 2010. Elsevier Current Trends.

- STRUNECKY, O.; ELSTER, J.; KOMAREK, J. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium “Phormidium” murrayi = *Wilmottia murrayi*. **Fottea**, v. 11, n. 1, p. 57–71, 2011.
- SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 896–907, 2011. Elsevier.
- SUN, Z.; WANG, X.; ZHANG, X.; WU, H.; ZOU, Y.; LI, P.; SUN, C.; XU, W.; LIU, F.; WANG, D. Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 213–227, 2018. Springer Verlag.
- SUNDARAM, S.; SOUMYA, K. K. Study of physiological and biochemical alterations in cyanobacterium under organic stress. **American Journal of Plant Physiology**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2011.
- TAN, X.; YAO, L.; GAO, Q.; WANG, W.; QI, F.; LU, X. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 2, p. 169–176, 2011. Elsevier.
- TARONCHER-OLDENBURG, G.; NISHINA, K.; STEPHANOPOULOS, G. Identification and Analysis of the Polyhydroxyalkanoate-Specific beta -Ketothiolase and Acetoacetyl Coenzyme A Reductase Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4440–4448, 2000. American Society for Microbiology (ASM).
- THOMPSON, C.; BEYS-DA-SILVA, W.; SANTI, L.; BERGER, M.; VAINSTEIN, M.; GUIMA RÃES, J.; VASCONCELOS, A. T. A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 65, 2013.
- TILLET, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; DÖHREN, H. VON; BÖRNER, T.; NEILAN, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide–polyketide synthetase system. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 10, p. 753–764, 2000.
- TROSCHL, C.; MEIXNER, K.; FRITZ, I.; LEITNER, K.; ROMERO, A. P.; KOVALCIK, A.; SEDLACEK, P.; DROSG, B. Pilot-scale production of poly-β-hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. **Algal Research**, v. 34, p. 116–125, 2018. Elsevier.
- TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006. Springer.
- TSENG, W.-C.; FANG, T.-Y.; CHEN, S.-Y. Cellular biocompatibility of cyanophycin substratum prepared with recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 97–106, 2016. Elsevier B.V.



- URITSKIY, G.; DIRUGGIERO, J. Applying Genome-Resolved Metagenomics to Deconvolute the Halophilic Microbiome. **Genes**, v. 10, n. 3, p. 220, 2019.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P. DE; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.
- VAZ, M. G. M. V. **Cianobactérias de ambiente costeiro: filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas**, 2014. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- WALSH, C. J.; GUINANE, C. M.; HILL, C.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W.; COTTER, P. D. In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 183, 2015. BioMed Central Ltd.
- WALTER, JULINE M.; COUTINHO, F. H.; DUTILH, B. E.; SWINGS, J.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C. Ecogenomics and Taxonomy of Cyanobacteria Phylum. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2132, 2017. Frontiers Media S.A.
- WALTER, JULINE M.; COUTINHO, F. H.; DUTILH, B. E.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C. Proposal of a new genome-based taxonomy for Cyanobacteria. **PeerJ Preprints**, v. 5, p. e2676v1, 2017.
- WANG, H.; FEWER, D. P.; HOLM, L.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 25, p. 9259–9264, 2014.
- WANG, H.; FEWER, D. P.; SIVONEN, K. Genome Mining Demonstrates the Widespread Occurrence of Gene Clusters Encoding Bacteriocins in Cyanobacteria. (M. A. Blazquez, Ed.) **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22384, 2011. Public Library of Science.
- WANG, M.; CAO, B.; YU, Q.; LIU, L.; GAO, Q.; WANG, L.; FENG, L. Analysis of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer region in *Klebsiella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3555–3563, 2008. American Society for Microbiology Journals.
- WANG, W.; LIU, X.; LU, X. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 69, 2013. BioMed Central.
- WATZER, B.; ENGELBRECHT, A.; HAUF, W.; STAHL, M.; MALDENER, I.; FORCHHAMMER, K. Metabolic pathway engineering using the central signal processor PII. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 192, 2015. BioMed Central Ltd.
- WATZER, B.; FORCHHAMMER, K. Cyanophycin: A Nitrogen-Rich Reserve Polymer. **Cyanobacteria**, 2018. InTech.
- WEISS, T. L.; YOUNG, E. J.; DUCAT, D. C. A synthetic, light-driven consortium of cyanobacteria and heterotrophic bacteria enables stable polyhydroxybutyrate production. **Metabolic Engineering**, v. 44, p. 236–245, 2017.

- WELKER, M.; DÖHREN, H. VON. Cyanobacterial peptides — Nature's own combinatorial biosynthesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 530–563, 2006. John Wiley & Sons, Ltd.
- WENCES, A. H.; SCHATZ, M. C. Metassembler: merging and optimizing de novo genome assemblies. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 207, 2015. Genome Biology.
- WESTRICK, J. A.; SZLAG, D. C.; SOUTHWELL, B. J.; SINCLAIR, J. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1705–1714, 2010. Springer.
- WILHELM, S. W.; TRICK, C. G. Iron-limited growth of cyanobacteria: Multiple siderophore production is a common response. **Limnology and Oceanography**, v. 39, n. 8, p. 1979–1984, 1994.
- WINKELMANN, G. Microbial siderophore-mediated transport. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 4, p. 691–696, 2002.
- WOODHOUSE, J. N.; ZIEGLER, J.; GROSSART, H.-P.; NEILAN, B. A. Cyanobacterial Community Composition and Bacteria–Bacteria Interactions Promote the Stable Occurrence of Particle-Associated Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Frontiers Media S.A.
- WU, T.; XU, J.; XIE, W.; YAO, Z.; YANG, H.; SUN, C.; LI, X. *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Frontiers Media S.A.
- XIE, H.; VALSAMIDIS, G.; MATHIOUDAKI, E.; TSIOTIS, G. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain phDV1, an Isolate Capable of Efficient Degradation of Aromatic Hydrocarbons. (D. A. Baltrus, Ed.) **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 2, 2019. American Society for Microbiology.
- XIE, M.; WANG, W.; ZHANG, W.; CHEN, L.; LU, X. Versatility of hydrocarbon production in cyanobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 905–919, 2017. Springer Verlag.
- YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; AMANN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 635–645, 2014. Nature Publishing Group.
- YEOMAN, K. H.; WISNIEWSKI-DYE, F.; TIMONY, C.; STEVENS, J. B.; DELUCA, N. G.; DOWNIE, J. A.; JOHNSTON, A. W. B. Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the. **Microbiology**, v. 146, n. 4, p. 829–837, 2000. Society for General Microbiology.

- YIN, X.-X.; CHEN, J.; QIN, J.; SUN, G.-X.; ROSEN, B. P.; ZHU, Y.-G. Biotransformation and Volatilization of Arsenic by Three Photosynthetic Cyanobacteria. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1631–1638, 2011. American Society of Plant Biologists.
- YOKONO, M.; SATOH, S.; TANAKA, A. Comparative analyses of whole-genome protein sequences from multiple organisms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. Nature Publishing Group.
- ZAHARAN, S. A.; ALI-TAMMAM, M.; HASHEM, A. M.; AZIZ, R. K.; ALI, A. E. Azoreductase activity of dye-decolorizing bacteria isolated from the human gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5508, 2019. Nature Publishing Group.
- ZHANG, H.; YANG, C. Arginine and nitrogen mobilization in cyanobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 863–867, 2019. Blackwell Publishing Ltd.
- ZHU, L.; ZANCARINI, A.; LOUATI, I.; CESARE, S. DE; DUVAL, C.; TAMBOSCO, K.; BERNARD, C.; DEBROAS, D.; SONG, L.; LELOUP, J.; HUMBERT, J.-F. Bacterial Communities Associated with Four Cyanobacterial Genera Display Structural and Functional Differences: Evidence from an Experimental Approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1662, 2016. Frontiers Media S.A.
- ZIEGLER, K.; DIENER, A.; HERPIN, C.; RICHTER, R.; DEUTZMANN, R.; LOCKAU, W. Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L- arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin). **European Journal of Biochemistry**, v. 254, n. 1, p. 154–159, 1998.
- ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3406–3415, 2003.
- ŻYSZKA-HABERECHE, B.; NIEMCZYK, E.; LIPOK, J. Metabolic relation of cyanobacteria to aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1. Feb. 2019. Springer Verlag.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Meio de cultura ASN III utilizado para o crescimento de cianobactérias tolerantes e/ou halófitas.

### Preparo do Meio líquido (1 Litro)

Preparar água salgada artificial:

Dissolver em 500 mL de água deionizada

NaCl	12,5 g L <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 g L <sup>-1</sup>
KCl	0,25 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,5 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 g L <sup>-1</sup>

Completar o volume para 1 L com água deionizada.

Adicionar em 500 mL de água salgada artificial, as soluções estoque do Meio BG-11, listadas abaixo

NaNO <sub>3</sub>	5 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 mL
Ácido cítrico *	0,5 mL
Citrato de amônio férico	0,5 mL
Na <sub>2</sub> EDTA	0,5 mL
Micronutrientes	1 mL
Carbonato de sódio	1 mL

(\*).Esterilizar por filtração.

Completar volume para 1 Litro com água deionizada. Após autoclavar a 120 °C por 20 minutos. Adicionalmente pode-se acrescentar vitamina B12 (0,5 mL L<sup>-1</sup>) ao esfriar o meio.

### Solução de Micronutrientes (1 Litro)

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g L <sup>-1</sup>
MnCl.4H <sub>2</sub> O	1,81 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,39 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079 g L <sup>-1</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,049 g L <sup>-1</sup>

Completar o volume para 1 L Esterilizar por filtração.

### Preparo do Meio sólido (1 Litro)

Adicionar ao meio líquido 1,5 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico.

**APÊNDICE B.** Alinhamento das duas seqüências ITS 16S-23S da linhagem *Oxynema thaianum* CCALA 960 disponíveis no GenBank (NCBI).

1. >MG825656.1 *Oxynema thaianum* CCALA 960 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence
2. >JF729323.1 *Oxynema thaianum* CCALA 960 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and tRNA-Ile gene, complete sequence; and tRNA-Ala gene and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.452)

```

ITS_MG825656.1  tgggggggctcatctcctttaaggagaccaatgggaaaaggagacgctctcgag
ITS_JF729323.1  tgtggctggatcacctcctttaaggagaccaagttgggaaaaggagaggcaatcaag
** ** ** ** ,***** ** ** **

ITS_MG825656.1  acccccaaacccagagtatcgcgatctctgtcagggttagagaaggaaatctcagaaaga
ITS_JF729323.1  acccccaaaaacca-agaatcccagggtcggtcagggttagagaaggaaaatcagaaaaa
***** ** ** ** ** ** ** *****

ITS_MG825656.1  gactgtcaatcttttagtgcggttcgcagcagggttattatctcaggtgggttagagcgc
ITS_JF729323.1  gactgtcaaacctcttagtgcggttcgcagcagggttattagctcaggtgggttagagcgc
***** ** ,*****

ITS_MG825656.1  acccgtgataagggtgatgtccgtgggttcgtgtccaggatggcccacctagaaccggagg
ITS_JF729323.1  acccctgataagggtgaggtccctgggttcgagtcaggatggcccacct-----
**** *****

ITS_MG825656.1  gggatatatctcagttggtagagcgtgccttcgcaacgcagatgccagcgggttagtgtcc
ITS_JF729323.1  -----

ITS_MG825656.1  gcttatctccaccaccatcgagagccgaaagagttagctcaaagcgaattcaacacagc
ITS_JF729323.1  -----

ITS_MG825656.1  acccatcatctacaaggccgaaagagccggagtagagaaacggaatgctggattgaaac
ITS_JF729323.1  -----

ITS_MG825656.1  ccagcaaagaaccttgaaaaaagcatagacaccaagagaaaagcatagggaaacaaaatcc
ITS_JF729323.1  -----

ITS_MG825656.1  tataacacgcaaaaagtgggcaagctacaagggttaacgggtggatacctatgcccacag
ITS_JF729323.1  -----

ITS_MG825656.1  aaaa
ITS_JF729323.1  ----

```

**APÊNDICE C.** Alinhamento das regiões da ITS 16S-23S das linhagens descritas no gênero *Oxynema*.

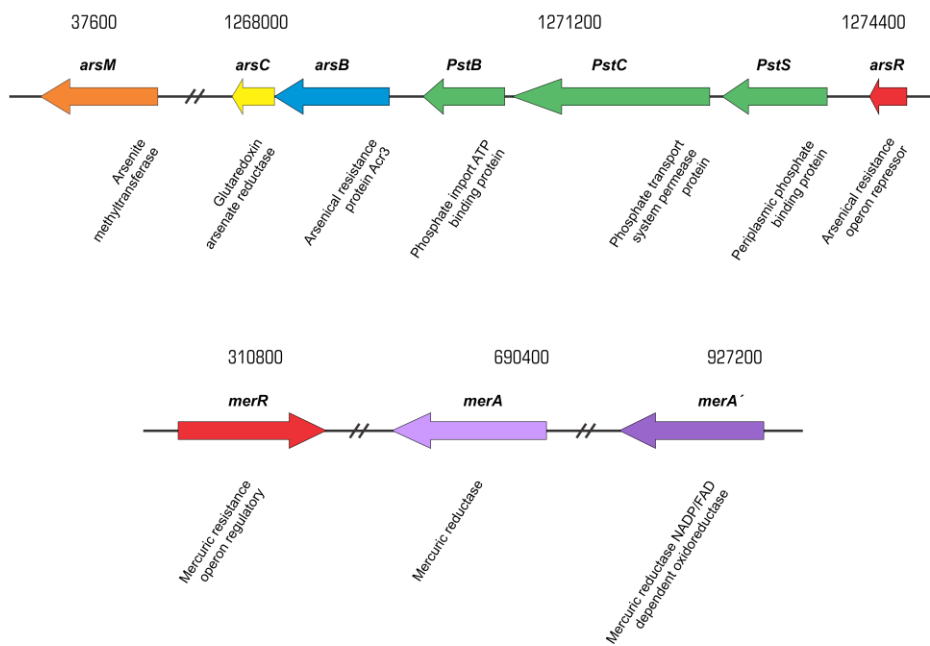
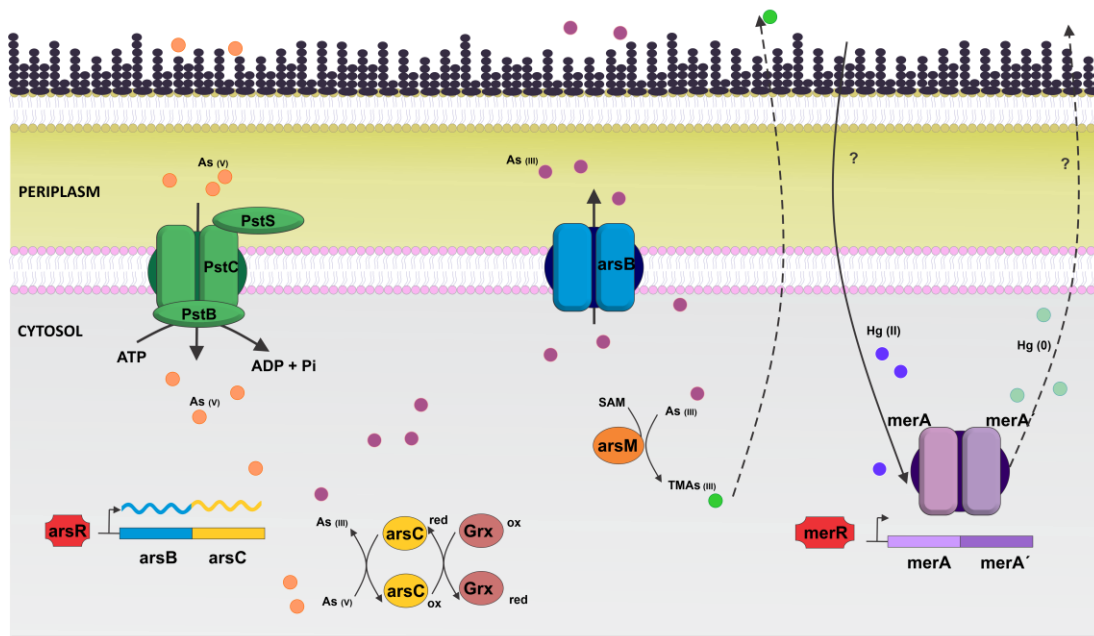
```

                16S            Lider            D1-D1'
CENA135      TGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGGAGACCCAACCTTTGGAAAAGGGAGAGGCCAAAAAG
CCALA_960    TGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGGAGACCCAAGTTTGGAAAAGGGAGAGGCCAATCAAG
AP17         TGTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGGAGACCCAACCTTTGGAAAAGGGAGAGGCCAATCAAG
AP24         -GTGGCTGGATCACCTCCTTTAAGGGGAGACCCAAGTTTGGAAAAGGGAGAGGCCAATCAAG
                *****
                                D2+ hélice+espaçador
CENA135      AGCCCTCAAACCAAAGCATCCCGAGGTTCGGTCGAGGTCAAAGAAGGAAGATCAAAAAAG
CCALA_960    ACCCCCAAACCA-AGAATCCCGAGGTTCGGTCGAGGTAGAGAAGGAAAATCAGAAAA
AP17         ACCCCCAAACCAAGAAATCCCGAGGTTCGGTCGAGGTAGAGAAGGAAAATCAGAAAA
AP24         ACCCCCAAACCAAGAAATCCCGAGGTTCGGTCGAGGTAGAGAAGGAAAATCAGAAAA
                *****
                                D3+espaçador
CENA135      AACTGTCAAACCTCTTCGTGCGGTTTCGCAGCGAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCCG
CCALA_960    GACTGTCAAACCTCTTAGTGCGGTTTCGCAGCGAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCCG
AP17         GACTGTCAAACCTCTTAGTGCGGTTTCGCAGCGAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCCG
AP24         GACTGTCAAACCTCTTAGTGCGGTTTCGCAGCGAGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCCG
                *****
                                gene tRNA-Ile                hélice V2
CENA135      ACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCCACTAGAACC GGAGG
CCALA_960    ACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCCACTAGAACC GGAGG
Ap17         ACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCCACTAGAACC GGAGG
AP24         ACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCCACTAGAACC GGAGG
                *****
                                gene tRNA-Ala
CENA135      GGGTATAGCTCAGTGGGTAGAGCGCTGCCTTTGCAAGGCAGATGCCAGCGGTTTCGAGTCC
CCALA_960    GGGTATATCTCAGTTGGTAGAGCGCTGCCTTGC AACGCAGATGCCAGCGGTTAGTGTCC
AP17         GGGTATAGCTCAGTGGGTAGAGCGCTGCCTTTGCAAGGCAGATGCCAGCGGTTTCGAGTCC
AP24         GGGTATAGCTCAGTGGGTAGAGCGCTGCCTTTGCAAGGCAGATGCCAGCGGTTTCGAGTCC
                *****
                                Pre-BoxB
CENA135      GCTTACCTCCACCTA-----ACGAATCAAAGTCAAAGGGAATCAAACA
CCALA_960    GCTTATCTCCACCACCATCGAGAGCGGAAA--GAGTTAGCTCAAAGCGAATCAAACACA
Ap17         GCTTACCTCCACCAACCATCGAGTTCAAAGATTAAGCTAGCTCAAAGCGAATCAAACACA
AP24         GCTTACCTCCACCAACCATCGAGTTCAAAGATTAAGTTAGCTCAAAGCGAATCAAACACA
                *****
                                BoxB
CENA135      GCACCCGTC-----AACTCGAGCAGAGAAAACGGA CTGCTGGATTGAA
CCALA_960    GCACCCATCATCTACAAGGCCGCAAAGAGCCGGAGTAGAGAAAACGGAATGCTGGATTGAA
AP17         GCACCCGTCATCTAGAAGGCAACAAAGAGCCGGAGTAGAGAAAACGGAATGCTGGATTGAA
AP24         GCACCCGTCATCTAGAAGGCAACAAAGAGCCGGAGTAGAGAAAACGGAATGCTGGATTGAA
                *****
                Pós-BoxB            BoxA            D4            V3
CENA135      AGCCAGCAAA GAACCTTGAAAAAGCATA GACACCAAGAGAAAAGCATAGGGAAAAAAT
CCALA_960    ACCCAGCAAA GAACCTTGAAAAAGCATA GACACCAAGAGAAAAGCATAGGGAAACAAAAT
AP17         ACCCAGCAAA GAACCTTGAAAAAGCATA GACACCAAGAGAAAAGCATAGGGAAAAAAT
AP24         ACCCAGCAAA GAACCTTGAAAAAGCATA GACACCAAGAGAAAAGCATAGGGAAAAAAT
                *****
                D5 + espaciador                23S
CENA135      CCTAGAA -AAGCCAAAAGTGG-----
CCALA_960    CCTATAACACGCCAAAAGTGGGCAAGCTACAAAGGGCTAACGGTGGATACCTATGCGCAC
AP17         CCTAGAACAAGCCAAAAGTGGTCAAGCTACAAAGGGCTAACGGTGGATACCTAGGCACAC
AP24         CCTAGAACAAGCCAAAAGTGGTCAAGCTACAAAGGGCTAACGGTGGATACCTAGGCACAC
                **** * * *****

CENA135      -----
CCALA_960    AGAAAA
AP17         AGA---
AP24         AG----

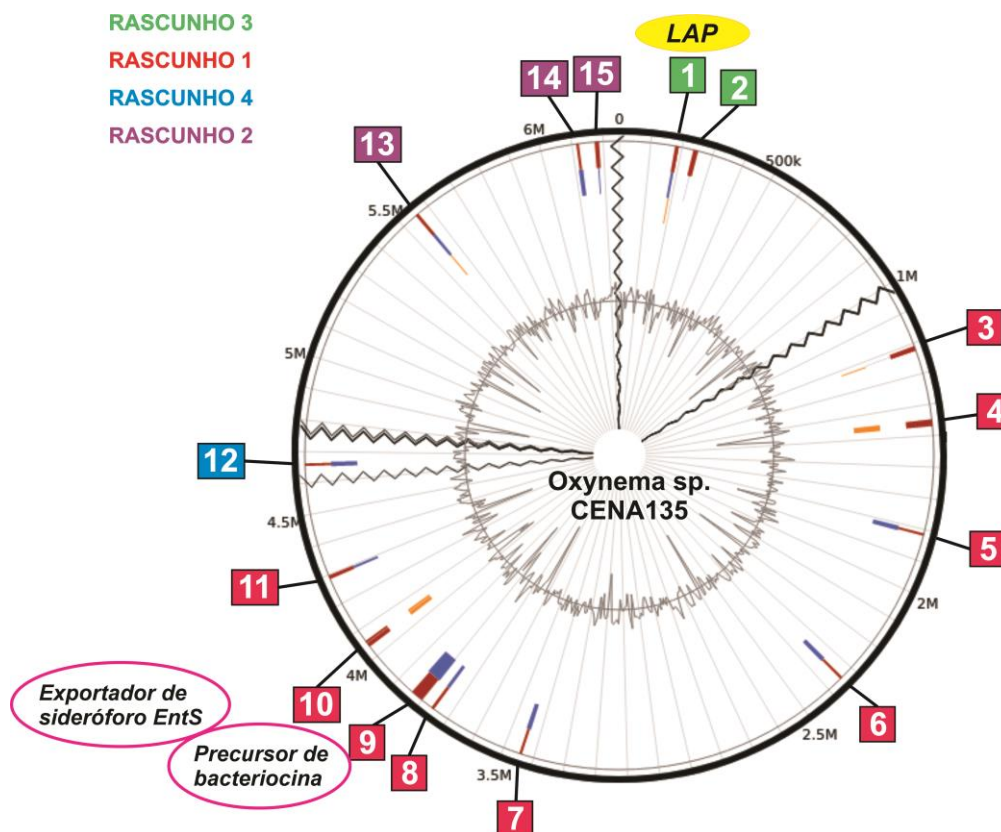
```

APÊNDICE D. Esquema da ciclagem celular de arsênio e mercúrio com os genes detectados em *Oxynema* sp. CENA135. Modificado de Huertas et al., (2014)





APÊNDICE E. Ilhas genômicas previstas com IsladViewer (http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/) no genoma da *Oxynema* sp. CENA135. 4



Nº	Tamanho (pb)	(G+C) %	Nº de genes	fago tail	Transposase	Proteína hipotética	Tipo de Ilha
1	11402	46.33	10	0	0	5	Ilha de Resistência
2	12037	46.21	10	0	1	7	Ilha Simbiótica
3	15239	44.54	15	0	0	8	Ilha Metabólica
4	20712	35.91	21	0	3	8	Ilha Metabólica
5	7688	51.22	8	0	1	1	Ilha Metabólica
6	8219	54.26	8	0	0	1	Ilha Metabólica
7	8020	49.84	8	0	1	2	Ilha Metabólica
8	9,753	44	9	0	2	4	Ilha Metabólica
9	40639	46.48	31	1	1	22	Ilha de Resistência
10	22581	39.35	22	0	0	9	Ilha Metabólica
11	11570	53	8	0	1	4	Ilha Metabólica
12	8272	52	10	0	3	4	Ilha Metabólica
13	10758	43.23	12	0	2	8	Ilha Metabólica
14	8194	46.81	10	0	4	4	Ilha Metabólica
15	13599	54	13	0	2	9	Ilha Metabólica





## ANEXO

**ANEXO A.** Árvore filogenético de 181 genomas de cianobacterias baseados em 2 seqüências de proteínas, acil-ACP reductase (TIGR04058) e aldeído descarboxilase (TIGR04059).



## PLASTICITY OF HYDROCARBON BIOSYNTHETIC PATHWAYS IN CYANOBACTERIA

Apaza-Castillo Gladys A.<sup>1</sup>, Souza Bruno C. E.<sup>1</sup>, Riano-Pachon Diego M.<sup>2</sup>, Fiore Marli F.<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Cellular and Molecular Biology Laboratory, Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo  
<sup>2</sup> Computational, Evolutionary and Systems Biology Laboratory, Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo

