

FERNANDA RIOS JACINAVICIUS

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS E SUAS RELAÇÕES COM
PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS EM CEPAS DE
Microcystis aeruginosa (CYANOBACTERIA)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área
de Concentração de Plantas Avasculares e
Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2015

FERNANDA RIOS JACINAVICIUS

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS E SUAS RELAÇÕES COM
PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS EM CEPAS DE
Microcystis aeruginosa (CYANOBACTERIA)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área
de Concentração de Plantas Avasculares e
Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. CÉLIA LEITE SANT'ANNA (IBT-SP)

CO-ORIENTADORA: DRA. ANA BEATRIZ FURLANETTO PACHECO (UFRJ-RJ)

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Jacinavicius, Fernanda Rios

J12a Aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos e suas relações com produção de microcistinas em cepas de *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) / Fernanda Rios Jacinavicius -- São Paulo, 2015.
329 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015
Bibliografia.

1. Algas. 2. Ultraestrutura. 3. Proteômica. I. Título

CDU: 582.26

Dedico à minha família, com amor.



"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério;
é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Essa tese poderia ser dividida em quatro etapas: no início um mundo totalmente novo, cheio de perspectivas e inúmeras possibilidades, eu não sabia de ultraestrutura, nem tão pouco de proteômica, estava empolgadíssima. A segunda etapa resumiria em medo do novo e anseio em aprender. A terceira etapa, tão almejada, o desenvolvimento do projeto, com ela começaram a surgir várias dificuldades, coleta, isolamento das linhagens, contaminação, parecia que todas as linhagens não tóxicas de *Microcystis* haviam sumido do planeta, quebra e instabilidade dos equipamentos, otimização dos ensaios, greve dos funcionários, contagens, centrifugações e leituras madrugada afora, otimização do método das análises proteômica... Corre pra lá, corre pra cá, enfim... quarta etapa, a tese final, e parece mesmo que no final tudo dá certo!

Para chegar até aqui não foi fácil, mas viveria tudo novamente. Contudo, não conseguiria ter chegado ao fim sem o apoio das minhas orientadoras, dos colaboradores, dos familiares, dos colegas e dos amigos. Assim, agradeço,

Primeiramente a Deus pela sua infinita misericórdia, por sempre se mostrar presente em todos os momentos de minha vida e por todas as bênçãos que me concedeu.

À Dra. Célia Leite Sant'Anna, minha orientadora ("Ori"), pela amizade durante estes onze anos de IBt, por sua constante preocupação e disponibilidade em ajudar em todos os momentos, pela paciência (criatura rs) e confiança, por ser minha mãe científica, me ensinando os primeiros passos na carreira científica e por ter sempre me encorajado nos momentos em que titubeei. Já sinto saudade, Ori!

À Dra. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco, minha coorientadora, uma pessoa admirável, com conduta notável, pela oportunidade e honra de conhecê-la, por abrir as portas do seu laboratório, pelas imensas contribuições nesta tese e para o meu desenvolvimento científico e pessoal. Muito obrigada pela força e dedicação!

Aos funcionários e amigos do Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ficologia, pela maravilhosa convivência ao longo desses anos: Dra. Andréa Tucci, Dra. Célia L. Sant'Anna, Dra. Luciana Retz, Dra. Dielá Pupo, Dra. Silvia M. Pitta, Dra. Mutue T. Fujii, Dra. Nair S. Yokoya, Neide P. R. Souza, Neuzete M. Oliveira, Elizete M. Mitsugui, José Domingos, Manuel G. Silva, Valdilene M. Santos.

À Dra. Luciana Retz de Carvalho, pela ajuda em todos os momentos, desde o empréstimo de bibliografias a sanar dúvidas referentes à sua especialidade, pela imensa ajuda nas análises de espectrometria de massa, em busca das tão desejadas linhagens tóxica e não tóxica. Exemplo de determinação. Obrigada por contribuir com tanto conhecimento e pelo auxílio.

À Dra. Andréa Tucci pelas imensas discussões na análise estatística, pela força e incentivo, pelos conselhos e amizade valiosa.

À Dra. Maria Teresa de Paiva Azevedo, pela contribuição nos congressos e pelo material cedido para o desenvolvimento deste estudo.

À Valdilene Maria do Santos, pelas discussões do mundo das cianobactérias, por toda ajuda na preparação dos meios de cultura para os experimentos, pela preocupação nos dias em que eu ficava até tarde, pela parceria e amizade.

Aos alunos do núcleo de pesquisa em Ficologia que compartilharam comigo os momentos de tristezas e também de alegrias, que não mediram esforços e muito me ajudaram na realização deste trabalho, por serem tão especiais e prestativos: Daniella, Rodrigo (*in memoriam*), Kleber Renan, Renata, Camila Malone, Suzana, Edna, Angélica, Natali, Jonathan, Vanessa, Geanne, Jonatas, Cesar, Raquel, Watson, Guilherme, Camila Rosal, Denise, Ana Livia, Júlia, Cecília, Juliana, Luanda, Maira, João Ost, Andrea G., Leandro... *“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*.

À Camila Malone pelo imenso auxílio na análise molecular, sempre me ensinando e compartilhando de sua experiência.

À Edna Rossini, por poder compartilhar a experiência do mestrado e agora do doutorado, mesmo no “sufoco da entrega da tese”, estava sempre disposta a ajudar.

Ao João Osti, pela coleta em busca da linhagem não tóxica e por ser tão prestativo.

À Hilda Palacio, pela imensa contribuição na aula de qualificação. Sinto saudades das intensas discussões que foram ricas de aprendizado.

À Ana Livia pelas inúmeras ajuda na análise do PAM e ao Jonatas e ao Cesar pelo auxílio na análise de pigmentos.

À Camila Rosal e Guilherme, pessoas especiais que sempre me deram grande força durante a realização deste trabalho.

Ao Kleber, pelas imensas discussões, pelo auxílio mesmo à distância e exemplo de amizade.

Ao Watson, que muitas vezes compartilhei momentos de tristezas, alegrias, angústias e ansiedade, que sempre estive ao meu lado me apoiando e me ajudando em tudo que precisei, muito obrigada!

A todos vocês agradeço pelo companheirismo e sincera amizade!

As pesquisadoras, Dra. Fanly Fungyi Chow Ho, Dra. Marília Gaspar Mais e Dra. Luciana Retz de Carvalho, pela valiosa contribuição de cada uma durante o exame de qualificação.

À equipe do Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM) - Instituto de Biociências, USP - São Paulo, em especial a Dra. Fanly Fungyi Chow Ho, por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório, pela colaboração na análise de antioxidantes, pelo treinamento dos princípios e aplicações da fluorescência da clorofila (fotossíntese), pelas discussões valiosas, por contribuir com tantos ensinamentos para o meu desenvolvimento profissional. Muito obrigada!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida (Processo 2011/50267-8), cujo auxílio foi fundamental para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela oportunidade de aprendizado. À Márcia Regina Ângelo (Marcinha), pela dedicação e bom atendimento.

À equipe do Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, em especial ao Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório.

À equipe do Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia, Instituto de Botânica, em especial a Dra. Marília Gaspar Mais por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório.

À equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, em especial a Dra. Zenilda L. Bouzon por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório. E ao Dr. Éder Carlos Schmidt pela colaboração e atenção.

À equipe do Laboratório de Toxicologia, Genômica e Evolução (LEGE). - CIIMAR (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental), Universidade do Porto, Portugal. Em especial, Dr. Alexandre Campos e Dr. Vitor Vasconcelos, pela discussão dos métodos empregados neste estudo e o aperfeiçoamento das técnicas utilizadas para estudo de proteoma.

Ao Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda – CEMSA, pela análise de microcistinas.

Ao Dr. Octávio Franco, Centro de Análises Protômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília, DF, pela contribuição no projeto inicial, pelo treinamento nas técnicas de extração de proteínas, eletroforese uni- e bidimensional bem como análises estatísticas para a validação dos géis.

Ao Dr. Fábio C. Gozzo, Instituto de Química, UNICAMP, SP pela atenção e contribuição na discussão da identificação/quantificação das proteínas marcadas com iTRAQ.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Laboratório Nacional de Biociências- LNBio, Campinas, SP, em especial a Dra. Adriana Franco Paes Leme por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório. À Dra. Bianca Alves Pauletti especialista em espectrometria de massas pelo auxílio e atenção.

À equipe da Unidade Multidisciplinar de Genômica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, em especial à Dra. Ana Beatriz F. Pacheco, Dr. Giovanni Veríssimo e Dra. Adriana M. da Silva, pelas imensas contribuições neste trabalho.

À equipe da Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, em especial à Dra. Lina Zingalli, por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório. Ao Dr. Dario Eluan Kalume pela imensa contribuição neste trabalho.

À equipe do Laboratório de Ficotoxinas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial ao Dr. Ernani Pinto, por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório. Ao Dr. Ronaldo Leal Carneiro, pela imensa contribuição e sugestões, e por tudo o que me ensinou.

À equipe do Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, em especial ao Dr. Luis H. Z. Branco por disponibilizar a infraestrutura do seu laboratório. A Dra. Janaina Rigonato pela colaboração na análise filogenética.

À teacher Emilia Mercaldi, pelo aprendizado, por ter sempre me socorrido e pela dedicação ao ensino do idioma inglês e principalmente pelos bons momentos juntas.

A todos os meus amigos que me incentivaram e me apoiaram nos momentos em que mais precisei!

À família Jacinavicius, por terem me acolhido e me apoiado. À Gabriela Castro Dias pela revisão da tese.

Ao Fernando, meu esposo, por ser essa pessoa maravilhosa, que sempre me incentivou a dar este grande passo, pelo carinho e amor, por ser amigo e sempre presente. Por toda compreensão e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam não aparecer. Você foi a pessoa que compartilhou comigo os momentos de tristezas, angustias, ansiedade e alegrias, sem você não teria conseguido chegar até aqui! Não tenho palavras para agradecer, além deste trabalho, dedico todo meu amor a você.

À família Rodrigues pelo incentivo, por serem meu apoio constante e minha estrutura. Em especial a minha irmã Patrícia e o meu cunhado Marco pelos momentos que passamos juntos e pela compreensão. A pequenina Júlia, minha fonte de alegria.

À minha mãe Regina, por todo amor e dedicação, por ser esta mulher forte e guerreira, fonte inesgotável de amor, carinho e incentivo. Que não mediu esforço pra que este sonho se realizasse. Sem o teu apoio não teria chegado até aqui. Ao meu pai Orivaldo (*in memoriam*), que infelizmente não pôde estar presente neste momento tão feliz da minha vida, mas não poderia deixar de dedicar a ele, pois se hoje estou aqui é por ter me ensinado a lutar e a reconhecer o que é o amor e a honestidade.... Saudade eterna! Sem a ajuda de vocês, eu jamais teria chegado aqui! Minha eterna gratidão!

Sendo assim, agradeço a todos que passaram pela minha vida durante o desenvolvimento desta tese, que mesmo sem saber, me ensinaram mais do que posso expressar em palavras.

RESUMO

ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS E SUAS RELAÇÕES COM PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS EM CEPAS DE *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA)

O gênero *Microcystis* é um dos que mais causam problemas em águas continentais de todo mundo devido a sua alta capacidade de formar florações e produzir toxinas. *M. aeruginosa* é a espécie mais conhecida e estudada do gênero, pois é uma impactante cianobactéria formadora de florações em ambientes aquáticos. As florações são formadas por um conjunto de linhagens, algumas capazes de produzir um peptídeo hepatotóxico chamado microcistina, outras não. Compreender os fatores que afetam a produção das microcistinas em cianobactérias tem sido um desafio para os pesquisadores há quase 40 anos. Apesar da intensa investigação, muitos resultados são contraditórios, deste modo, ainda não há clareza sobre sua função bem como o controle de sua produção. Essa falta de dados conclusivos gera uma lacuna quando se busca estabelecer como e quando uma toxina pode ser produzida por uma dada espécie de cianobactéria. Assim, nosso objetivo foi comparar uma linhagem tóxica (CCIBt3194) e outra não tóxica (CCIBt3106) de *M. aeruginosa* quanto à produção de microcistinas, analisando parâmetros morfométricos, ultraestruturais e fisiológicos revelados pelo perfil de pigmentos, expressão diferencial de proteínas e atividades fotossintética e antioxidante, em diferentes fases de crescimento. As linhagens isoladas de reservatórios em São Paulo foram cultivadas nas seguintes condições: 23 ± 2 ° C, 40-50 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 14-10h ciclo claro-escuro e meio ASM-1. As células foram coletadas em fase de crescimento exponencial e exponencial tardia e todos os parâmetros foram investigados. Os dados obtidos apontam que as linhagens tóxica e não tóxica exibiram perfis diferentes de proteínas ao passar da fase exponencial para a exponencial tardia. A linhagem não tóxica teve o metabolismo mais ativo na fase exponencial, com maior número de proteínas mais expressas e de células, o que inverteu-se na exponencial tardia, quando a cepa tóxica teve a maior taxa de crescimento e o metabolismo mais ativo. Quanto à linhagem tóxica em crescimento exponencial, também foram observadas funções associadas ao metabolismo energético ativo (síntese de ATP, Acetil-CoA, de proteínas, utilização de carbono e processos catalíticos). Pode-se especular que essas diferenças estejam associadas à produção de um pool de proteínas, o que inclui a atividade de síntese de microcistina, indicando que a cepa tóxica investiu recursos produzindo proteínas em detrimento da duplicação celular. As linhagens apresentaram diferenças no metabolismo de nitrogênio, o que pode ou não

estar relacionado à diferença quanto à síntese de microcistinas. Além do mais, a linhagem tóxica formou colônias flutuantes com numerosas células incorporadas na mucilagem em ambas às fases de crescimento, com alta síntese de proteínas constituintes de aerótopos. Sendo assim, exibiu atributos relacionados à maior dependência de luz, como menores concentrações de pigmentos acessórios, maiores valores de antioxidantes e maiores valores de rendimento de extinção não-fotoquímica regulada e não regulada. Portanto, o sistema protetor contra a fotooxidação foi mais atuante nesta linhagem. Enquanto isso, a linhagem não tóxica exibiu atributos relacionados à menor dependência de luz, colônias pequenas, com poucas células, não flutuantes, maiores valores de pigmentos acessórios, clorofila *a*, eficiência fotossintética e rendimento de extinção fotoquímica. Em relação à organização celular, o volume dos grânulos de cianoficinas, os aerótopos e a disposição dos tilacóides foram os que mais contribuíram para a distinção entre as linhagens e entre as diferentes fases de crescimento. O acúmulo de carboxissomos e grânulos de polifosfato foram observados em maior número na linhagem não tóxica na fase exponencial, indicando maior ênfase na fixação de CO₂ pelos carboxissomos e disponibilidade do uso de reservas dos grânulos de polifosfato como fonte de energia para a síntese de ATP. Ambas as linhagens apresentaram sistema de membranas tilacoidais tipo padrão, disperso por todo o citoplasma, na fase exponencial de crescimento. Contudo, na fase exponencial tardia a linhagem não tóxica apresentou células com diferentes distribuições dos tilacóides. Sendo assim, as duas linhagens comparadas neste estudo tiveram estratégias bem diferentes para lidar com duas condições fisiológicas diferentes representadas pelas fases exponencial e exponencial tardia de crescimento. Isso pode ser devido à variabilidade fenotípica (de base genética) entre as duas linhagens que têm potencial para explorar de forma distinta o seu ambiente. Esta variabilidade pode suplantear a diferença pontual que é a capacidade ou não de síntese de microcistina. Deste modo, na natureza, essas diferentes estratégias encontradas para absorção de luz devem proporcionar condições favoráveis para que linhagens tóxica e não tóxica compartilhem do mesmo ambiente.

Palavras-chave: microcistinas, ultraestrutura, morfologia, fisiologia e bioquímica.

ABSTRACT

MORPHOLOGIC, PHYSIOLOGIC AND BIOCHEMICAL ASPECTS AND THEIR RELATIONSHIP WITH MICROCYSTIN PRODUCTION IN STRAINS OF *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA)

The genus *Microcystis* is one that causes most problems in continental waters worldwide due to its capacity of forming blooms and producing toxins. *M. aeruginosa* is the most known and studied species of the genus since it is an impacting cyanobacteria able to form blooms in water environments. Blooms are formed by a group of lineages; some are capable of producing hepatotoxic peptides called microcystins, others are not. Understanding the factors that affect microcystin production in cyanobacteria has been a challenge for researchers for almost 40 years. In spite of intense investigation, many results are contradictory, thus, its function as well as control of its production are not clear yet. Lack of conclusive data generates a gap when seeking to establish how and when a toxin can be produced by a given species of cyanobacteria. Thus, our objective was to compare a toxic (CCIBt3194) and a non-toxic (CCIBt3106) lineage of *M. aeruginosa* regarding microcystin production, analyzing morphometric, ultrastructural and physiological parameters revealed by pigment profile, protein differential expression and photosynthetic and antioxidant activities in different growth phases. Lineages isolated from reservoirs in São Paulo were cultivated in the following conditions: $23 \pm 2^\circ \text{C}$, $40\text{-}50 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 14-10h light-dark cycle and ASM-1 medium. Cells were collected in exponential and stationary growth phases and all parameters were investigated. The obtained data indicate that toxic and non-toxic lineages presented different profiles of protein when they went from exponential to stationary phases. Non-toxic lineages showed more active metabolism in the exponential phase, with a higher number of more expressed proteins and cells, and that was inverted in the stationary phase when toxic strains had higher growth rate and more active metabolism. As for the toxic lineage in exponential growth, it was also observed functions associated with active energetic metabolism (ATP, Acetil-CoA and protein synthesis, carbon utilization and catalytic processes). It is possible to speculate that these differences are associated with the production of a protein pool, which includes the microcystin synthesis activity, indicating that the toxic strain invested resources producing protein instead of duplicating cells. The lineages presented differences in the nitrogen metabolism, which may or may not be related to the difference in terms of microcystin synthesis. Besides, the toxic lineage formed floating colonies with numerous cells incorporated to the mucilage in

both growth phases, with high protein synthesis constituting of aerotopes. This way, it showed attributes related to more dependence on light, with lower concentration of accessory pigments, higher antioxidant values and higher values of yield of regulated and non-regulated non-photochemical extinction. Consequently, the protector system against photooxidation was more active in this lineage. On the other hand, the non-toxic lineage showed attributes related to less dependence of light, small colonies, with few cells, non-floating, higher values of accessory pigments, chlorophyll *a*, photosynthetic efficiency and yield of photochemical extinction. In relation to cell organization, the volume of the cyanoficeas granules, aerotopes and thylakoid disposition were the ones that contributed the most to the distinction between lineages and between the different growth phases. The accumulation of carboxysomes and polyphosphate granules was observed in higher number in the non-toxic lineage in the exponential phase, indicating more emphasis on CO₂ fixation by the carboxysomes and availability of the use of reserves of polyphosphate granules as energy source for ATP synthesis. Both lineage presented a standard system of thylakoid membranes, dispersed throughout the cytoplasm in the exponential growth phase. However, in the stationary phase, the non-toxic lineage presented cells with different thylakoid distributions. Thus, the two lineages compared in this study had very different strategies to deal with two different physiological conditions represented by the exponential and stationary growth phases. This may be due to the phenotypical variability (of genetic basis) between the two lineages, which have potential to exploit their environment in distinct ways. This variability may supplant the specific difference which is the synthesis capacity, or not, of microcystin. Therefore, in nature, these strategic differences found in light absorption may provide favorable conditions for the toxic and non-toxic lineages to share the same environment.

Key words: microcystins, ultrastructure, morphology, physiology, biochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Representação estrutural do ficobilissomo..	25
Figura 2.	Eutrofização e os potenciais efeitos das mudanças climáticas sobre a abundância de florações de algas e cianobactérias nocivas.	29
Figura 3.	Estruturas das microcistinas e seus derivados	36
Figura 4.	Representação esquemática da estrutura do fígado normal e após o efeito da microcistina no tecido hepático.....	38
Figura 5.	Modelo proposto para a biossíntese da microcistina-LR.....	39
Figura 6.	Agrupamentos gênicos correspondentes a enzimas envolvidas na síntese das hepatotoxinas microcistina (mcy) e nodularina (nda) de alguns gêneros de cianobactérias.....	40
Figura 7.	Esquema de fracionamento, purificação e quantificação das microcistinas a partir de extratos celulares de cepas de <i>M. aeruginosa</i>	66
Figura 8.	Aspecto geral das culturas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica).....	76
Figura 9.	<i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt3194 (tóxica).	90
Figura 10.	Produtos de amplificação dos genes <i>mcyD</i> , <i>mcyG</i> e <i>mcyE</i>	91
Figura 11.	Análise filogenética de sequências do gene RNAr 16S pelo método de Máxima Verossimilhança (TrN+I+G,1000x)	92
Figura 12.	Curvas de crescimento de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt 3194 (linhagem tóxica) e CCIBt3106 (linhagem não tóxica)	93
Figura 13.	<i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt3194 (tóxica) ..	97
Figura 14.	Variação dos diâmetros celulares (μm) das linhagens de <i>M. aeruginosa</i>	98
Figura 15.	Micrografia eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3106 <i>Microcystis aeruginosa</i> (não tóxica), fase exponencial de crescimento..	100
Figura 16.	Micrografia eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3194 <i>Microcystis aeruginosa</i> (tóxica), fase exponencial de crescimento.....	100
Figura 17.	Micrografia Eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3106 <i>Microcystis aeruginosa</i> (não tóxica), fase exponencial tardia de crescimento	101

Figura 18.	Micrografia eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3194 <i>Microcystis aeruginosa</i> (tóxica), fase exponencial tardia de crescimento.	101
Figura 19.	Cromatogramas representativos obtidos por HPLC-DAD em $\lambda = 238$ nm para análise de microcistinas, do extrato em metanol 90% de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt3194.	106
Figura 20.	Cromatogramas representativos obtidos por HPLC-DAD em $\lambda = 238$ nm para análise de microcistinas, do extrato em metanol 90% de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt3106	107
Figura 21.	Quantificação das microcistinas isoladas nas diferentes fases de crescimento da linhagem CCIBt3194.	107
Figura 22.	Variação da cota celular de clorofila <i>a</i> nas diferentes fases de crescimento para a linhagem tóxica (CCIBt 3194) e para a linhagem não tóxica (CCIBt 3106) de <i>Microcystis aeruginosa</i>	108
Figura 23.	Concentrações de β -caroteno e carotenóides totais nas células de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), nas diferentes fases de crescimento.	110
Figura 24.	Variação da carotenogênese (razão carotenóides/clorofila) nas células de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), nas diferentes fases de crescimento..	110
Figura 25.	Variação da cota celular de C-ficocianina nas diferentes fases de crescimento para as linhagens CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) de <i>Microcystis aeruginosa</i>	111
Figura 26.	Variação da cota celular de aloficocianina nas diferentes fases de crescimento para as linhagens CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) de <i>Microcystis aeruginosa</i>	111
Figura 27.	Variação da cota celular de todos os pigmentos analisados nas diferentes fases de crescimento.....	112
Figura 28.	Variação do potencial redutor do ferro nas células de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) nas diferentes fases de crescimento.....	113
Figura 29.	Variação do potencial de compostos fenólicos nas células de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), nas diferentes fases de crescimento..	114

Figura 30.	Curvas de fotossíntese-irradiância da linhagem tóxica (CCIBt 3194) e não tóxica (CCIBt 3106).....	115
Figura 31.	Aspecto geral das culturas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) na fase exponencial de crescimento..	116
Figura 32.	Número de proteínas diferencialmente mais expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica).....	121
Figura 33.	Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica).....	122
Figura 34.	Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3106 (não tóxica).....	123
Figura 35.	Número de proteínas diferencialmente mais expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica).....	136
Figura 36.	Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt31006 (não tóxica)	137
Figura 37.	Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt31006 (não tóxica)	138
Figura 38.	Ordenação biplot pela análise dos componentes principais (APC)	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Metabólitos secundários de cianobactérias	32
Tabela 2.	Sais do meio de cultura ASM-1.....	63
Tabela 3.	Cepas de <i>M. aeruginosa</i> selecionadas para análise de toxicidade.....	64
Tabela 4.	Volumes de cultura (mL) utilizados para cada parâmetro estudado.....	76
Tabela 5.	Parâmetros de crescimento das linhagens CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica)	94
Tabela 6.	Valores de fotossíntese máxima (Fmax), eficiência fotossintética (Alfa) e ponto de saturação da fotossíntese (Ik) das linhagens de <i>Microcystis aeruginosa</i> CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica).	115
Tabela 7.	Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica).....	125
Tabela 8.	Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3106 (não tóxica)	130
Tabela 9.	Proteínas expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica)	139
Tabela 10.	Proteínas expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de <i>M. aeruginosa</i> CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica)	143
Tabela 11.	Síntese dos resultados da APC realizada a partir de 39 parâmetros	150

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Eutrofização de corpos d'água.....	21
1.2 Estratégias adaptativas das cianobactérias.....	22
1.3 Alterações climáticas globais.....	28
1.4 Metabólitos secundários	30
1.5 Florações de cianobactérias tóxicas	33
1.6 Microcistina.....	34
1.6.1 Modo de ação	37
1.6.2 Biossíntese.....	38
1.7 Casos de ocorrências de microcistinas no Brasil e Legislação Brasileira.....	41
2 ESTADO DA ARTE: POSSÍVEIS FUNÇÕES DAS MICROCISTINAS E REGULAÇÃO DA SUA PRODUÇÃO	43
2.1 Microcistinas e fatores ambientais	43
2.1.1 Regulação da transcrição dos genes <i>mcy</i>	46
2.2 Microcistinas e seu papel extracelular	49
2.2.1 Morfologia.....	50
2.2.2 Alelopatia e competição	51
2.2.3 Herbivoria.....	51
2.2.4 Quorum sensing.....	52
2.3 Microcistinas e seu papel intracelular	54
2.3.1 Regulação fotossintética	54
2.3.2 Proteção a estresse oxidativo	56
2.4 Estudos de proteômica e outras abordagens de larga escala.....	57
3 OBJETIVO.....	61
3.1 Objetivo geral.....	61
3.2 Objetivos específicos	61
4 MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1 Coleta	62
4.2 Isolamento e cultivo	62
4.3 Culturas monoespecíficas em laboratório.....	63
4.4 Meio de cultivo	63
4.5 Seleção das cepas.....	64
4.5.1 Teste de toxicidade.....	64
4.6 Obtenção de Biomassa para teste de toxicidade.....	65
4.7 Preparo dos extratos para análise de microcistinas	65
4.8 Análise qualitativa e quantitativa das microcistinas utilizando a técnica de LC-MS/MS	66
4.9 Curvas de Crescimento.....	66
4.9.1 Obtenção de biomassa	66

4.9.2 Biovolume	67
4.9.3 Densidade celular	67
4.9.4 Determinação das taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento celular	68
4.10 Critérios de escolha das linhagens	68
4.11 Estudo Molecular	69
4.11.1 Caracterização filogenética das cepas estudadas	69
4.11.2 Preparação da amostra para extração de DNA genômico	69
4.11.3 Tratamento I	69
4.11.4 Tratamento II	69
4.11.5 Extração de DNA genômico	70
4.11.6 Amplificação gênica do fragmento 16S rRNA + ITS	70
4.11.7 Amplificação de fragmentos gênicos envolvidos na biossíntese de microcistinas, <i>mcyD</i> , <i>mcyE</i> e <i>mcyG</i>	70
4.11.8 Clonagem dos fragmentos gênicos	71
4.11.9 Extração de DNA plasmidial	72
4.11.10 Sequenciamento	73
4.11.11 Processamento e análise filogenética das sequências	74
4.12 Delineamento experimental e Análise dos dados	75
4.13 Estudos morfométricos	77
4.14 Microscopia eletrônica de transmissão	77
4.15 Extração e análise de pigmentos	77
4.15.1 Clorofila <i>a</i> e ficobiliproteínas	77
4.15.2 Carotenóides	78
4.16 Determinação dos parâmetros fotossintéticos	79
4.17 Toxina intracelular	79
4.18 Determinação de antioxidantes	80
4.18.1 DPPH	80
4.18.2 Ensaio de redução do ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power)	81
4.18.3 Ensaio da atividade antioxidante pelo método do Folin-Ciocalteu	81
4.19 Análise proteômica	82
4.19.1 Extração de proteínas	82
4.19.2 Dosagem de proteínas	83
4.19.3 Digestão das proteínas	83
4.19.4 Purificação de peptídeos para marcação	84
4.19.5 Marcação de peptídeos com tags de massa (kit iTRAQ)	84
4.19.6 Purificação dos peptídeos após marcação	85
4.19.7 Análise das amostras de peptídeos por LC-MS/MS	85
4.19.8 Processamento de dados e identificação de proteínas	87
4.19.9 Análise Quantitativa	87
4.19.10 Análise no ProteinLynx Global Server	88

4.20 Análises estatísticas	89
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1 Seleção das linhagens tóxica x não tóxica	90
5.2 Análise filogenética	91
5.3 Curva de crescimento	92
5.4 Estudo morfométrico	95
5.5 Estudo de ultraestrutura	99
5.6 Análises qualitativa e quantitativa das microcistinas LR, RR e YR utilizando a técnica de HPLC	106
5.7 Análise de pigmentos, antioxidantes e parâmetros fotossintéticos	108
5.8 Análise Proteômica	119
5.8.1 Identificação de proteínas.....	119
5.8.2 Proteínas diferencialmente expressas	120
5.8.2.1 Comparação entre fases de crescimento para a linhagem tóxica e para a linhagem não tóxica	120
5.8.2.2 Comparação entre as linhagens tóxica e não tóxica na fase exponencial e exponencial tardia de crescimento.....	135
6 Considerações finais	157
7 REFERÊNCIAS.....	160

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eutrofização de corpos d'água

A água ocupa cerca de 75% da superfície do nosso planeta, o que representa um volume de mais de um bilhão de quilômetros cúbicos (Smol, 2002), contudo, é importante considerar que somente 2,6% desta grande massa são constituídos de água doce. Além disso, 99,7% destes 2,6% não estão disponíveis para consumo, seja por estarem congeladas formando as calotas polares ao norte e ao sul (76,4%), seja por integrarem os aquíferos (22,8%). Apenas uma fração ínfima, cerca de 0,3%, encontra-se prontamente acessível como água superficial formando áreas alagadas, rios, lagos e represas (Tundisi, 2003).

No entanto, mesmo restando apenas essa pequena parte de água doce superficial, nas últimas décadas a sua qualidade vem decrescendo rapidamente em virtude dos impactos antrópicos. Os processos intensos e desordenados de urbanização, industrialização, desmatamento e exploração agropecuária fazem com que parte da água disponível, tanto nas economias em desenvolvimento quanto nas desenvolvidas, esteja poluída (Tundisi, 2003). Esta situação ocasiona um excesso de entrada de nutrientes através do lançamento de efluentes domésticos e industriais sem tratamento e do escoamento de fertilizantes nos ecossistemas aquáticos, resultando na eutrofização (Tundisi & Tundisi, 2008).

A eutrofização é o processo de enriquecimento das águas através da entrada de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, com consequente aumento da biomassa fitoplancônica e de macrófitas (Rebouças et al., 1999; Tundisi, 2003). O aumento da biomassa algal em consequência desse processo é um fenômeno conhecido como floração, o que ocasiona diversos problemas econômicos, ambientais e de saúde pública, como total desequilíbrio ecológico, mortalidade de peixes, aves e mamíferos, alteração na diversidade de espécies, gosto e odor desagradáveis nas águas, produção de toxinas e comprometimento do uso dessa água pela sociedade (von Sperling, 2006; Tundisi & Tundisi, 2008; Ansari et al., 2011; Carvalho et al., 2013). A eutrofização é a principal causa do enriquecimento artificial por nutrientes dos sistemas aquáticos e uma das piores ações do homem sobre o meio ambiente (Ansari et al., 2011). Neste cenário, a eutrofização tem propiciado condições favoráveis para que as cianobactérias dominem a comunidade fitoplancônica e formem florações, tais como alta concentração de nutrientes, baixa transparência da água e elevados valores de pH (Costa & Azevedo, 1994; Mur et al., 1999; Honda et al., 2006; Tundisi et al., 2006; Sant'anna et al., 2008). Um dos mais favoráveis ecossistemas para a expansão das

florações de cianobactérias no Brasil são as represas de abastecimento. Em geral, possuem alto tempo de retenção de água e frequentemente são eutrofizadas, em decorrência do despejo de efluentes domésticos e industriais, como é o caso dos reservatórios Billings e Guarapiranga, em São Paulo (CETESB, 1998, 2002, 2005; Sant'anna et al., 2008).

O alto tempo de retenção de água nas represas favorece o desenvolvimento das cianobactérias, pois como estas apresentam taxas de crescimento menores do que as observadas em muitas espécies de algas, elas exigem águas com baixa turbulência para que possam formar florações (Chorus & Bartram, 1999; Nalewajko & Murphy, 2001). Contudo, as espécies de cianobactérias se estabelecem em um corpo d'água devido a um conjunto de estratégias adaptativas que as tornam competitivas nos ecossistemas aquáticos (Sant'anna et al., 2008) e que são bastante influenciadas por fatores ambientais como temperatura, luz e nutrientes.

1.2 Estratégias adaptativas das cianobactérias

A temperatura é um fator importante no desenvolvimento das cianobactérias, uma vez que afeta processos fisiológicos como a fotossíntese, a respiração e a taxa de crescimento destes organismos (Grzebyk & Berland, 1995; Reynolds, 1997; Yamamoto & Nakahara, 2005; Reynolds, 2006).

De acordo com resultados recentes divulgados pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas da Organização das Nações Unidas (ONU) (IPCC, 2014), caso as emissões de gases do efeito estufa continuem crescendo às atuais taxas pelos próximos anos, a temperatura do planeta poderá aumentar até 4,8°C neste século. As taxas de crescimento das cianobactérias são otimizadas em temperaturas relativamente elevadas, acima de 25°C (Robarts & Zohary, 1987; Butterwick et al., 2005; Watkinson et al., 2005).

Esse aquecimento global intensificará a formação de florações de cianobactérias graças ao aumento da temperatura média da água. Vários estudos têm mostrado que cianobactérias formadoras de florações em temperaturas mais elevadas têm vantagem competitiva sobre os outros grupos fitoplancônicos nos sistemas eutróficos (Jöhnk et al., 2008; Paerl & Huisman, 2008). Além disso, temperatura elevada favorece a estratificação térmica de lagos e reservatórios por períodos mais longos, reduzindo a mistura vertical e tornando as águas quentes e pobres em nutrientes na superfície, enquanto são frias e ricas em nutrientes na profundidade. Isto trará um impacto significativo sobre a comunidade planctônica nas águas

superficiais, pois essas condições beneficiarão algumas espécies de cianobactérias capazes de flutuar de forma controlada na coluna d'água (Paerl & Huisman, 2008; O'Neil et al., 2012).

A regulação da flutuabilidade constitui um importante recurso ecológico que permite a busca dos organismos por nichos mais adequados em termos de concentração de nutrientes, melhor aproveitamento de luz e competição (Hyenstrand et al., 1998; Chorus & Bartram, 1999), incluindo redução da perda por sedimentação e maior taxa de fotossíntese (Oliver & Ganf, 2000; Visser et al., 2005). Deste modo, as cianobactérias ganham uma vantagem competitiva em relação a outros organismos fitoplanctônicos por regularem a sua posição na coluna de água (Hyenstrand et al., 1998).

Cianobactérias em colônias e filamentos podem regular sua flutuabilidade na coluna d'água em resposta às condições ambientais em virtude da capacidade de formarem as chamadas vesículas de gás ou aerótopos (Klebahn, 1895; Walsby, 1994). Quanto à morfologia, aerótopos são estruturas inertes, ocas, de cavidade cilíndrica com extremidades cônicas, e rígidas – isto é, não podem ser infladas de acordo com a quantidade de gás em seu interior (Walsby, 1969). Em cada espécie, a largura do cilindro bicônico é razoavelmente uniforme – aproximadamente 70 nm de diâmetro – e seu comprimento varia de 100-800 nm, ou mesmo mais (Walsby, 1994). Os aerótopos estão orientados em feixes paralelos, aumentando assim a permeabilidade de gás nas células.

Os aerótopos são constituídos exclusivamente de proteínas altamente permeáveis a diversos gases como H_2 , N_2 , O_2 , CO_2 , CO , CH_4 , no entanto são impermeáveis às moléculas de água, uma vez que a superfície interna da membrana é hidrofóbica (Stoeckenius & Kunau, 1968; Walsby, 1969; Jones & Jost, 1970). A produção de aerótopos é muito rápida. Em *Microcystis*, um aerótopo pode chegar ao seu máximo de comprimento (600 nm) em apenas 12h (Lehmann & Jost, 1971). Sua síntese foi descrita em *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing, sendo regulada por 20 genes (Mlouka et al., 2004). A regulação da posição vertical é feita através do número de aerótopos presente nas células, em pressão mais elevada, eles entram em colapso irreversível, seguido da perda da flutuabilidade da célula (Walsby, 1971). O controle da densidade celular também pode desempenhar um papel importante na flutuabilidade dos organismos através do acúmulo de substâncias mais densas do que a água, como carboidratos ou proteínas (Walsby, 1994).

A flutuabilidade também é influenciada pelas dimensões das colônias (Falconer, 2005): quanto maior a colônia, maior a superfície de contato, o que proporciona maior flutuabilidade.

Ao mesmo tempo, colônias grandes e a presença de mucilagem oferecem proteção contra a predação, diminuindo significativamente as taxas de herbivoria.

A luz também tem grande influência no desenvolvimento e na fisiologia das cianobactérias e, além disso, em condições de alta ou baixa irradiância as cianobactérias têm vantagens sobre os demais grupos do fitoplâncton.

As cianobactérias promovem captação de luz através de dois tipos de sistemas antenas presentes na membrana do tilacóide: o primeiro é constituído por moléculas de clorofila *a* e carotenóides (antenas proximais) e o segundo de ficobilissomos (antena distal) (Lundell et al., 1985). A luz solar é distribuída ao longo de toda a faixa visível e as clorofilas absorvem apenas uma parte desse espectro (Madigan et al., 2010). Os pigmentos antenas acessórios captam a energia luminosa em regiões do espectro luminoso não absorvidas pelas clorofilas, fazendo com que a transmissão de energia luminosa tenha eficiência próxima a 100% (Grossman, 2003).

Os carotenóides são pigmentos de coloração vermelha, laranja e amarela que absorvem mais intensamente a irradiância nos comprimentos de onda entre 460 a 550 nm. Os mais de 750 tipos de carotenóides conhecidos podem ser subdivididos em dois subgrupos: xantofilas e carotenos (Johnson & Schroeder, 1995; Haegele et al., 2000; Britton et al., 2004). As xantofilas apresentam grupos polares contendo moléculas de oxigênio tais como hidroxí, ceto ou epóxi, o que facilita a solubilização em água. Os carotenos são constituídos por hidrocarbonetos puros e só se encontram em solução quando associados a proteínas (Sözer, 2011). O β -caroteno é o carotenóide majoritário nas cianobactérias, entretanto, a fase de crescimento, a irradiância, as fontes e as concentrações de nitrogênio, assim como a espécie e o tipo de linhagem, podem alterar a composição de carotenóides (Takaichi & Mochimaru, 2007).

Os carotenóides estão firmemente associados à membrana fotossintética, auxiliando tanto na captação de luz como na proteção contra fotooxidação da clorofila *a* (Nelson & Cox, 2002; Madigan et al., 2010). A fotooxidação ocorre sob condições de absorção de luz em excesso e a principal função dos carotenóides é proteger a célula contra o dano oxidativo durante a fotossíntese (Steiger et al., 1999). Logo, a expressão genética relacionada à biossíntese de carotenóides é estimulada por altas intensidades luminosas (Schafer et al., 2006).

As ficobilinas estão ligadas covalentemente a proteínas específicas, formando as ficobiliproteínas, que se associam em complexos altamente ordenados chamados ficobilissomos e estes se unem às membranas fotossintéticas (Nelson & Cox, 2002; Madigan et al., 2010) - (figura 1). Quanto às características espectrais, as ficobiliproteínas podem ser: vermelhas, absorver mais intensamente luz de comprimentos de onda na faixa de 550 nm (ficoeritrina), energia luminosa na região do verde; ou azuis que absorvem luz de comprimentos de onda próximos a 620 nm (c-ficocianinas) e 650 nm (aloficocianinas), energia luminosa na região do vermelho (Glazer, 1981; Madigan et al., 2010).

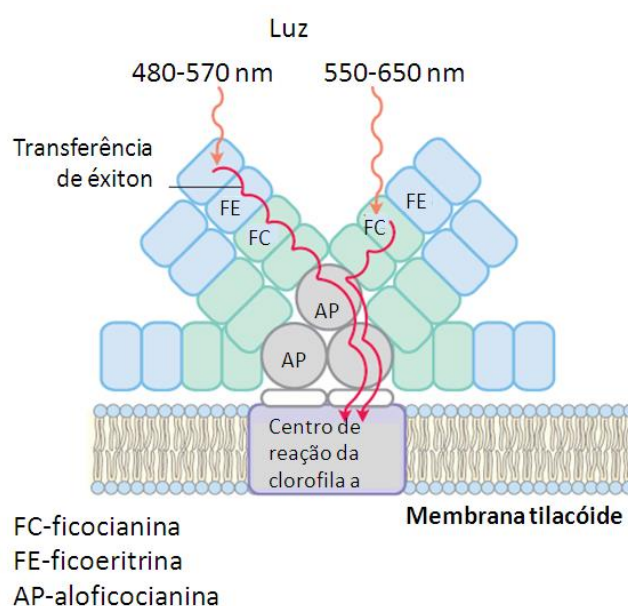


Figura 1. Representação estrutural do ficobilissomo. Fonte: (Lima, 2012).

A qualidade e a quantidade de luz podem influenciar a composição dos ficobilissomos. Em geral, altas taxas de intensidade luminosa resultam em diminuição do número de proteínas cromóforas no complexo e de ficobilissomos por célula, assim como de clorofila *a* (Porter et al., 1978; Wyman & Fay, 1986; Sendersky et al., 2005). À medida que a intensidade luminosa diminui, a quantidade de ficobilissomos em uma cianobactéria aumenta, permitindo assim o crescimento destes organismos em intensidades relativamente baixas (Madigan et al., 2010).

O principal papel biológico das ficobiliproteínas é o de receptores de luz durante o processo fotossintético. Atualmente, tem-se discutido um papel secundário para estas moléculas, que seria o de reserva de nitrogênio, visto que são seletivamente degradadas quando as células são expostas à deficiência deste nutriente (Sloth et al., 2006).

Sendo assim, os pigmentos acessórios aloficocianina, ficocianina (Madhyastha et al., 2009), ficoeritrina (Cano-Europa et al., 2010) e carotenóides (Telfer et al., 1994), além de auxiliarem na captação de luz, são responsáveis pela defesa contra agentes oxidativos nas cianobactérias, fazendo com que estas sejam tolerantes à alta intensidade luminosa. Os carotenóides são capazes de desativar espécies reativas de oxigênio e sequestrar radicais livres (Yamauchi et al., 1993; Montenegro et al., 2002; Montenegro et al., 2004; Rios et al., 2009). Tais espécies ativas de oxigênio provocam o que se conhece por estresse oxidativo, resultando em danos que podem levar à morte celular (Mittler, 2002).

As cianobactérias são os únicos organismos oxifototróficos (fotossíntese oxigênica) que contêm mecanismos e adaptações para fixar diretamente o nitrogênio atmosférico (N_2) (Lee, 2008; Whitton & Potts, 2012). Contudo, a fotossíntese aeróbica é incompatível com a fixação de nitrogênio, uma vez que a nitrogenase é inativada por oxigênio (Kumar et al., 2010). Deste modo, as cianobactérias utilizam dois mecanismos principais para separar essas atividades: um temporal e outro espacial. A primeira ocorre segundo o ciclo circadiano, no qual há o armazenamento de glicogênio durante o dia e fixação de nitrogênio durante a noite (Toepel et al., 2009), sendo comum em alguns gêneros unicelulares. A outra forma ocorre por meio de células diferenciadas denominadas heterócitos, sendo um mecanismo exclusivo de espécies de cianobactérias filamentosas (Sandh et al., 2009; Kumar et al., 2010).

Ao lado do conjunto de pigmentos fotossintetizantes, da presença de vesículas gasosas e da fixação do nitrogênio atmosférico, cianobactérias apresentam no citoplasma duas estruturas associadas ao acúmulo de reservas: carboxissomos e grânulos, sendo que os últimos podem ser constituídos de cianoficina, de substância semelhante ao glicogênio ou de polifosfato (Stanier & Cohen-Bazire, 1977). Desta forma, são elevadas a capacidade e a eficiência de estocar o nitrogênio, o fósforo e o dióxido de carbono, na forma de grânulos de cianoficina (Falconer, 2005), grânulos de polifosfato (Lee, 2008) e carboxissomos (Yeates et al., 2008), respectivamente.

O amido das cianofíceas (semelhante ao glicogênio) é constituído por polissacarídeos formados por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4. Essa substância difere do amido ao apresentar ramificações abundantes em relação à cadeia principal de polissacarídeo (Lourenço, 2006). Estas estruturas apresentam diâmetro em torno de 30-140 nm, são bastante numerosas, ocorrem entre tilacóides, cuja função é material de reserva carbonada, constituindo a principal reserva energética da célula (Pankratz & Bowen, 1963; Dembinskat & Allen, 1988).

Os grânulos de cianoficina são estruturas esféricas ou poliédricas de até 500 nm, incolores e de índice de refração ligeiramente superior ao citoplasma (Fuhs, 1973). São sintetizados ao final da fase exponencial e seu volume máximo ocorre durante a fase estacionária de crescimento (Lang, 1968; Simon, 1973). A produção independe de ribossomos (Dembinskat & Allen, 1988). Quanto às estruturas, são formadas por dois aminoácidos: ácido aspártico e arginina com razão molar 1:1, cuja função é armazenar nitrogênio (Simon, 1971; Simon & Weathers, 1976). Em situações de carência de nitrogênio, os grânulos de cianoficina podem ser decompostos rapidamente por ação de pepsinas e o conteúdo de nitrogênio presente pode ser aproveitado pelas diversas funções metabólicas da célula.

As cianoficinas servem como reservatório e controle dinâmico de nitrogênio na célula, cuja concentração depende do suprimento deste elemento no ambiente e das demandas metabólicas das células (Perry & Staley, 1997). A habilidade de maximizar seu acúmulo nitrogenado, com a vantagem de tornar o nitrogênio fixado sempre disponível, é uma adaptação extremamente importante das cianobactérias, provendo-as de capacidade competitiva superior a de outros microrganismos (Mackerras et al., 1990).

Os grânulos de polifosfato têm papel equivalente aos grânulos de cianoficina, porém armazenam fosfato e estão ausentes nas células em fase inicial de crescimento e em meio deficiente desse elemento (Lee, 2008). Estes grânulos contêm, ainda, potássio, cálcio e magnésio e podem acumular metais (Kromkamp, 1987). Em *Microcystis* estes grânulos têm tamanhos na faixa de 100 a 400 nm de diâmetro (Jacobson & Halmann, 1982).

Além disso, as cianobactérias são capazes de sobreviver em ambientes com baixa concentração de CO₂, pois possuem mecanismos de concentração de carbono inorgânico ativo através de uma organela especializada chamada carboxissomo (Badger et al., 2002). Os carboxissomos são inclusões cristalinas que permitem fixação mais rápida de CO₂ sem afetar a osmolaridade citoplasmática (a pressão osmótica não sofre alterações, porque os carboxissomos são insolúveis) (Madigan et al., 2010). Apresentam diâmetro em torno de 80-140 nm (Tanaka et al., 2008) e envoltórios de proteínas poliédricas que contêm enzimas envolvidas na fixação de carbono (Badger & Price, 2003). Estas estruturas concentram o dióxido de carbono para superar a ineficiência da RuBisCO na fixação de CO₂ (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase), que catalisa a primeira etapa das reações no escuro da fotossíntese (ciclo de Calvin), conhecida como fixação fotossintética de CO₂ (Yeates et al., 2008).

As cianobactérias possuem alta afinidade para captação de CO₂ (Ohkawa et al., 2000). Em baixa concentração de CO₂, os mecanismos de concentração de carbono em cianobactérias são mais eficientes do que nos eucariontes (Badger & Price, 2003; Badger et al., 2006), o que facilita o seu domínio nessas condições (Price et al., 2008). Assim, o mecanismo de concentração de CO₂ é uma importante estratégia adaptativa que permite o crescimento de cianobactérias em ambientes com limitações deste elemento. O fato das cianobactérias possuírem carboxissomos pode, portanto, ser considerado uma adaptação evolutiva à vida em condições estritamente autotróficas, conferindo-lhes considerável competitividade ecológica (Madigan et al., 2010).

Além disso, vários estudos têm demonstrado que as cianobactérias impõem-se sobre algumas algas em pH elevado e em baixas concentrações de CO₂ (Shapiro, 1990; Oliver & Ganf, 2000; Qiu & Gao, 2002). Em ambientes aquáticos, a disponibilidade de CO₂ é relativamente baixo especialmente no intervalo de pH de 7-8,5 (Badger et al., 2006). Em pH alcalino, o bicarbonato (HCO₃⁻) é a maior fonte de carbono inorgânico disponível e, dessa forma, o mecanismo de concentração de CO₂ utiliza-o para a realização da fotossíntese (Badger et al., 2006). O fato de muitas cianobactérias poderem utilizar o bicarbonato como fonte de carbono confere grande vantagem competitiva ao grupo.

1.3 Alterações climáticas globais

Como as cianobactérias possuem diversas adaptações que as tornam extremamente competitivas, os relatos de ocorrência de florações de cianobactérias em reservatórios eutrofizados de todo o mundo estão se tornando cada vez mais corriqueiros (Sant'anna et al., 2008; Neilan et al., 2013; Paerl & Otten, 2013). Essa situação está sendo agravada em virtude dos efeitos diretos e indiretos das alterações climáticas globais (O'Neil et al., 2012) - (figura 2).

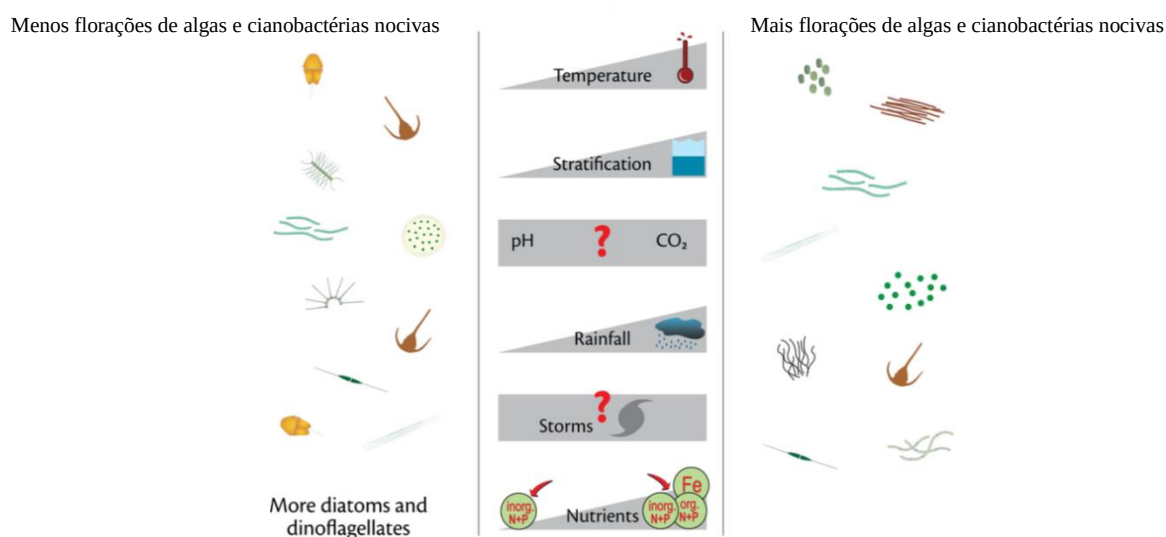


Figura 2. Eutrofização e os potenciais efeitos das mudanças climáticas sobre a abundância de florações de algas e cianobactérias nocivas (O'Neil et al., 2012).

O aumento da temperatura, as variações na disponibilidade de nutrientes, luz, estratificação e outros fatores abióticos e bióticos associados às modificações do meio ambiente e do clima podem beneficiar o desenvolvimento das cianobactérias (Jöhnk et al., 2008; Paerl & Huisman, 2008; Huertas et al., 2011; Winder & Sommer, 2012).

Entretanto, ainda não se sabe se as tempestades e as precipitações irão favorecer o seu desenvolvimento (figura 2). Segundo revisão realizada por O'Neil et al. (2012), mudando as condições climáticas, potencialmente alteram-se também os padrões de chuva e a entrada de nutrientes nos ecossistemas aquáticos. Portanto, dois cenários seriam possíveis em diferentes regiões: primeiro, as tempestades e precipitações iriam aumentar a entrada de água doce, melhorando a distribuição de nutrientes e diminuindo o tempo de residência, o que pode estimular ou prejudicar a formação de florações de cianobactérias tóxicas, dependendo dos fatores físicos como luz e temperatura. Segundo, o aumento do fluxo de água poderia suprimir inicialmente a floração de cianobactérias, devido à diminuição do tempo de residência, o aumento da turbidez e a redução na estratificação. Em seguida, períodos de seca aumentariam o tempo de residência e ciclagem interna de nutrientes, proporcionando aumento na densidade celular e mudança na composição específica do fitoplâncton, o que favoreceria o desenvolvimento e a permanência das florações de cianobactérias nocivas (figura 2). Como visto anteriormente, as cianobactérias apresentam estratégias flexíveis para aquisição de N e P, que incluem a captação e utilização de compostos orgânicos, beneficiando o seu desenvolvimento.

Outra lacuna no conhecimento é referente às concentrações de CO₂: elas favorecerão ou não a fotossíntese e o crescimento celular desses organismos? É difícil inferir algo, pois na maior parte dos estudos o foco está sobre uma única variável ambiental isolada (temperatura, pH, concentrações de CO₂, nutrientes, dentre outros). No entanto, sabe-se que as mudanças nas condições climáticas não vão ocorrer independentemente uma da outra, mas sim simultaneamente (O'Neil et al., 2012).

Deste modo, as inter-relações entre condições ambientais e respostas do fitoplâncton são bastante complexas, não permitindo prever os efeitos das mudanças climáticas (Sommer & Lewandowska, 2011). Contudo, alguns estudos propõem uma relação entre os efeitos das alterações climáticas globais e da eutrofização sobre as florações de cianobactérias (Peperzak, 2003; Paerl & Huisman, 2008; Paul, 2008; Kosten et al., 2012; O'Neil et al., 2012). A literatura menciona que várias espécies de cianobactérias serão beneficiadas, aumentando a sua taxa de crescimento em decorrência de mudanças climáticas regionais e globais, graças à multiplicidade de estratégias adaptativas que elas apresentam (Hudnell, 2008; Hudnell & Dortch, 2008; Paul, 2008). Isso levará à frequência e persistência de florações de cianobactérias nocivas e aumento potencial na toxicidade, exigindo um intenso foco de pesquisa nesse tema (O'Neil et al., 2012).

1.4 Metabólitos secundários

Além dos compostos tóxicos, as cianobactérias são conhecidas por produzirem rica gama de raros e interessantes metabólitos secundários (Codd, 1995; Jaspars & Lawton, 1998; Fastner et al., 2001; Kaplan et al., 2012). Cerca de 600 metabólitos secundários produzidos por cianobactérias já foram descritos na literatura (Welker & von Döhren, 2006), entretanto, a maior parte destes compostos, seu papel biológico, modo de ação e processos que regulam sua produção é pouco compreendida (Kaplan et al., 2012). Apesar das especulações sobre a função destes bioativos na ecologia e fisiologia de cianobactérias, nenhuma conclusão ainda foi obtida sobre o seu real papel no metabolismo destes organismos.

Os metabólitos produzidos apresentam diferentes estruturas químicas, sendo muitos deles de classes ainda desconhecidas (Kaplan et al., 2012), e possuem as mais diversas atividades biológicas (tabela 1), incluindo substâncias tóxicas ou não, com atividade antifúngica, como as laxaficinas, antivirais, anticancerígenas, antibacterianas, anti-inflamatórias, algicidas, imunossupressoras e de proteção à radiação ultravioleta (Gromov et

al., 1991; Frankmolle et al., 1992; Jaspars & Lawton, 1998; Burja et al., 2001; Wrasidlo et al., 2008; Villa et al., 2010; Dogo et al., 2011; Leão et al., 2012; Silva-Stenico et al., 2012; Silva-Stenico et al., 2013a; Silva-Stenico et al., 2013b).

As substâncias ativas classificadas como tóxicas são denominadas cianotoxinas e são elas: microcistinas, nodularinas, cilindrospermopsina, anatoxinas, homoanatoxina-a e saxitoxinas (Watanabe, 1996; Chorus & Bartram, 1999). Mais recentemente, foi isolado de *Nostoc* o aminoácido β -metilaminoalanina (BMAA), neurotóxico, causador de intoxicação e morte em seres humanos, cujo perfil ecotoxicológico é ainda desconhecido (Cox et al., 2005). Segundo suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser reunidas em três grupos: alcalóides, peptídeos cíclicos e lipopolissacarídeos (LPS) (Carmichael, 1994). Entretanto, também podem ser classificadas levando-se em consideração sua ação toxicológica: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (LPS) - (Wiegand & Pflugmacher, 2005).

Tabela 1. Metabólitos secundários de cianobactérias - cianopeptídeos

Classe de peptídeo	Sinônimos	Atividade biológica	Referência
Aeruginosinas	Microcina e spumigina	Inibidoras de proteases e tripsina	(Matsuda et al., 1996; Welker & von Döhren, 2006; Silva-Stenico et al., 2011)
Cianopeptolinas	Aeruginopeptina, anabaenopeptilídeo, dolostatina, hofmanolina, microcistilida, micropeptina, nostociclina, nostopeptina, oscillapeptilida, oscilapeptilida, oscilapeptina, planctopeptina, scriptolina, somamida, simplostatina, tasipectina	Inibidoras de proteases, promotoras da diferenciação celular, atividade anticâncer, inseticida e atividade antifúngica	(Welker & von Döhren, 2006; Silva-Stenico et al., 2011)
Microgininas	Cyanostatina, oscillaginina, nostoginina	Inibidoras de proteases, promotoras da diferenciação celular, atividade anticâncer, inseticida e atividade antifúngica	(Ishida et al., 2000; Silva-Stenico et al., 2011)
Anabaenopeptinas	Osilamida, ácido ferintóico, queramamida, combamida, monzamida, nodulapeptina, plectamida, schizopeptina	Inibidoras de proteases, tripsina, quimotripsinas, trombina, plasmina, elastase, leucina, aminopeptidase e papaína e proteínas fosfatases 1 e 2 A, atividade inibidora de protease carboxipeptidase A.	(Welker & von Döhren, 2006)
Nostociclamidas		Efeito inibitório sobre a protease	(Berlinck & Kossuga, 2005)
Nostocoficinas		Ação relaxante	(Harada, 2004)

1.5 Florações de cianobactérias tóxicas

Intoxicações humanas causadas por cianotoxinas já foram relatadas em diversos países, como Austrália, Inglaterra, Brasil, China, África do Sul e Índia (Falconer, 1994; Kaebernick & Neilan, 2001). Por esse motivo, as cianobactérias foram incluídas entre os microorganismos patogênicos emergentes, ainda que não ocorra colonização ou invasão em um hospedeiro (OECD, 2005).

A proliferação de cianobactérias nocivas vem sendo relatada na literatura científica por mais de 130 anos (Francis, 1878) e, nas últimas décadas, a incidência e a intensidade dessas florações, bem como as perdas econômicas associadas a estes eventos, têm aumentado (Chorus & Bartram, 1999; Carmichael, 2001; Hoagland et al., 2002; Carmichael, 2008; Heisler et al., 2008; Hudnell, 2008; Paerl & Huisman, 2008; Paul, 2008).

Segundo Azevedo (1998), cerca de 50% das florações de cianobactérias testadas em bioensaios em diferentes partes do planeta mostraram-se tóxicas. As florações de cianobactérias podem ser dominadas por uma única espécie ou compostas por uma variedade delas, onde se encontram espécies tóxicas e não tóxicas (Kurmayer et al., 2002).

A proporção entre as espécies presentes pode resultar em uma variação temporal da toxicidade das florações de cianobactérias. Na floração, em uma única espécie é possível encontrar cepas tóxicas e não tóxicas devido aos vários fatores que influenciam a distribuição de genes envolvidos na biossíntese de toxinas nas espécies que as produzem (Azevedo & Brandão, 2003; Via-Ordorika et al., 2004).

Cerca de 40 gêneros são potencialmente tóxicos, contudo, as espécies que despertam maior interesse na pesquisa ou monitoramento pertencem aos seguintes gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Planktothrix* (Carmichael, 2001). As cianobactérias tóxicas ocorrentes no Brasil são representadas por 32 espécies distribuídas em três ordens: 12 Chroococcales, 10 Oscillatoriales e 10 Nostocales (Sant'anna et al., 2008).

A espécie *M. aeruginosa* é uma das cianobactérias formadoras de floração mais comuns em ecossistemas de água doce e recebe atualmente grande atenção das pesquisas em âmbito mundial pela sua ampla distribuição geográfica em todos os continentes e pela frequente produção de toxinas (Falconer, 2005; Rouco et al., 2011; Straub et al., 2011).

No Brasil, essa espécie está presente comumente em lagos naturais e artificiais, desenvolvendo florações permanentes em lagos eutróficos, tanto na parte tropical como subtropical do país (Branco & Senna, 1994; Sant'anna et al., 2008; Silva-Stenico et al., 2011). Além disso, o Brasil integra o grupo dos países com numerosos registros de florações de *M. aeruginosa* em reservatórios de abastecimento com casos comprovados de intoxicações fatais em seres humanos pela presença de microcistinas (Azevedo et al., 2002).

O gênero *Microcystis*, que apresenta maior número de espécies tóxicas (Sant'anna et al., 2008), foi descrito por Kützinger em 1833. Este gênero é cosmopolita, colonial e abrange 25 espécies tipicamente planctônicas (Komárek & Hauer, 2014). As principais características morfológicas desse gênero são colônias formadas por células arredondadas dotadas de aerótopos, arranjadas irregularmente em um fino envelope mucilaginoso e cuja divisão celular ocorre em três planos perpendiculares (Komárek, 2003).

Linhagens de *Microcystis* comumente associadas a florações em todo o mundo são produtoras de peptídeos tóxicos conhecidos como microcistinas (Pearson et al., 2010; Dittmann et al., 2012), mas também produzem diferentes classes de cianopeptídeos como: aeruginosinas, microgininas, anabaenopeptinas, cianopeptolinas, microviridinas e ciclâmidas (Namikoshi & Rinehart, 1996; Welker et al., 2006; Welker & von Döhren, 2006; Carneiro et al., 2012). Há também dois casos na literatura onde se relata a produção de neurotoxina em *Microcystis*: o primeiro refere-se à ocorrência da neurotoxina anatoxina-a (Park et al., 1993) e o segundo de uma linhagem de *M. aeruginosa* que sintetizava duas toxinas – a hepatotoxina [L-ser7] microcistina-RR e a neurotoxina saxitoxina (goniautoxinas 1, 2, 3 e 4) - (Sant'Anna et al., 2011).

Assim como para a ampla maioria dos metabólitos secundários, não se sabe ao certo o papel dos cianopeptídeos para as cianobactérias. A produção de neurotoxinas por cianobactérias unicelulares é totalmente inusitada e somente estes dois casos foram documentados.

1.6 Microcistina

A microcistina é a cianotoxina mais frequente em florações e a mais estudada pela sua elevada toxicidade (Jochimsen et al., 1998). Constitui um problema de saúde pública, uma vez que a sua presença é uma ameaça à qualidade dos corpos de água doce de todo o mundo,

sendo um desafio para a potabilidade. Além de causarem sérios danos à vida animal (Carmichael, 1997; Dittmann & Wiegand, 2006; Zegura et al., 2011), ocasionam aumento dos custos do tratamento da água.

A primeira identificação química dessa hepatotoxina foi feita por Bishop et al. (1959), que a isolou de uma cultura de *M. aeruginosa*, daí a origem do nome. A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael et al. (1988) e baseia-se nas variações qualitativas observadas nos dois L-aminoácidos da toxina, como, por exemplo, microcistina-LR (leucina-arginina) e microcistina-RR (arginina-arginina).

Além de *Microcystis*, sabe-se que vários outros gêneros como *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* também são capazes de produzi-las (Carmichael, 1992; van Apeldoorn et al., 2007). As microcistinas são classificadas como heptapeptídeos cíclicos, os quais possuem em comum a estrutura cíclica, contendo cinco aminoácidos fixos, (-D-Ala1-X2-D-MeAsp3-Y4-Adda5-D-Glu6-Mdha7), sendo D-Alanina (posição 1), ácido D-metil-aspartico (posição 3), Adda (3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6- ácido dienólico) (posição 5), Ácido D-glutâmico (posição 6) e N-metilhidroalanina (Mdha) (posição 7), e dois aminoácidos variáveis nas posições 2 (X) e 4 (Y), normalmente L-aminoácidos (Botes et al., 1984; Msagati et al., 2006) que contribuem para as diferentes isoformas (Sivonen & Jones, 1999; Welker & von Döhren, 2006). (Figura 3)

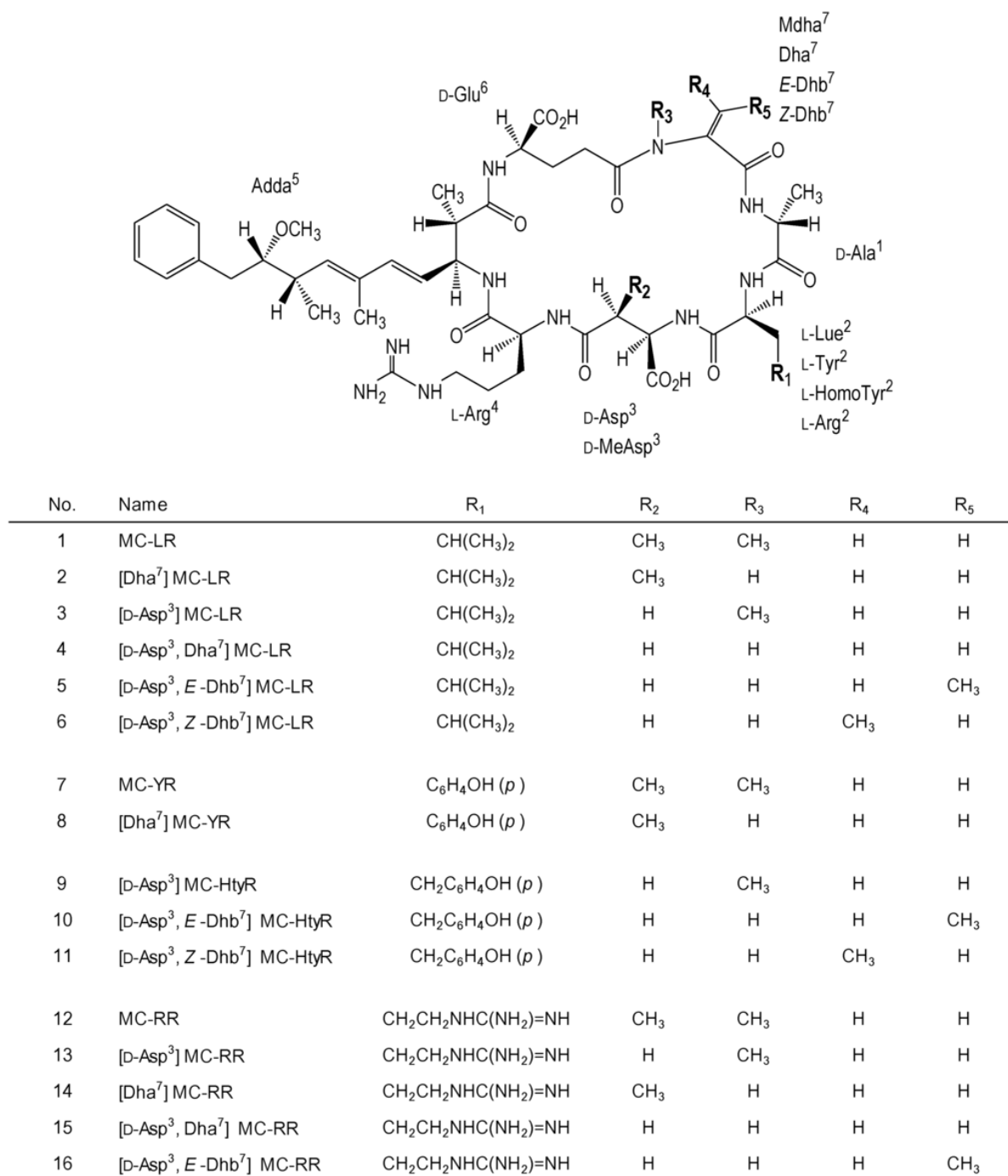


Figura 3. Estruturas das microcistinas e seus derivados. Fonte: (Shimizu et al., 2014)

A maioria das variantes de L-aminoácidos apresenta aminoácidos hidrofóbicos na posição X e hidrofílicos na posição Y (Falconer, 2005). Metilações e demetilações também são comuns (Sivonen & Jones, 1999). Há também a ocorrência de oxidação em três áreas da molécula: a dupla ligação conjugada na metade Adda, a única dupla ligação na metade Mdha e a cadeia lateral dos aminoácidos das variantes (Westrick et al., 2010). Considerando as

variantes microcistinas-LR, -LA, -RR e - YR, somente os aminoácidos arginina e tirosina são potencialmente vulneráveis à oxidação (Falconer, 2005). Essas toxinas mostram-se relativamente polares, devido principalmente à presença de ácidos carboxílicos livres na estrutura (Msagati et al., 2006) e sua massa molecular varia de 800 e 1.100 Da (Sivonen & Jones, 1999).

Atualmente, são conhecidas mais de 90 variantes estruturais deste peptídeo (Pearson et al., 2010). As variantes mais tóxicas de microcistina apresentam L-aminoácidos mais hidrofóbicos, como, por exemplo, microcistinas-LA, -LR, -YR e -YM, e as menos tóxicas são aquelas com aminoácidos mais hidrofílicos, como a microcistinas-RR (Falconer, 2005). A microcistina-LR é a mais tóxica e mais comumente encontrada em água doce (Pinho et al., 2003), apresentando dose letal mediana (LD50) de 50 µg/Kg de peso corporal em camundongos expostos intraperitonealmente (Falconer, 2005). O grupo Adda, que é comum a todas as microcistinas, é apontado como responsável por sua atividade biológica (Chorus & Bartram, 1999).

Em ambientes naturais, as microcistinas, principalmente em ausência de luz, podem permanecer estáveis por mais de três meses, graças à sua alta estabilidade química (Funari & Testai, 2008). Estes compostos são resistentes a hidrólise e oxidação química em pH próximo a neutralidade (Sivonen & Jones, 1999). A hidrólise ocorre somente em condições extremas, como 6 M HCl e altas temperaturas (Chorus & Bartram, 1999). Em temperaturas elevadas (40°C) e alto ou baixo valor de pH, são citadas hidrólises lentas, períodos de aproximadamente 10 semanas a pH 1 e mais de 12 semanas a pH 9 para que uma degradação superior a 90% seja obtida (Teixeira, 2009). Assim, essas toxinas, quando dissolvidas, não são removidas pelo sistema de tratamento convencional da água (Lambert et al., 1996).

1.6.1 Modo de ação

As microcistinas atuam bloqueando a ação das proteínas serina/treonina fosfatases 1 e 2A das células hepáticas, o que causa morte por hemorragia em poucas horas após dose aguda (Kuiper-Goodman et al., 1999) (Figura 4).

Em mamíferos, a exposição crônica a baixas doses de microcistinas pode promover a carcinogênese, resultando em tumor no fígado (Pegram et al. 2008, Ji et al. 2011). Recentemente, verificou-se que as microcistinas não atuam somente como promotoras, mas

também como agentes iniciadores de tumores por sua capacidade genotóxica, como apresentada por microcistina-LR (Zegura et al., 2011). No entanto, não se sabe ainda quais são os mecanismos envolvidos na indução tumoral, pois há falta de modelos celulares para estudos de toxicidade *in vitro*. Esses compostos não são capazes de penetrar diretamente a membrana lipídica das células animais, vegetais ou bacterianas (Sivonen & Jones, 1999). Nos casos de exposição recreacional, podem ocorrer irritações cutâneas e problemas gastrintestinais (Kuiper-Goodman et al., 1999).

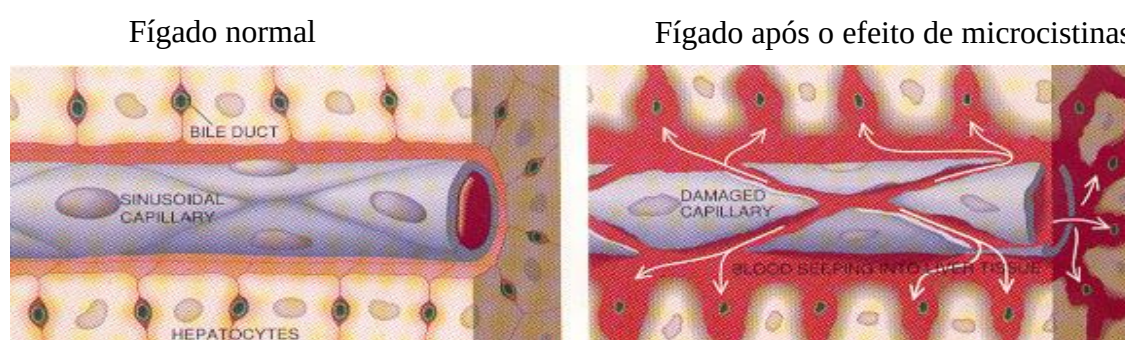


Figura 4. Representação esquemática da estrutura do fígado normal e após o efeito da microcistina no tecido hepático (Carmichael, 1994).

1.6.2 Biossíntese

As microcistinas são produzidas por uma via não-ribossomal através da ação de enzimas de alta massa molecular, contendo multi-domínios, denominadas peptídeo-sintetases não-ribossomais (NRPS, do inglês *Non Ribosomal Peptide Synthetase*) e policetídeo sintases (PKS, do inglês *Polyketide Synthase*), que juntas são responsáveis pela incorporação de sete aminoácidos na molécula e sua ciclização (Arment & Carmichael, 1996; Dittmann et al., 1997; Tillett et al., 2000). A biossíntese de microcistina envolve 48 reações catalíticas iniciais, sendo que 45 são catalisadas por domínios dentro de seis grandes grupos enzimáticos (McyA-E e G) (Tillett et al., 2000) (figura 5).

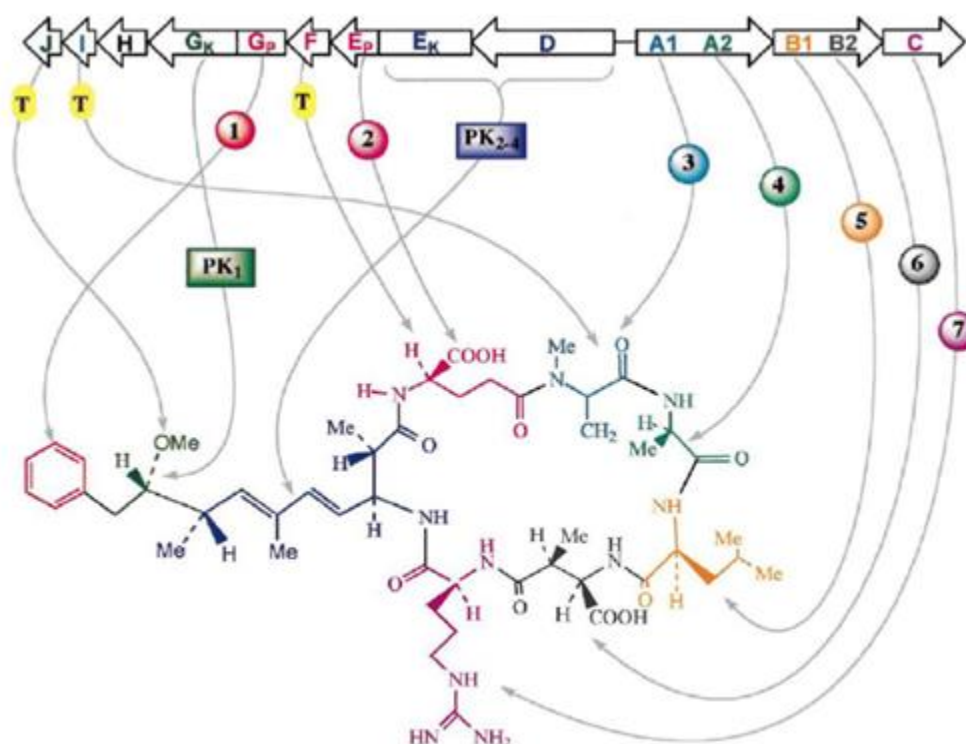


Figura 5. Modelo proposto para a biossíntese da microcistina-LR (leucina-arginina). Observar a organização do cluster gênico mycA-J. A biossíntese ocorre via complexo multienzimático que consiste de módulos peptídeo sintetase e policetídeo sintetase. Os círculos numerados indicam a ordem dos aminoácidos incorporados à crescente cadeia peptídica por McyA, B, C, Ep e GP). As enzimas McyA e B contêm dois módulos, A1/A2 e B1/B2, respectivamente. A1 também codifica o domínio N-metiltransferase. Os retângulos numerados mostram a ordem da síntese policetídica e a formação do Adda (myc Gk, Ek, D), t-enzimas complementares (Kaebernick & Neilan, 2001).

A caracterização do agrupamento gênico envolvido na biossíntese de microcistina foi primeiramente descrita para duas linhagens de *M. aeruginosa* (Nishizawa et al., 1999; Nishizawa et al., 2000; Tillett et al., 2000). Posteriormente, estes genes foram sequenciados em outros gêneros, como *Planktothrix* (Christiansen et al., 2003) e *Anabaena* (Rouhiainen et al., 2004). A comparação do agrupamento gênico mostrou que a disposição de alguns genes não é semelhante em diferentes gêneros, alguns genes não estavam presentes em todos. A identidade entre as sequências proteicas foi baixa, 65 até 75% (McyJ, 80%) no nível de aminoácidos e identidades de 69 a 75% (*mcjJ*, 79%) no nível dos nucleotídeos (Rouhiainen et al., 2004) - (figura 6).

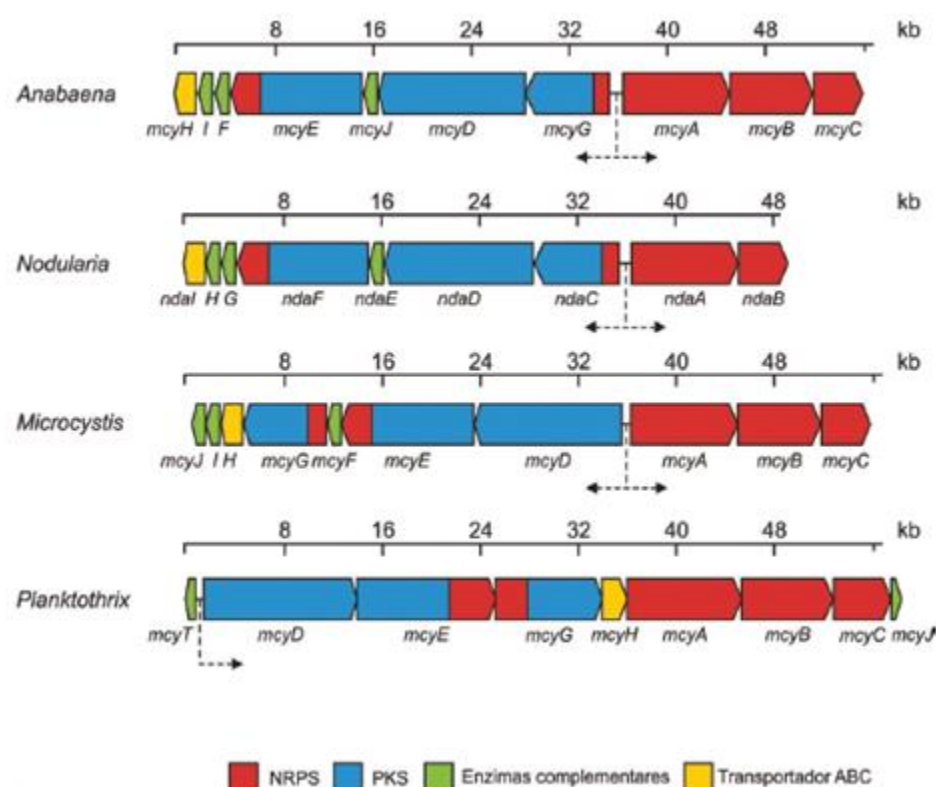


Figura 6. Agrupamentos gênicos correspondentes a enzimas envolvidas na síntese das hepatotoxinas microcistina (*mcy*) e nodularina (*nda*) de alguns gêneros de cianobactérias. Fonte: Adaptado de Dittmann & Börner (2005), apud Fiore et al. (2011).

O locus genômico em *Microcystis* abrange 55 Kb de DNA e compreende 10 genes (figura 6). Os genes são diferenciados por letras (*mcyA-mcyJ*), sendo que seis destes codificam módulos de NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS ou PKS/NRPS. Estes genes estão dispostos em dois operons (*mcyA-C* e *mcyD-J*), que são transcritos em direções opostas, a partir de um promotor bidirecional. (Tillett et al., 2000).

O *mcyH* aparentemente não está envolvido na formação da molécula (figura 5), acredita-se *mcy* que esta enzima esteja envolvida no transporte da microcistina para o meio extracelular. No entanto, por motivos ainda desconhecidos, a supressão deste gene conduz à perda completa da produção de toxina (Pearson et al., 2004).

Cepas não tóxicas também podem apresentar genes que codificam para microcistina sintetases. A não produção da toxina deve-se a mutações e ausência de parte do operon *mcy* (Meissner et al., 1996).

1.7 Casos de ocorrências de microcistinas no Brasil e Legislação Brasileira

No Brasil, o primeiro caso comprovado de presença de microcistinas ocorreu em um lago eutrófico na cidade de São Paulo, onde *M. aeruginosa* foi coletada e isolada de uma floração ocorrida em junho de 1988. Observou-se que a cepa produzia duas variantes de microcistinas: LR e outra nova para a ciência (LF) - (Azevedo et al., 1994). Posteriormente, linhagens tóxicas de *M. aeruginosa* foram reportadas em diversas regiões brasileiras (Yunes et al., 1996; Yunes et al., 1998; Zagatto et al., 1998; Hirooka et al., 1999; Porfirio et al., 1999; Jardim et al., 2000; Matthiensen et al., 2000; Minillo et al., 2000; Bittencourt-Oliveira et al., 2001; Jardim et al., 2001; Magalhaes et al., 2001; Azevedo et al., 2002; Jardim & Viana, 2003; Anjos et al., 2006; Costa et al., 2006; Sotero-Santos et al., 2006; Sant'anna et al., 2008; Sá et al., 2010). Um dos episódios mais marcantes no Brasil e no exterior sobre mortes humanas comprovadamente causadas por microcistinas ocorreu no início de 1996 em uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru (Pernambuco). Dos cento e trinta pacientes renais crônicos submetidos a sessões de hemodiálise que apresentaram grave hepatotoxicidade, cinquenta e um vieram a falecer (Carmichael et al., 2001; Azevedo et al., 2002).

Embora sem comprovação efetiva, de acordo com (Teixeira et al., 1993) há também uma forte evidência de correlação entre a ocorrência de florações provavelmente produtoras de microcistinas e a intoxicação de seres humanos no reservatório de Itaparica (Bahia). Dentre duas mil pessoas que consumiram água deste reservatório entre março e abril de 1988, observou-se intoxicação e morte de oitenta e oito.

A partir do evento ocorrido em Caruaru, o estudo da ocorrência de florações de cianobactérias aumentou muito no Brasil. Além de estimular um número cada vez maior de pesquisas sobre a relação entre as cianobactérias e a qualidade da água, este incidente teve repercussão expressiva na legislação brasileira relacionada aos recursos hídricos.

Em 2000, as condições de balneabilidade foram normatizadas pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), Resolução nº 274, que estabelece restrições quanto à recreação de contato primário em corpos hídricos que apresentam ocorrência de florações e considera passível de interdição pelos órgãos de controle ambiental trechos dos corpos d'água em que ocorra toxicidade ou formação de espuma decorrente de florações de algas (Brasil, 2001).

No ano de 2000, o Ministério da Saúde criou a Portaria nº 1469 que estabelecia os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Em 2004 esta portaria foi revogada pela portaria nº 518 (Brasil, 2004). Em 2011 essa portaria foi substituída integralmente pela portaria nº 2914 (Brasil, 2011), que tornou-se mais ampla e rigorosa. Portanto, instituições responsáveis pelo sistema de abastecimento de água são obrigadas a monitorar semanalmente cianobactérias e cianotoxinas quando a densidade celular no ponto de captação ultrapassar 20.000 células/mL. Na água tratada, devem ser monitoradas as cianotoxinas saxitoxinas e microcistinas, sendo os limites máximos admissíveis iguais a 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Em relação às cianotoxinas, cilindrospermopsina e anatoxina-a(s), recomenda-se a análise sempre que for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores. Foi vedado o uso de algicidas para o controle do crescimento de microalgas e cianobactérias no manancial de abastecimento ou qualquer intervenção que provoque a lise das células, em função dos riscos à saúde associados às cianotoxinas. A regulamentação das excepcionalidades sobre o uso de algicidas nos cursos d'água superficiais será definida pelas autoridades ambientais e de recursos hídricos.

A quantificação das cianobactérias é também uma das exigências da Resolução nº 357, criada no ano de 2005 pelo CONAMA (Brasil, 2005), que aborda a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes visando controlar a poluição e a qualidade da água através de análises de variáveis físico-químicas e biológicas. A portaria MS nº 2914 orienta que sejam utilizados os valores máximos permitidos para água de consumo humano conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS).

2 ESTADO DA ARTE: POSSÍVEIS FUNÇÕES DAS MICROCISTINAS E REGULAÇÃO DA SUA PRODUÇÃO

2.1 Microcistinas e fatores ambientais

A pesquisa para compreender o papel biológico das microcistinas começou nos anos 1980, quando vários grupos passaram a estudar os impactos dos fatores ambientais sobre o teor de toxinas celulares. Diversos trabalhos testaram a correlação de diferentes fatores ambientais específicos com o teor de toxinas como, concentração de nitrogênio (Watanabe & Oishi, 1985; Orr & Jones, 1998; Long et al., 2001; Sevilla et al., 2010; Harke & Gobler, 2013; Horst et al., 2014; Pimentel & Giani, 2014), irradiância (Kaebernick et al., 2000; Kaebernick et al., 2002; Wiedner et al., 2003; Kardinaal et al., 2007; Jähnichen et al., 2011; Kurmayer, 2011; Meissner et al., 2013), temperatura (Kim et al., 2005; Davis et al., 2009; Dziallas & Grossart, 2011; Jähnichen et al., 2011; Kurmayer, 2011), fósforo (Jähnichen et al., 2011; Harke & Gobler, 2013; Kuniyoshi et al., 2013; Pimentel & Giani, 2014), efeitos interativos do fósforo e nitrogênio (Vezie et al., 2002; Downing et al., 2005a; Bortoli, 2011; Horst et al., 2014), ferro (Utkilen & Gjølme, 1992; Lukač & Aegerter, 1993; Sevilla et al., 2008; Alexova et al., 2011a; Fujii et al., 2011; Jähnichen et al., 2011), efeitos alelopáticos interespecíficos (Jang & Takamura, 2007), comunicação intercelular, seja intra ou interespecífica (Kearns & Hunter, 2000; Dittmann et al., 2001; Santos, 2009b), competição; (Vezie et al., 2002; Kardinaal & Visser, 2005; Kardinaal et al., 2007; Melgaço, 2007; Briand et al., 2012), pH, (Jähnichen et al., 2001), fotoperíodo (Straub et al., 2011), CO₂ (van de Waal et al., 2011), salinidade (Tonk et al., 2007) e estresse oxidativo (Dziallas & Grossart, 2011; Ding et al., 2013; Meissner et al., 2013).

Em muitos estudos a maior produção de microcistinas ocorreu nas condições que sucediam o ótimo de crescimento (Sivonen & Jones, 1999; Wiedner et al., 2003; Kurmayer, 2011), levando à suposição de que o teor de microcistina celular está correlacionado com a taxa de crescimento (Orr & Jones, 1998; Long et al., 2001). Orr & Jones (1998) encontraram correlação positiva entre a produção de microcistinas por *M. aeruginosa* e a taxa de crescimento, em condição limitante de nitrogênio. Estes autores verificaram esta correlação independente do parâmetro ambiental que estivesse provocando a limitação do crescimento. Logo, a concentração intracelular de microcistinas deveria permanecer constante em diferentes taxas de crescimento, o que sugere que a produção de microcistinas apresentaria algum papel no metabolismo primário. Os autores concluíram que microcistina não é um

metabólito secundário, mas sim apresenta características de um composto intracelular essencial.

Esta hipótese, no entanto, foi contestada quando se observou que diferentes linhagens de *Microcystis* responderam diferentemente a fatores como luz e fósforo (Hesse & Kohl, 2001). E também, as taxas de crescimento de linhagens de *Microcystis* selvagem (produtora de microcistinas) e seu mutante (*mcyB*-, deficiente na biossíntese de microcistinas) foram semelhantes em diferentes níveis de irradiância (40 a 110 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) - (Hesse et al., 2001). Wiedner et al. (2003) também não encontraram correlação entre a taxa de crescimento e o conteúdo de microcistina em diferentes intensidades de luz. Estes estudos concluíram que as microcistinas não são essenciais para o crescimento (Hesse et al., 2001).

A utilização de diferentes condições de cultura, linhagens e métodos de análise dificulta a comparação dos resultados obtidos experimentalmente por diferentes grupos (Gehring & Wannicke, 2014). Por exemplo, um estudo recente demonstrou que discrepâncias podem resultar da dosagem de toxina apenas a partir de extratos solúveis em metanol, amplamente utilizada, o que não detecta a fração de toxina ligada a proteínas intracelulares, que é considerável e subestimada (Meissner et al., 2013). Assim, embora não existam ainda dados conclusivos a respeito dos fatores ambientais que regulam a produção da toxina (Molica & Azevedo, 2009), algumas tendências podem ser apontadas. Por exemplo, vários grupos (Lukač & Aegerter, 1993; Sevilla et al., 2008; Alexova et al., 2011a) correlacionaram baixas concentrações de ferro, com maior produção de microcistinas. Entretanto, Fujii et al. (2011) não encontraram diferença na absorção de ferro entre linhagens tóxicas e não tóxicas. Há uma lacuna de estudos mais recentes neste tema que quantifica microcistina total e não só solúvel para confirmar estes dados e também que esclareçam sobre a função da molécula sob limitação de ferro.

No caso do nitrogênio, que é o fator limitante de crescimento mais comum, o efeito de sua concentração sobre a produção de microcistina também é controverso (Gehring & Wannicke, 2014). Uma vez que a síntese de microcistina está relacionada a de proteínas em geral, uma alta razão N:P e seu efeito sobre a assimilação de nitrogênio afeta positivamente a síntese da toxina (Downing et al., 2005b; Kuniyoshi et al., 2013; Horst et al., 2014). De acordo com esta ideia, linhagens não tóxicas de *M. aeruginosa* crescem melhor do que as tóxicas em baixa disponibilidade de nutrientes, porém em alta de nutrientes o inverso é

verdadeiro (Vezie et al., 2002). Já outros autores encontraram maior produção da toxina sob limitação de nitrogênio (Ginn et al., 2010; Pimentel & Giani, 2014)

Tanto a intensidade luminosa quanto a qualidade alteram a síntese de microcistina. Em geral, o aumento de irradiância afeta positivamente a síntese de toxina, até certo limite, quando tem efeito negativo, provavelmente devido ao estresse celular (Kaebernick et al., 2000; Wiedner et al., 2003; Deblois & Juneau, 2010; Zilliges et al., 2011; Sevilla et al., 2012). O efeito da luz implica na relação entre atividade fotossintética e microcistina. Por exemplo, a inibição da cadeia de transporte de elétrons do fotossistema II resultou em decréscimo da síntese de microcistina (Sevilla et al., 2012). Outro desdobramento da resposta à intensidade luminosa é o estresse oxidativo resultante de alta irradiância. Neste contexto, estudos recentes apontam um papel protetor da microcistina sob estresse (Zilliges et al., 2011; Kaplan et al., 2012; Meissner et al., 2014), como será abordado mais adiante.

Quanto à temperatura, seu aumento tende a resultar em maior cota celular de microcistina, embora possivelmente afete de forma diferente as variantes da toxina (Jähnichen et al., 2001; Dziallas & Grossart, 2011; Kurmayer, 2011).

No caso de fósforo, menores concentrações tendem a aumentar a cota celular de microcistina (Jähnichen et al., 2011; Kurmayer, 2011; Kuniyoshi et al., 2013; Horst et al., 2014; Pimentel & Giani, 2014).

Quanto ao efeito de CO₂, foi observada maior cota celular de microcistina sob limitação deste elemento, como detalhado no item “Regulação fotossintética” (Jahnichen et al., 2007).

É possível que os efeitos dos parâmetros ambientais aferidos sejam menos pronunciados do que a particularidade de cada linhagem quanto à produção de toxinas. Sendo assim, um sério problema para a interpretação e comparação de diferentes estudos, é a diferença observada nas linhagens quanto à produção de microcistinas. Estudos com cepas de *M. aeruginosa* têm demonstrado capacidade diferente de produção de toxinas, desde valores muito baixos até valores muito altos de biossíntese da toxina, por isso a inclusão de várias linhagens para entender uma resposta ambiental é muito importante (Alexova et al., 2011a; Dziallas & Grossart, 2011; Ding et al., 2013; Pimentel & Giani, 2014).

É interessante notar que alguns fatores ambientais tiveram efeito diferencial em várias isoformas da toxina (Rapala et al., 1997; Tonk et al., 2005; Bortoli, 2011; Dziallas & Grossart, 2011). A variação da concentração de *microcistinas* por *cota* celular parece ocorrer

dentro de um limite (aumento de até 3 a 5 vezes) (Kurmayer, 2011; Neilan et al., 2013), sob uma variedade de condições de crescimento. Sendo assim, estudos fisiológicos poderiam fornecer uma visão geral da influência dos fatores abióticos sobre a produção de microcistinas, mas ainda assim é difícil esclarecer o papel da toxina nas células produtoras.

2.1.1 Regulação da transcrição dos genes *mcy*

A produção de microcistina em resposta a fatores ambientais pode ser investigada a partir de estudos da expressão dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da toxina (*mcy*).

Rueckert & Cary (2009) acompanharam os níveis de transcrição do gene *mcyE* de acordo com a fase de crescimento de uma cultura de *Microcystis*. O nível máximo de expressão ocorreu no final da fase exponencial de crescimento. Com avanço do tempo de cultivo, a transcrição do gene foi diminuindo gradualmente, de acordo com observações de vários trabalhos anteriores, mostrando uma forte correlação entre taxa de crescimento e síntese de microcistina (Long et al., 2001; Wiedner et al., 2003; Jähnichen et al., 2011; Sitoki et al., 2012).

A intensidade e a qualidade de luz têm efeito direto sobre a expressão dos genes *mcy* (Kaebernick et al., 2000; Kaebernick et al., 2002; Wiedner et al., 2003). Kaebernick et al. (2000) mediram a transcrição de *mcyB* e *mcyD*, em *M. aeruginosa*, sob diferentes qualidades e intensidades de luz. Estes autores verificaram que o aumento da intensidade de luz (acima de 30 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e luz vermelha levavam ao aumento da transcrição, enquanto luz azul levou à redução.

O grupo de genes *mcy* é transcrito como duas unidades transcricionais policistrônicas, *mcyABC* e *mcyDEFGHIJ*, a partir de promotores bidirecionais entre *mcyA* e *mcyD* (Kaebernick et al., 2002). Porém sítios de início da transcrição adicionais foram detectados no início de outros genes e sua atividade pareceu ser dependente da intensidade luminosa (Kaebernick et al., 2002). Curiosamente, estudos seguintes não avançaram na caracterização desses padrões alternativos de transcrição.

O aumento na transcrição de genes *mcy* em irradiância elevada, também foi relatado na cianobactéria *Planktothrix agardhii* (Tonk et al., 2005). Apesar disso, o efeito da luz sobre a transcrição não pode ser correlacionado com o teor mais elevado de toxina por célula.

Em um estudo mais recente (Sevilla et al., 2012), o efeito da intensidade de luz sobre a transcrição do gene *mcyD* foi avaliado, confirmando que maiores valores (de 28 a 109 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) induzem a transcrição. Porém, os autores ressaltam que este é um evento precoce e de curto prazo, pois ao se bloquear a cadeia de transferência de elétrons da fotossíntese, na verdade a transcrição deste gene cai. Isso sugere que o segundo efeito seja mediado pelo estresse oxidativo causado pelo bloqueio da fotossíntese. No entanto, o efeito destes fatores sobre a quantidade de microcistina nas células não foi tão evidente.

Ainda relacionado ao efeito da luz sobre a transcrição gênica do conjunto *mcy*, Straub et al. (2011) relataram pela primeira vez dados sobre a expressão global do genoma de *M. aeruginosa* durante ciclo claro/escuro. Os autores verificaram variações na abundância de transcritos de genes *mcy*, sugerindo que eles são influenciados por luz e possuem um ritmo circadiano endógeno. Neste caso, como todos os 10 genes foram acompanhados, pode-se detectar um padrão comum, embora não idêntico, de expressão nessas condições. De forma geral, a transcrição aumentou logo após o início da fase clara e começou a decair lentamente até o início do período escuro, quando diminuiu mais intensamente. Estes dados sugeriram que a síntese de microcistina fosse favorecida no período diurno e, portanto, se relacionasse com a parte diurna do metabolismo central (captação de carbono, fotossíntese, redução de pentoses, síntese de glicogênio). Entretanto, mais recentemente, Penn et al. (2014) caracterizam a expressão destes genes em uma floração em um ciclo de dia e noite. Para o gênero *Microcystis* a expressão de todos conjunto gênicos de *policetídeos* e *peptídeos não-ribossomais* (PKS/NRPS), incluindo microcistina e aeruginosina, ocorreu durante todo o período.

A deficiência de fosfato foi mais um fator que causou aumento da transcrição de *mcyD*, e em paralelo, aumento na concentração celular de microcistina. Já o excesso de fosfato não alterou a síntese de toxina (Kuniyoshi et al., 2013; Pimentel & Giani, 2014).

Nestes casos mencionados acima, não se caracterizou a base molecular da regulação da transcrição dos genes *mcy*. Porém, isso foi investigado para o efeito de nitrogênio e ferro.

Uma vez que vários estudos já haviam mostrado uma relação entre a síntese de microcistina e a disponibilidade de nitrogênio, foi avaliado se o regulador global de resposta a nitrogênio em cianobactérias (NtrA) estaria envolvido na regulação da transcrição de genes *mcy*. De fato, este regulador se liga a sítios localizados na região promotora de *mcyA/D* e a transcrição de *mcyB* seguiu um padrão semelhante à do próprio gene *ntrA* (que é

autoregulado), aumentando sob limitação de nitrogênio (Ginn et al., 2010). Em seguida, foi mostrado que a ligação de NtrA ao promotor dos genes *mcy* ocorria com maior afinidade na presença de 2-oxoglutarato (Kuniyoshi et al., 2011). Os níveis de 2-oxoglutarato na célula refletem o balanço da concentração intracelular de nitrogênio em relação à de carbono. Por sua vez, NtcA é um regulador global, ligado não só ao metabolismo de nitrogênio mas também de carbono, à fotossíntese e a respostas de estresse. Assim, o status N/C poderia influenciar a síntese de microcistina. Estes dados foram confirmados por Pimentel & Giani (2014), que acompanharam a síntese de microcistina sob limitação de nitrogênio e relataram aumento da cota celular de microcistina e da transcrição do gene *mcyD*, além de correlação direta entre a transcrição do gene *ntcA* e a do gene *mcyD*.

Em contraste, em um estudo recente, a resposta do transcriptoma de uma linhagem tóxica de *M. aeruginosa* durante o crescimento com baixos níveis de nitrogênio inorgânico dissolvido foi avaliada utilizando-se a tecnologia de *RNA-Seq*. Com baixo teor de nitrogênio, o conteúdo de microcistina por célula foi significativamente reduzido e os transcritos dos genes microcistina sintetase foram menos abundantes, sugerindo que a síntese de microcistina é dependente de um fornecimento suficiente de nitrogênio (Harke & Gobler, 2013).

Também foi testado se a resposta a disponibilidade de ferro seria mediada pela ligação do regulador global Fur à região promotora do conjunto *mcy*. Fur é um regulador transcricional que se liga a sequências específicas quando complexado a Fe⁺², reprimindo a transcrição gênica. Em baixas concentrações de ferro intracelulares, Fur livre de Fe⁺² se libera do DNA, permitindo a transcrição. A região promotora do conjunto *mcy* apresenta sequências reconhecidas por Fur *in vitro*, o que sugere que pode regular a síntese de microcistina (Martin-Luna et al., 2006). De acordo com esta ideia, a deficiência de ferro aumentou tanto a transcrição de *mcyD* quanto a síntese de microcistina em *M. aeruginosa* PCC7806 (Sevilla et al., 2008).

Em um trabalho mais extenso, a relação entre limitação de ferro e síntese de microcistina foi avaliada com três linhagens, sendo uma tóxica (PCC7806), seu mutante *mcyH*- e uma linhagem naturalmente não tóxica (PCC7005) e em diferentes fases de crescimento (Alexova et al., 2011a). Genes relacionados à síntese de microcistina, aquisição de ferro e resposta a estresse oxidativo foram testados. Observou-se ampla variação dos padrões de transcrição em resposta a baixo ferro de acordo com a linhagem e com a fase de crescimento. Embora em células privadas de ferro a cota celular de microcistina tenha

aumentado, esse efeito não ocorreu na transcrição gênica. Cabe notar que as duas linhagens não tóxicas, uma selvagem e outra a mutante construída (*mcyH*⁻) a partir de PCC7806, não responderam da mesma forma à limitação de ferro.

Embora em alguns trabalhos o aumento/diminuição da transcrição de genes *mcy* seja acompanhado de aumento/diminuição da quantidade de microcistina, isso não é geral. Muito das discrepâncias pode ser devido ao fato de que não foi dosada a microcistina total (incluindo a conjugada com proteínas), apenas a solúvel. Outro fator responsável seria o fato de que a síntese das enzimas do complexo *mcy* pode não significar sua imediata atividade, que pode depender da formação do complexo, modificação das enzimas, localização específica, sendo que nenhum destes aspectos foi estudado ainda. Além disso, na maior parte dos casos se escolhe apenas um gene do conjunto para avaliar a resposta, e a síntese da toxina depende da presença de todas as enzimas do conjunto.

2.2 Microcistinas e seu papel extracelular

Sabe-se que a liberação das microcistinas para o meio externo ocorre através da lise celular (Park et al., 1998; Sivonen & Jones, 1999; Pietsch et al., 2002). No entanto, há indícios de que a liberação dessas toxinas pode ocorrer de uma forma alternativa (Pearson et al., 2004). Acredita-se que o gene *mcyH* codifica um transportador tipo ABC, e embora este gene não esteja relacionado à síntese estrutural da molécula, ele pode estar envolvido no transporte das microcistinas (Pearson et al., 2004). Este transportador pode também ser responsável pela localização da toxina no tilacóide (Young et al., 2005) ou pela excreção da toxina sob certas condições. Por exemplo, a exposição de linhagens de *M. aeruginosa* a um aumento na intensidade luminosa (de 10 para 40 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ou a alteração da qualidade de luz (vermelha), pode ocasionar aumento da fração extracelular da toxina. (Kaebernick et al., 2000; Wiedner et al., 2003).

A partir da década de 2000, alguns estudos passaram a investigar o papel extracelular das microcistinas. Alguns trabalhos demonstraram que maior produção de microcistinas poderia promover a aptidão (*fitness*) e competitividade de linhagens de *Microcystis* em relação a outras espécies do fitoplâncton (Babica et al., 2006; Chu et al., 2007; Leflaive & Ten-Hage, 2007; Santos, 2009b); ou mesmo em relação a plantas aquáticas (Jang & Takamura, 2007). Além disso, vários trabalhos têm relacionado a formação de colônias em

Microcystis com a produção de microcistinas (Minillo et al., 2000; Kurmayer et al., 2003; Kehr et al., 2006; Zilliges et al., 2008; Gan et al., 2012).

2.2.1 Morfologia

Dittmann et al. (1999) encontraram forte evidência de que microcistinas influenciam o volume celular e documentaram que as células aumentaram claramente o volume na presença de microcistinas. Sedmak & Elersek (2006) testaram as microcistinas LR, RR e YR e também observaram aumento do diâmetro celular em linhagens tóxicas e não tóxicas de *M. aeruginosa*, na presença destas microcistinas.

Um estudo da relação entre tamanho da colônia, teor de microcistina e proporção de genótipos produtores de cianotoxinas no lago Wannsee, Berlim mostrou que maiores colônias tinham maior teor de microcistinas por célula e maior proporção de genótipos produtores de cianotoxinas. Os autores concluíram que a produção da microcistina no lago foi influenciada principalmente pela abundância de grandes colônias (Kurmayer et al., 2003).

Minillo et al. (2000) estudaram concentrações de microcistinas nas formas coloniais de *M. aeruginosa* em florações no Estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul e constataram também que diferentes formas coloniais de *M. aeruginosa* são indicadoras dos níveis intracelulares de toxinas nos eventos de florações.

O padrão de expressão de duas proteínas extracelulares, lectina (MVN) (Kehr et al., 2006) e glicoproteína (MrpC) (Zilliges et al., 2008) foram fortemente alterados na cepa mutante *mcyB*⁻ (que não produz microcistinas). MrpC é a proteína extracelular dominante em *Microcystis* e está envolvida no contato célula-célula (Zilliges et al., 2008). A produção de MVN está correlacionada com a produção de microcistinas, mas a produção de microcistinas não é essencial para a sua expressão (Kehr et al., 2006). As proteínas MVN e MrpC parecem ser específicas para os diferentes tipos de colônias de *Microcystis* (Welker et al., 2007). Contudo, não está claro se a microcistina está diretamente envolvida na formação do morfotipo e o mecanismo pelo qual isto influencia as proteínas da superfície celular.

Gan et al. (2012) mostraram que a adição de microcistinas, em concentrações compatíveis com as do ambiente, levou a um aumento no tamanho das colônias de *Microcystis*, assim como da síntese de exopolissacarídeos, apoiando a ideia de que a fração extracelular desta molécula esteja relacionada ao tamanho de colônia.

2.2.2 Alelopatia e competição

(Santos, 2009b) investigou o impacto provocado por *Cylindrospermopsis raciborskii* sobre o crescimento de cepa tóxica e não tóxica de *M. aeruginosa* e sobre a produção de microcistinas pela cepa tóxica de *M. aeruginosa*. O autor constatou que cepas tóxicas e não tóxicas respondiam de forma diferenciada à interação, e que a maior inibição de crescimento coincidiu com as fases de maior produção da microcistina, dando suporte à hipótese de que esta cianotoxina poderia ter um papel na comunicação celular.

Em experimentos de competição entre cepas tóxicas e não tóxicas de *Microcystis*, as cepas tóxicas foram competitivamente excluídas, mesmo com inóculo de células muito superior em relação a não tóxica, contradizendo a ideia de que a microcistina desempenha um papel ecologicamente importante como composto alelopático (Kardinaal et al., 2007).

Embora estudos tenham testado os efeitos das microcistinas sobre vários organismos, poucos deles utilizaram esses compostos em concentrações típicas do ambiente. As concentrações de microcistinas ecologicamente relevantes, como as encontradas nas florações de *Microcystis*, seriam muito baixas para promover efeitos alelopáticos (Babica et al., 2006).

Portanto, ainda não se sabe se a produção de microcistinas representa uma vantagem em relação às espécies e/ou cepas de cianobactérias que não as produzem e, se as cepas não produtoras de microcistinas desenvolveram mecanismos de compensação, por exemplo, a síntese de outros peptídeos (anabaenopeptinas, microviridina e aeruginosina) com função equivalente às microcistinas (Nishizawa et al., 2007; Rohrlack & Utkilen, 2007).

2.2.3 Herbivoria

Durante muito tempo acreditou-se que as microcistinas desempenhassem um papel protetor contra o zooplâncton herbívoro, com consequência, por exemplo, na taxa de crescimento populacional (Ferrão-Filho et al., 2000; Ferrão-Filho et al., 2009; Sarnelle et al., 2010), na reprodução (Lurling, 2003; Soares et al., 2009; Sarnelle et al., 2010; Zagatto et al., 2012) além de mudanças na estrutura de comunidades (Hansson et al., 2007). Contudo, alguns autores relatam, além de efeitos negativos, efeitos neutros e positivos sobre o zooplâncton (Wilson et al., 2006; Ferrão-Filho et al., 2009; Sarnelle et al., 2010; Zagatto et al., 2012). Por exemplo, um estudo em que *Daphnia* foi alimentada com *Microcystis* revelou que diferentes espécies não podiam distinguir entre o tipo selvagem (tóxica) e o mutante (não

tóxica) e ambas as linhagens foram ingeridas em taxas semelhantes (Rohrlack et al., 1999; Rohrlack et al., 2001).

A caracterização dos genes *mcy* em diferentes gêneros de cianobactérias forneceu a base para a reconstrução da história evolutiva desses gêneros. A hipótese proposta por (Rantala et al., 2004) é que a habilidade de produzir microcistinas foi herdada verticalmente por meio da diversificação dos gêneros de cianobactérias tóxicas e depois disso, repetidamente perdida. Esta hipótese é suportada pela observação de eventos de deleção parcial ou completa do grupo de genes *mcy* em populações naturais e linhagens de laboratório (Schatz et al., 2005; Christiansen et al., 2008; Alexova et al., 2011b). Outra descoberta importante deste estudo é que a data de aparecimento do ancestral das cianobactérias, contendo o grupo de genes *mcy*, foi estimada e antecedeu o aparecimento dos metazoários. Sendo assim, um papel original de defesa das microcistinas contra herbivoria é bastante questionável (Rantala et al., 2004; Schatz et al., 2005; Christiansen et al., 2008).

2.2.4 Quorum sensing

A primeira indicação de que microcistinas teriam um papel na comunicação celular partiu de Schatz et al. (2007), que verificaram que a lise de células de *M. aeruginosa* induziu o aumento da produção de microcistinas nas células remanescentes da cultura. Um efeito de autoindução menos pronunciada também pode ser visto depois da adição de microcistina pura ou outros peptídeos não ribossomais, enquanto que um efeito mais pronunciado resultou da adição de lisado celular. Deste modo, foi sugerido que microcistinas mais peptídeos não ribossomais atuariam de forma sinérgica. Averiguou-se também, que a resposta das células remanescentes é fortemente afetada pela idade da cultura, sendo dificilmente detectada em culturas mais velhas. Os autores sugeriram que a microcistina atuasse como uma molécula sinalizadora, cuja presença indicasse a extensão da morte celular dentro de uma população de *Microcystis* e aumentasse a capacidade adaptativa das células sobreviventes, por promover sua toxicidade.

Em bactérias, sistemas chamados *quorum sensing* (QS) são uma forma de regular a expressão gênica em resposta à densidade celular, através da secreção e percepção de pequenas moléculas sinalizadoras difundidas em gradiente no meio, resultando em um comportamento coordenado da população (Waters & Bassler, 2005; Reading & Sperandio, 2006). QS é um fenômeno comumente observado que favorece o acesso a nutrientes ou a

nichos ambientais mais favoráveis permitindo, por exemplo, que bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos, além de aumentar a capacidade destas se diferenciarem em formas mais adaptadas a sobreviverem em ambientes hostis, onde condições de crescimento são restritivas (Swift et al., 2001; Waters & Bassler, 2005).

Alguns autores sugeriram a possibilidade do QS estar envolvido em vários processos fisiológicos das cianobactérias (Mann, 2000), devido ao fato de alguns genes relacionados com produção de microcistina apresentarem grande similaridade com genes de outras bactérias que são regulados por um sistema de QS.

A existência de sistema de regulação de QS em cianobactéria foi confirmada no caso de *Gloeotheca*. A presença de N-octanoil homoserina lactona no meio de cultura de uma linhagem axênica apresentou um padrão característico do fenômeno da autoindução, sendo dependente da densidade de células e fase de crescimento (Sharif et al., 2008).

Porém não há nenhum relato de microcistina atuando diretamente como um autoindutor em QS. Um estudo recente de Pereira & Giani (2014) mostrou a dependência da densidade celular para a produção de diversos cianopeptídeos como microcistinas, aeruginosinas, cianopeptolinas e microviridinas. Isso indica que a síntese destes compostos possa estar sob controle de um sistema QS, embora não se saiba qual seria o autoindutor.

Em outro estudo recente, (Makower et al., 2015) foi investigado o transcriptoma de linhagens axênicas de *M. aeruginosa*, tóxica e não tóxica (mutante *mcyB*-), e suas respostas à adição de microcistina no meio de cultivo. As alterações na expressão gênica devido a esta adição ocorreram em uma pequena porção de genes, sendo seus produtos do metabolismo secundário. Nesta categoria, a maioria dos genes foi mais expresso na ausência de microcistina e em alguns casos este efeito pode ser complementado pela adição desta molécula ao meio de cultivo. Porém os genes codificantes para enzimas da síntese de aeruginosina, microcistina e cianopeptolina não foram diferencialmente expressos entre as linhagens ou entre os tratamentos. Portanto, embora não se tenha observado uma ampla alteração no transcriptoma, estes resultados indicam que a presença de microcistina pode ser um sinal de comunicação celular que é transduzido para o interior da célula, alterando seu metabolismo (Makower et al., 2015).

Em cultura tem-se observado que linhagens de *Microcystis* não entram em fase de senescência, mas permanecem por longo período na fase exponencial tardia. A sobrevivência na fase exponencial tardia de crescimento pode ser controlada por moléculas sinalizadoras

(Dagnino et al., 2006; Santos, 2009a). Sabe-se que as mudanças morfológicas que quase sempre ocorrem durante cultura prolongada, geralmente são acompanhadas por mudanças fisiológicas (Whitton & Potts, 2000). Durante prolongada limitação nutricional, as estruturas intracelulares mudam consideravelmente. As mudanças mais prováveis são a degradação das membranas intracelulares do aparato fotossintético, os tilacóides, e o acúmulo de inclusões celulares (Schwarz & Forchhammer, 2005; Dagnino et al., 2006). Contudo, o mecanismo que regula o ciclo celular em cianobactérias ainda é pouco conhecido.

Portanto, ainda não há evidências de que as variações nas concentrações intra e extracelulares de cianotoxinas estejam relacionadas a algum tipo de comunicação controlada por quorum sensing (Braun & Bachofen, 2004; Whitton, 2008).

2.3 Microcistinas e seu papel intracelular

A quantidade intracelular de microcistina geralmente é muito maior do que a dissolvida no meio externo. Apenas cerca de 10% é encontrado no espaço extracelular, ou seja, microcistinas dissolvidas (Pietsch et al., 2002; Zheng et al., 2004; Ibelings & Chorus, 2007; van Apeldoorn et al., 2007). Portanto, a maior parte dos estudos que investigam possíveis funções para as microcistinas se concentra em seu papel intracelular.

2.3.1 Regulação fotossintética

Sugere-se que as microcistinas tenham papel na regulação fotossintética, inclusive pelo fato de serem encontradas em maiores concentrações nas membranas dos tilacóides (Shi et al., 1995; Young et al., 2005), mais precisamente ligadas às ficobilinas (Juttner & Luthi, 2008) ou carboxissomos (Gerbersdorf, 2006).

Cepas de *M. aeruginosa* produtoras de microcistinas e seu mutante não tóxico foram comparadas em diferentes regimes de luz, quanto ao crescimento e pigmentação. Hesse et al. (2001) não encontraram diferenças entre as taxas de crescimento das cepas, em intensidades luminosas de 4 a 110 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mas o espectro de absorção de radiação gama fotossinteticamente ativa variou significativamente. As células mutantes possuíam menores teores de clorofila *a* e de vários carotenóides sob estas condições.

Em seguida, foi proposto por Jahnichen et al. (2007) que a produção de microcistina poderia responder a baixas concentrações de carbono inorgânico intracelular, o que de fato foi confirmado. Também foi relatada neste estudo a variação na cota celular de microcistina durante um ciclo diurno, no qual maiores valores de toxina coincidiram com menores concentrações intracelulares de carbono. Comparando uma a linhagem tóxica (PCC7806) com seu mutante *mcyB*- em baixas concentrações de carbono inorgânico, foi observado que, enquanto ambos responderam aumentando a concentração de ficocianina, somente a linhagem selvagem elevou o nível de clorofila a, mas não a mutante. Este ajuste na razão ficocianina /Chl a é uma forma de a cianobactéria se adaptar às concentrações intracelulares de carbono, otimizando a captação e concentração deste elemento e assim otimizando a eficiência fotossintética. Esta capacidade estava ausente no mutante, o que prejudicou sua adaptação a baixas concentrações de carbono. Portanto, o estudo suporta a ideia de que a microcistina tenha um papel na adaptação fotossintética em resposta à limitação de carbono inorgânico intracelular, considerando que a microcistina afeta a eficiência do mecanismo de concentração de carbono, favorecendo uma razão CO_2/O_2 alta e assim a função de RuBisCO.

A relação entre microcistina e limitação de carbono foi aprofundada no estudo de van de Waal et al. (2011) Experimentos de competição entre uma linhagem tóxica de *M. aeruginosa* (CYA140) e uma linhagem não tóxica (CYA43) em quemostato limitado em CO_2 mostraram que a linhagem tóxica prevaleceu, indicando que a microcistina confere vantagem seletiva nestas condições, o que não ocorre quando há ampla oferta de CO_2 . O mesmo tipo de experimento comparando a linhagem de *M. aeruginosa* PCC7806 e seu mutante *mcyB*- confirmou que a produção de microcistina confere vantagem seletiva sob limitação de carbono. Já em quemostatos repletos de CO_2 e com redução de intensidade luminosa (inicial de $25 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e decaindo para cerca de $2 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi simulada competição por luz e neste caso ocorreu o reverso da vantagem competitiva, sendo a linhagem tóxica suplantada pela não tóxica.

Wiedner et al. (2003), ao estudarem o efeito da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (intensidades entre 10 e $403 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; 12:12 h luz escuro) sobre a produção de microcistinas em uma linhagem de *Microcystis* (PCC7806), em cultivo contínuo. A cota celular de microcistina se correlacionou positivamente com PAR sob condição limitada de PAR. Porém, sob saturação de PAR uma correlação negativa entre estas variáveis foi observada. Portanto PAR afetou positivamente a síntese de microcistina até o ponto de

máxima taxa de crescimento, em seguida com o aumento de PAR a produção da toxina foi inibida. Foi sugerido que este efeito ocorra na regulação da biossíntese de microcistinas, de forma ainda não elucidada.

Tonk et al. (2005) verificaram que em *Planktothrix agardhii*, diferentes intensidades luminosas podem modificar a produção das variantes de microcistinas e parece que a capacidade fotossintética é aumentada na presença da toxina.

2.3.2 Proteção a estresse oxidativo

Como citado nos itens acima, uma série de dados da literatura apontam para um papel das microcistinas na resposta celular ao dano oxidativo. O envolvimento de NtrA e Fur, reguladores ligados a respostas de estresse oxidativo, na transcrição de genes *mcy* apoia esta ideia, assim como os diversos estudos que relacionam cotas celulares de microcistina e intensidade luminosa, já discutidos.

Além disso, Dziallas & Grossart (2011) mostraram os efeitos benéficos de microcistinas na presença de radicais de oxigênio, comparando linhagens tóxicas e não tóxicas. Em todos os casos, houve diminuição de crescimento e de clorofila a sob efeito do tratamento com peróxido de hidrogênio, mas a redução foi menos significativa para linhagens tóxicas do que não tóxicas. A produção de microcistina aumentou com a temperatura, quando espera-se aumento de radicais de oxigênio na célula.

Situações de estresse também diferenciaram uma linhagem tóxica de seu mutante não tóxico de *P. agardhii* (Tran et al., 2013). A expressão de vários genes da resposta de choque térmico (*hsp*), quando avaliada sob alta intensidade de luz ($600 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), foi intensificada em maior grau na linhagem selvagem do que na mutante, indicando um papel protetor da toxina nesta condição.

A resposta à limitação de ferro inclui o componente da resposta oxidativa, já que resulta na formação de espécies ativas de oxigênio (ROS) através da reação de Fenton (Latifi et al., 2009). Em baixo ferro, ocorre a degradação de ficobilissomos resultando em clorose e na síntese de proteínas que protegem os fotossistemas I e II, para reduzir o fluxo de elétrons e a formação de ROS. Quando linhagens tóxicas e não tóxicas foram comparadas sob limitação de ferro, foi observado que a ausência de microcistina na célula afetou o remodelamento da maquinaria fotossintética, o transporte de ferro e a regulação de funções mediadas por Fur.

Assim, a presença da toxina propiciou vantagem protegendo a célula de ROS (Alexova et al., 2011a).

Ainda na linha de um papel protetor, Ding et al. (2013) avaliaram a influência da radiação UVB (testando intensidades ambientais) sobre linhagens de *M. aeruginosa* tóxicas e uma naturalmente não tóxica (PCC7005) e relataram que a última foi mais suscetível aos efeitos deletérios da radiação, com pouca capacidade de recuperação após o dano celular.

Em um estudo recém publicado (Pimentel & Giani, 2014), foi investigada a síntese de microcistina sob estresse nutricional em duas linhagens de *Microcystis*, sendo uma 10 vezes mais tóxica do que a outra. A privação de nutrientes, seja de nitrato, amônia ou fosfato, levou ao aumento da cota celular de microcistina e da transcrição do gene *mcyD*. De forma geral a linhagem mais tóxica foi mais tolerante e mostrou maior alteração na expressão gênica apenas nas condições de limitação mais severa. O perfil de transcrição do gene *ntcA*, que codifica o regulador global de nitrogênio NtcA, se correlacionou positivamente com o do gene *mcyD*. Uma vez que a expressão de NtcA é afetada pelo estado redox da célula, e que NtcA se liga ao promotor dos genes *mcy*, este resultado sugere que a microcistina pode ter sua função ligada ao metabolismo de carbono/nitrogênio e controle do estado redox na célula. De fato, sob limitação de nutrientes as linhagens diminuíram o conteúdo de clorofila a, a expressão do gene de ficocianina, o crescimento celular e a pigmentação. A clorose das culturas indicou a ocorrência de estresse oxidativo.

Portanto, diferenças na adaptação ou tolerância ao estresse (principalmente variações no estado redox) e seu reflexo no balanço carbono/nitrogênio, parece ser o que distingue linhagens tóxicas de não tóxicas. Estudos mais recentes explorando abordagens de larga escala têm dado cada vez mais suporte a esta ideia, como descrito a seguir.

2.4 Estudos de proteômica e outras abordagens de larga escala

A proteômica é o estudo integrado do conjunto total de proteínas expressas por um organismo, sob um determinado estímulo. Seu objetivo é obter uma visão global e integrada de todas as proteínas da célula (Graves & Haystead, 2003). Tais estudos podem fornecer informações sobre fenótipos de células e efeitos de alterações do ambiente sobre os organismos. Em suma, é possível observar alterações quantitativas, detectar modificações

pós-traducionais, identificar interações protéicas ou estabelecer a dinâmica celular de proteínas e seus complexos (Ow & Wright, 2009).

Embora o gênero *Microcystis* seja amplamente estudado devido à sua capacidade de formar florações tóxicas, de grande importância no âmbito econômico, ecológico e de saúde pública, são escassos os trabalhos a respeito do padrão de expressão de proteínas. No Brasil, apenas um trabalho foi desenvolvido neste assunto (Tonietto et al., 2012). Neste estudo, foram comparados os proteomas de duas cepas, sendo uma tóxica *M. aeruginosa* (PCC 7820) e a outra não tóxica (NIVA CYA43). Entre as proteínas diferencialmente expressas, não foram observadas enzimas diretamente envolvidas na biossíntese da microcistina. Os autores concluíram que a produção da microcistina depende da expressão em níveis mais elevados de proteínas relacionadas principalmente ao metabolismo energético, considerando-se o gasto necessário para sua produção. Este estudo foi baseado na metodologia de separação de proteínas por géis em eletroforese bi-dimensional, seguido de identificação por espectrometria de massas.

O método livre de gel, sem marcação (*label-free*) ou com uso de marcação de proteínas com *tags* de massa (iTRAQ) são abordagens mais avançadas, que embora aumentem muito a complexidade de execução, tem potencial de revelar um número maior de proteínas, sendo bem mais eficientes que o desenvolvido em gel. Destaca-se que a análise proteômica livre de gel ainda é pouco desenvolvida no Brasil e esta tese representa o primeiro estudo de cianobactéria a utilizar esta abordagem. No exterior, os estudos mais importantes e recentes que abordam a elucidação do papel de microcistinas têm usado a abordagem proteômica e outras de larga escala, como descrito a seguir.

Um estudo amplo de proteômica comparativa com o objetivo de elucidar o papel da microcistina foi aplicado a seis linhagens de *M. aeruginosa*, naturalmente tóxicas e não tóxicas (Alexova et al., 2011b). A maior parte das diferenças foi representada por particularidades de cada linhagem, não tendo relação com a produção da toxina, e de fato nenhuma proteína pode ser identificada como exclusiva de linhagens tóxicas ou não tóxicas. As proteínas diferencialmente expressas eram participantes do metabolismo de carbono/nitrogênio e manutenção do estado redox. Os autores mencionam que diferenças na aclimação às condições de mudança do estado redox, de luz ou de disponibilidade de carbono podem, portanto, ser os parâmetros principais que distinguem linhagens tóxicas de não tóxicas.

Em outra abordagem, a comparação dos proteomas da linhagem de *M. aeruginosa* PCC 7806 e seu mutante *mcyB*- foi feita sob condições de alta intensidade luminosa ($300 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e estresse oxidativo, e escuro (Zilliges et al., 2011). Isso resultou na alteração da expressão de diversas proteínas envolvidas com a fotossíntese: principalmente enzimas do ciclo de Calvin, ficobiliproteínas e redutases. Em muitos casos as linhagens diferiam em isoformas das mesmas proteínas, e verificou-se que isso resultava da ligação covalente da microcistina a diversas proteínas na linhagem selvagem, o que era intensificado em condições de alta irradiância e estresse oxidativo. A microcistina se ligou a resíduos de cisteína de diversas proteínas *in vitro*, inclusive à subunidade maior de RuBisCo, o que aumentou sua resistência à degradação. De acordo com estudos anteriores, o mutante foi mais sensível sob alta irradiância ($300 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e tratamento com peróxido de hidrogênio. Estes dados sugeriram um papel modulador para a microcistina, estabilizando proteínas específicas sob estresse oxidativo (Zilliges et al., 2011).

Recentemente, foi feita nova comparação entre a linhagem de *M. aeruginosa* PCC 7806 e seu mutante *mcyB*- em termos de transcriptoma, sob baixa irradiância ($16 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condição em que as duas linhagens não diferem em crescimento, mas diferem quanto aos conteúdos de clorofila a e pigmentos (Makower et al., 2015). Grande parte de genes do metabolismo intermediário foi menos expressa no mutante, incluindo funções como aquisição e metabolismo de carbono, assim como genes ligados à fotossíntese (indicando alteração da razão PSI: PSII), respiração e metabolismo energético, ainda que não houvesse diferença nas taxas de crescimento. Por outro lado, genes mais expressos no mutante corresponderam a funções como transporte de bicarbonato, indicando que o mutante seja mais sensível à limitação de carbono, de acordo com evidências anteriores de cultivo nesta condição. Genes de chaperoninas também foram mais expressos no mutante, o que pode indicar maior necessidade de manter a estrutura de proteínas na ausência da função estabilizadora da microcistina. A principal categoria regulada positivamente no mutante foi do metabolismo secundário. Em alguns casos, o efeito na transcrição pode ser complementado pela adição de microcistina no meio. O trabalho sugere que a microcistina tenha múltiplos papéis na célula e que tenha efeito predominante intracelular, mas também possa ser sentida a partir do meio externo (Makower et al., 2015).

Também recentemente, uma análise inédita de metabolômica comparando estas mesmas duas linhagens (PCC7806 e mutante *mcyB*-) revelou mais uma vez um papel crucial

da microcistina na adaptação a alta irradiância ($250 \mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Meissner et al., 2014). A partir da identificação de metabólitos sintetizados, foi visto que a linhagem selvagem acumulou glicolato mais rapidamente em resposta ao aumento de luz, enquanto que o mutante acumulou moléculas indicadoras de estresse, como trealose e sacarose.

Apesar dos inúmeros estudos, ainda há muitos resultados contraditórios em relação à produção de microcistinas e ainda não há clareza sobre sua função bem como o controle de sua produção (Kaebernick & Neilan, 2001; Welker & von Döhren, 2006). Essa falta de dados conclusivos gera uma lacuna quando se busca estabelecer como e quando uma toxina pode ser produzida por uma dada espécie de cianobactéria. Uma visão que inclua a produção de toxinas como um fenômeno associado à fisiologia do microorganismo pode contribuir para o controle de florações tóxicas no ambiente. Assim, nosso objetivo foi estudar a produção de microcistinas de forma integrada, analisando parâmetros morfométricos, fisiológicos, ultraestruturais, genéticos e toxicológicos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Comparar em diferentes fases de crescimento, as variações no crescimento, na morfologia, no perfil de proteínas e na produção de microcistinas de duas cepas de *M. aeruginosa*, uma tóxica e outra não.

3.2 Objetivos específicos

Para cada cepa e em cada fase:

- Determinar variações fisiológicas associadas ao crescimento celular, número de células e produção de pigmentos (clorofila-*a*, ficobiliproteínas e carotenóides).
- Avaliar parâmetros ultra estruturais em relação ao crescimento celular.
- Estudar as variações morfométricas, como diâmetro celular, bainha mucilaginosa.
- Identificar proteínas diferencialmente expressas.
- Avaliar possíveis correlações entre a categoria funcional das proteínas identificadas, a capacidade de produzir microcistinas, e as alterações fisiológicas em geral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas três coletas em ambientes com florações de cianobactérias, com o objetivo de isolar uma linhagem tóxica e outra não tóxica de *M. aeruginosa*:

- Represa Billings – “Prainha” – Riacho Grande, São Bernardo. A coleta foi realizada no dia 15/01/2011.
- Lago das Garças- Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo. A coleta foi realizada no dia 22/01/2011.
- Represa de Furnas- Areado, Minas Gerais. A coleta foi realizada no dia 12/06/2011.

Também se tentou isolar linhagens a partir de outras amostras coletadas por outros pesquisadores do Instituto de Botânica e foram analisadas:

- Lago Jaó- Goiânia-Goiás. Amostra cedida pelo Ms. Watson Arantes Gama Junior. A coleta foi realizada no dia 07/03/2011.
- Viveiro localizado na cidade de Jaboticabal- SP. Amostra cedida pelo Dr. João Alexandre Saviolo Osti. A coleta foi realizada no dia 15/03/2011.
- Lago em Jundiaí-SP. Amostra cedida pela Dra. Maria Teresa de Paiva Azevedo. A coleta foi realizada no dia 04/07/2011.

As amostras foram coletadas com garrafa de plástico na superfície da água. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas com gelo, protegida da luz, até serem analisadas em laboratório. Parte de todas as amostras foi fixada (formol 4%) e outra parte foi mantida fresca.

4.2 Isolamento e cultivo

Os procedimentos de isolamento e cultivo do material foram realizados no Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marinho” do Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica. O isolamento do material foi feito em câmara de fluxo laminar, utilizando-se os métodos de plaqueamento e pescaria (Jacinavicius et al., 2013). As linhagens, tanto do isolamento quanto da manutenção (quando já isoladas), foram mantidas em sala com condições controladas: temperatura 23 ± 2 °C, irradiância 40-50 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2}$

s⁻¹ e fotoperíodo 14-10h claro-escuro (Azevedo & Sant'Anna, 2003). A irradiância foi medida com o uso do medidor de quanta Li-COR (modelo LI-250) com sensor subaquático esférico Li-COR (modelo LI-190).

4.3 Culturas monoespecíficas em laboratório

As cepas estudadas foram mantidas em 3 réplicas em tubos de ensaio, fechados com rolhas de algodão, contendo 15 mL de meio de cultura *Artificial Seawater Medium-1* (ASM-1), pH 7,4 e foram repicadas a cada 30 dias. O repique foi feito em dois tubos novos com meio de cultura autoclavado. As cepas foram repicadas com auxílio de pipetas tipo Pasteur, esterilizadas. O sistema de classificação adotado foi o de Komárek & Anagnostidis, 1998.

4.4 Meio de cultivo

O preparo do meio de cultura foi feito conforme Jacinavicius et al. (2013).

Tabela 2. Sais do meio de cultura ASM-1 (Gorham et al. 1964), com modificações (Zagatto & Aragão, 1992).

Nutrientes – Soluções Estoque	Quantidade (g/L)
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	8,500
Fosfato ácido dipotássio (K ₂ HPO ₄)	8,700
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2,450
Cloreto magnésio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	2,050
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	1,450
Hidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	8,700
Fosfato disodium de hidrogênio dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	17,800
Cloreto de manganês tetrahidratado (MnCl ₂ .4H ₂ O)	13,900
Cloreto de ferro hexahidratado (FeCl ₂ .6H ₂ O)	10,800
Cloreto de zinco (ZnCl ₂)	3,350
Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,190
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	28,400
Cloreto de cobre dihidratado (CuCl ₂ .2H ₂ O)	0,014
EDTA tritriplex	18,600

Todo o material utilizado para o processo de isolamento e manutenção das cepas foi autoclavado por um período de 30 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1,5 atm. Também foi acrescentado o antibiótico cicloheximida (evita o crescimento de eucariontes) a

todos os meios de cultura utilizados para o isolamento. A quantidade de cicloheximida utilizada foi de 50 mg/L, adicionada após esfriamento dos meios. Após autoclavagem de todos os materiais, o manuseio dos mesmos foi feito sempre em câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada com álcool 70% e exposta à luz UV durante 30 minutos.

4.5 Seleção das cepas

4.5.1 Teste de toxicidade

Além de quatro cepas de *M. aeruginosa* isoladas a partir das coletas descritas acima, trinta e sete linhagens pertencentes à Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica (CCIBt) foram analisadas em microscópio óptico, sendo que 22 estavam identificadas como *M. aeruginosa* e 15 como *Microcystis* sp. Ressalta-se que muitos caracteres morfológicos como tamanho das células, espessura da mucilagem e distribuição das células na colônia sofrem alterações em culturas mantidas por longos períodos. Por precaução, foram selecionadas oito linhagens que conservavam ainda as principais características morfológicas da espécie.

Sendo assim, foram selecionadas 12 linhagens de *M. aeruginosa* (tabela 3) para teste de toxicidade e escolha das linhagens tóxica e não tóxica a serem estudadas.

Tabela 3. Cepas de *M. aeruginosa* selecionadas para análise de toxicidade.

CCIBt	Data da Coleta	Local de Coleta
3106*	26/02/1998	Represa em Americana
3109*	15/07/1998	Represa de Furnas
3113*	15/07/1998	Represa de Furnas
3130*	01/03/1999	Lago das Garças- IBt
3194*	01/08/2001	Represa Billings
3202*	04/10/2001	Pesqueiro Domingão
3212*	13/09/2002	Pesqueiro Fito da Mata
3226*	06/08/2004	Lago pequeno- IBt
3337**	07/03/2011	Lago Jaó- Goiânia/ Goiás
3452**	04/07/2011	Lago em Jundiá
3453**	15/03/2011	Viveiro Cidade de Jaboticabal
3454**	15/01/2011	Represa Billings

Legenda: * Linhagens pertencentes à Coleção de Culturas do Instituto de Botânica (CCIBt), ** Linhagens isoladas no presente estudo.

4.6 Obtenção de Biomassa para teste de toxicidade

A produção de biomassa foi realizada conforme as seguintes etapas:

a) Um inóculo de 4 mL foi transferido para erlenmeyer com 40 mL de meio de cultura ASM-1. Os cultivos foram mantidos em agitador de bancada com rotação constante (70 rotações por minuto) durante 7 dias. As condições de cultivo foram as mesmas do Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” (temperatura 23 ± 2 °C, irradiância 40-50 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 14-10h claro-escuro).

b) Constatado o crescimento da cultura (aproximadamente 7 dias), transferiu-se 40 mL do inóculo para 400 mL de meio de cultura ASM-1. Os erlenmeyers foram mantidos em câmara de cultivo com as mesmas condições controladas da sala de cultivo de cianobactérias, sem aeração. As cepas ficaram sob estas condições durante 2 semanas. Foi a partir desta biomassa de 400 mL que foi realizada a análise quantitativa e qualitativa das microcistinas para seleção das cepas.

4.7 Preparo dos extratos para análise de microcistinas

As 12 cepas estudadas foram submetidas ao seguinte procedimento: a biomassa foi liofilizada, pesada e as células foram rompidas, sob ação de ultrassom (4x, 30 sec., 100 W), em MeOH/H₂O 75:25 v/v (4x). Os extratos foram centrifugados (1.830 x g, 50 min) e o sobrenadante foi coletado, concentrado a vácuo e liofilizado. O extrato seco foi fracionado por aplicação à coluna de gel de sílica octadecilsilanizada (C18) (Bond Elut) pré-condicionada com 15 mL de MeOH 100% e 15 mL de H₂O; a amostra foi eluída em gradiente formado por 150 mL de H₂O 100%; 150 mL de H₂O/MeOH 80:20 v/v; 150 mL de H₂O/MeOH 50:50 v/v; 150 mL de H₂O/MeOH 10:90 v/v e finalmente 150 mL de MeOH 100% (Harada et al., 1988) figura 7. Em trabalhos anteriores foi relatado que os peptídeos eluem na fração (3) (figura 7), no processo de extração em fase sólida descrito anteriormente (Carvalho et al., 2008) Portanto, para análise de microcistinas esta fração foi concentrada e pesada para obtenção do rendimento (anexo 1).

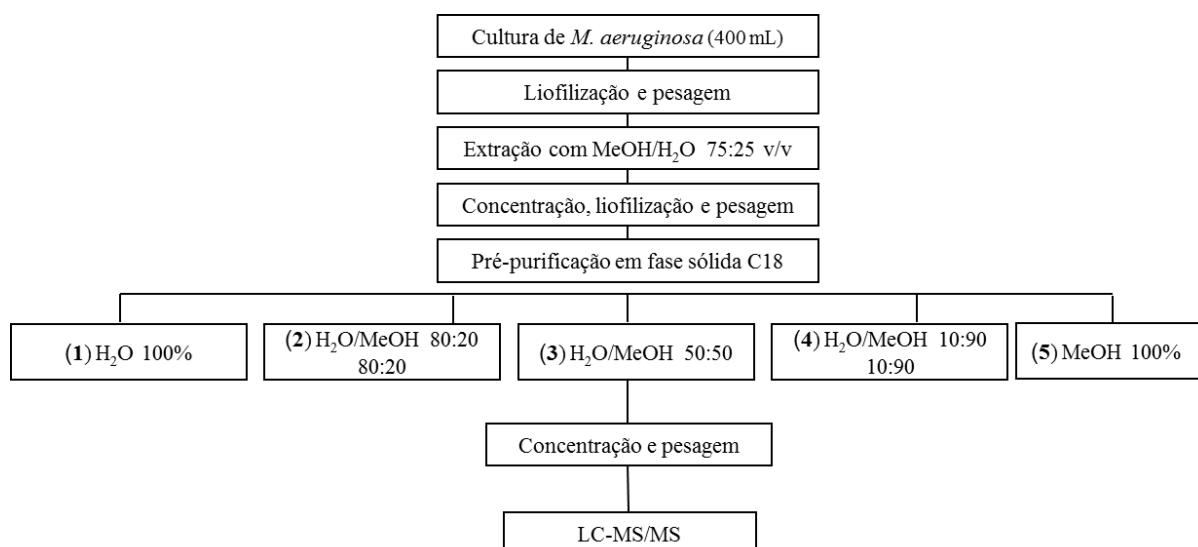


Figura 7. Esquema de fracionamento, purificação e quantificação das microcistinas a partir de extratos celulares de cepas de *M. aeruginosa*.

4.8 Análise qualitativa e quantitativa das microcistinas utilizando a técnica de LC-MS/MS

A análise de microcistinas foi realizada no Centro de Espectrometria de Massas Aplicada Ltda (CEMSA). Para análise, o liofilizado da fração (3), de cada uma das amostras foi resuspendido com uma solução de 90% água ultrapura/10% acetronitrila (v/v). Após a adição da solução os tubos tipo eppendorf foram agitados em vortex por 1 minuto. As amostras (10 mg/mL) foram filtras em Millex® de 0,45 µm e adicionadas diretamente em uma placa contendo 96 poços para posterior injeção no sistema de LC-MS/MS. As configurações estabelecidas para espectrometria de massas assim como a configuração da corrida cromatográfica estão apresentadas no anexo 1.

4.9 Curvas de Crescimento

4.9.1 Obtenção de biomassa

a) Pré-inóculo inicial: um inóculo de 10 mL foi transferido para erlenmeyer com 100 mL de meio de cultura ASM-1. As condições de cultivo foram as mesmas do Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino”.

b) Pré-inóculos: após sete dias de cultivo, transferiu-se 100 mL do inóculo para 300 mL de meio ASM-1. As cepas foram mantidas nas mesmas condições do item “a” durante 14 dias.

c) Inóculos: no 15º dia foi calculado o número de células. mL^{-1} para cada cultivo e todos os inóculos foram padronizados em $1,5 \times 10^5$ células mL^{-1} , utilizando-se a fórmula $C1.V1 = C2.V2$, onde C é a concentração e V é o volume. Estes inóculos foram transferidos para erlenmeyers de 1 L com 500 mL de meio de cultivo ASM-1. As curvas de crescimento foram realizadas a partir de 3 réplicas de culturas. Foram coletados diariamente 500 μL a partir de cada réplica de cultura das linhagens, durante o período de 20 dias. Cada amostra foi fixada (250 μL) logo após a coleta em formol 4%.

As curvas de crescimento foram estabelecidas a partir dos valores de biovolume das cianobactérias ($\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$) e de número de células (células. mL^{-1}) em relação ao tempo de cultivo. Para realizar a contagem de células foi necessário eliminar a mucilagem e, para isto, adicionou-se NaOH 1M (1 mL da cultura:0,5 mL de NaOH). Esta mistura permaneceu em banho-maria a 60°C durante 10 min. No entanto, após o 5º dia o uso do banho-maria foi dispensável, pois as mucilagens estavam mais frouxas e as amostras foram tratadas somente com NaOH 1M.

4.9.2 Biovolume

O volume celular (V) foi obtido a partir da média do diâmetro de trinta células (Sun & Liu, 2003). O biovolume ($\text{mm}^3. \text{L}^{-1}$) total foi estimado multiplicando-se a densidade celular por seus respectivos volumes (Sun & Liu, 2003). Os valores obtidos em $\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$ foram divididos por 10^{-6} para conversão em $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$.

4.9.3 Densidade celular

Para determinação das curvas de crescimento foram realizadas contagens do número de células diariamente em câmara de Fuchs-Rosenthal durante 20 dias e aplicados os fatores de conversão. A tabela 4 apresenta o fator de multiplicação necessário para conversão do número de células contadas, para nº. de células. mL^{-1} .

Foram contadas as células de no mínimo uma área da câmara, o que corresponde a 16 quadrados da mesma. Foi estabelecido um número máximo de 200 células por área de contagem (caso este número fosse excedido, uma nova contagem teria que ser realizada após a diluição da amostra). Foram feitas contagens nos dois lados da câmara e, caso houvesse diferença maior que 10% entre os lados, também era realizada uma nova contagem.

4.9.4 Determinação das taxas de crescimento, tempo de duplicação e rendimento celular

Após determinação das curvas de crescimento, foram calculadas as taxas de crescimento (μ , dia^{-1}) e o tempo de duplicação (G , dia^{-1}) de cada cultivo analisado. Estas taxas foram calculadas com a média das contagens dos três frascos ($n=3$). As taxas de crescimento foram obtidas como descrito por Carneiro et al. (2012), com modificações. Resumidamente, regressões exponenciais e os dados de adesão de 96% ($R^2 \geq 0,96$) foram utilizados para verificar a duração da taxa de crescimento exponencial. As taxas de crescimento foram calculadas de acordo com Reynolds (2006), utilizando a fórmula de regressão exponencial:

$$N = N_0^{m.t}$$

Onde N é o número de células no momento t ; N_0 é o número inicial de células e m é a taxa de crescimento.

O tempo médio de duplicação também foi calculado como descrito por Fogg & Thake (1987):

$$G = \ln(2) \cdot \mu^{-1} \text{ dia}^{-1}$$

O rendimento celular máximo (R), medido em células. mL^{-1} , corresponde ao número final de células menos o número de células do inóculo.

4.10 Critérios de escolha das linhagens

Os critérios utilizados para a seleção das linhagens tóxica e não tóxica foram:

- Manutenção das características morfológicas diacríticas da espécie;
- Biomassa suficiente para análise de microcistinas, após extrato de purificação;
- Presença de microcistinas que pudessem ser confirmadas com os padrões (MC-LR, RR, LA e YR) usando um LC-MS/MS, no caso da linhagem tóxica;
- Alta taxa de crescimento;
- Bom rendimento celular.

4.11 Estudo Molecular

4.11.1 Caracterização filogenética das cepas estudadas

Após a definição das linhagens tóxica e não tóxica, foi realizado o sequenciamento de diferentes marcadores moleculares: 16S RNAr e genes envolvidos na biossíntese de microcistinas (*mcyD*, *mcyE* e *mcyG*). As análises moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia, Ecologia e Taxonomia de Algas - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP - São José do Rio Preto, em colaboração com a Dra. Janaina Rigonato. O sequenciamento foi realizado na empresa Genomic Engenharia Molecular Ltda, São Paulo-SP.

4.11.2 Preparação da amostra para extração de DNA genômico

A produção de biomassa para as análises moleculares foi realizada a partir de linhagens uniespecíficas. Para a extração de DNA, utilizou-se cerca de 10 mL de cultura em meio líquido. Uma vez que as linhagens estudadas não são axênicas e apresentam bainha mucilaginosa, métodos de lavagem foram necessários para remoção de bactérias heterotróficas associadas. A presença destas bactérias aderidas ou não à bainha mucilaginosa pode interferir nas diferentes etapas da análise. Deste modo, os tratamentos I ou II foram utilizados para a lavagem da biomassa produzida, como segue:

4.11.3 Tratamento I

1 mL de Tampão TE (Tris 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M) foi adicionado ao material e agitado em vortex. Posteriormente, o material foi centrifugado (10.000 g por 10 min) e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido 3 vezes (Kling et al., 2012).

4.11.4 Tratamento II

500µl de solução de lavagem (Tris-HCL 1M pH 8,0; EDTA 0,5M e NaCL 5M) e 50µl de SDS 2% (dodecil sulfato de sódio) foram adicionados às amostras. Posteriormente, o material foi agitado em vortex, centrifugado (10.000 g por 5 min) e o sobrenadante descartado. Por fim, adicionou-se mais 1 mL da solução de lavagem e o material foi agitado em vortex novamente, centrifugado (5.000 g por 5 min) e o sobrenadante descartado.

4.11.5 Extração de DNA genômico

A extração e a purificação do DNA genômico foram realizadas por meio do Kit Ultra Clean® Microbial DNA Isolation (MO BIO, Carlsbad, CA, EUA). Alíquotas (5µl) dos DNAs extraídos foram acrescidas de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,5%; glicerol 0,3%; EDTA 0,5M) e GelRed™ 0,6X (Biotium, Hayward, USA). A integridade dos mesmos foi verificada em gel de agarose 1 %, após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (1X TBE: Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). A documentação do gel foi feita usando o programa *Multi Analyst* do *Fluor-S™ MultiImager* (BioRad, Hercules, CA, USA). Como padrão de tamanho e concentração de DNA foi utilizado o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O DNA genômico foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento de realização da próxima etapa.

4.11.6 Amplificação gênica do fragmento 16S RNAr + ITS

A amplificação do fragmento gênico 16S RNAr + ITS foi realizada utilizando os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: 27F1 (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Neilan et al., 1997) e 23S30R (5' -CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT- 3') (Taton et al., 2003). A amplificação do fragmento foi realizada em solução contendo: 5 µL de tampão para a reação PCR 1X (Tris HCl 20mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 0,25 mM de cada dNTP, MgCl₂ 3 mM, 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life Technologies), 20-50 ng de DNA, 5 µM de cada iniciador, água ultrapura (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador Techne TC-412 Thermocycler (Bibby Scientific). As condições para amplificação foram: 94°C por 5', seguidos de 25 ciclos de desnaturação a 92°C por 45'', anelamento a 57°C por 45'', extensão a 72°C por 2'; e extensão final a 72°C por 7'. A verificação dos produtos de PCR e documentação do gel foi realizada conforme descrito no item 4.11.2.

4.11.7 Amplificação de fragmentos gênicos envolvidos na biossíntese de microcistinas, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*

A fim de verificar o potencial genético para produção de microcistinas na linhagem que não produziu microcistinas, a presença dos genes *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* foi investigada. Para a

amplificação de fragmento do gene *mcuD* (~818 pb, codifica parte da cetoaciltransferase e domínio da aciltransferase - PKS) utilizou-se os iniciadores *mcuDF* (5'GATCCGATTGAATTAGAAAG3') e *mcuDR* (5'GTATTCCCCAAGATTGCC3') (Rantala et al., 2004). Para o gene *mcuE* (809 a 812 pb, codifica parte do domínio de adenilação e do sítio de ligação da fosfopanteteína - PS) foram usados os iniciadores *mcuEF2* (5'GAAATTTGTGTAGAAAGGTGC3') e *mcuER4* (5'AATTCTAAAGCCCCAAAGACG3') (Rantala et al., 2004). A amplificação de fragmento do gene *mcuG* (385 pb, codifica o domínio da C-metiltransferase - PKS) foi realizada a partir dos iniciadores *mcuGF* (5'GAAATTGGTGCGGGAAGTGGAG3') e *mcuGR* (5'TTTGAGCAACAATGATACTTTGCTG3') (Fewer et al., 2007). A amplificação do fragmento foi realizada em solução contendo: 5 µL de tampão para a reação PCR 1X (Tris HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM), 0,25 mM de cada dNTP, MgCl₂ 3 mM, 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life Technologies), 20-50 ng de DNA, 5 µM de cada iniciador, água ultrapura (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador Techne TC-412 thermocycler (Bibby Scientific). As condições para amplificação foram: 95°C por 3', 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30", anelamento a 52°C por 30', extensão a 72°C por 3"; e extensão final a 72°C por 10 min. A verificação dos produtos de PCR e documentação do gel foi realizada conforme descrito no item 4.11.2.

As amostras positivas a PCR foram purificadas utilizando o kit "GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare). No caso onde a presença de mais de uma banda foi observada após a eletroforese, elas foram excisadas do gel e purificadas utilizando o mesmo kit.

4.11.8 Clonagem dos fragmentos gênicos

Dentre os marcadores analisados neste estudo (16S RNAr + ITS, *mcuD*, *mcuE* e *mcuG*), a clonagem foi realizada apenas para o fragmento 16S RNAr + ITS. Após a amplificação das sequências de DNA via PCR foi realizada a clonagem dos produtos da PCR utilizando o kit de clonagem "pGEM®-T Easy Vector Systems" (Promega). A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5α foi feita através de choque térmico (Sambrook et al., 1989). Aliquotas de 10 µL do produto de ligação e 100 µL de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5α foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 min. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-

maria a 42°C e deixado por 30 segundos, sem agitar. Em seguida o microtubo foi incubado no gelo por 2 min. Posteriormente adicionou-se 250 µL de meio SOC (Sambrook et al., 1989) à temperatura ambiente e a mistura foi incubada a 37°C, durante 1 hora, sob agitação de 200 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Life technologies), ambos em concentrações finais de 100 µg/mL de meio. As placas foram incubadas por 15 horas, à temperatura de 37°C. Em seguida, uma colônia de cor branca foi utilizada para reação de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25 µL de reação de PCR utilizando-se os iniciadores: CYA359F (5'-GGGGAATTTTCCGCAATGGG-3'), CYA781aR (5'-GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT-3') e CYA781bR (5'-GACTACAGGGGTATCTA ATCCCTTT-3' – (Nubel et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo: tampão para reação PCR 10X (Tris HCl 20mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,2 mM de cada dNTP; MgCl₂ 3 mM; 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Life technologies); 10 ng de DNA; 5 pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q) esterilizada, para um volume final de 25 µL. A reação foi feita em um termociclador Techne TC-412 Thermocycler (Bibby Scientific). As condições de amplificação foram: 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 63°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 1 min. A verificação do tamanho dos produtos da PCR gerados foi feita em gel de agarose 1,0% - 0,5 X TBE conforme descrito acima.

4.11.9 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5α que continham os insertos foi feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina (Birnboim & Doly, 1979). As colônias brancas foram transferidas para 4 mL de meio LB contendo ampicilina e cultivadas por 15 horas, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em microtubos foram colocados 1,5 mL da cultura de células que, em seguida, foram centrifugadas a 10.000 × g por 20 segundos. Esse procedimento repetiu-se por duas vezes. O pellet formado foi ressuspensionado em 100 µL de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM e glicose 50 mM). Em seguida, 200µL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram adicionados e misturados gentilmente por meio da inversão dos microtubos. Após terem sido incubados no gelo por 5 minutos, foram acrescentados 150µL de solução III

gelada (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M). Novamente foi realizada a mistura por inversão e os microtubos foram incubados no gelo por mais 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a $10.000 \times g$ durante 7 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Adicionou 270 μL de isopropanol à temperatura ambiente, misturando e centrifugando conforme descrito anteriormente. Após a eliminação do sobrenadante, o pellet foi lavado uma vez com 250 μL de etanol 70% gelado e centrifugado a $10.000 \times g$ por 2 minutos. O pellet foi seco e ressuspendido em 30 μL de uma solução contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,5 M e RNase a 10 mg/mL. Incubou-se essa mistura a 37°C por 30 minutos. Os plasmídeos assim extraídos foram armazenados a -20°C até o próximo uso.

4.11.10 Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos foi feita usando-se o kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para a reação foram utilizados 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5 pmol dos iniciadores externos M13F(5'-GCCAGGGTTTCCCAGTCACGA-3') ou M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') e 2 μL de “Big Dye Terminator versão 3.0 ” e 2 μL de tampão 5X BigDye Terminator Sequencing Buffer (Life technologies) (protocolo fornecido pelo fabricante) e água ultrapura para volume final de 10 μL . Também foram utilizados conjuntos de iniciadores visando o fechamento das sequências que codificam o 16S RNAr (357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R) (Lane, 1991). As condições de amplificação foram as seguintes: 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s, 60°C por 1 min. Após a amplificação dos fragmentos, foi realizada a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit. Posteriormente, as reações precipitadas foram analisadas no sequenciador capilar ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Life technologies) para o sequenciamento dos fragmentos de DNA. Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM® DNA Sequencing – Analysis Software” versão 3.7 (Applied Biosystems).

O sequenciamento dos marcadores para microcistinas *mcyD*, *mcyE* e *mcyG* foi conduzido diretamente a partir dos produtos de PCR purificados. Para cada amostra foram misturados 50 ng de produto de PCR com 5 pmol dos respectivos iniciadores usados na PCR, nas mesmas condições descritas acima. Os fragmentos foram sequenciados e comparados com sequências depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1990).

4.11.11 Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências geradas foram processadas para checagem de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade ≤ 20) através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998), em sistema operacional Linux. As sequências obtidas foram comparadas com outras previamente depositadas no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1990).

Para a construção das árvores filogenéticas, as sequências obtidas neste estudo e outras selecionadas nos bancos de dados públicos foram alinhadas (ClustalW) e editadas manualmente. Os métodos de inferência foram *Neighbor Joining* (NJ) e Máxima Verossimilhança (ML), implementados a partir do pacote de programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011), e Inferência Bayesiana (IB), utilizando-se MrBayes 3.2.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). O teste de modelos de análises filogenéticas foi aplicado no programa Topali 2.5 (Milne et al., 2009) a fim de se definir qual o melhor modelo evolutivo a ser aplicado para o conjunto de sequências analisadas. Os modelos utilizados para cada conjunto de sequências estão descritos nas legendas das árvores filogenéticas apresentadas. A porcentagem de identidade entre as sequências analisadas foi realizada pelo método “p-distance” no programa MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011).

Em relação à inferência Bayesiana, os parâmetros para a construção da árvore filogenética foram fixados em duas corridas de 15.000.000 gerações em quatro cadeias, com reamostragem a cada 1000 árvores. A qualidade das corridas foi avaliada pela convergência entre as corridas independentes usando o programa TRACER versão 1.5 (Rambaut & Drummond, 2007), e os 10% iniciais da corrida foram descartados (*burn-in*). Posteriormente, a melhor topologia foi obtida através de consenso estrito.

4.12 Delineamento experimental e Análise dos dados

Com o objetivo de facilitar a comparação dos dados, uma biomassa única foi produzida para cada linhagem e usada para análise de todos os parâmetros estudados. A partir dos dados das curvas de crescimento, amostras foram retiradas nas fases exponencial e exponencial tardia de crescimento (figura 8, tabela 4).

Para obtenção de biomassa:

a) Pré-inóculos iniciais: um inóculo de 5 mL de cada cepa estudada foi transferido para erlenmeyer com 50 mL de meio de cultura ASM-1. Os cultivos foram mantidos nas mesmas condições do Laboratório de Cultura de Algas e Cianobactérias “Marilza Cordeiro Marino” (temperatura 23 ± 2 °C, irradiância 40-50 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo 14-10h claro-escuro).

b) Pré-inóculos: constatado o crescimento das culturas (aproximadamente 7 dias), transferiu-se 50 mL do inóculo para 500 mL de meio de cultura ASM-1. As cepas ficaram sob as mesmas condições mencionadas, durante 14 dias.

c) Inóculos: no 15º dia foi calculado o número de células. mL^{-1} para cada cultivo e todos os inóculos foram padronizados em $1,5 \times 10^5$ células. mL^{-1} , utilizando-se a fórmula $C1.V1 = C2.V2$, onde C é a concentração e V é o volume.

Estes inóculos foram usados para produzir a biomassa de cada linhagem. Os cultivos foram realizados em 6.500 mL, mantidos em erlenmeyers com capacidade de 10.000 mL. A partir desta etapa, os experimentos foram executados em triplicatas e todos os erlenmeyers foram agitados manualmente três vezes por dia durante a manutenção e o período experimental. Amostras foram retiradas nas fases exponencial (5 dias) e exponencial tardia (17 dias) de crescimento (figura 8, tabela 4).

Em nossas análises todas as amostras foram coletadas em câmara de fluxo laminar, uma hora e meia após iniciar o ciclo de luz e em seguida foram congeladas.

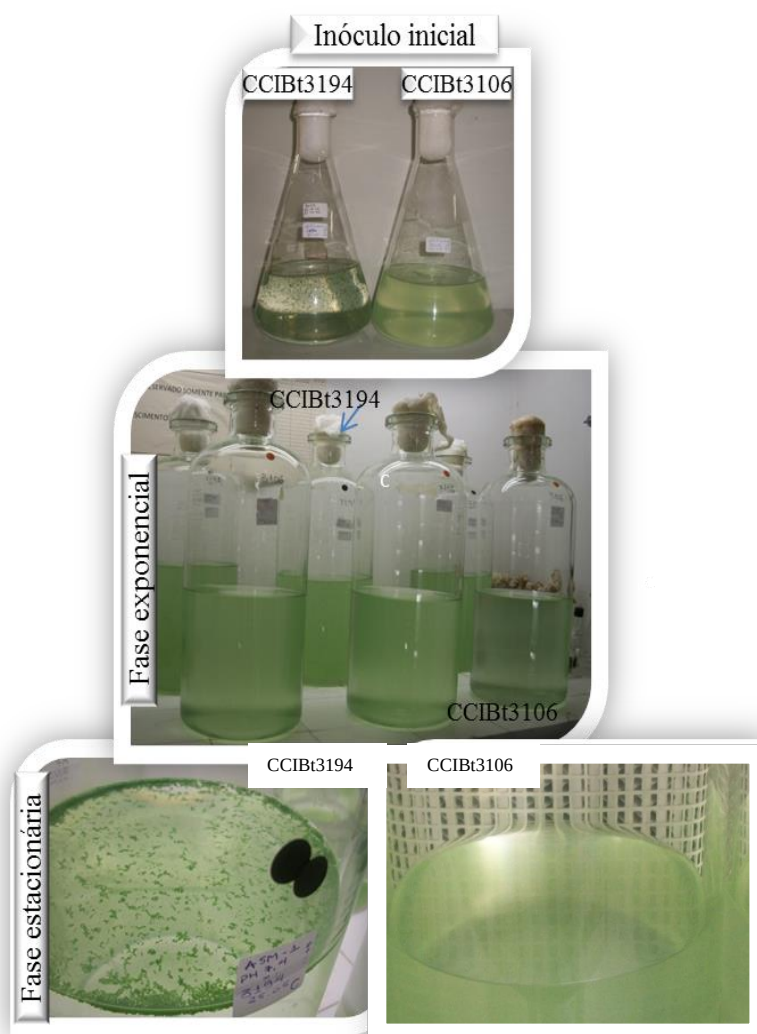


Figura 8. Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), durante a produção de biomassa (material homogeneizado).

Tabela 4. Volumes de cultura (mL) utilizados para cada parâmetro estudado. *, linhagem tóxica (CCIBt 3194); **, linhagem não tóxica (CCIBt 3106)

	exponencial*	exponencial tardia*	exponencial**	exponencial tardia**
Morfométricos	1	1	1	1
Microscopia eletrônica	300	300	300	300
Clorofila <i>a</i> e ficobiliproteínas	~200	~100	~200	~200
Carotenóides	15	8	10	3
Toxina intracelular	220	130	120	50
Antioxidantes	200	200	200	200
Parâmetros fotossintéticos	-----	15	-----	15
Proteômica	2.000	2.000	2.000	2.000

4.13 Estudos morfométricos

As análises morfométricas do material da natureza preservado em formol 4% e da cultura foram realizadas ao microscópio óptico binocular Axioplan-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com câmara clara, ocular de medição e dispositivo de epifluorescência acoplado ao equipamento. O sistema de epifluorescência foi utilizado para evidenciar a presença de ficocianina (filtro verde: excitação na faixa de 546 nm) e clorofila *a* (filtro azul: excitação na faixa de 450-490 nm). A epifluorescência auxilia na confirmação de que a cultura está de fato uniespecífica.

Para evidenciar a bainha mucilagínosa utilizou-se solução aquosa de nanquim na proporção de 1:1, sempre que necessário. Foram feitas 60 medidas do diâmetro celular de cada linhagem, diariamente durante 20 dias.

As amostras foram fotografadas em sistema de captura digital de imagens AxioCAM MCR. (Carl Zeiss), acoplado ao equipamento e os dados métricos foram obtidos analisando as fotografias por meio do programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.6.3.

4.14 Microscopia eletrônica de transmissão

Para observação em microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras provenientes da fase exponencial e exponencial tardia foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 2,0%, tamponadas com cacodilato 0,1 M (pH 7,2). O material foi pós-fixado em 1% de tetróxido de ósmio por 4 horas, desidratado em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (Schmidt et al., 2009). Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr. As secções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão, modelo Jeol (JEM)1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, cuja responsável é a Dra. Zenilda L. Bouzon.

4.15 Extração e análise de pigmentos

4.15.1 Clorofila *a* e ficobiliproteínas

Uma determinada biomassa de cada linhagem foi coletada a cada três dias durante 16 dias (equivalente a aprox. 150 mL). Logo após as coletas as biomassas foram imediatamente congeladas em frascos âmbar e liofilizadas para obtenção do peso seco. O material seco foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 5,5 e temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada por 20 minutos a 1.4000 g a 4°C. O sobrenadante, contendo as ficobiliproteínas, foi mantido no escuro em tubos tipo eppendorf, para posterior leitura em espectrofotômetro (Shimadzu – UV 1800; λ = 562, 615 e 652 nm). O sedimento foi ressuspendido em acetona 90% para obter um homogeneizado. A solução foi centrifugada (10.000 rpm a 4 °C) durante 15 minutos, e o sobrenadante, contendo a clorofila *a* foi transferido para tubos tipo eppendorf vedados e mantidos no escuro até a leitura em espectrofotômetro (λ = 630, 647 e 664 nm). A determinação da concentração das ficobiliproteínas foi realizada utilizando-se as fórmulas descritas por Bennett & Bogorad (1973) e a concentração de clorofila *a* foi realizada utilizando a fórmula descrita por UNESCO (1966). Os valores de ficobiliproteínas e clorofila-*a* foram expressos em fentograma por células.

4.15.2 Carotenóides

Alíquotas dos cultivos foram filtradas em membranas de fibra de vidro (AP-20, 13 mm de diâmetro, Millipore), os filtros foram armazenados em microtubos âmbar e mantidos em freezer (-20 °C) para posterior análise. A extração dos carotenóides totais foi promovida pela adição de 1,5 mL de acetona 90% sobre os filtros, seguida de agitação no vortex. Para lise celular, as amostras foram mantidas em ultrassom em 3 ciclos de 10 minutos, com intervalos de 20 minutos, e armazenadas a - 20 °C durante 4h, no escuro. Para análise, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, 4 °C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membranas de PVDF (0,45 μ m, 13 mm de diâmetro, Millipore) para frascos âmbar e analisados por HPLC-PDA (Shimadzu, Kyoto, Japão), segundo protocolo de Jodlowska & Latala (2003). Os pigmentos foram identificados pelo seu espectro de absorção (β -caroteno: 451 nm) e pela comparação entre os tempos de retenção com padrão analítico. A quantificação foi feita automaticamente pela integração dos picos cromatográficos e as áreas utilizadas para cálculo da concentração através de curvas de calibração construídas com padrão analítico de β -caroteno (Sigma- Aldrich) (anexo 5). Os valores de carotenóides foram expressos em fentograma por célula.

4.16 Determinação dos parâmetros fotossintéticos

As variáveis da fluorescência da clorofila *a* foram determinadas com o fluorômetro portátil de pulso de amplitude modulada PAM - 2500 (Walz, Effeltrich, Alemanha), Luz actínica vermelha, o qual foram obtidas a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR), a extinção fotoquímica ($Y(PSII) = \Delta F/F_m' = (F_m' - F_t) / F_m'$), a extinção não-fotoquímica regulada ($NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$) e a extinção não-fotoquímica não regulada ($Y(NO) = F / F_m$). O rendimento quântico máximo foi determinado após adaptação das cianobactérias a 15 min no escuro. As linhagens foram expostas à luz e determinou-se o rendimento quântico efetivo.

A taxa de transferência de elétrons (ETR) foi avaliada através das curvas de fotossíntese e irradiância (PxI) medindo-se a fluorescência da clorofila *a* em 7 níveis crescentes de irradiância actínica de PAR (E ; 0, 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{mol. fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Os parâmetros da curva de ETR foram calculados com base no ajuste não linear da função sem fotoinibição (Jassby & Platt, 1976). Com base nas curvas de PxI , foram determinados os seguintes parâmetros fotossintéticos: fotossíntese máxima (F_{max}) – m_1 , eficiência fotossintética da cianobactéria (Alfa) – m_2 e ponto de saturação da fotossíntese ($I_k = ETR_{\text{max}} / \alpha$), utilizando-se o programa KaleidaGraph.

4.17 Toxina intracelular

Alíquotas dos cultivos foram filtradas em membranas de fibra de vidro (AP-20, 47 mm de diâmetro, Millipore), os filtros foram armazenados em microtubos tipo eppendorf âmbar e mantidos em freezer (-20°C) para posterior análise. Os filtros foram picotados, transferidos para novos tubos âmbar de 2 mL e a eles adicionados 2 mL de metanol 90%. Após 3 ciclos de 20 minutos em banho de ultrassom, para lise celular, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g a 4°C , por 25 minutos e o sobrenadante retirado. Após filtração em membranas de PVDF de 0,45 μm (Millipore), 100 μL de extrato foram injetados no sistema cromatográfico. As análises foram realizadas por HPLC-PDA em um sistema (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20AT quaternário e um detector de arranjo de diodos

SPDM20A, utilizando-se uma coluna cromatográfica Luna C18(2) (5 µm, 250 mm x 4,6 mm; Phenomenex). A fase móvel consistiu-se de 2 eluentes: A) água contendo 0,08% de ácido fosfórico e B) acetonitrila, com fluxo de 0,5 mL/min. Um gradiente linear de fase móvel de 10 a 50% de acetonitrila por 40 minutos foi utilizado. Microcistinas foram quantificadas pela integração das áreas dos picos cromatográficos em 238 nm usando uma curva de calibração construída com padrões analíticos de MC-RR, MC-LR, MC-YR e MC-LA, cuja concentração é de 10 µg/mL (Sigma-Aldrich). As curvas padrões foram construídas a partir de 6 pontos (triplicatas). Foram utilizadas as seguintes diluições em µg/mL: 1,25 (8x), 0,625 (16x), 0,3125 (32x), 0,15625 (64x), 0,078125 (128x) e 0,0390625 (256x). Os valores de microcistinas foram expressos em fentograma por célula.

4.18 Determinação de antioxidantes

As análises de antioxidantes foram realizadas no Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" (LAM) - Instituto de Biociências, USP - São Paulo, em colaboração com a Dra. Fanly Fungyi Chow Ho. As amostras de cultura de *M. aeruginosa*, fase exponencial e exponencial tardia de crescimento, foram centrifugadas e concentradas (n=3). Em seguida, estas foram preparadas de acordo com o descrito a seguir:

As amostras contendo massa fresca (200 mL), foram congeladas em nitrogênio líquido, trituradas e em seguida suspensas em 1 mL de metanol (100%) para a fase exponencial e 2 mL de metanol para a fase exponencial tardia. O material então foi reservado para completar a extração durante 3 h à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 min à temperatura ambiente. Recolheu-se o sobrenadante e deste fez-se diluições a partir de 200µL do extrato (100%), 160µL extrato + 40 µL MeOH (80%), 120µL extrato + 80 µL MeOH (60%), 80µL extrato + 120 µL MeOH (40%) e 40µL extrato + 160 µL MeOH (20%).

Após o preparo das amostras, estas foram submetidas às análises de antioxidantes específicos, de acordo com as metodologias abaixo. Todas as metodologias são baseadas em leituras por meio de espectrofotometria, sendo assim necessário estabelecer uma curva de calibração para cada uma delas (anexo 5).

4.18.1 DPPH

Para preparo da solução alcóolica de DPPH $32 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ($80 \mu\text{M}$) foram dissolvidos 0,0016 g de DPPH ($\text{MM} = 394,32 \text{ g}.\text{mol}^{-1}$; 2,2-difenil-1- picril-hidrazil) em 50 mL de metanol, homogeneizada em vortex e verificada a sua absorbância em 517 nm, a qual deveria estar em torno a 0,8 a 1,0, modificado por Pires et al. (2014a), adaptado de Brand-Williams et al. (1995), Rufino et al. (2007) e Serra (2012).

Montagem da microplaca (volume final 300 μL): em cada poço da microplaca foi adicionados 280 μL da solução de DPPH. Em seguida foram adicionados 20 μL de extrato. O branco para cada amostra foi feito misturando-se 280 μL de metanol/água ultrapura e 20 μL de extrato. As amostras foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. Em seguidas foram lidas a 517 nm. A % de atividade antioxidante foi calculada conforme Pires et al. (2014a). Os dados foram apresentados em μg de equivalente padrão/número de células($\times 10^5$).

4.18.2 Ensaio de redução do ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power)

Nesta metodologia utiliza-se o reagente FRAP, o qual foi obtido a partir da combinação tampão acetato 0,3 M pH 3,6, solução TPTZ 10 mM e de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, na proporção de 10:1:1, modificado por Pires et al. (2014c), adaptado de Brito et al. (2006)

Montagem da microplaca (volume final 300 μL): todo o procedimento foi realizado em ambiente escuro. Misturou-se 15 μL de água ultrapura, 20 μL de extrato a 265 μL do reagente FRAP. O mesmo foi feito para o branco (20 μL metanol/DMSO 10%). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C durante 30 min. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm. Os dados foram apresentados por % de inibição em μg de equivalente padrão/número de células($\times 10^5$).

4.18.3 Ensaio da atividade antioxidante pelo método do Folin-Ciocalteu

Foi utilizada a metodologia proposta por Singleton & Rossi (1965) e Waterman & Mole (1995), com adaptações de Pires et al. (2014b).

Montagem da microplaca (volume final 300 μL): em cada poço foi adicionado água ultrapura, extrato, Folin (2N) e solução de Na_2CO_3 saturado, na proporção de 10:1:1:3. A placa foi homogeneizada e incubada por 30 min no escuro. As amostras foram lidas em 760

nm. Os dados foram apresentados por % de inibição em μg de equivalente padrão/número de células($\times 10^5$).

4.19 Análise proteômica

Etapa desenvolvida na Unidade Multidisciplinar de Genômica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, e na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, no Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.19.1 Extração de proteínas

Diversos métodos foram aplicados visando purificar proteínas solúveis de *M. aeruginosa* de forma compatível com a análise livre de gel e marcação com *tags* de massa (iTRAQ). Os métodos testados são apresentados no anexo 6.

A partir das células liofilizadas, a extração de proteínas foi realizada de acordo com o protocolo de Wang et al. (2006), descrito para tecidos de plantas, em que as células são lisadas na ausência de detergente, o que parece minimizar a co-purificação de interferentes como pigmentos. Além disso, este método inclui uma série de lavagens com solventes diversos, permitindo a extração de proteínas solúveis sem pigmentos.

As células foram ressuspensas em HEPES 10 mM pH 7,5; PMSF 1 mM; tiouréia 2 M e uréia 7 M e lisadas por tratamento em FastPrep (BIO101) na presença de matriz de lise (Lysing Matrix B, MPBio), nas seguintes condições: 4 ciclos de potência 6,5 por 45 segundos cada com intervalos de 5 min no gelo. Os lisados foram centrifugados (10.000 g, 5 min a 4° C) em microtubos para separar os debris. O sobrenadante foi recuperado e em seguida foram adicionados 7 volumes de ácido tricloroacético 10% em acetona. Após agitação em vortex, as soluções foram incubadas no gelo durante 1 hora para precipitação das proteínas. As soluções foram centrifugadas (10.000 g, 15 min a 4° C), os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em acetato de amônio 0,1 M em 80% metanol. Após agitação em vortex, as soluções foram incubadas no gelo por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas (10.000 g, 15 min a 4° C). Os pellets foram ressuspensos em acetona 80% e ficaram refrigerados a -20° C, durante a noite. Posteriormente, foram centrifugados (10.000 g, 15 min a 4° C), os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram secos em banho-maria. Em seguida, foram ressuspensos em solução de sacarose 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,1 M pH 8; DTT 100 μM . Adicionou-se 1 volume de fenol pH 8, após agitação

em vortex, as soluções foram incubadas no gelo por 5 min e centrifugadas (10.000 g, 15 min a 4 °C). Transferiu-se a fase superior para outro microtubo de 2 ml. Adicionou-se 5 volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol. Após agitação em vortex, as soluções ficaram refrigeradas a -20°C, durante o período noturno. As soluções foram centrifugadas (10.000 g, 15 min a 4 °C) e os pellets foram lavados com etanol:acetona:ácido acético (50:50:1). Em seguida fez-se agitação em vortex e as soluções foram centrifugadas (10.000 g, 15 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram lavados com metanol 100%. Após agitação em vortex, as soluções foram centrifugadas (10.000 g, 15 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram lavados com acetona 80%. Os pellets foram secos em banho-maria e depois as proteínas foram solubilizadas em: uréia 7 M; tiouréia 2 M; CHAPS 4%; DTT 40 mM. As amostras de proteínas solúveis foram armazenadas a -20 °C.

4.19.2 Dosagem de proteínas

Para dosagem de proteínas, alíquotas das amostras de proteínas solúveis foram analisadas com o *Kit Protein Assay* (Bio-Rad). O corante (*Dye Reagent Concentrate*) foi diluído (1 parte de corante + 4 partes de água). Em placa de microtitulação foram adicionados a cada poço 2 ou 4 µL de amostra mais o volume de H₂O suficiente para chegar a 10 µL, além de 190 µL de reagente. Em paralelo foi feita uma curva padrão com diluições seriadas de uma solução de albumina sérica bovina (BSA) a 0,5 mg/mL, cobrindo uma faixa de concentração de 1 a 5 µg. Tanto as amostras como a curva de BSA foram dosadas em duplicata. Após incubar por 10 minutos à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em $\lambda = 595$ nm. A partir dos valores de densidade óptica, a determinação da concentração de proteínas nas amostras foi feita utilizando-se a equação da reta gerada a partir da curva de calibração de BSA (anexo 5).

4.19.3 Digestão das proteínas

- Alíquotas da solução de proteínas solúveis correspondentes a 100 µg de proteínas foram retiradas. Nesta etapa foram constituídos os *pools*, reunindo em um mesmo tubo 100 µg de cada replica de cultivo como representativo de uma condição experimental. Assim, soluções contendo 300 µg de proteínas foram precipitadas por adição de 7 volumes de acetona e incubação a -20 °C durante a noite. Após centrifugação (10.000 g, 15 min, 4 °C), o

pellet foi seco à temperatura ambiente por 5 min. Então as proteínas foram solubilizadas em 120 µL de tampão de ressuspensão do kit iTRAQ (TEAB 250 mM; SDS 0,05% (w/v). Em seguida foram realizadas as etapas de redução, desnaturação, bloqueio das cisteínas e digestão das proteínas.

- Desnaturação e redução de proteínas: adicionou-se 6 µL do reagente “Denaturant” do kit iTRAQ (SDS 1%) e 12µL de “Reducing Agent” do kit iTRAQ (tris(2-carboxietilfosfina (TCEP) 5 mM), incubou-se durante 60 minutos a 60 °C.
- Alquilação das cisteínas: adicionou-se 6 µL de “Cystein Bloking Reagent” do kit iTRAQ, (s-metil metanotiosulfonato (MMTS) 10 mM) incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente.
- Digestão das proteínas com tripsina: adicionou-se 10 µL de tripsina (6 µg) (Promega sequencing grade, reconstituída em bicarbonato de amônio 25 mM pH 8, conforme instruções do fabricante), para uma proporção de tripsina: proteína = 1:50 (w/w) e incubou-se durante 20 horas a 37 °C, depois o material foi seco em *Speed-Vac* e congelado a -80 °C.

4.19.4 Purificação de peptídeos para marcação

Com o objetivo de purificar os peptídeos e eliminar os reagentes das etapas anteriores, cada digestão foi passada em uma coluna de fase reversa (Oasis HLB Cartridge, Waters). As amostras foram primeiro acidificadas pela adição de ácido fórmico, na concentração final de 2%. Verificado o pH em torno de 3-4, as amostras foram centrifugadas (12.000 g , 15 min). A coluna foi condicionada com 1 mL de metanol, e equilibrada com 1 mL de H₂O. A amostra foi aplicada na coluna, e esta foi lavada com 1 mL de metanol 5%. Os peptídeos foram eluídos com 1 mL de metanol 100%. O eluato foi seco a vácuo, em *Speed-Vac*.

No intuito de verificar a qualidade das preparações de peptídeos antes da marcação, as amostras foram analisadas em LC-MS/MS no equipamento (Q-TOF ULTIMA – Waters, Co) na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Centro de Ciências de Saúde (UFRJ). Os parâmetros de análise e resultados encontram-se no anexo 7.

4.19.5 Marcação de peptídeos com tags de massa (kit iTRAQ)

As misturas de peptídeos foram ressuspensas em 30 µL de H₂O (Tedia) e o pH foi verificado e acertado para neutro por adição de 6 µL de “Dissolution buffer” do kit iTRAQ.

A marcação foi feita de acordo com as instruções do fabricante do kit iTRAQ (*iTRAQ™ Reagents Methods Development Kit*). Utilizamos os reagentes iTRAQ 114, 115, 116 e 117, sendo os isóbaros: (A) 114 linhagem CCIBt 3194, fase exponencial; (B) 115 linhagem CCIBt 3194, fase exponencial tardia; (C) 116 linhagem CCIBt 3106, fase exponencial e (D) 117 linhagem CCIBt 3106, fase exponencial tardia. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h. Após a marcação, as amostras foram então reunidas em um só tubo.

4.19.6 Purificação dos peptídeos após marcação

Seguiu-se uma etapa de purificação de peptídeos para remover detergentes, utilizando coluna *Pierce® Detergent Removal Spin Columns* (Thermo Cientific, Rockford, IL, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente o pH das amostras foi acidificado para pH 3,0 por adição de 20 volumes de KH₂PO₄ 10 mM /acetonitrila 25% pH 3,0 (tampão de carregamento). A coluna foi condicionada com este mesmo tampão, centrifugando-se a 2000 g por 5 min. A amostra foi aplicada, repetindo-se a etapa de centrifugação. Em seguida foi feita a lavagem adicionando-se 400 µL de tampão de carregamento seguido de centrifugação. Finalmente os peptídeos foram eluídos por adição de 400 µL de KH₂PO₄ 10mM /acetonitrila 25%/ KCl 1 M pH 3,0 e centrifugação.

Com o objetivo de remover os outros reagentes, como *tags* de massa não incorporados e sais, a amostra foi em seguida passada em uma coluna de fase reversa (*Oasis HLB Cartridge*, Waters), como descrito anteriormente. O eluato com os peptídeos foi seco a vácuo, em *Speed-Vac*.

4.19.7 Análise das amostras de peptídeos por LC-MS/MS

A amostra foi ressuspendida em 200 µL de formiato de amônio 5 mM, acetonitrila 5% pH 3,2, misturada em vortex e centrifugada a 12.000 g por 10 min. O sobrenadante foi recuperado e 10 µL desta solução foi injetada em LC-MS/MS. A análise foi feita em sistema 2D-LC-MS/MS no equipamento SYNAPT™ G1 HDMS (Waters) na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Centro de Ciências de Saúde (UFRJ). O instrumento estava acoplado a sistema nanoACQUITY UPLC (Waters). A configuração da cromatografia foi baseada no método de Liu et al. (2006), com algumas modificações. Consistiu em uma cromatografia líquida bidimensional (2D) que inclui uma coluna de troca catiônica forte (SCX) (nanoACQUITY UPLC SCX TRAP, Waters), utilizada para a primeira dimensão, em

conjugação com uma coluna analítica de fase reversa (nanoACQUITY BEH130 C18, Waters).

Uma bomba isocrática (chamada bomba auxiliar, ASM) permitiu que a coluna SCX fosse equilibrada com tampão de carregamento e carregada com 9 μ L de "tampões de sal". As soluções tampões continham tanto sal (formiato de amônio) como solvente orgânico (acetonitrila) em concentrações variadas. As nove frações foram preparadas a partir de uma solução-mãe de formiato de amônio 1 M, pH de 3,2 e acetonitrila de acordo com o seguinte: três tampões de sal (50, 100 e 150 mM de formiato de amônio) contendo 5% de acetonitrila, quatro tampões de formiato de amônio 200 mM, com 5, 10, 20 e 30% de acetonitrila, um tampão de formiato de amônio 350 mM, com 30% de acetonitrila e uma "Solução flush" (formiato de amônio 350 mM, acetonitrila 50%). Após a injeção "tampões de sal" (a uma taxa de fluxo de 5 μ L/min durante 10 minutos), os peptídeos liberados a partir da coluna SCX foram capturados na pré coluna C18. Por sua vez, os peptídeos eluídos da pré coluna foram separados na coluna analítica de fase reversa usando um gradiente linear de 0,1% de ácido fórmico em água (fase móvel A) e 0,1% ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) durante 60 minutos executados pela bomba binária. O gradiente consistiu de 5 minutos em 95% de A e 5% de B, em seguida, 5-25 minutos, 60% de A e 40% de B, 25-30 minutos, 15% de A e 85% de B, 30-40 minutos, 15% de A e 85% de B, 40- 42,5 minutos, 95 de A e 5% de B, seguido por reequilíbrio da coluna (95% de A e 5% de B) de 42,5-60 minutos a uma taxa de fluxo de 300 nL/min.

A mistura de peptídeos foi injetada e analisada quatro vezes, compondo as réplicas técnicas.

Os espectros de massas foram adquiridos em íon positivo TOF V-mode. O analisador TOF foi calibrado com os íons fragmentos de MS/MS [GLU1]-fibrinopeptídeo B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (GFP, 100 fmol/ μ L em 50:50:1, metanol: H₂O: ácido acético) de 50 a 2000 m/z. O íon precursor GFP m/z 785.8426 com dupla carga foi utilizado como correção de massa de bloqueio para medições precisas de aquisição de pós MS. Durante cada corrida LCMS/MS, o pulverizador de referência (GFP) foi injetado uma vez a cada 30 segundos e obtido durante 1 segundo.

Foi utilizada aquisição de DDA "*Data Dependent Acquisition*". O capilar e cone tensão foram fixados em 3000 e 35 V, respectivamente. O tempo de varredura foi fixado em 1 segundo e o intervalo de varredura de pesquisa de MS foi 300-2000 Da. A pesquisa mudou

para aquisição MS/MS quando a intensidade do íon precursor chegou a 20 contagens por segundo. O número máximo de íons precursores selecionados para a fragmentação (MS/MS) foi três íons de carga 2, 3 ou 4, detectados a partir de uma varredura única de MS. O MS/MS foi obtido a uma taxa de varredura de 1 segundo, adquiridos ao longo da faixa de 50 a 2000Da. A energia de colisão foi elevada de acordo com a m/z e estado de carga iônica do precursor, controlada pelos arquivos de reconhecimento de estado de carga. A aquisição MS/MS voltou para o modo MS quando a intensidade de pico caiu abaixo de 4 contagens por segundo ou depois que três segundos se passaram.

O controle do equipamento, a aquisição e análise de dados, visualização dos espectros de massa e armazenamento dos dados foram feitas através do software *MassLynx* (Waters).

4.19.8 Processamento de dados e identificação de proteínas

Os espectros MS/MS armazenados em arquivos .raw, gerados pelo programa *MassLynx* (Waters), foram convertidos a formato .MGF. Em seguida foram processados utilizando o programa *Mascot Distiller* versão 2.3.2.0, (Matrix Science), no LNBbio, CNPEM, Campinas, SP. Foram usados como parâmetros, falha na clivagem por tripsina, 1; modificação fixa, carbamidometilação de cisteína; modificação variável, oxidação de metionina. Quantificação iTRAQ 8 plex. Para busca foi usado o banco de dados não redundante do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI nr 08/2013. As identificações de proteínas foram estabelecidas pela detecção de peptídeos únicos e valor de $p < 0.05$.

4.19.9 Análise Quantitativa

A quantificação relativa de proteínas foi obtida utilizando o programa *Mascot Distiller* versão 2.3.2.0, (Matrix Science). Foram registradas as razões entre os marcadores 114:116 e 115:117 (comparação entre as linhagens, fase exponencial e exponencial tardia, respectivamente) e 114:115 e 116:117 (comparação entre fases de crescimento para cada uma das linhagens, respectivamente).

Estes dados foram gerados para cada réplica de dados obtidos (cada injeção) na análise de MS/MS. Foram então exportados para *Microsoft Office Excel*. Foram consideradas para análise aquelas proteínas identificadas em, no mínimo, 3 das 4 réplicas. Estas foram reunidas em uma única planilha, o que gerou a lista de todas as proteínas identificadas.

Em seguida, foram agrupadas todas as identificações referentes a uma mesma proteína, que às vezes ocorriam com denominações diferentes ou número de acesso diferentes por serem originadas de espécies de cianobactérias diferentes ou de linhagens de *Microcystis* diferentes (já que se usou o banco de dados geral do NCBI).

A partir deste ponto foram analisadas separadamente as comparações: 114:116, 115:117, 114:115 e 116:117.

Em cada caso, para cada grupo de identificações referente a uma mesma proteína foi calculada a média entre os valores de expressão diferencial (*fold change*) gerados por cada peptídeo. Foram então mantidas apenas as proteínas cujos peptídeos apresentavam a mesma tendência de expressão diferencial, isto é, todos mais expressos em uma condição do que na outra. A partir da média dos valores de expressão diferencial deste conjunto de peptídeos, foi determinado o valor de expressão diferencial da proteína correspondente. Apenas foram consideradas proteínas cujas mudanças de expressão tinham com valores maiores que 1,2 ou menores que 0,8.

As proteínas diferencialmente expressas foram classificadas por categoria funcional de acordo com informações do banco de dados Uniprot.

4.19.10 Análise no ProteinLynx Global Server

Alternativamente os dados foram processados usando o software ProteinLynx Global Server (PLGS 2.2.5, Waters) com as seguintes definições. Mass accuracy / electrospray survey - lock spray calibration: GFP; 10 lock spray scans; 0,3 Da lock mass tolerance. Mass accuracy / MSMS – no lock spray calibration. Noise reduction/ electrospray survey: adaptive background subtract type. Noise reduction// MSMS: none. Deisotoping and centroiding / electrospray survey and MSMS: perform deisotoping; medium deisotoping type, automatic thresholds.

A busca foi realizada em um banco de dados restrito ao gênero *Microcystis* obtido de UniProt (em 12/11/2013, com 77544 entradas). A busca foi realizada com os seguintes parâmetros: tolerância para peptídeos 100 ppm, para fragmentos 0,1 Da; erro de calibração estimado 0,005 Da; faixa de peso molecular 0 a 800000 Da; faixa de pI de 0 a 14; mínimo de peptídeos 1; clivagens de tripsina perdidas 1; modificações fixas: isobaric iTRAQ

114,115,116,117 N -term, modificações variáveis: oxidação de metionina, carbamil N-term, metiltio C, isobaric iTRAQ 114,115,116,117 em lisina e tirosina.

A análise de expressão diferencial foi feita usando o módulo Expression Analysis 2.0 e foram aproveitados os hits com score > que 9,0. Estes dados foram exportados para *Microsoft Excel*, incluindo as 4 réplicas de injeção de MS/MS. Foram mantidas aquelas proteínas presentes em pelo menos 3 das 4 réplicas. Em seguida foram eliminadas as redundâncias. Para quantificação, foram consideradas apenas aquelas proteínas em que todas as 3 ou 4 réplicas apresentavam a mesma tendência de aumento ou diminuição na comparação entre dois marcadores. Foram considerados para definição do *fold change*, apenas quantificações relativas com valores de $p > 0,1$. A designação de função foi feita com base no Uniprot e *Cyanobase*.

4.20 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o teste-t para amostras independentes, módulo “Basic Statistics/Tables” (Callegari-Jacques, 2003). As características métricas foram descritas estatisticamente através do cálculo de média aritmética e desvio padrão como medidas de tendência central e grau de dispersão absoluta dos dados, respectivamente. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Komolgorov-Smirnov (Zar, 1999), submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator e quando esta análise apresentou variação significativa ($p < 0,05$) foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 5.0). Para análise da variabilidade dos parâmetros estudados nas diferentes fases de crescimento das linhagens CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica) foi realizada análise de componentes principais (ACP). Utilizou-se para os parâmetros estudados a transformação “ranging” $[(x - x_{min}) / (X_{max} - X_{min})]$ e matriz de covariância. Os dados foram analisados mediante análises estatísticas multivariadas através do Programa PC-ORD versão 6.0 para Windows (McCune & Mefford, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção das linhagens tóxica x não tóxica

O presente estudo foi realizado com duas linhagens de *Microcystis aeruginosa*, sendo uma tóxica e outra não tóxica: CCIBt3106 foi a única que não produziu microcistinas, por isto foi selecionada como representante da linhagem não tóxica. A linhagem tóxica selecionada foi a CCIBt3194, pois apresentou todos os requisitos de desenvolvimento e toxicidade (figuras 9 - 13 e anexos 1 e 3). Esta linhagem produziu microcistinas RR, LR e YR, as proporções relativas observadas foram as seguintes: 1: 0,20: 0,14, respectivamente (resultados da análise de microcistinas por LC-MS/MS estão apresentados no anexo 3).

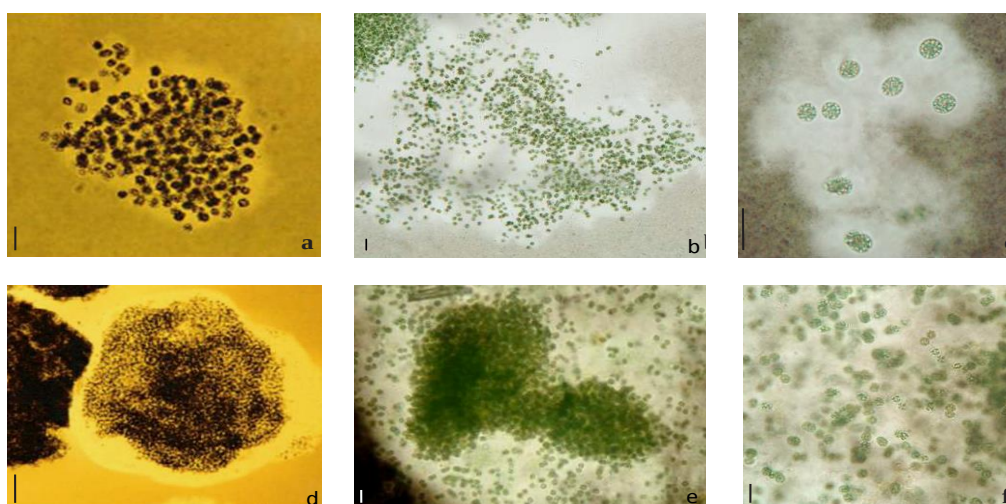


Figura 9. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica): a- Material da natureza (Honda 2003), b- Aspecto geral da colônia (cultura), c - Detalhe da célula (cultura); CCIBt3194 (tóxica): d- Material da natureza (Honda 2003), e- Aspecto geral da colônia (cultura) e f - Detalhe da célula (cultura). Escalas 10µm. Exceto figura d= 50 µm.

Em geral, cepas não tóxicas não contêm genes *mcy* (Neilan et al., 1999; Tillett et al., 2001). Para confirmar a não toxicidade da linhagem CCIBt3106 foi testada a amplificação de fragmentos gênicos envolvidos na biossíntese de microcistinas, *mcyD*, *mcyE* e *mcyG*. Na revelação do gel de agarose, apesar de terem sido observadas diferentes bandas na amplificação dos genes *mcyE* e *mcyG* (figura 10, coluna número 3), seu sequenciamento provou que não estavam relacionados com os genes da biossíntese de microcistinas. Portanto,

comprovamos que a linhagem não tóxica não apresentava os genes envolvidos na síntese de microcistinas.

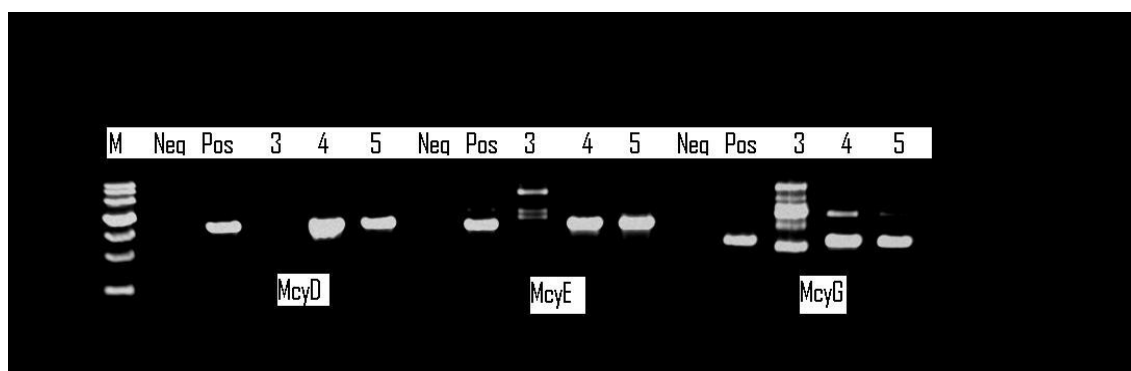


Figura 10. Produtos de amplificação dos genes *mcyD*, *mcyG* e *mcyE*. M= marcador molecular; Neg= controle negativo; Pos= Controle positivo; 3. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106; 4. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3194 e 5. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3454.

5.2 Análise filogenética

O sequenciamento do gene 16S RNAr foi realizado para confirmar a identificação das linhagens CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt3194 (tóxica). Com base na análise filogenética deste gene (figura 11), as linhagens CCIBt3106 e CCIBt3194 formaram um clado com outras sequências de *Microcystis* disponíveis no GenBank, corroborando as análises morfológicas. O clado apresentou alto suporte filogenético a partir dos métodos evolutivos empregados: 100% NJ, 100% ML e 0,9 de probabilidade posterior. A similaridade entre as espécies deste clado foi acima de 99%. Deste modo, ambas as linhagens estudadas pertencem ao gênero *Microcystis* e estão próximas a outras linhagens de *M. aeruginosa*.

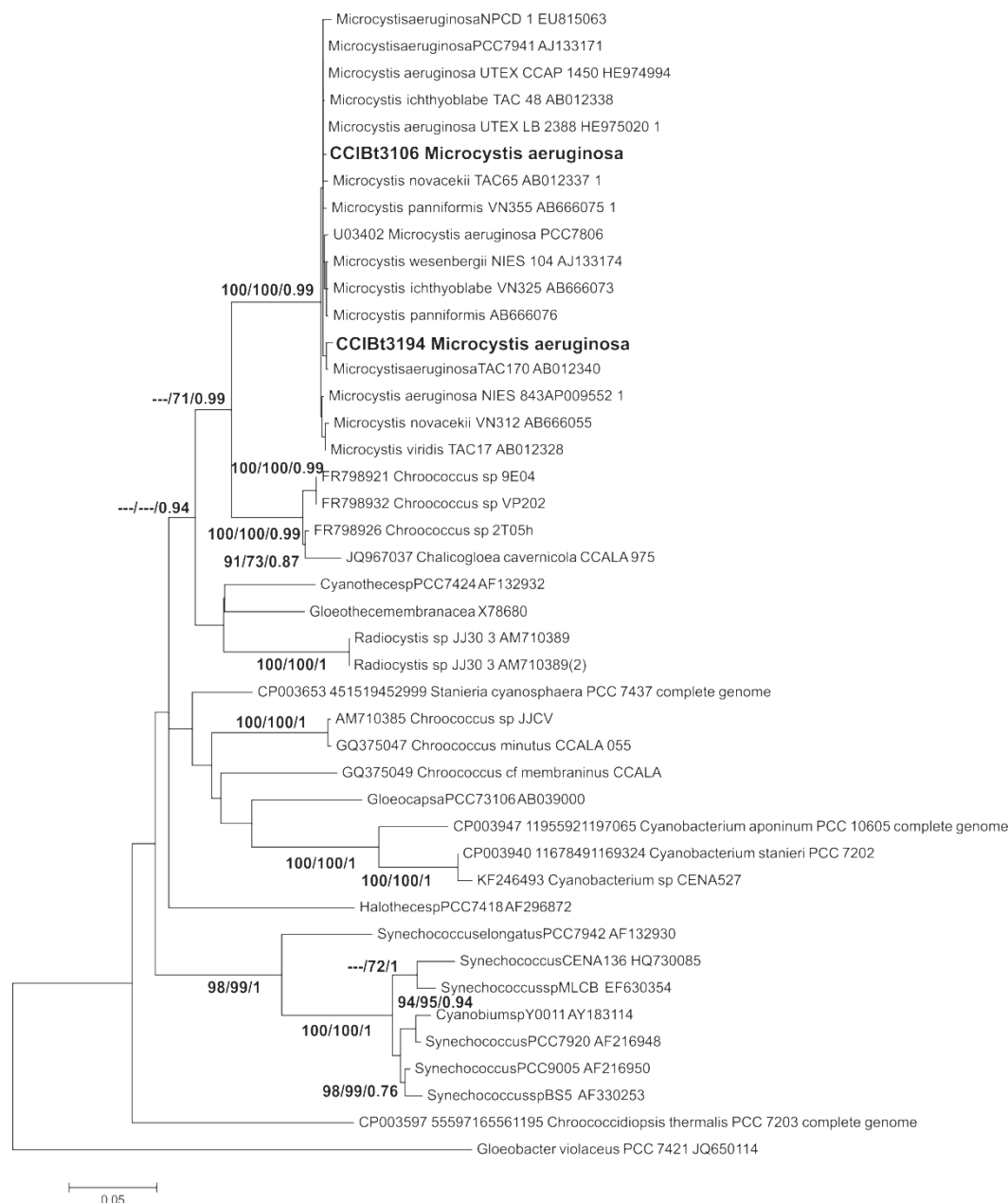


Figura 11. Análise filogenética de sequências do gene RNAr 16S pelo método de Máxima Verossimilhança (TrN+I+G,1000x). As sequências geradas neste estudo estão em negrito. Valores de reamostragem acima de 70% para os métodos Neighbor-Joining, Máxima Verossimilhança e 0.7% de probabilidade posterior estão representados em cada nó.

5.3 Curva de crescimento

As curvas de crescimento das linhagens de *M. aeruginosa* CCIBt 3194 e CCIt3106 foram determinadas por número de células e por biovolume (ambas em triplicata) e serviram de base para a escolha da linhagem tóxica, detalhes destes resultados estão apresentados no anexo 4. Como ambas as curvas apresentaram resultados semelhantes, apresentaremos os dados em número de células (figura 12).

O crescimento das duas linhagens selecionadas, CCIBt 3106 (não tóxica) e CCIBt 3194 (tóxica), foi muito semelhante, o que facilita a interpretação e comparação dos demais resultados. As linhagens não diferenciaram quanto a taxa de crescimento exponencial, entretanto a linhagem tóxica apresentou maior rendimento celular (figuras 12, tabela 5). Além disso, a linhagem não tóxica apresentou maior densidade celular, em relação à linhagem tóxica nos dias 5- 9 e 11, fase exponencial de crescimento. Na fase exponencial tardia (a partir do 12º dia), a situação inverteu-se e a linhagem tóxica apresentou maior densidade, sendo as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens (figura 12, tabela 5).

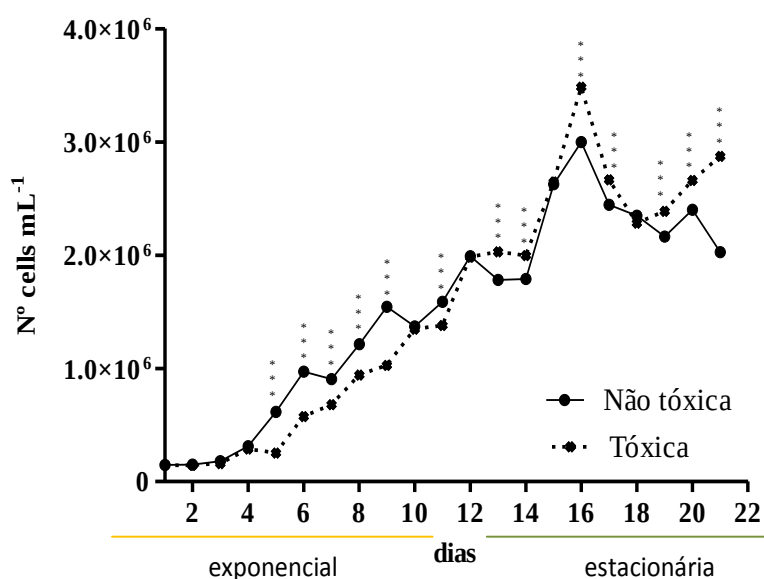


Figura 12. Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* CCIBt 3194 (linhagem tóxica) e CCIBt3106 (linhagem não tóxica), construída com o número de células.mL⁻¹. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). As diferenças estatísticas são reportadas; *** Teste de Tukey, p <0,001, comparação entre as diferentes linhagens.

Tabela 5. Parâmetros de crescimento das linhagens CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica)

Linhagem CCIBt	Duração da fase exponencial (dia)	Regressão exponencial (R ²)	Taxa de crescimento exponencial ^a (μ dia ⁻¹)	Tempo de duplicação (fase exponencial ^a , dias)	Rendimento celular máximo (R, células mL ⁻¹)
3194	12	0.91	0.26 ± 0.00096	3.04 ± 0.013	3.483.000± 68
3106	12	0.95	0.26 ± 0.0028	2,67 ± 0,029	2.998.000± 106***

^aOs dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). As diferenças estatísticas são reportadas: ** teste t, p<0.01; *** teste t, p<0.001, comparação entre as diferentes linhagens.

5.4 Estudo morfométrico

A linhagem tóxica apresentou colônias de 150µm a 800µm de diâmetro na fase exponencial e de 400µm a 1.850µm de diâmetro na fase exponencial tardia de crescimento. As células permaneceram densamente distribuídas em toda a mucilagem colonial nos dois tempos amostrais (figura 13C, D). Por outro lado, a linhagem não tóxica na fase exponencial exibiu pequenas colônias (< 100µm) com no máximo 4 células (figura 13A). Na fase exponencial tardia, as colônias continuaram pequenas (< 100µm) e atingiram um número máximo de 20 células, sendo a média $7,5 \pm (4,1)$ células por colônia (figura 13B). As células encontravam-se sempre dispersas na mucilagem (figura 13B). A bainha mucilagínosa manteve-se ampla nas diferentes fases de crescimento (figura 13A, B).

A formação de colônias é uma característica comum em *Microcystis* e o seu tamanho pode variar de poucas a centenas de células (Reynolds et al., 1981; Šejnohová, 2008). Além do mais, algumas características morfológicas podem mudar com o tempo de cultivo, como desagregação celular, perda de aerótopos e mucilagem (Lange, 1976; Krüger & Eloff, 1977; Rippka, 1979; Krüger et al., 1981; Reynolds et al., 1981; Otsuka et al., 2000; Day et al., 2005; Zhang et al., 2007). Entretanto, as linhagens mantiveram as características morfológicas típicas da espécie durante todo o estudo (figura 9).

Diversos trabalhos têm reportado que o tamanho da colônia está diretamente relacionado com a concentração de microcistinas extracelulares, assim essas toxinas atuam tanto na formação das colônias quanto na sua especificidade (Minillo et al., 2000; Kurmayer et al., 2003; Kehr et al., 2006; Sedmak & Elersek, 2006; Zilliges et al., 2008; Gan et al., 2012). A produção de microcistinas afeta a expressão das proteínas extracelulares envolvidas no contato célula-célula (Kehr et al., 2006; Zilliges et al., 2008).

Assim, linhagens tóxicas apresentariam células agregadas com distribuição homogênea na colônia. Enquanto linhagens não tóxicas, devido à deficiência na expressão das proteínas extracelulares, apresentariam células dispersas na mucilagem. Desta forma, nossos dados corroboram o fato de que linhagens tóxicas produzem principalmente colônias grandes e células agregadas, o que já foi constatado também por Kurmayer et al. (2003), Sedmak & Elersek (2006) e Gan et al. (2012) e linhagens não tóxicas, apresentam colônias com células dispersas na mucilagem.

Outra característica morfológica marcante que diferenciou as linhagens estudadas foi o tamanho da bainha mucilagínosa. Os polissacarídeos são os principais componentes da

mucilagem de *M. aeruginosa* (Plude et al., 1991). A composição elementar (C, H, O) das secreções envolve baixo custo para as células (Margalef, 1997). A densidade média da mucilagem de *Microcystis* é tipicamente equivalente à densidade da água que elas habitam (diferença de 0,07%) (Reynolds et al., 1981).

A presença da mucilagem é um importante critério taxonômico, portanto vários artigos descrevem sua morfologia. Contudo, são pouquíssimos os trabalhos que consideram as funções e os benefícios que a mucilagem pode fornecer a espécie (Reynolds, 2007). Mesmo assim, algumas funções foram propostas: 1) a bainha mucilagínosa poderia fornecer um micro ambiente especializado em torno das células, no qual nutrientes essenciais são concentrados e mantidos (Lange, 1976; apud Reynolds et al., 1981); 2) a bainha poderia ser um local para concentrar os carboidratos não utilizados (Margalef, 1997); 3) a bainha poderia ser utilizada como defesa contra o oxigênio. Sirenko (1972) demonstrou que um microambiente de baixo redox é mantido no interior da mucilagem de diversas espécies de cianobactérias, fato atribuído à produção e a manutenção de radicais de sulfidríla. Estes radicais ajudam a proteger as células contra processos oxidativos e a tolerar elevadas concentrações de oxigênio externo (Gusev, 1962; Sirenko et al., 1969; Sirenko, 1972; apud Reynolds, 2007); 4) a bainha poderia regular a flutuabilidade: quanto maior a colônia, maior a superfície de contato, o que proporciona maior flutuabilidade (Reynolds & Walsby, 1975); 5) ao mesmo tempo, colônias grandes e a presença de mucilagem ofereceriam proteção contra a predação, diminuindo significativamente as taxas de herbivoria, sendo este quesito mais uma consequência (Gliwicz, 2003).

De acordo com Reynolds (2007), a ideia de que a mucilagem pode ser um repositório para a concentração e armazenamento de nutrientes essenciais é antiga e foi mencionada formalmente apenas por Lange (1976). Ainda segundo Reynolds (2007), concentrações intracelulares de nitrogênio, fósforo e mesmo carbono são da ordem de um milhão de vezes maiores do que nos lagos e mares, e armazenar nutrientes extracelulares parece ser uma atividade de alto risco para célula. Portanto, o autor não considera viável esta hipótese. Outra observação é que a produção de mucilagem ocorre principalmente em ambientes deficientes em nutrientes, ao longo de vários dias e em águas rasas, o que implica uma resposta à exposição a altos níveis de irradiância (Margalef, 1997). As linhagens neste estudo mantiveram as mesmas características ao longo do crescimento (figura 13). Além disso, principalmente a linhagem não tóxica, apresentou ampla bainha mucilagínosa no início da fase exponencial de crescimento, quando os nutrientes no meio não eram limitantes.

Como visto, não há uma explicação única e inequívoca para a função da mucilagem e nem todas as funções que foram sugeridas podem ser consideradas viáveis (Reynolds, 2007). Para este autor, duas funções são de fato prováveis para a bainha de mucilagem: flutuabilidade e proteção contra processos oxidativos. O papel da bainha na flutuabilidade é provável para colônias maiores do que 100 μm , já que para as menores, a mucilagem não seria suficiente para aumentar a sua taxa de flutuabilidade.

No presente estudo, parece mais provável que a bainha tenha tido um papel na proteção contra processos oxidativos, já que ambas as linhagens produziram ampla bainha mucilaginosa. No entanto, a grande diferença entre as linhagens foi o número de células por colônia e o tamanho das colônias, que foi muito maior na linhagem tóxica. Neste caso, a flutuabilidade promovida pela bainha parece ter sido importante para a manutenção das grandes colônias tóxicas ($> 100\mu\text{m}$) na superfície. Esta flutuabilidade das colônias tóxicas foi nitidamente observada nos frascos de cultivo. Ao contrario, as colônias não tóxicas ($< 100\mu\text{m}$) permaneceram sempre distribuídas no meio ou no fundo dos frascos.

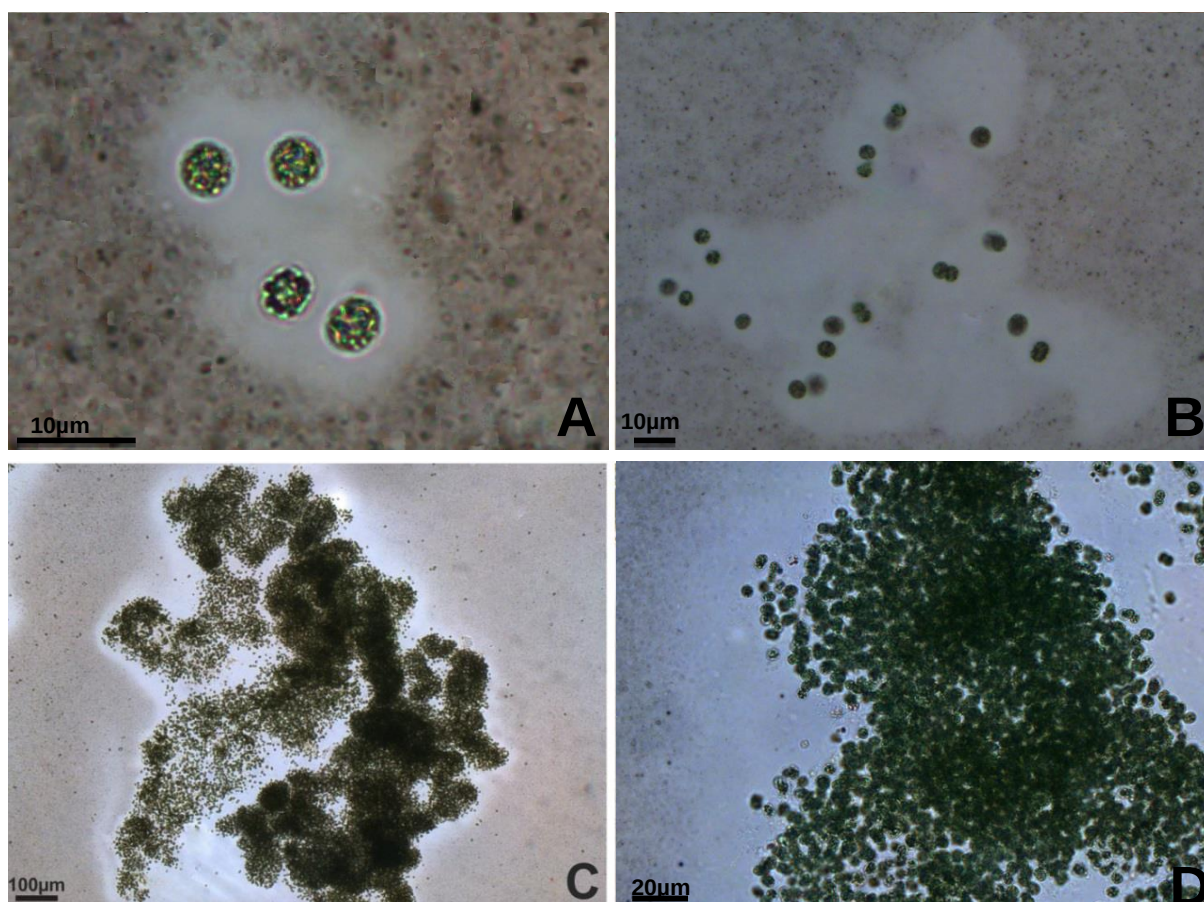


Figura 13. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica): A. Fase exponencial, aspecto geral das colônias; B. Fase exponencial tardia, detalhe das células distribuídas em ampla bainha mucilaginosa. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica): C. Fase exponencial, aspecto geral das colônias; D. Fase exponencial tardia, aspecto geral da colônia com as células agregadas.

Além da mudança na morfologia das colônias, a linhagem não tóxica apresentou diâmetros celulares estatisticamente maiores quando comparada com a linhagem tóxica, nos dias 5, 15, 17 e 18 do cultivo (figura 14).

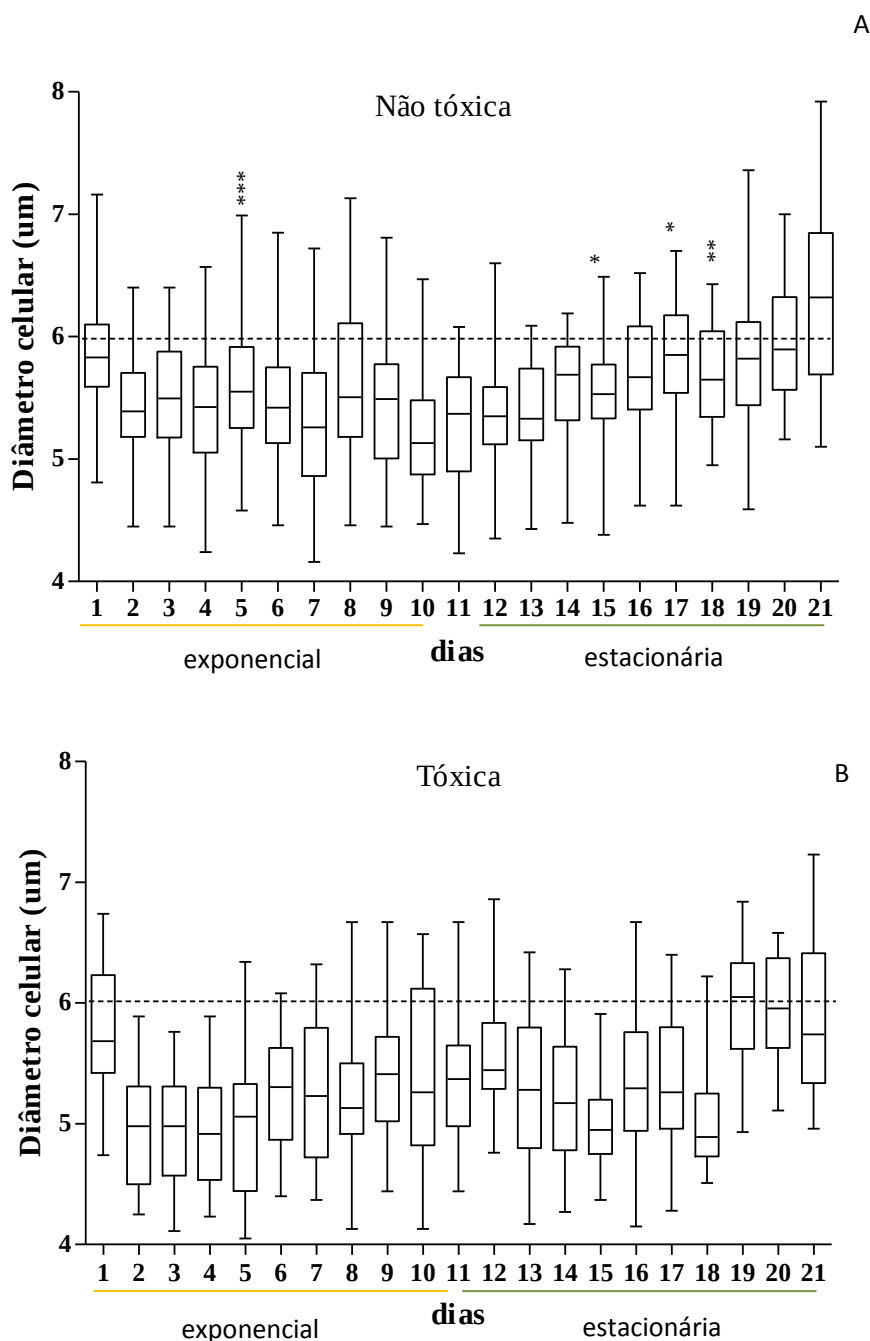


Figura 14. Variação dos diâmetros celulares (μm) das linhagens de *M. aeruginosa*. A. CCIBt 3106 (não tóxica); B. CCIBt3194 (tóxica). Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – “Whisker Box-Plot” ($n=30$). As diferenças estatísticas são reportadas segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$, comparação entre as diferentes linhagens

De acordo com os relatos da literatura, linhagens não tóxicas possuem maiores diâmetros celulares (Rohrlack et al., 2001; Kurmayer et al., 2002; Kurmayer et al., 2003; Via-Ordorika et al., 2004). Watanabe et al. (1991) classificaram linhagens de *M. aeruginosa* em dois grupos, com base na análise estatística dos diâmetros celulares, ou seja, tamanho de célula pequena (S) e tamanho de célula grande (L).

Segundo os autores, estes dois grupos também podem ser reorganizados pela sua composição de microcistinas. As cepas que pertencentes ao grupo L continham microcistinas-RR, YR e LR, enquanto a maioria das cepas do grupo S não era tóxica. No entanto, uma cepa altamente tóxica, que produziu microcistina-LR em quantidade de mais de 1% do seu peso seco, também pertenceu ao grupo S. Portanto, ainda não se pode alegar que existe relação direta entre o aumento do diâmetro celular e a produção de microcistinas.

Além disso, avaliando todo o período de cultivo estudado, as linhagens (produtora e não produtora de microcistinas) mantiveram o mesmo comportamento geral na distribuição do diâmetro celular (figura 14). Deste modo, a diferença encontrada entre as linhagens em relação ao diâmetro celular não pode ser atribuída ao conteúdo de microcistinas.

5.5 Estudo de ultraestrutura

Dentre as 192 imagens obtidas para análise no presente trabalho, são apresentadas 24 eletromicrografias selecionadas. As células coletadas nas diferentes fases de crescimento mostraram típica organização de uma célula de *Microcystis*. Como visto nas figuras 15-18, tanto a linhagem de *M. aeruginosa* não tóxica CCIBt3106, quanto a tóxica CCIBt3194 apresentaram as seguintes estruturas: 1. Parede celular (seta), 2. Tilacóides (T), 3. Aerótopos (A), 4. Amido das cianofíceas (AC), 5. Grânulo de Cianoficina (GC), 6. Grânulo de Polifosfato (GP) 7. Carboxissomo (CB) e 8. Inclusão lipídica (IL).

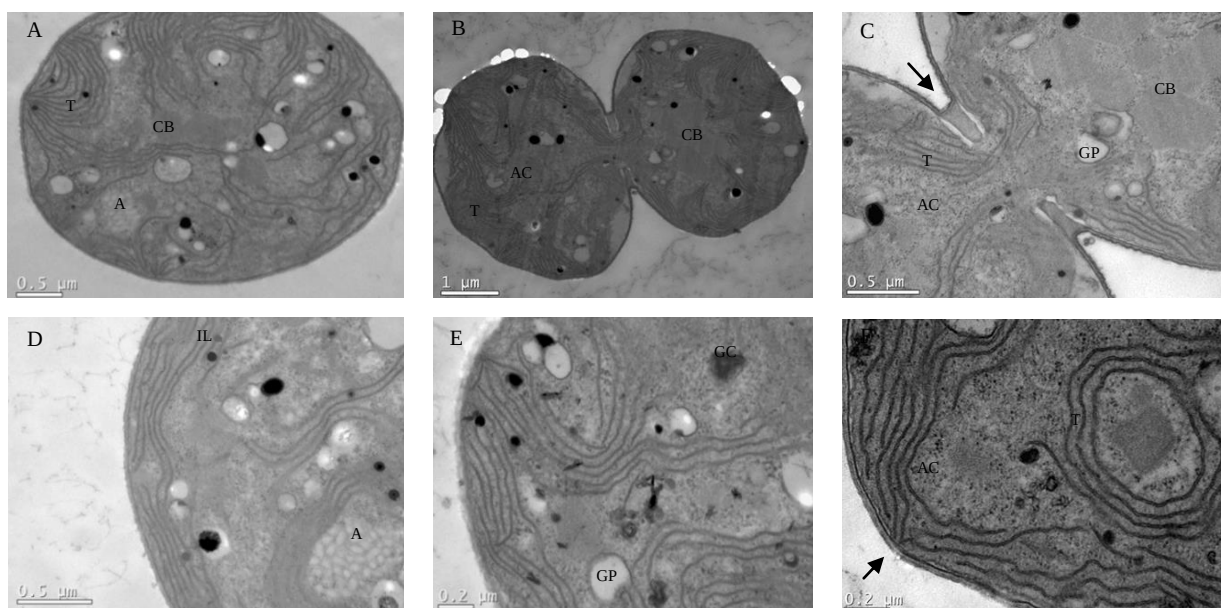


Figura 15. Micrografia eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3106 *Microcystis aeruginosa* (não tóxica), fase exponencial de crescimento (n=3). A) Aspecto geral da célula com tilacóides; B) Aspecto geral da célula em divisão; C) Detalhe da invaginação para divisão celular (seta); D) Detalhe dos aerótopos; E) Detalhe dos grânulos de polifosfato; F) Detalhe da organização dos tilacóides e da parede celular (seta). T. Tilacóides, GC. Grânulo de Cianoficina, A. Aerótopos, GP. Grânulo de Polifosfato, AC. Amido das cianofíceas, CB. Carboxissomo, IL. Inclusão lipídica.

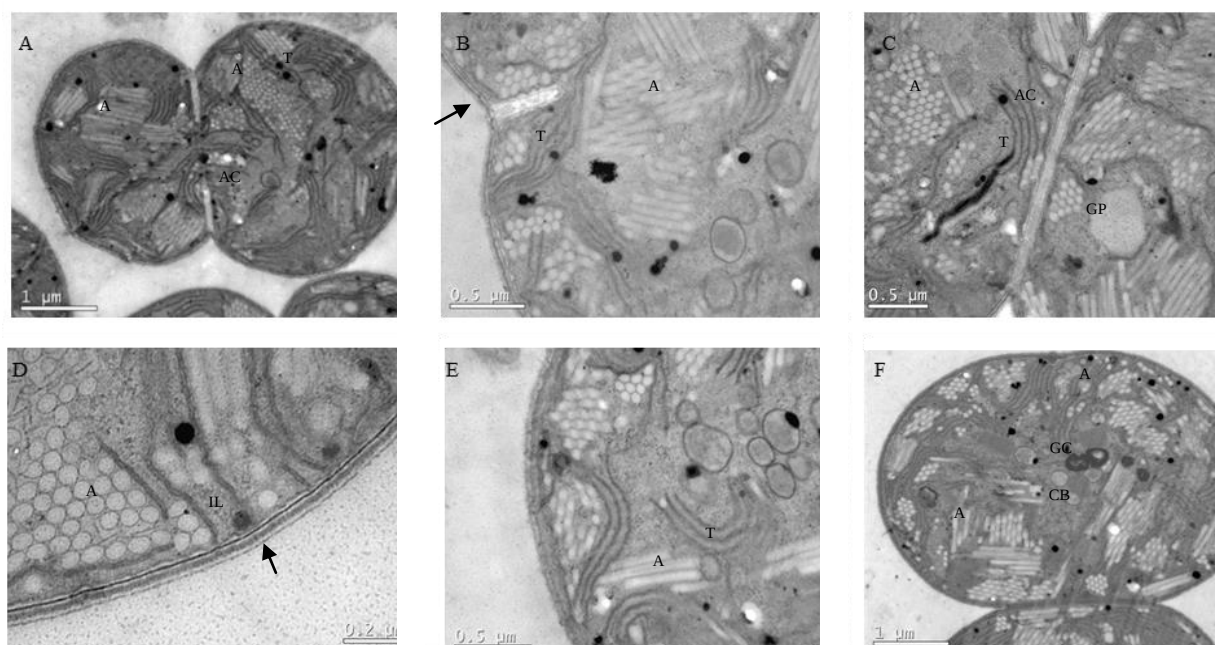


Figura 16. Micrografia eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3194 *Microcystis aeruginosa* (tóxica), fase exponencial de crescimento (n=3). A) Aspecto geral da célula com tilacóides e aerótopos; B) Detalhe da invaginação para divisão celular (seta); C) Detalhe da divisão celular; D) Detalhe da parede celular (seta); E) Detalhe da organização dos tilacóides; F) Detalhe dos aerótopos. T. Tilacóides, GC. Grânulo de Cianoficina, A. Aerótopos, GP. Grânulo de Polifosfato, AC. Amido das cianofíceas, CB. Carboxissomo, IL. Inclusão lipídica.

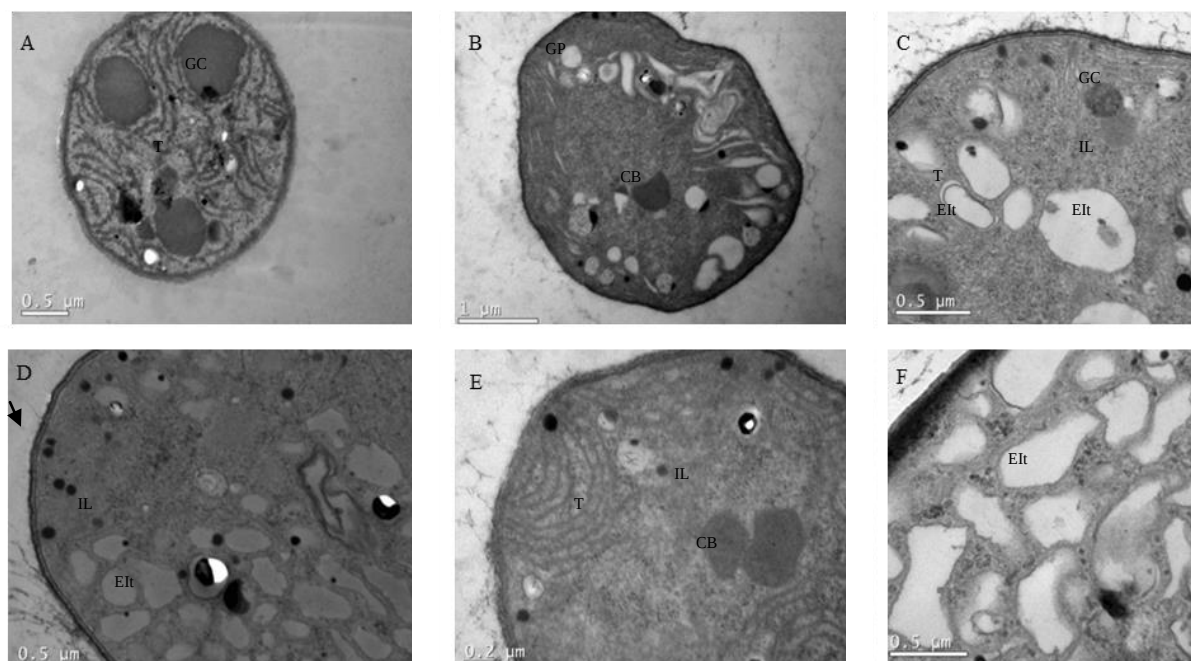


Figura 17. Micrografia Eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3106 *Microcystis aeruginosa* (não tóxica), fase exponencial tardia de crescimento (n=3). A) Aspecto geral da célula com tilacóides proeminentes e grânulos de cianoficinas; B) Aspecto geral da célula com tilacóides vesiculados; C) Detalhes do grânulo de cianoficina e vesiculação dos tilacóides; D) Detalhes da parede celular e tilacóides alongados; E) Detalhes do arranjo dos tilacóides (padrões) e caboxissomos; F) Detalhe dos espaços intra - tilacóides. T. Tilacóides, GC. Grânulo de Cianoficina, GP. Grânulo de Polifosfato, CB. Carboxissomo, IL. Inclusão lipídica, Elt. Espaço intra-tilacóide

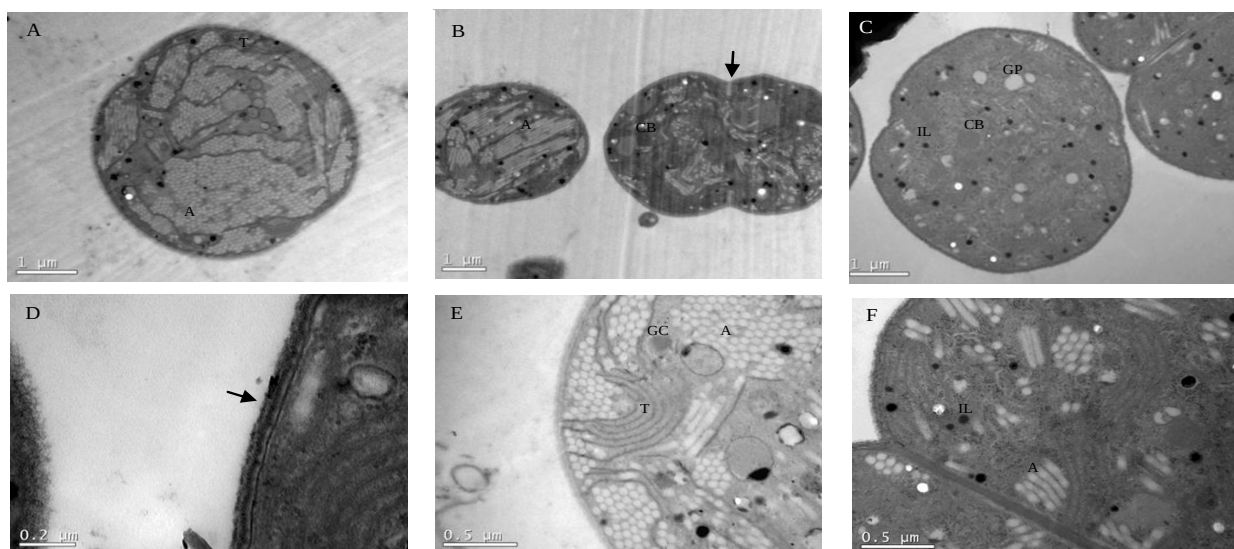


Figura 18. Micrografia eletrônica de transmissão da linhagem CCIBt3194 *Microcystis aeruginosa* (tóxica), fase exponencial tardia de crescimento (n=3). A) Aspecto geral da célula com tilacóides; B) Invaginação para divisão celular (seta); C) Aspecto geral da célula sem tilacóides visíveis; D) Detalhe da parede celular (seta); E) Detalhe do arranjo dos tilacóides; F) Detalhe dos aerótopos. T. Tilacóides, GC. Grânulo de Cianoficina, A. Aerótopos, GP. Grânulo de Polifosfato, AC. Amido das Cianofíceas, CB. Carboxissomo, IL. Inclusão lipídica.

A análise ultraestrutural mostrou mudanças significativas entre as linhagens estudadas e entre as diferentes fases de crescimento. Diversas estruturas nas células de *Microcystis* podem mudar durante as fases de crescimento (Reynolds et al., 1981). A espessura da parede celular foi maior na linhagem tóxica quando comparada com a linhagem não tóxica, nas duas fases de crescimento (figuras 15F e 16D; 17D e 18D). Em ambas as linhagens a parede celular estava organizada por um envoltório constituído por três camadas: uma membrana mais interna (membrana citoplasmática), uma intermediária (parede celular, camada rígida composta do peptidoglicano mureína), e uma membrana externa (lipopolissacarídeos). Este tipo de disposição é típico de cianobactérias e bactérias gram-negativas (Allen, 1968).

Estudos sobre alterações na ultraestrutura de células de cianobactérias são escassos e antigos (Jost & Zehnder, 1966; Smith & Peat, 1967; Jones & Jost, 1970; Golecki & Drews, 1974; Vasconcelos & Fay, 1974; Miller & Holt, 1977; Kessel, 1978; Sherman & Sherman, 1983; Stevens et al., 1985; Wanner et al., 1986; Ariño et al., 1995). A morfologia e ultraestrutura de *Microcystis* foram estudadas em detalhe por Reynolds et al. (1981). Um estudo compilado mais recente é uma monografia que resume um conjunto considerável de resultados das análises ultra-estruturais das cianobactérias *Synechococcus* sp., *Anabaena variabilis*, *Chlorogloopsis fritschii* e *Nostoc* sp. mas, mesmo neste caso, boa parte das referências datam do período entre 1960-1980 (Baulina, 2012).

Em relação à organização celular, o volume dos grânulos de cianoficinas, os aerótopos e a disposição dos tilacóides foram os que mais contribuíram para a distinção entre as linhagens e entre as diferentes fases de crescimento. Durante prolongada limitação nutricional, as estruturas intracelulares mudam consideravelmente, as mudanças mais prováveis são a degradação das membranas intracelulares do aparato fotossintético, os tilacóides, e o acúmulo de inclusões celulares (Schwarz & Forchhammer, 2005; Dagnino et al., 2006).

Os **carboxissomos** estavam localizados na região central das células, em ambas as linhagens e fases de crescimento (figuras 15A, 16F; 17E e 18C). Estas estruturas foram observadas isoladas ou em grupos e estão ligadas ao processo de fixação do carbono durante a fotossíntese (Badger & Price, 2003). Os carboxissomos foram mais numerosos na linhagem não tóxica indicando, o que parece indicar maior ênfase desta linhagem na fixação de CO₂.

Os **grânulos de polifosfato** estavam presentes em ambas as linhagens, principalmente na fase exponencial de crescimento. Estes grânulos têm a função de reserva de fosfato

inorgânico (PO_4^{2-}) e são degradados e utilizados como fontes de fosfato na biossíntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos, ou servem como fonte de energia para a síntese de ATP (Allen, 1984).

Os **grânulos de cianoficinas** foram abundantemente encontrados na linhagem não tóxica, principalmente na fase exponencial tardia de crescimento (figura 17A). Esses grânulos são exclusivos de cianobactérias (Lawry & Simon, 1982) e são acumulados quando as células estão sob limitação de luz (Allen et al., 1980; van Eykelenburg, 1980), de fósforo (Allen et al., 1980; Stevens et al., 1981; Lawry & Simon, 1982), de enxofre (Allen et al., 1980; Lawry & Simon, 1982) ou quando as células são cultivadas em baixa temperatura (van Eykelenburg, 1979). Estes grânulos formados por aminoácidos como ácido aspártico e arginina e que são componentes essenciais na síntese de aerótopos, durante a privação de nitrogênio são os primeiros a serem degradados (Whitton & Potts, 2000).

O citoplasma da linhagem tóxica foi caracterizado por número acentuado de **aerótopos**, em ambas as fases de crescimento (figuras 16A e 18A). No entanto, a linhagem não tóxica apresentou raríssimos aerótopos (figuras 15D). Mesmo em cultura, células de *Microcystis* contêm muitos aerótopos (Jost & Zehnder, 1966; Smith & Peat, 1967; Jones & Jost, 1970; Avakyan & Baulina, 1972). Estas estruturas proporcionam flutuabilidade às células e por serem visivelmente brilhantes, de qualidade refringente e aparência avermelhada, podem estar envolvidas na proteção das cianobactérias contra a ação prejudicial de alta intensidade de luz, o que provoca a decomposição celular fotooxidativa (Walsby, 1972). No entanto, esta afirmação está ainda aberta à discussão (Baulina, 2012).

Neste estudo, encontramos correlação negativa entre a síntese de aerótopos e o volume dos grânulos de cianoficinas. Esta mesma correlação foi observada por Šejnohová (2008) em *Microcystis* bentônicas. Deste modo, o fato da linhagem não tóxica não possuir aerótopos na fase exponencial tardia de crescimento não está relacionado à limitação de nitrogênio na célula.

Outra forma de estocar nitrogênio nas cianobactérias que não fixam nitrogênio é através dos **ficobilissomos** (Li et al., 2001; Sloth et al., 2006). Os ficobilissomos são moléculas complexas nos quais estão organizadas as ficobiliproteínas, estas estruturas são encontradas nos tilacóides (Abalde et al., 1998; Sun et al., 2006). O principal papel biológico das ficobiliproteínas é o de receptores de luz durante o processo fotossintético, mas em condição de limitação de nitrogênio elas atuam como reserva de nitrogênio. Células sem

ficobiliproteínas continuam a fotossíntese porque a clorofila permanece associada ao fotossistema II (Allen, 1984). No entanto, neste estudo os ficobilissomas não puderam ser distintamente revelados na superfície externa dos tilacóides.

Na fase exponencial de crescimento, ambas as linhagens apresentaram acentuado sistema de **membranas tilacoidais**, com disposição padrão para o grupo, dispersos por todo o citoplasma (figuras 15A, 16A e 17F). Contudo, na fase exponencial tardia, diversas células da linhagem tóxica não apresentavam mais os tilacóides visíveis (figura 18C) e, quando presentes, apresentavam sempre arranjo típico para a espécie (figura 18E). Mudanças nos arranjos dos tilacóides, como alongado, vesiculado (aumento no espaço intra-tilacóide) e proeminente não foram observados.

Todavia, a linhagem não tóxica na fase exponencial tardia apresentou células com diferentes distribuições dos tilacóides, desde padrão (figura 17E), proeminente (figura 17A), alongado (figura 17D) e vesiculado (figuras 17B, C, D e F).

O estresse oxidativo foi atribuído como o principal agente causador de vários tipos de reorganizações estruturais e funcionais nos sistemas tilacoidais de cianobactérias (Pinevich, 1991; Baulina, 2012). Alguns trabalhos relatam a inter relação da configuração dos tilacóides e a transferência de elétrons durante a fotossíntese e também durante a respiração (Albertsson, 1982; Pinevich, 1991; Pinevich & Topchieva, 1991; Pinevich, 1997, 2006).

Células com tilacóides proeminentes e com vesiculação foram observadas quando cianobactérias foram mantidas em condições de estresse fisiológico (Findley et al., 1970; Nikitina et al., 1974; Suleimanova & Mineeva, 1981; Hardie et al., 1983; Schmetterer et al., 1983; Balkwill et al., 1984; Al-Hasan et al., 1989; Baulina, 2012). A presença de células com vesiculação significativa nos tilacóides foi associada com as fases iniciais do comprometimento funcional do aparato fotossintético (Baulina, 2012). No entanto, aparentemente, proeminências e vesiculações não são estágios obrigatórios na mudança destrutivas dos tilacóides (Stevens et al., 1981). De acordo com o que foi observado por Stevens et al. (1981), neste estudo, algumas células da linhagem tóxica não apresentavam mais tilacóides, no entanto nenhuma fase intermediária foi observada. Além disso, o acúmulo de **inclusões lipídicas** foi mais frequente nessas células e pode ser decorrente das alterações estruturais geradas na membrana do tilacóide (figura 18C), uma vez que a deposição de grânulos de lipídios pode ser causada pela destruição dos tilacóides (Vasconcelos & Fay, 1974).

Células com alongamento da membrana do tilacóide foram observadas quando cianobactérias foram mantidas em diferentes condições de iluminação (Al-Hasan et al., 1989; Merzlyak, 1989; Sciuto et al., 2008). O alongamento pode ocorrer devido às alterações na composição de ácidos graxos (fosfolipídios), através da atividade da dessaturase (Tasaka et al., 1996; Szalontai et al., 2000; Sciuto et al., 2008). Correlações entre a configuração dos tilacóides e a presença de **amido das cianofíceas**, durante um período de incubação no escuro (até 45 dias), foram feitas por Baulina (2012) para diferentes espécies de cianobactéria. Entretanto, neste estudo pudemos observar que os amidos das cianofíceas estavam presentes independentemente da forma dos tilacóides (figuras 15F, 17A e 17D).

Deste modo, no presente estudo, a diferença mais acentuada entre as linhagens ocorreu na fase exponencial tardia de crescimento. Entretanto, ambas as linhagens foram mantidas sob as mesmas condições de cultivo e as análises foram realizadas no mesmo tempo amostral. Assim, diferenças encontradas na ultraestrutura dos tilacóides não podem estar relacionadas exclusivamente à limitação de nutrientes ou condição específica de cultivo, mas podem estar relacionadas à particularidade de cada linhagem em um sistema de regulação em nível genético, corroborando os dados obtidos por Pinevich, 1991.

A plasticidade ultraestrutural dos tilacóides em diferentes espécies, independente da idade da cultura e da condição de iluminação, foi documentada por Baulina (2012). Diferenças na ultraestrutura dos tilacóides da cianobactéria *Chlorogloeopsis fritschii*, foram observadas mesmo no caso de células de tamanho semelhante envolvidas por uma bainha comum (Baulina, 2012). Além disso, *Synechococcus* sp. cultivada sob as mesmas condições de *C. fritschii* apresentou células sem tilacóides ou tilacóides com distribuição padrão, mas proeminentes, alongados ou vesiculados não foram observados (Allen, 1968; Baulina, 2012).

Deste modo, as diferenças entre as linhagens de *M. aeruginosa* na ultraestrutura dos tilacóides, na espessura da parede celular, no volume dos grânulos de cianoficinas, na quantidade de aerótopos e carboxissomos sugerem que as linhagens tóxica e não tóxica possuem diferentes mecanismos de desenvolvimento. Na natureza, estas diferenças devem constituir diferentes estratégias ecológicas para aumentar a eficiência na utilização de nutrientes e irradiância disponíveis.

5.6 Análises qualitativa e quantitativa das microcistinas LR, RR e YR utilizando a técnica de HPLC

Os extratos em metanol de *M. aeruginosa* CCIBt3194 apresentaram resultados positivos para a presença das microcistinas LR, RR, YR, nas fases exponencial e exponencial tardia de crescimento (figura 19). Como esperado, os extratos em metanol de *M. aeruginosa* CCIBt3106 apresentaram resultados negativos para a presença de microcistinas (figura 20). As microcistinas foram quantificadas a partir da construção de uma curva analítica: no eixo y área do pico cromatográfico em 238 nm e no eixo X tempo da corrida. Todas as curvas de calibração obtidas e seus respectivos R^2 estão apresentadas no anexo 5.

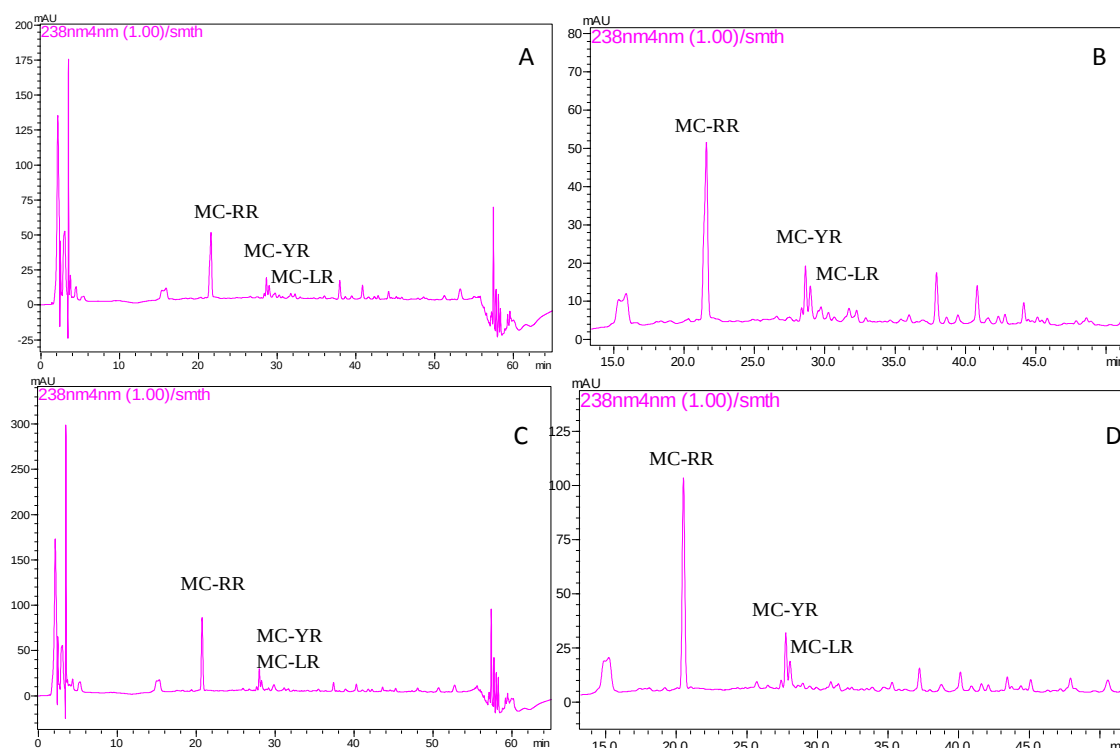


Figura 19. Cromatogramas representativos obtidos por HPLC-DAD em $\lambda = 238$ nm para análise de microcistinas, do extrato em metanol 90% de *Microcystis aeruginosa* CCIBt3194 A. Perfil cromatográfico da fase exponencial de crescimento; B. Detalhe do perfil cromatográfico, destacando as microcistinas, fase exponencial de crescimento; C. Perfil cromatográfico da fase exponencial tardia de crescimento; D. Detalhe do perfil cromatográfico, destacando as microcistinas, fase exponencial tardia de crescimento.

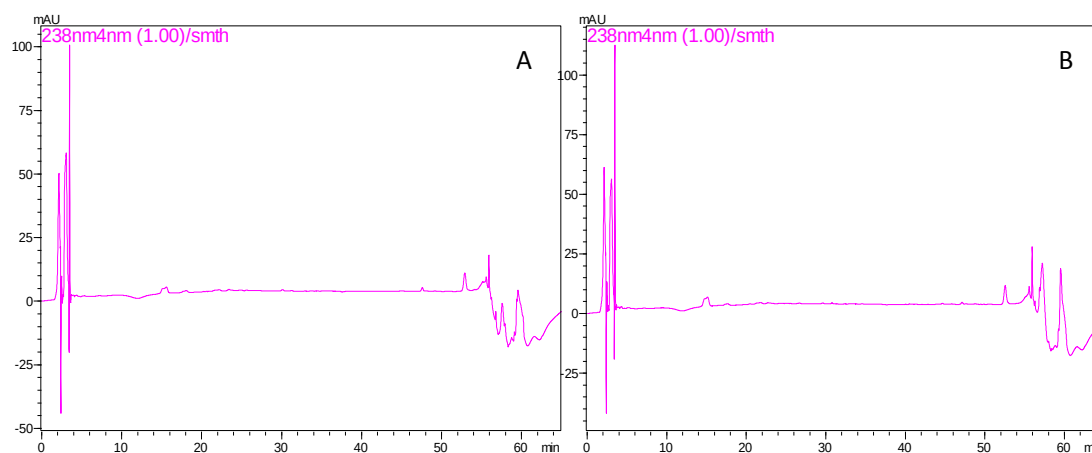


Figura 20. Cromatogramas representativos obtidos por HPLC-DAD em $\lambda = 238$ nm para análise de microcistinas, do extrato em metanol 90% de *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 A. Perfil cromatográfico da fase exponencial de crescimento; B. Perfil cromatográfico da fase exponencial tardia de crescimento

Orr & Jones (1998) propuseram que o teor de microcistina celular está correlacionado com a taxa de crescimento. Em concordância, van der Westhuizen & Eloff (1985), Sivonen (1990, 1996), Watanabe (1996), Wiedner et al. (2003), Long et al. (2001) e Repka et al. (2004) mencionam que os maiores concentrações de microcistinas são observados no meio da fase exponencial de crescimento. No presente estudo, amostragens das diferentes fases de crescimento exibiram valores de toxinas totais distintos, 83,28 ($\pm 4,25$) pgMC/célula na fase exponencial e 65,25 ($\pm 4,31$) pgMC/célula na fase exponencial tardia, sendo a maior produção de microcistinas encontrada também na fase exponencial de crescimento ($p < 0.05$) (figura 21).

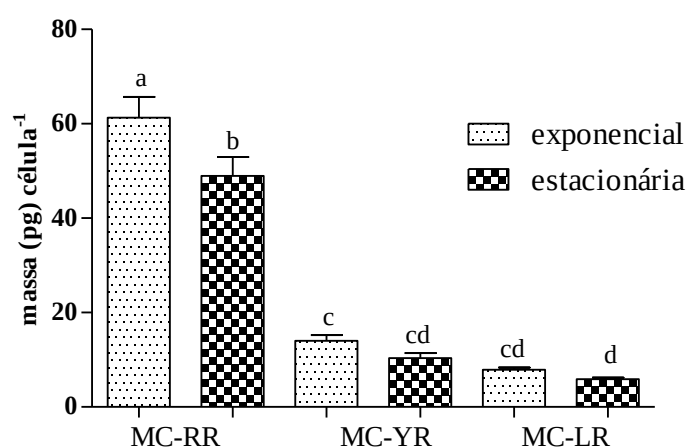


Figura 21. Quantificação das microcistinas isoladas nas diferentes fases de crescimento da linhagem CCIBt3194. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Quando as diferentes fases de crescimento foram comparadas em relação às concentrações das diferentes variantes de microcistinas, houve diminuição na concentração de todas as variantes encontradas, RR, YR e LR. A microcistina RR predominou, tanto na fase exponencial quanto na exponencial tardia de crescimento. No entanto apenas a microcistina RR foi estatisticamente diferente entre as fases estudadas ($p < 0,05$) - (figura 21). Alterações na produção das distintas variantes de microcistinas foram constatadas em diferentes fases do crescimento da espécie *M. aeruginosa* quando mantida em cultivo (Lyck, 2004). A redução proporcional nas concentrações celulares de microcistinas entre as fases de crescimento pode ser explicada pela redução da atividade de enzimas complexas NRPS/PKS. Segundo Agha et al. (2013), ao estudarem cepas de *M. aeruginosa* submetidas a estresse fisiológico, observaram redução gradual da concentração total de oligopeptídeos e o consequente desaparecimento de oligopeptídeos minoritários simultaneamente com a redução do crescimento da linhagem.

5.7 Análise de pigmentos, antioxidantes e parâmetros fotossintéticos

A figura 22 apresenta a variação da concentração de clorofila *a* por célula nas diferentes fases de crescimento para a linhagem tóxica e para a linhagem não tóxica. Foi possível observar que na fase exponencial as linhagens apresentaram a mesma produção de clorofila *a*. Entretanto, houve diferença significativa na fase exponencial tardia e a linhagem não tóxica apresentou maiores concentrações nesta fase.

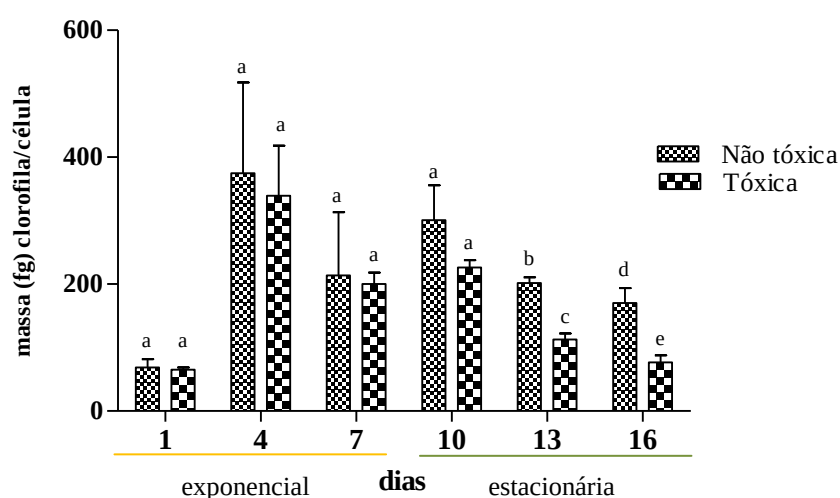


Figura 22. Variação da cota celular de clorofila *a* nas diferentes fases de crescimento para a linhagem tóxica (CCIBt 3194) e para a linhagem não tóxica (CCIBt 3106) de *Microcystis aeruginosa*. Valores

médios (n=3). Barras indicam o desvio padrão. Comparação entre as diferentes linhagens. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

A figura 23 mostra as variações das concentrações de β -caroteno e carotenóides totais por célula nas diferentes fases de crescimento. Para a quantificação dos carotenóides totais foram considerados todos os picos com espectro de absorção idêntico ao do β -caroteno (anexo 5). As curvas de calibração obtidas, seus respectivos R^2 e os cromatogramas representativos dos carotenóides estão apresentados no anexo 5. Foi possível observar que houve diferenças significativas nas concentrações de β -caroteno e carotenóides totais (figura 23). A linhagem tóxica apresentou maior concentração de β -caroteno na fase exponencial de crescimento, entretanto, não houve diferença significativa na fase exponencial tardia (figura 23).

Neste estudo verificamos que além do β -caroteno as linhagens apresentaram diversos outros carotenóides que não puderam ser identificados, mas foram quantificados. Apesar do β -caroteno ser o carotenóide majoritário nas cianobactérias, a fase de crescimento, a irradiância, as fontes e as concentrações de nitrogênio e o tipo de linhagem, podem alterar a composição de carotenóides (Takaichi & Mochimaru, 2007).

A linhagem não tóxica apresentou maiores concentrações de carotenóides totais tanto na fase exponencial quanto na exponencial tardia de crescimento ($P < 0.01$) - (figura 23). Alterações qualitativas nos componentes principais dos carotenóides podem estar relacionadas ao seu papel protetor contra a foto-oxidação da clorofila (Raps et al., 1983). Quando as diferentes fases de crescimento para a linhagem tóxica e para a linhagem não tóxica foram comparadas em relação à concentração de carotenóides totais, maiores concentrações foram observadas na fase exponencial de crescimento (figura 23). Na figura 24 está demonstrada a razão entre carotenóides totais e clorofila *a* para ambas as linhagens, nas diferentes fases de crescimento. Esta razão é usada como indicativo da síntese de carotenóides (carotenogênese). Houve aumento na concentração de carotenóides em relação à clorofila *a* apenas para a linhagem não tóxica na fase exponencial de crescimento.

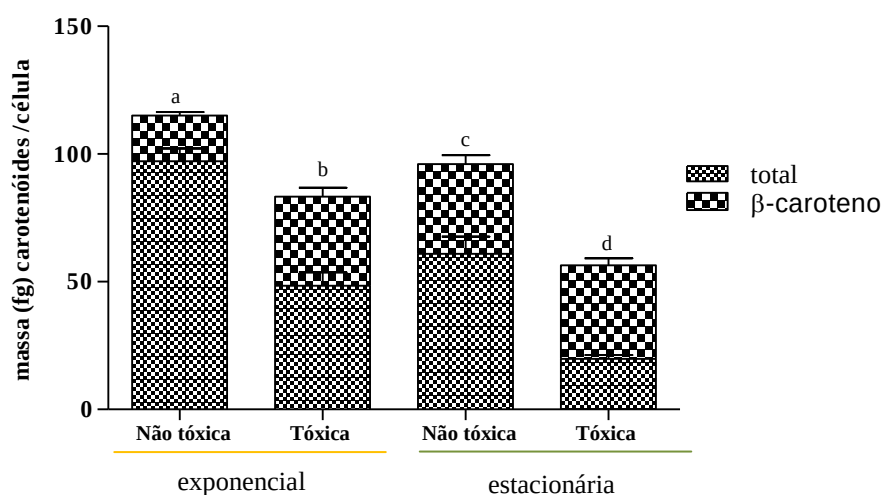


Figura 23. Concentrações de β -caroteno e carotenóides totais nas células de *Microcystis aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), nas diferentes fases de crescimento. Valores médios ($n=3$). Comparação entre as diferentes linhagens. Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

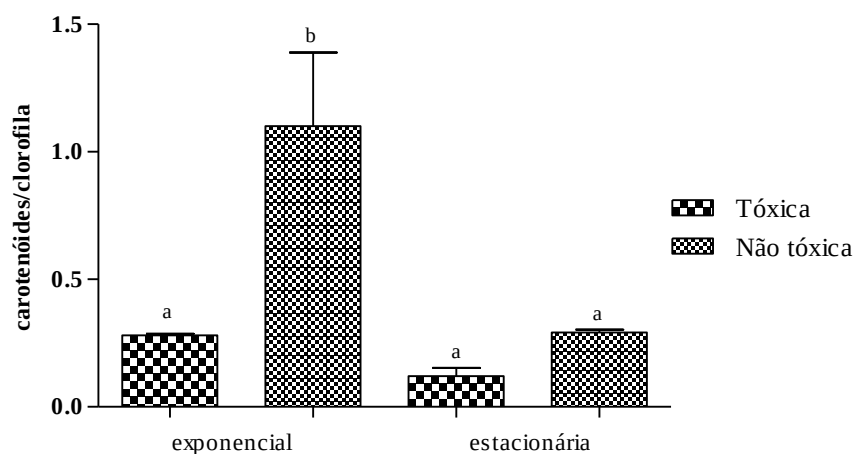


Figura 24. Variação da carotenogênese (razão carotenóides/clorofila) nas células de *Microcystis aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), nas diferentes fases de crescimento. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

As figuras 25 e 26 mostram respectivamente, as variações das concentrações de C-ficocianina e aloficocianina por célula nas diferentes fases de crescimento. Foi possível observar que as linhagens tóxica e não tóxica obtiveram a mesma produção de C-ficocianina e aloficocianina na fase exponencial de crescimento. Entretanto, houve diferença significativa na fase exponencial tardia, a linhagem não tóxica apresentou maiores concentrações destes pigmentos nesta fase de crescimento.

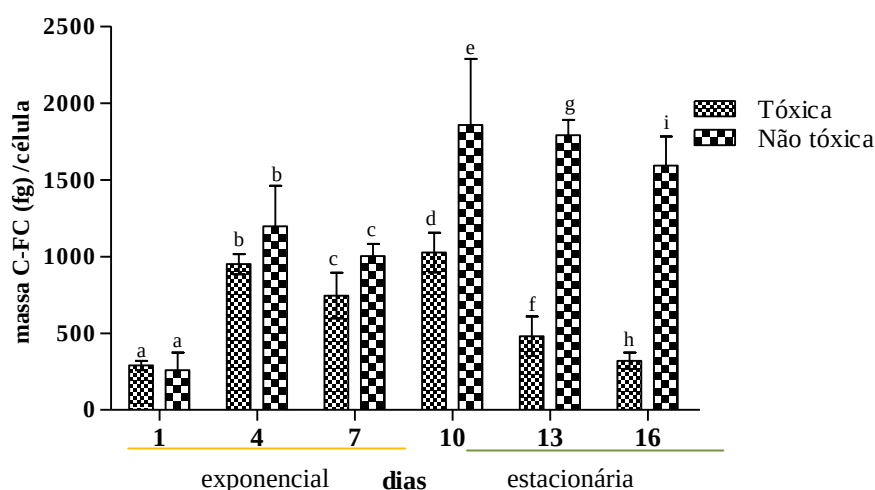


Figura 25. Variação da cota celular de C-ficocianina nas diferentes fases de crescimento para as linhagens CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) de *Microcystis aeruginosa*. Valores médios (n=3). Comparação entre as diferentes linhagens. Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

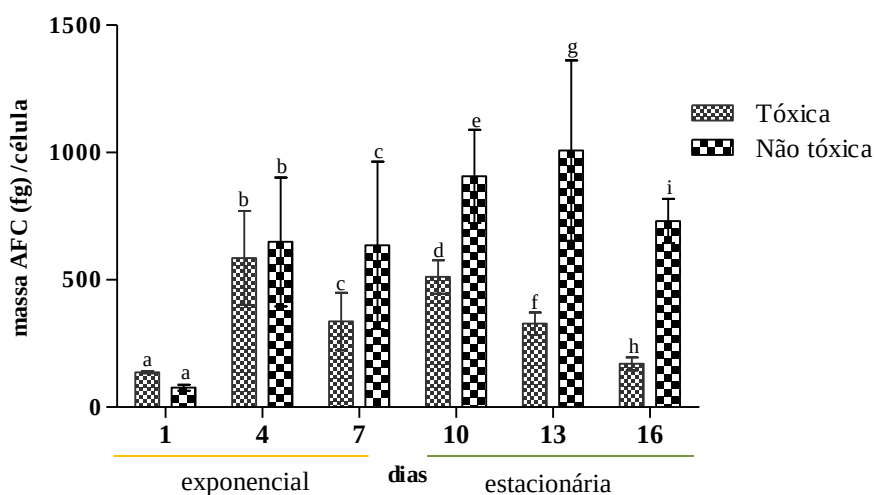


Figura 26. Variação da cota celular de aloficocianina nas diferentes fases de crescimento para as linhagens CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) de *Microcystis aeruginosa*. Valores médios (n=3). Barras indicam o desvio padrão. Comparação entre as diferentes linhagens. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

A figura 27 mostra as variações das concentrações de todos os pigmentos analisados para as duas linhagens, nas diferentes fases de crescimento. A linhagem não tóxica obteve maior produção de pigmentos do que a linhagem tóxica na fase exponencial tardia de crescimento.

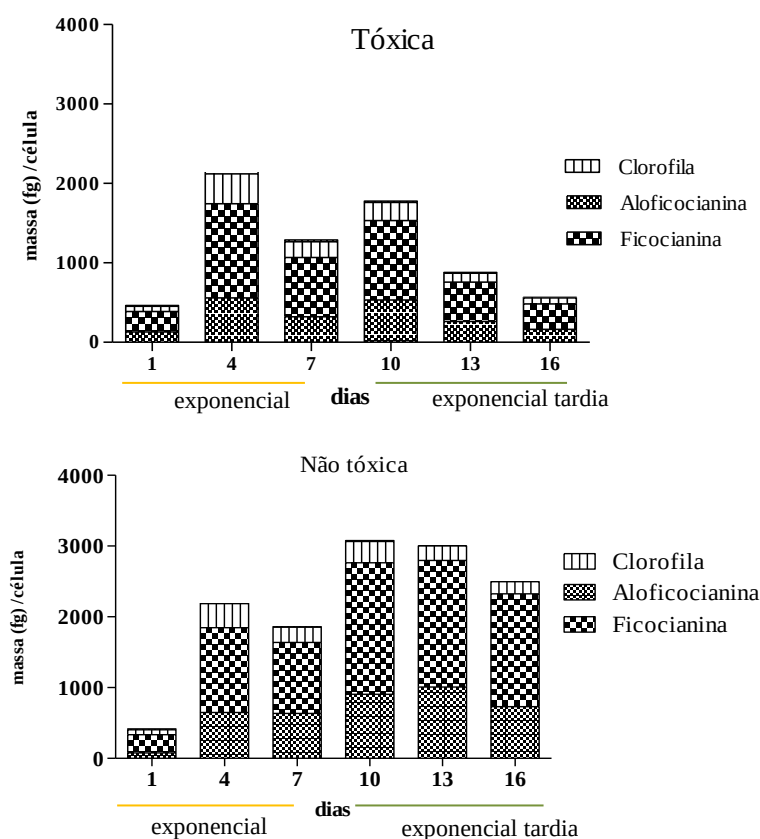


Figura 27. Variação da cota celular de todos os pigmentos analisados nas diferentes fases de crescimento. A) linhagem CCIBt 3194 (tóxica) e B) linhagem CCIBt 3106 (não tóxica).

Com o objetivo de estimar o potencial de atividades antioxidantes das linhagens CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica) foram dosados os seguintes compostos: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), o complexo tripiridil hidrazina férrica (Fe^{3+} TPTZ) – (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power) e propriedade redutora das substâncias fenólicas (Folin-Ciocalteu).

O método DPPH consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre DPPH (Brand-Williams et al., 1995). O método FRAP determina a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (Tandon et al., 2008). O Folin-Ciocalteu baseia-se na propriedade redutora das substâncias fenólicas que reage com o reagente de Folin-Ciocalteu (mistura de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico) em condições alcalinas (Genovese et al., 2003; Huang et al., 2005). A figura 28 apresenta a variação do potencial de redução do ferro por célula nas diferentes fases de crescimento. As linhagens tóxica e não tóxica obtiveram poder redutor do ferro em diferentes graus de intensidade. Quanto maior a redução do ferro pela amostra, maior é sua atividade antioxidante. Em todos os casos, o poder redutor diminuiu quando adicionados menores

volumes de extrato bruto metanólico no ensaio, sendo assim, o potencial de redução do ferro foi diretamente proporcional à concentração da amostra. Os valores em μg equivalente padrões (Trolox e ácido gálico) foram semelhantes, tendo escalas parecidas, portanto apenas os valores por Trolox serão apresentados (figura 28). Ambas as linhagens tóxica e não tóxica apresentaram maior potencial redutor na fase exponencial, aproximadamente 2,5 vezes ou mais. A linhagem tóxica apresentou maior atividade antioxidante, tanto para a fase exponencial como exponencial tardia de crescimento.

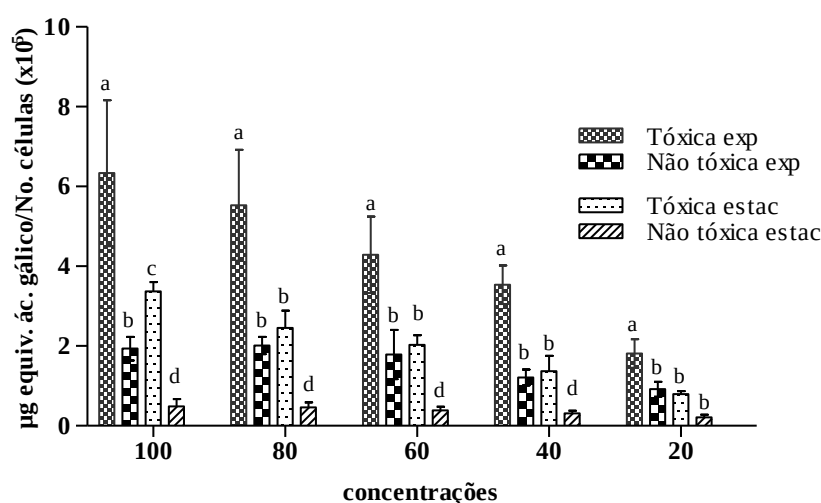


Figura 28. Variação do potencial redutor do ferro nas células de *Microcystis aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) nas diferentes fases de crescimento. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Comparação entre as diferentes linhagens nas diferentes concentrações. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

A figura 29 apresenta a variação do potencial de compostos fenólicos por célula nas diferentes fases de crescimento. As linhagens tóxica e não tóxica obtiveram potencial de compostos fenólicos em diferentes graus de intensidade. Os compostos fenólicos diminuíram quando adicionados menores volumes de extrato bruto metanólico no ensaio, sendo assim, o potencial de compostos fenólicos foi diretamente proporcional à concentração da amostra. (figura 29ab). As linhagens tóxica e não tóxica apresentaram maior potencial redutor na fase exponencial para os valores equivalentes a trolox (figura 29b) Mas para os valores equivalentes a ácido gálico a linhagem tóxica apresentou maior atividade antioxidante, tanto na fase exponencial como na exponencial tardia de crescimento (figura 29a).

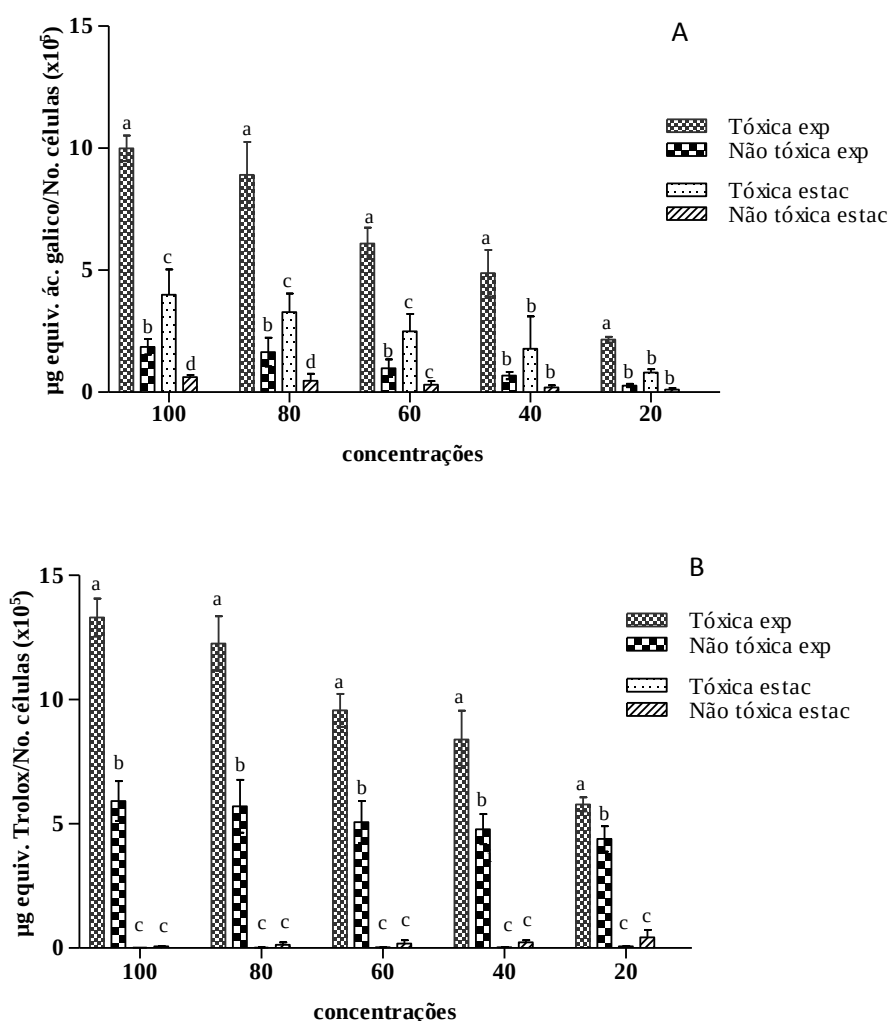


Figura 29. Variação do potencial de compostos fenólicos nas células de *Microcystis aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica), nas diferentes fases de crescimento. (A) ac gálico e (B) trolox. Valores médios ($n=3$). Barras indicam o desvio padrão. Comparação entre as diferentes concentrações. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

A figura 30 apresenta a variação das curvas de fotossíntese e irradiância (PxI) para a linhagem tóxica e para a linhagem não tóxica, na fase exponencial tardia de crescimento. Foi possível observar que a taxa de transporte de elétrons (curva ETR-PAR) e seus respectivos parâmetros foram diferentes entre as linhagens (figura 30, tabela 6). A linhagem não tóxica apresentou maiores valores de taxa de transporte de elétrons, fotossíntese máxima (F_{max}), eficiência fotossintética (α), irradiância de saturação (I_k) e rendimento de extinção fotoquímica (Y_{PSII}), porém os valores de I_k não foram estatisticamente diferentes entre as linhagens.

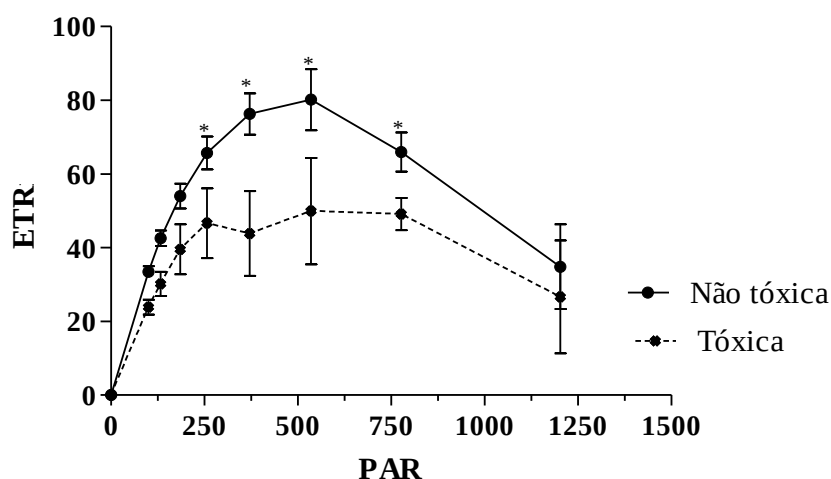


Figura 30. Curvas de fotossíntese-irradiância da linhagem tóxica (CCIBt 3194) e não tóxica (CCIBt 3106). ETR, taxa de transporte de elétrons. Barras indicam o desvio padrão (n=3). As diferenças estatísticas são reportadas segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparação entre as diferentes linhagens.

Tabela 6. Valores de fotossíntese máxima (Fmax), eficiência fotossintética (Alfa) e ponto de saturação da fotossíntese (I_k) das linhagens de *Microcystis aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste t.

	Tóxica	Não tóxica
Fmax (ETR)	55,7±5 ^a	72,9±9 ^b
Alfa (ETR)	0,31±0,05 ^a	0,36±0,03 ^b
I_k (μmol fótons.m⁻².s⁻¹)	182,9±17 ^a	199,9±22 ^a

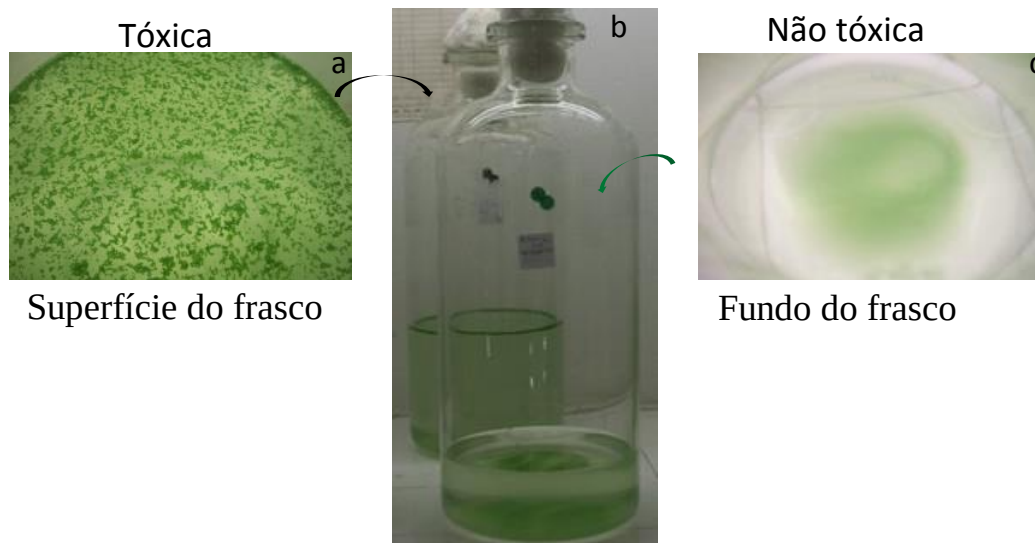


Figura 31. Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* CCIBt 3194 (tóxica) e CCIBt 3106 (não tóxica) na fase exponencial de crescimento. A) Detalhe das colônias tóxicas na superfície do frasco; B) Aspecto geral dos cultivos; C) Detalhe das colônias não tóxicas no fundo do frasco.

Sendo assim, a variação dos pigmentos fotossintéticos entre as linhagens tóxica e não tóxica exibiu comportamento semelhante em ambas as fases de crescimento (figura 29). O principal pigmento para ambas as linhagens foi C-ficocianina. O pigmento aloficocianina, foi o segundo mais representativo em termos de concentração por célula (figura 29). Na fase exponencial de crescimento não houve diferenças significativas na proporção de pigmentos entre as linhagens estudadas (figura 29). A exceção foram os carotenóides que apresentaram maiores teores na linhagem não tóxica (figura 25).

O aumento da síntese de carotenóides na linhagem não tóxica na fase exponencial de crescimento pode estar relacionado à maior exposição das células à intensidade de luz mais elevada, uma vez que a biomassa da espécie ainda é reduzida, o que leva ao aumento da luz incidente sobre as células (figura 31b,c).

A principal função dos carotenóides é proteger a célula contra o dano oxidativo durante a fotossíntese (Young & Frank, 1996; Edge et al., 1997; Steiger et al., 1999). Halliwell & Gutteridge (1989) provaram que o β caroteno é uma molécula antioxidante externa para o oxigênio singlete. Logo, a expressão genética relacionada à biossíntese de carotenóides é estimulada por altas intensidades luminosas (Schafer et al., 2006; Kang et al., 2007; Imamoglu et al., 2009; Li et al., 2010). Vários trabalhos reportaram o aumento do teor de carotenóides em cianobactérias em resposta ao aumento da irradiância de maneira a prevenir o dano oxidativo, já que os carotenóides em altas intensidades de luz funcionam

como dissipadores da energia absorvida em excesso e como agentes antioxidantes (Rücker et al., 1995; Niyogi et al., 1997; Miskiewicz et al., 2000; Takaichi & Mochimaru, 2007).

A linhagem tóxica também produziu mais carotenóides totais na fase exponencial de crescimento, entretanto não houve aumento no processo de carotenogênese. Isso significa que esta linhagem ativa outro processo de aclimação ou controle para evitar a fotooxidação dos pigmentos, fato verificado também por Tandeau de Marsac & Houmard (1993) em linhagem de *M. aeruginosa*. Mecanismos para lidar com o estresse oxidativo são cruciais e as cianobactérias desenvolveram numerosas estratégias a fim de evitar a produção de espécies reativas de *oxigênio* ou para minimizar seus danos, uma vez produzidas (Latifi et al., 2009). Neste estudo verificamos que a linhagem tóxica apresentou maior atividade antioxidante, como alto teor de compostos fenólicos e poder redutor de ferro, principalmente na fase exponencial de crescimento (figuras 28 e 29). Uma vez que esses compostos atuam como agentes redutores, sugere-se que foram produzidos para evitar o estresse, exercendo proteção ao organismo contra o estresse oxidativo (Oyaizu, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1999; MacDonald-Wicks et al., 2006). Entretanto, não há informações na literatura sobre a função destes antioxidantes em cianobactérias (Molot et al., 2010; Onofrejová et al., 2010; Oliveira, 2012). Ainda, estudos apontam que as microcistinas apresentam papel protetor nas células sob estresse oxidativo em resposta à alta intensidade luminosa (Zilliges et al., 2011; Kaplan et al., 2012; Meissner et al., 2014). As colônias tóxicas foram nitidamente observadas sempre na superfície dos frascos de cultivo, portanto sempre expostas a maior intensidade de luz, em ambas as fases de crescimento (figura 31a,b).

Além disso, a linhagem tóxica na fase exponencial tardia de crescimento produziu menores teores de C-ficocianina, aloficocianina e clorofila *a*, provavelmente como estratégia de prevenção contra o dano foto-oxidativo ocasionado pela geração de radicais livres (Porter et al., 1978; Suleimanova & Mineeva, 1981; Wyman & Fay, 1986; Sendersky et al., 2005). Em altas intensidades luminosas a diminuição dos ficobilissomos ocorre devido à redução da síntese e o aumento da degradação por proteases (Pojidaeva et al., 2004; Stanne et al., 2007). Tal comportamento conduz à proteção da célula dos efeitos de absorção de luz em excesso, favorecendo o crescimento em situações que poderiam ocasionar foto-oxidação da clorofila *a* (Wyman & Fay, 1986; Bailey & Grossman, 2008).

Ao contrário da linhagem tóxica, a linhagem não tóxica aumentou as concentrações celulares de pigmentos na fase exponencial tardia de crescimento, talvez devido ao sombreamento das células, ocasionado pelo aumento da biomassa celular. Além disso, as

colônias não tóxicas permaneceram sempre distribuídas no meio ou no fundo dos frascos nesta fase de crescimento, corroborando o fato de que as ficobiliproteínas teriam sua síntese otimizada em baixas intensidades luminosas para capturarem maior quantidade de energia radiante possível e assim garantirem o crescimento celular (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993).

De acordo com os dados observados neste estudo, diferenças na composição dos pigmentos acessórios em linhagens de *Microcystis* tóxicas e não tóxicas foram relatadas por Kardinaal et al. (2007) e Tonietto et al. (2012), sendo que estes autores também relataram quantidade de ficocianina muito maior na linhagem não tóxica. Mudanças na composição de pigmentos e possibilidade de cianobactérias do mesmo gênero apresentarem diferentes respostas de crescimento ao aumento da irradiância foram relatadas na literatura por Wilmotte (1988), Böttcher et al. (2001) e Kardinaal et al. (2007).

Böttcher et al. (2001) e Hesse et al. (2001) relataram diferenças nas respostas de crescimento de várias linhagens de *Microcystis*, dependentes de luz. Em concordância, foi demonstrando por Kardinaal et al. (2007), que linhagens tóxicas e não tóxicas possuem estratégias diferentes na competição por luz e que diferenças sutis entre linhagens de *Microcystis* são suficientes para provocar substituição competitiva. Cepas tóxicas foram concorrentes mais fracas para absorção de luz do que as cepas não tóxicas.

No presente estudo, a linhagem não tóxica pareceu ser favorecida na absorção de luz, fato observado pelos maiores valores de taxa de transporte de elétrons, fotossíntese máxima (F_{max}) e eficiência fotossintética (α) na fase exponencial tardia de crescimento (figura 32), enquanto a linhagem tóxica mostrou maior capacidade de fotoproteção, como observado pelo maior rendimento de extinção não-fotoquímica regulada e não regulada.

Deste modo, os resultados deste trabalho revelaram que as linhagens tóxica e não tóxica de *M. aeruginosa* apresentaram estratégias distintas para absorção de luz, com variações significativas nos teores de pigmentos, atividades antioxidantes e parâmetros fotossintéticos. A linhagem tóxica exibiu atributos relacionados à maior dependência de luz, como menores concentrações de pigmentos acessórios, maiores valores de antioxidantes e maiores valores de rendimento de extinção não-fotoquímica regulada e não regulada. Enquanto isso, a linhagem não tóxica exibiu atributos relacionados à menor dependência de luz, como maiores valores de pigmentos acessórios, clorofila *a*, eficiência fotossintética e rendimento de extinção fotoquímica. Sendo assim, na natureza, essas diferentes estratégias

encontradas para absorção de luz devem proporcionar condições favoráveis para que linhagens tóxicas e não tóxicas compartilhem do mesmo ambiente.

5.8 Análise Proteômica

5.8.1 Identificação de proteínas

Para a análise proteômica, inicialmente diversos testes foram realizados no intuito de estabelecer a melhor metodologia para extração e purificação de proteínas, como detalhado no anexo 6. Uma vez estabelecida a metodologia, os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas e, a partir dos dados brutos, duas abordagens para identificação e quantificação relativa de proteínas foram utilizadas. Uma delas foi realizada com o programa *Mascot Server* (Matrix Science) com busca em banco de proteínas geral do NCBI. Outra foi realizada com o programa *ProteinLynx Global Server* (Waters) com busca em um banco de proteínas restrito ao gênero *Microcystis*.

Com a busca no banco geral usando o programa *Mascot*, um total de 240 proteínas foi identificado, após eliminadas aquelas redundantes. Apenas as proteínas que possuíam funções moleculares ou/e participação em processos biológicos definidos foram mantidas (excluindo as hipotéticas, não nomeadas etc). Assim, restou um total de 162 proteínas (tabela 17 anexo 10).

Já no caso da análise de dados com o programa *ProteinLynx* e banco de *Microcystis*, um total de 146 proteínas foi identificado, após eliminadas as redundantes e hipotéticas. (tabela 18 anexo 11).

Comparando as duas abordagens de identificação, 36 proteínas foram identificadas em comum pelos dois programas nos bancos analisados (anexo 11, tabela 18).

Para ambos os casos, para quantificação relativa das proteínas diferencialmente expressas foram consideradas apenas aquelas presentes em três ou quatro réplicas técnicas (dados resultantes da análise de espectrometria de massas). Estas estão apresentadas nas tabelas a seguir que listam as comparações entre linhagens e fases de crescimento.

Neste estudo não identificamos proteínas envolvidas na biossíntese de microcistinas, apesar da capacidade da técnica do iTRAQ para identificar proteínas de baixa abundância. Estas proteínas são difíceis de serem detectadas, como já apontado por outros autores (D'Agostino et al., 2014).

5.8.2 Proteínas diferencialmente expressas

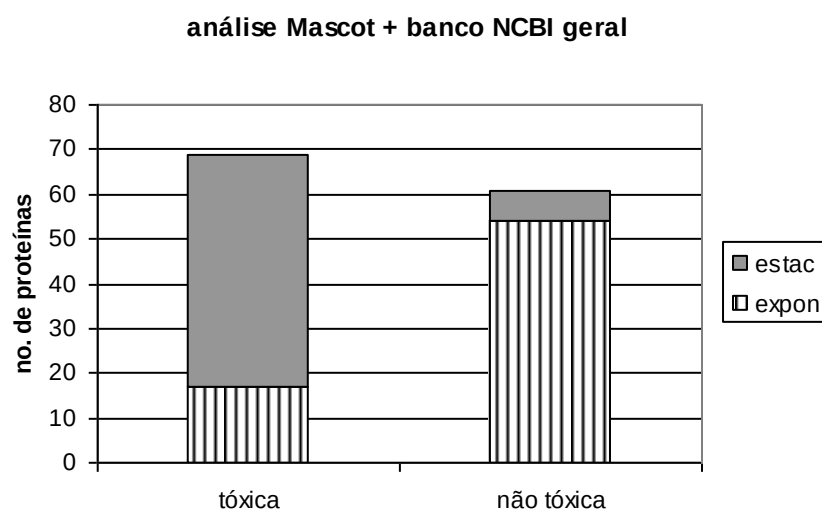
5.8.2.1 Comparação entre fases de crescimento para a linhagem tóxica e para a linhagem não tóxica

Quando as fases de crescimento de cada linhagem foram comparadas, de acordo com a análise Mascot e banco geral NCBI: 1) na linhagem tóxica, de um total de 69 proteínas diferencialmente expressas, 17 estavam mais expressas na fase exponencial e 52 estavam mais expressas na fase exponencial tardia (figura 32a, tabela 7). 2) na linhagem não tóxica, de um total de 61 proteínas diferencialmente expressas, 54 estavam mais expressas na fase exponencial e 7 mais expressas na fase exponencial tardia (figura 32a, tabela 8).

De acordo com a análise ProteinLynx e banco de *Microcystis*, 1) na linhagem tóxica, de um total de 18 proteínas diferencialmente expressas, 6 estavam mais expressas na fase exponencial e 12 estavam mais expressas na fase exponencial tardia (figura 32b). 2) na linhagem não tóxica, de um total de 15 proteínas identificadas 2 estavam mais expressas na fase exponencial e 1 estava exclusivamente presente nesta fase de crescimento, enquanto 12 estavam mais expressas na fase exponencial tardia (figura 32b).

Uma vez que o número de proteínas diferencialmente expressas foi bem superior na análise por Mascot e banco geral NCBI do que análise por ProteinLynx e banco de *Microcystis*, optamos por discutir os resultados em função da primeira análise. Nas tabelas a seguir são apresentadas as listas de proteínas diferencialmente expressas por cada linhagem comparando as fases de crescimento (tabelas 7 e 8). Já as tabelas de proteínas diferencialmente expressas identificadas por ProteinLynx encontram-se no anexo 11.

A



B

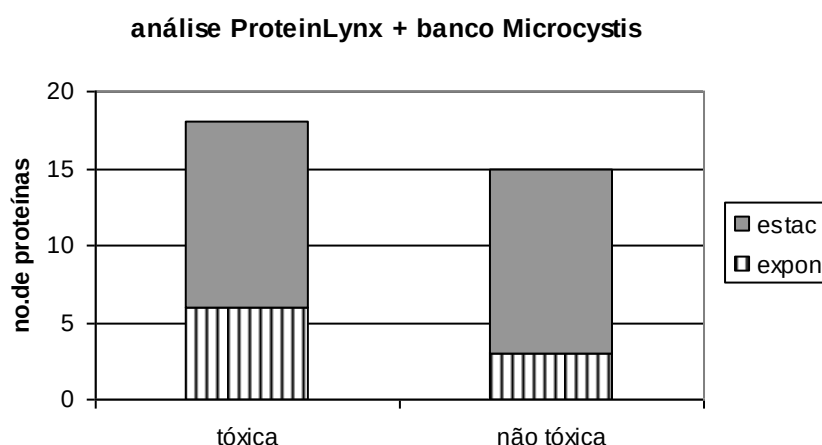


Figura 32. Número de proteínas diferencialmente mais expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica), por marcação com iTRAQ, comparando as diferentes fases de crescimento para cada linhagem. (a) Resultados da análise por Mascot e busca no banco geral de proteínas do NCBI. (b) Resultados da análise por ProteinLynx e busca no banco de proteínas de *Microcystis*.

Em relação à linhagem tóxica, as proteínas mais expressas na fase exponencial estavam relacionadas com a fotossíntese, metabolismo de carboidratos e carbono, componentes de membrana, processos catalíticos e resposta a estresse (tabela 7, figura 33).

Quanto à linhagem tóxica na fase exponencial tardia, as proteínas diferencialmente mais expressas estavam relacionadas com a fotossíntese, absorção de luz e transporte de elétrons, metabolismo energético, como ATP, carboidratos e carbono, biossíntese de aminoácidos, processos catalíticos e catabólico, síntese de nucleotídeos, processo de

biossíntese de acetil-CoA, síntese de proteínas e glutamina, transporte de proteínas, resposta a estresse, processos de oxidação-redução, organização dos aerótopos, peptidases e síntese de lipídios (figura 33, tabela 7).

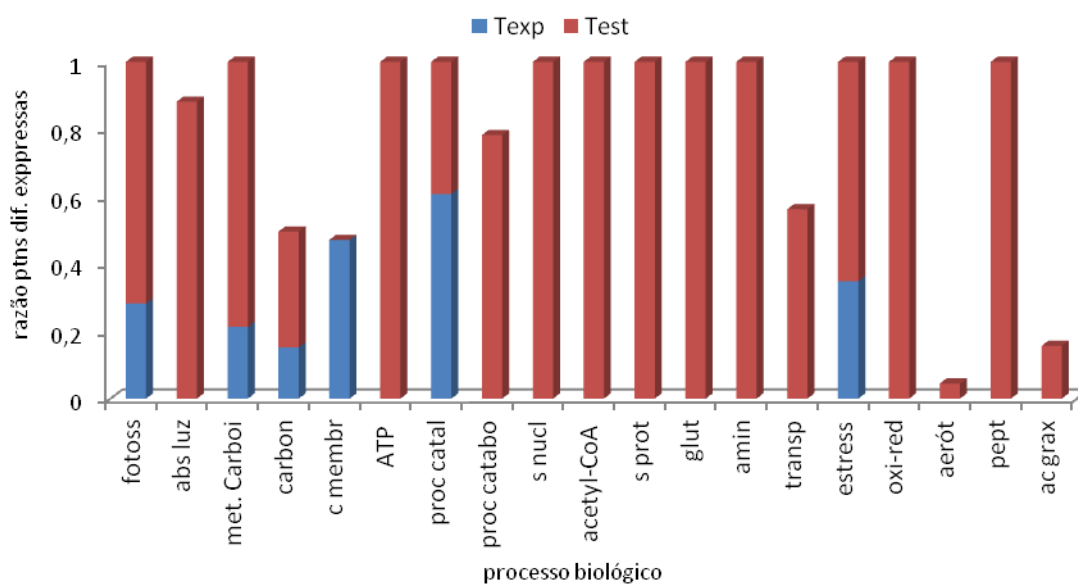


Figura 33. Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica), comparação entre as diferentes fases de crescimento, por marcação com iTRAQ. O agrupamento foi realizado pela soma das proteínas de um mesmo processo biológico mais expressas na linhagem tóxica na fase exponencial e exponencial tardia de crescimento, posteriormente os dados foram transformados (log ranging). O valor 1 representa o máximo de expressão. Fotossíntese (fotoss), absorção de luz (abs. luz), metabolismo de carboidratos (met. Car), processos relacionados ao carbono (Carbon), componente de membrana (c membr), adenosina tri-fosfato (ATP), processo catalítico (proc cat), Processo catabólico (proc catabo), síntese de nucleotídeo (s nucl.), Acetil-CoA (acetyl-C), síntese de proteínas (s ptn), síntese de glutamina (glut), síntese de aminoácidos (amin), transporte de proteína (transp), relacionadas ao estresse (estresse), processo de oxidação-redução (oxi-red), aerótopos (aerót), peptidase (pept), síntese de ácidos graxos (ac grax).

Já no caso da **linhagem não tóxica**, as proteínas diferencialmente expressas na **fase exponencial** estavam relacionadas com a fotossíntese, absorção de luz, metabolismo de carboidratos e carbono, biossíntese de aminoácidos, componentes de membrana, metabolismo energético, processos catalíticos e catabólicos, síntese de nucleotídeos, processo de biossíntese de acetil-CoA, síntese de proteínas, gliconeogênese, transporte de proteínas, resposta a estresse, processos de oxidação-redução, organização dos aerótopos, peptidases e síntese de lipídios (figura 34, tabela 8). Na **fase exponencial tardia**, as proteínas mais

expressas estavam relacionadas com a absorção de luz e transporte de elétrons, síntese de proteínas e aminoácidos (figura 34, tabela 8).

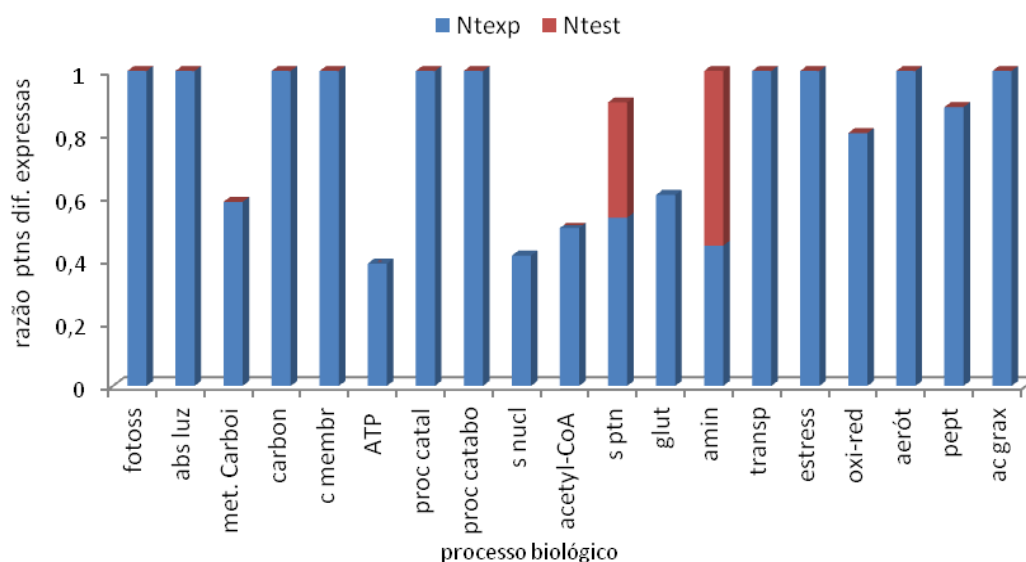


Figura 34. Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica), comparação entre as diferentes fases de crescimento, por marcação com iTRAQ. O agrupamento foi realizado pela soma das proteínas de um mesmo processo biológico mais expressas na linhagem não tóxica na fase exponencial e estacionária de crescimento, posteriormente os dados foram transformados (log ranging). O valor 1 representa o máximo de expressão. Fotossíntese (fotoss), absorção de luz (abs. luz), metabolismo de carboidratos (met. Car), processos relacionados ao carbono (carbon), proteína integral de membrana (c membr), adenosina tri-fosfato (ATP), processo catalítico (proc catal), processo catabólico (proc catabo), síntese de nucleotídeo (s nucl.), Acetil-CoA (acetyl-C), síntese de proteínas (s ptn), síntese de glutamina (glut), síntese de aminoácidos (amin), transporte de proteína (transp), relacionadas ao estresse (estresse), processo de oxidação-redução (oxi-red), aerótopos (aerót), peptidase (pept), síntese de ácidos graxos (ac grax).

Sendo assim, a linhagem tóxica ao passar da fase exponencial de crescimento para a fase exponencial tardia apresentou como modificações mais importantes na síntese de proteínas, aquelas com funções relacionadas ao metabolismo central, como acetil coenzima A, metabolismo energético, absorção de luz, síntese de nucleotídeos, aminoácidos e proteínas; adaptações metabólicas, como processos de oxidação-redução, síntese de ácidos graxos, resposta ao estresse, além de proteínas relacionadas ao transporte e aerótopos.

A linhagem não tóxica, na fase exponencial mostrou metabolismo mais ativo nas funções relacionadas ao metabolismos central, como fotossíntese, absorção de luz, processos relacionados ao carbono, metabolismo energético, adaptações metabólicas, como processos de oxidação-redução, síntese de ácidos graxos, resposta ao estresse, além de proteínas

relacionadas ao transporte e aerótopos. Na fase exponencial tardia, todas as proteínas diferencialmente expressas estavam relacionadas ao metabolismo central, sendo a proteína de maior grau de aumento de expressão nesta fase relacionada à síntese de aminoácidos.

Ambas as linhagens expressaram em maior grau proteínas integrais de membrana na fase exponencial de crescimento. Entretanto, todas as outras proteínas foram diferencialmente expressas entre as linhagens, na passagem da fase exponencial para exponencial tardia de crescimento. Sendo assim, a diferença entre as linhagens esteve relacionada ao seu investimento diferencial na passagem entre as fases de crescimento, sendo que a linhagem tóxica mostrou o metabolismo mais ativo na fase exponencial tardia, e a linhagem não tóxica na fase exponencial de crescimento.

Tabela 7. Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguida de análise no programa Mascot e busca no banco de proteínas geral do NCBI. Comparação entre as diferentes fases de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na fase exponencial (marcador 114). Vermelho. proteínas mais expressas na fase exponencial tardia (marcador 115).

(continua)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/115	Proteínas
S16200	gi 97733	47	28,381		carbohydrate metabolic process			3,40	photosystem I iron-sulfur protein psaC - <i>Calothrix</i> sp. (PCC 7601)
NP_441966	gi 16331238	1	8,828	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem I	photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding, oxidoreductase activity	2,78	photosystem I subunit VII [<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803]
CCH95263	gi 389675643	77	29,823		Photosynthesis, photosystem II stabilization	cell outer membrane, extrinsic component of membrane, integral component of membrane, photosystem II oxygen evolving complex	calcium ion binding	2,77	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9432]/psbO [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
CCH91132	gi 389680157	91	21,195		response to stress			2,15	General stress protein 16U [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9432]
AAA88634	gi 154573	33	81,637	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore, Iron, Iron-sulfur, Magnesium, Metal-binding	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity	1,91	chlorophyll a/b apoprotein [<i>Synechococcus</i> sp.]
CCH91355	gi 389679901	41	25,845	Zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity	1,82	Carbonic anhydrase [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9432]
CAO90013	gi 159029027	90	42,663		catalytic activity		catalytic activity	1,77	unnamed protein product [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
CCI04895	gi 389730996	03	11,205	2Fe-2S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	electron transport chain		2 iron, 2 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding	1,74	Ferredoxin [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443]
CCI03993	gi 389732000	56	49,73		Phage tail sheath protein			1,62	Phage tail sheath protein [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443]
CAO88745	gi 159031042			zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity	1,61	Carbonic anhydrase [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
CCI04196	gi 389731782	52	70,383		Carbon dioxide concentrating mechanism			1,47	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443]
CAO88672	gi 159030975	49	82,6	4Fe-4S, Chlorophyll,	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I,	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll	1,41	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1/ psaA [<i>Microcystis</i>

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/115	Proteínas
				Chromophore, Iron, Iron-sulfur, Magnesium, Metal-binding		thylakoid membrane	binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity		aeruginosa PCC 7806]
CAO89669	gi 159027866	36	14,659		response to stress			1,41	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001658313	gi 166366040	08	55,898		photosynthetic electron transport chain	photosystem II	chlorophyll binding	1,36	photosystem II core light harvesting protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657813	gi 166365540	60	60,274		integral component of membrane	transporter activity		1,31	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO86553	gi 159026621	72	18.159		protein folding		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	1,301	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659808	gi 166367535	03	11,084		carbon utilization			1,29	carbon dioxide concentrating mechanism protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88531	gi 159030852	68	72.263		metal ion binding	Calcium, Magnesium, Metal-binding, Thiamine, pyrophosphate	metal ion binding	0,79	Transketolase/unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88879	gi 159026302	66	51,008		photosynthetic electron transport in photosystem II	light-harvesting complex, photosystem II	chlorophyll binding, electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity	0,75	psbC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88947	gi 159026435	03	33,381		cysteine-type peptidase activity		cysteine-type peptidase activity	0,74	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91267	gi 159030372	73	53,04	ATP-binding, Nucleotide-binding	glutamine biosynthetic process, nitrogen fixation	cytoplasm	ATP binding, glutamate-ammonia ligase activity	0,74	glnA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89299	gi 159027205	02	53,979	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	0,73	atpA / ATP synthase subunit alpha, membrane-bound, F1 sector [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88566	gi 159030885	44	59,093	Magnesium, Metal-binding	carbohydrate metabolic process		intramolecular transferase activity, phosphotransferases, magnesium ion binding	0,71	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88098	gi 159028287	20	35.524		light absorption		chloride ion binding	0,70	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88147	gi 159028676	59	17,69		fatty acid biosynthetic process, lipid A	cytoplasm	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	0,69	fabZ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/115	Proteínas
					biosynthetic process		activity		
YP_001659 994	gi 166367721	75	63,834		metallopeptidase activity		metallopeptidase activity	0,64	secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCIO5346	gi 389730366	20	35,54		light absorption, transport	phycobilisome	chloride ion binding	0,63	Orange carotenoid-binding protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO87645	gi 159029497	92	32,213		photosynthesis	phycobilisome		0,43	cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]/ phycobilisome rod linker polypeptide
CAO90410	gi 159030029	61	59,181	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	isoleucine biosynthetic process, valine biosynthetic process		4 iron, 4 sulfur cluster binding, dihydroxy-acid dehydratase activity, metal ion binding	0,63	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001660 757	gi 166368484	12	22,685	RNA-binding, rRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome	0,61	50S ribosomal protein L3/ rplC [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCIO3504	gi 389732587	75	63,821		metallopeptidase activity		metallopeptidase activity	0,60	Predicted secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
YP_001659 290	gi 166367017	09	44,918	GTP-binding Nucleotide- binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	0,58	Elongation factor Tu (EF-Tu) /tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88754	gi 159025964	14	66,546	ATP, Nucleotide- binding	ATP binding, nucleoside- triphosphatase activity		ATP binding, nucleoside- triphosphatase activity	0,57	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89332	gi 159027237	33	37,775	ATP-binding, Nucleotide- binding	carbohydrate metabolic process		ATP binding, phosphoribulokinase activity	0,55	prK [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88327	gi 159030657	7	8,42		photosynthesis	photosystem I reaction center, thylakoid membrane		0,55	psaE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659 743	gi 166367470	64	18,123		photosynthesis	photosystem I reaction center		0,54	photosystem I subunit III [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO87589	gi 159029229	91	75,744	GTP-binding, Nucleotide- binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	0,51	fusA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87588	gi 159029228	09	44,804	GTP-binding, Nucleotide- binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity	0,52	Elongation factor Tu (EF-Tu) /tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659 801	gi 166367528		111	13,153	reductive pentose- phosphate cycle		monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	0,49	ribulose bisphosphate carboxylase small subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO91151	gi 159030256	38	36,438		glucose metabolic process		NAD binding, NADP binding, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	0,48	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/115	Proteínas
CAO90265	gi 159029605	45	37,231	Manganese	Gluconeogenesis, Metal-binding	glycerol metabolic process, reductive pentose-phosphate cycle	fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase activity	0,47	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86244	gi 159025950	99	44,55	FAD, Flavoprotein, NADP	ferredoxin-NADP+ reductase activity	phycobilisome	ferredoxin-NADP+ reductase activity	0,49	Ferredoxin--NADP reductase [Microcystis aeruginosa PCC 9807]unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH98893	gi 389716930	49	16,473	ATP-binding, Magnesium, Metal-binding, Nucleotide-binding	CTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process, UTP biosynthetic process	cytoplasm	ATP binding, metal ion binding, nucleoside diphosphate kinase activity	0,47	Nucleoside diphosphate kinase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CAO87008	gi 159028376	17	77,947	ATP, Magnesium, Metal-binding, RNA-binding, Nucleotide-binding	acetyl-CoA biosynthetic process, RNA processing, mRNA catabolic process, organic acid metabolic process	cytoplasm	ATP binding, 3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity, acetate kinase activity	0,46	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657460	gi 166365187	62	17,516	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		0,45	phycocyanin alpha subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657856	gi 166365583	12	12,506		regulation of transcription, DNA-templated			0,45	anti-sigma f factor antagonist [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657462	gi 166365189	92	32,088		photosynthesis	phycobilisome		0,43	phycobilisome rod linker polypeptide [Microcystis aeruginosa NIES-843]/ cpcl [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH98787	gi 389717064	44	15,76		peroxidase activity, peroxiredoxin activity		peroxidase activity, peroxiredoxin activity	0,41	putative peroxiredoxin bcp [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
YP_001660682	gi 166368409	51	38,743		iron transport	None.		0,41	iron transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001661107	gi 166368834	44	15,746		antioxidant activity, peroxidase activity		antioxidant activity, peroxidase activity	0,40	bacterioferritin comigratory protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]/putative peroxiredoxin bcp
CCH98487	gi 389717414	68	72,277	Calcium	Magnesium, Metal-binding, thiamine pyrophosphate			0,40	Transketolase (TK) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
YP_722628	gi 113476567	81	20,639	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	0,40	rplE gene product [Trichodesmium erythraeum IMS101]
CAO89807	gi 159028200	42	27,404	RNA-binding, rRNA-binding	translation	small ribosomal subunit	mRNA binding, rRNA binding, structural constituent of ribosome	0,39	rpsC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/115	Proteínas
CAO88453	gi 159030775	41	57,566	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	0,39	groL1 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89619	gi 159027749	25	45,991	NAD	one-carbon metabolic process	cytoplasm	adenosylhomocysteinase activity	0,38	ahcY [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86279	gi 159026025	51	38,051		aromatic amino acid family biosynthetic process		aldehyde-lyase activity, transferase activity	0,37	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89973	gi 159028802	82	51,613	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	0,36	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657459	gi 166365186	72	18,164	Bile pigment, Chromophore	mannitol transport, oxidation-reduction process, photosynthesis	phycobilisome		0,34	phycocyanin beta subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO87341	gi 159028535	63	58,947	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	0,33	groL2 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
AAA27284	gi 154465	52	57,774	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding, response to stress	cytoplasm	ATP binding	0,31	chaperonin 60 [Synechocystis sp.]
YP_001659383	gi 166367110	60	16,723		photosynthesis	integral component of membrane, photosystem I reaction center, thylakoid membrane		0,27	photosystem I reaction center protein subunit XI [Microcystis aeruginosa NIES-843]
NP_439981	gi 16329253	18	77,831	Magnesium, Metal-binding, RNA-binding	RNA processing, mRNA catabolic process	cytoplasm	3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity	0,27	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase [Synechocystis sp. PCC 6803]
CAO90156	gi 159029290	25	67,592	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	0,27	ftsH3/ ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001656041	gi 166363768	61	17,319	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		0,26	apcA / allophycocyanin subunit alpha [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89837	gi 159028395	37	25,83	RNA-binding, rRNA-binding,	regulation of translation, translation	large ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome,	0,25	rplA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(conclusão)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/115	Proteínas
				tRNA-binding			tRNA binding		
YP_001656376	gi 166364103	34	67,746	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress	ATP binding	Acts as a chaperon	0,23	molecular chaperone DnaK [Microcystis aeruginosa NIES-843]
ABK34499	gi 117394905	12	25,106		gas vesicle organization	gas vesicle		0,22	gas vesicle protein C [uncultured Microcystis sp.]
CAO86696	gi 159026977	99	21,817		metal ion binding, superoxide dismutase activity		metal ion binding, superoxide dismutase activity	0,18	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
NP_485782	gi 17229234	33	67,908	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress		ATP binding	0,18	dnaK gene product / molecular chaperone DnaK [Nostoc sp. PCC 7120]

Tabela 8. Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguida de análise no programa Mascot e busca no banco de proteínas geral do NCBI. Comparação entre as diferentes fases de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na fase exponencial (marcador 116). Vermelho. proteínas mais expressas na fase exponencial tardia (marcador 117).

(Continua)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	116/117	Proteínas
AAY34443	gi 63148628	79	21,184		gas vesicle organization	gas vesicle		49,02	gas vesicle structural protein [Microcystis sp. BC 8401]
CAO88098	gi 159028287	20	35,524		light absorption		chloride ion binding	12,56	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88879	gi 159026302	66	51,008		photosynthetic electron transport in photosystem II	light-harvesting complex	chlorophyll binding	9,92	psbC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001655623	gi 166363350	16	65,547		transporter activity	integral component of membrane	transporter activity	6,78	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88947	gi 159026435	03	33,381		cysteine-type peptidase activity		cysteine-type peptidase activity	6,55	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI04196	gi 389731782	52	70,383		Carbon dioxide concentrating mechanism			5,67	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
YP_001657813	gi 166365540	60	60,274		integral component of membrane	transporter activity		5,20	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659801	gi 166367528	11	13,153		reductive pentose-phosphate cycle		monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	5,12	ribulose bisphosphate carboxylase small subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	116/117	Proteínas
CAO88672	gi 159030975	49	82,6	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore	Photosynthesis, protein- chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity	4,89	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1/ psaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86279	gi 159026025	51	38,051		aromatic amino acid family biosynthetic process		aldehyde-lyase activity, transferase activity	4,82	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88147	gi 159028676	59	17,69		fatty acid biosynthetic process, lipid A biosynthetic process	cytoplasm	3-hydroxyoctanoyl-[acyl- carrier-protein] dehydratase activity	4,41	fabZ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657459	gi 166365186	72	18,164	Bile pigment, Chromophore	mannitol transport, oxidation-reduction process, photosynthesis	phycobilisome		4,08	phycocyanin beta subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCI03504	gi 389732587	75	63,821		metallopeptidase activity		metallopeptidase activity	3,88	Predicted secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
YP_001659994	gi 166367721	75	63,834		metallopeptidase activity		metallopeptidase activity	3,88	secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO90156	gi 159029290	25	67,592	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide- binding, Zinc	protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	3,45	ftsH3/ ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001655636	gi 166363363	38	47,665		amino acid transport	outer membrane-bounded periplasmic space		3,42	ABC-type urea transport system substrate- binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657460	gi 166365187	62	17,516	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		2,85	phycocyanin alpha subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO90265	gi 159029605	45	37,231	Manganese	Gluconeogenesis, Metal- binding	glycerol metabolic process, reductive pentose-phosphate cycle	fructose 1,6-bisphosphate 1- phosphatase activity	2,85	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
AAA88634	gi 154573	33	81,637	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore, Iron, Iron- sulfur, Magnesium, Metal-binding	Photosynthesis, protein- chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity	2,78	chlorophyll a/b apoprotein [Synechococcus sp.]
CCH98893	gi 389716930	49	16,473	ATP-binding, Magnesium, Metal-binding, Nucleotide- binding	CTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process, UTP biosynthetic process	cytoplasm	ATP binding, metal ion binding, nucleoside diphosphate kinase activity	2,71	Nucleoside diphosphate kinase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
YP_001659383	gi 166367110	60	16,723		photosynthesis	integral component of membrane, photosystem I		2,61	photosystem I reaction center protein subunit XI [Microcystis aeruginosa NIES-]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	116/117	Proteínas
						reaction center, thylakoid membrane			843]
YP_001660757	gi 166368484	12	22,685	RNA-binding, rRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome	2,57	50S ribosomal protein L3/ rplC [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001656376	gi 166364103	34	67,746	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress	ATP binding	Acts as a chaperon	2,28	molecular chaperone DnaK [Microcystis aeruginosa NIES-843]
AAA27284	gi 86606865	8,947		ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding, response to stress	cytoplasm	ATP binding	2,27	groL2 [Microcystis aeruginosa/ chaperonin 60 PCC 7806]
NP_485782	gi 17229234	33	67,908	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress		ATP binding	2,17	dnaK gene product / molecular chaperone DnaK [Nostoc sp. PCC 7120]
CAO89837	gi 159028395	37	25,83	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	regulation of translation, translation	large ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	2,17	rplA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88754	gi 159025964	14	66,546	ATP, Nucleotide-binding	ATP binding, nucleoside-triphosphatase activity		ATP binding, nucleoside-triphosphatase activity	2,16	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87645	gi 159029497	92	32,213		photosynthesis	phycobilisome		2,56	cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]/ phycobilisome rod linker polypeptide
YP_001660682	gi 166368409	51	38,743		iron transport system	None.		2,48	iron transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCIO3033	gi 389733164	64	60,784		integral component of membrane	transporter activity		2,47	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
YP_722628	gi 113476567	81	20,639	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	2,45	rplE gene product [Trichodesmium erythraeum IMS101]
CCIO3993	gi 389732000	56	49,73		Phage tail sheath protein			2,39	Phage tail sheath protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO91151	gi 159030256	38	36,438		glucose metabolic process		NAD binding, NADP binding, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	2,37	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
NP_441966	gi 16331238	1	8,828	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem I	photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding, oxidoreductase activity	2,37	photosystem I subunit VII [Synechocystis sp. PCC 6803]
CAO87008	gi 159028376	17	77,947	ATP, Magnesium, Metal-binding, RNA-binding, Nucleotide-	acetyl-CoA biosynthetic process, RNA processing, mRNA catabolic process, organic acid metabolic process	cytoplasm	ATP binding, 3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide	2,05	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	116/117	Proteínas
				binding			nucleotidyltransferase activity, acetate kinase activity		
CAO88566	gi 159030885	44	59,093	Magnesium, Metal-binding	carbohydrate metabolic process		intramolecular transferase activity, phosphotransferases, magnesium ion binding	2,04	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI04196	gi 389731782	52	70,383		Carbon dioxide concentrating			2,02	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO87589	gi 159029229	91	75,744	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	1,92	fusA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH91355	gi 389679901	41	25,845	Zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity	1,86	Carbonic anhydrase [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH91132	gi 389680157	91	21,195		response to stress			1,85	General stress protein 16U [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CAO90410	gi 159030029	61	59,181	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	isoleucine biosynthetic process, valine biosynthetic process		4 iron, 4 sulfur cluster binding, dihydroxy-acid dehydratase activity, metal ion binding	1,84	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89299	gi 159027205	02	53,979	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	1,81	atpA / ATP synthase subunit alpha, membrane-bound, F1 sector [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89973	gi 159028802	82	51,613	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	1,79	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657856	gi 166365583	12	12,506		regulation of transcription, DNA-templated			1,77	anti-sigma f factor antagonist [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88453	gi 159030775	41	57,566	ATP-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	1,72	groL1 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89332	gi 159027237	33	37,775	ATP-binding, Nucleotide-binding	carbohydrate metabolic process		ATP binding, phosphoribulokinase activity	1,68	prK [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90013	gi 159029027	90	42,663		catalytic activity		catalytic activity	1,62	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
NP_439981	gi 16329253	18	77,831	Magnesium,, Metal-binding, RNA-binding	RNA processing, mRNA catabolic process	cytoplasm	3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding,	1,61	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase [Synechocystis sp. PCC 6803]

(conclusão)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	116/117	Proteínas
							polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity		
YP_001659743	gi 166367470	64	18,123		photosynthesis	photosystem I reaction center		1,57	photosystem I subunit III [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO89669	gi 159027866	36	14,659		response to stress			1,50	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89619	gi 159027749	25	45,991	NAD	one-carbon metabolic process	cytoplasm	adenosylhomocysteinase activity	1,50	ahcY [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI04895	gi 389730996	03	11,205	2Fe-2S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	electron transport chain		2 iron, 2 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding	1,47	Ferredoxin [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
YP_001661107	gi 166368834	44	15,746		antioxidant activity, peroxidase activity		antioxidant activity, peroxidase activity	1,42	bacterioferritin comigratory protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]/putative peroxiredoxin bcp
YP_001658313	gi 166366040	08	55,898		photosynthetic electron transport chain	photosystem II	chlorophyll binding	1,22	photosystem II core light harvesting protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO86244	gi 159025950	99	44,55	FAD, Flavoprotein, NADP	ferredoxin-NADP+ reductase activity	phycobilisome	ferredoxin-NADP+ reductase activity	0,60	Ferredoxin--NADP reductase [Microcystis aeruginosa PCC 9807]unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88327	gi 159030657	7	8,42		photosynthesis	photosystem I reaction center, thylakoid membrane		0,60	psaE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659290	gi 166367017	09	44,918	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	0,58	Elongation factor Tu (EF-Tu) /tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI05346	gi 389676976	20	35,54		light absorption, transport	phycobilisome	chloride ion binding	0,57	Orange carotenoid-binding protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCH98487	gi 389717414	68	72,277	Calcium, Magnesium, Metal-binding, Thiamine pyrophosphate	metal ion binding, transketolase activity		metal ion binding, transketolase activity	0,57	Transketolase (TK) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CAO91267	gi 159030372	73	53,04	ATP-binding, Nucleotide-binding	glutamine biosynthetic process,nitrogen fixation	cytoplasm	ATP binding, glutamate-ammonia ligase activity	0,54	glnA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86696	gi 159026977	99	21,817		metal ion binding, superoxide dismutase activity		metal ion binding, superoxide dismutase activity	0,25	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

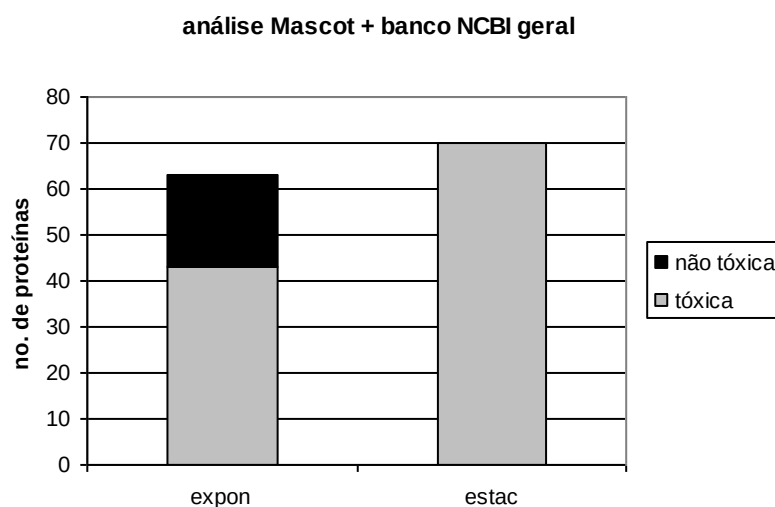
5.8.2.2 Comparação entre as linhagens tóxica e não tóxica na fase exponencial e exponencial tardia de crescimento

Quando as linhagens tóxica e não tóxica foram comparadas entre si em relação cada fase de crescimento: 1) na fase exponencial de crescimento, das 63 proteínas diferencialmente expressas, 43 proteínas foram mais expressas na linhagem tóxica do que na não tóxica e 20 proteínas foram mais expressas na linhagem não tóxica (figura 35 A); 2) na fase exponencial tardia de crescimento, todas as 70 proteínas identificadas foram mais expressas na linhagem tóxica (figura 35 A). Estes dados foram obtidos pela análise do programa Mascot e busca no banco de dados geral de proteínas do NCBI.

No caso da análise com o ProteinLynx e banco de *Microcystis*, na fase exponencial de crescimento, das 14 proteínas diferencialmente expressas, 6 proteínas foram mais expressas na linhagem tóxica do que na não tóxica e 8 proteínas foram mais expressas na linhagem não tóxica (figura 35 B); 2) na fase exponencial tardia de crescimento, das 17 proteínas diferencialmente expressas, 3 proteínas foram mais expressas na linhagem tóxica do que na não tóxica e 14 proteínas foram mais expressas na linhagem não tóxica (figura 35 B).

Mais uma vez, devido ao número superior de proteínas diferencialmente expressas encontradas na primeira abordagem, esta foi escolhida e nas tabelas a seguir são apresentadas as listas de proteínas diferencialmente expressas em cada fase de crescimento comparando as linhagens (tabelas 8 e 9). A partir destes dados os resultados são discutidos. Já as tabelas de proteínas diferencialmente expressas identificadas por ProteinLynx encontram-se no anexo 11.

A



B

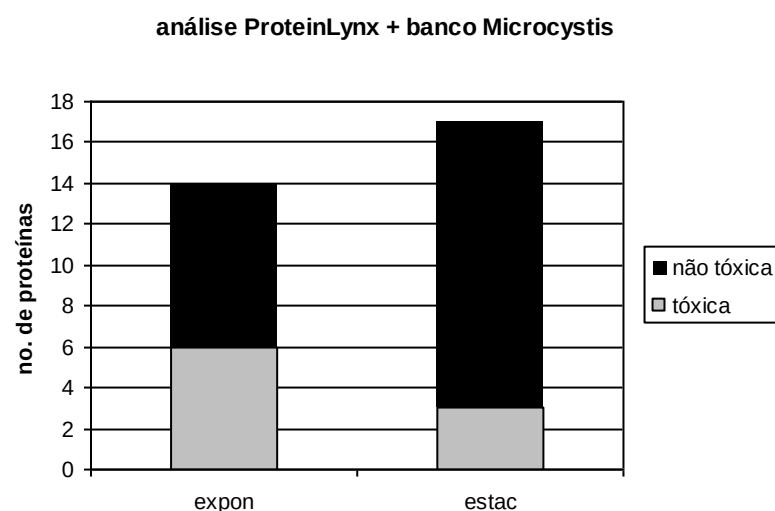


Figura 35. Número de proteínas diferencialmente mais expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica), por marcação com iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, comparando as diferentes linhagens em cada fase de crescimento. (a) Resultados da análise por Mascot e busca no banco geral de proteínas do NCBI. (b) Resultados da análise por ProteinLynx e busca no banco de proteínas de *Microcystis*.

Na fase exponencial, as diferenças mais acentuadas entre as duas linhagens estiveram relacionadas ao crescimento celular, componentes integrais de membrana, absorção de luz, síntese de nucleotídeos e fotorrespiração, sendo estas proteínas mais expressas na linhagem não tóxica. Enquanto isso, o metabolismo de carboidratos, metabolismo energético,

biossíntese de aminoácidos e glutamina e peptidases foram mais expressos na linhagem tóxica (figura 36).

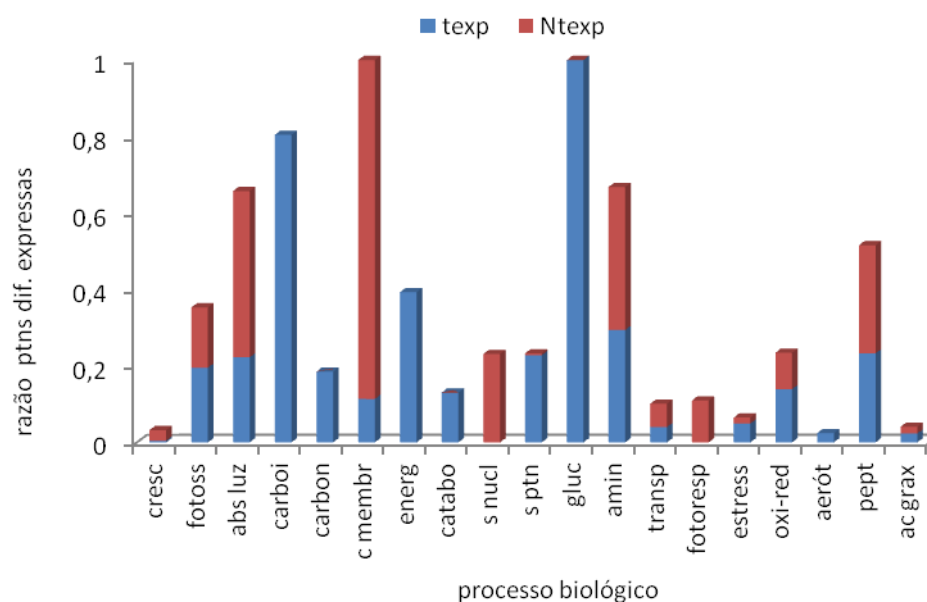


Figura 36. Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt31006 (não tóxica), comparação na fase de crescimento exponencial, por marcação com iTRAQ. O agrupamento foi realizado pela soma das proteínas de um mesmo processo biológico mais expressas na linhagem tóxica e mais expressas na não tóxica, posteriormente os dados foram transformados (log ranging). O valor 1 representa o máximo de expressão. Crescimento celular (cresc), fotossíntese (fotoss), absorção de luz (abs. luz), metabolismo de carboidratos (met. car), processos relacionados ao carbono (carbon), componente de membrana (c membr), metabolismo energético (energ), processo catalítico (proc cat), processo catabólico (proc catabo), síntese de nucleotídeo (s nucl.), síntese de proteínas (s ptn), síntese de glutamina (gluc), síntese de aminoácidos (amin), transporte de proteína (transp), fotorrespiração (fotorresp), proteínas relacionadas ao estresse (estresse), processo de oxidação-redução (oxi-red), aerótopos (aerót), peptidase (pept), síntese de ácidos graxos (ac grax).

Já na fase exponencial tardia a linhagem tóxica mostrou metabolismo mais ativo e todas as funções estavam mais expressas em relação à linhagem não tóxica (figura 37).

Nenhuma das proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens estava relacionada diretamente com a síntese de microcistinas. Alexova et al. (2011b) realizaram amplo estudo de proteômica envolvendo seis linhagens de *Microcystis* e também não encontraram nenhuma proteína responsável pela síntese desta toxina ou que pudesse ser identificada como exclusiva de linhagens tóxicas ou não tóxicas. Do mesmo modo, Tonietto et al. (2012), realizaram estudo comparativo dos proteomas de duas cepas, sendo uma tóxica *M. aeruginosa* (PCC 7820) e a outra não tóxica (NIVA CYA43). Entre as proteínas diferencialmente expressas, não foram observadas enzimas diretamente envolvidas na biossíntese da microcistina.

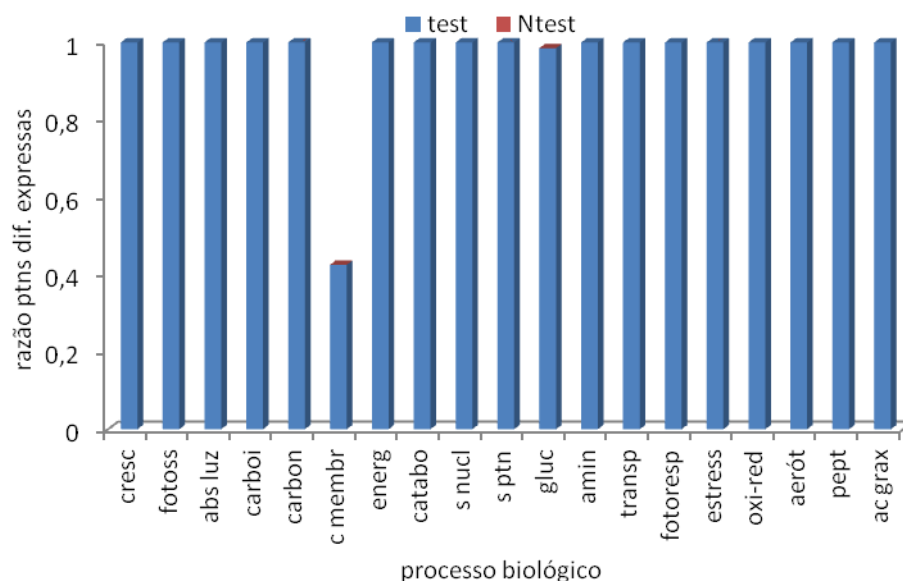


Figura 37. Proteínas diferencialmente expressas agrupadas por processo biológico, a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt31006 (não tóxica), comparação na fase de crescimento exponencial tardia, por marcação com iTRAQ. O valor 1 representa o máximo de expressão. O agrupamento foi realizado pela soma das proteínas de um mesmo processo biológico mais expressas na linhagem tóxica e mais expressas na não tóxica, posteriormente os dados foram transformados (log ranging). Crescimento celular (cresc), fotossíntese (fotoss), absorção de luz (abs. luz), metabolismo de carboidratos (met. car), processos relacionados ao carbono (carbon), componente de membrana (c membr), metabolismo energético (energ), processo catalítico (proc cat), Processo catabólico (proc catabo), síntese de nucleotídeo (s nucl.), síntese de proteínas (s ptn), síntese de glutamina (gluc), síntese de aminoácidos (amin), transporte de proteína (transp), fotorrespiração (fotoresp), proteínas relacionadas ao estresse (estresse), processo de oxidação-redução (oxi-red), aerótopos (aerót), peptidase (pept), síntese de ácidos graxos (ac grax).

Tabela 9. Proteínas expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguida de análise no programa Mascot e busca no banco de proteínas geral do NCBI. Comparação entre as diferentes linhagens na fase exponencial de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na linhagem tóxica (marcador 114). Vermelho. proteínas mais expressas na linhagem não tóxica (marcador 116)

(continua)

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/116	Proteínas
NP_441966	gi 16331238	81	8,828	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem I	photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding, oxidoreductase activity	5,99	photosystem I subunit VII [Synechocystis sp. PCC 6803]
CCH95263	gi 389675643	277	29,823		Photosynthesis, photosystem II stabilization	cell outer membrane, extrinsic component of membrane, integral component of membrane, photosystem II oxygen evolving complex	calcium ion binding	5,21	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide [Microcystis aeruginosa PCC 9432]/psbO [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90383	gi 159030003	732	78,543		carbohydrate metabolic process		aldehyde-lyase activity	4,25	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90410	gi 159030029	561	59,181	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	isoleucine biosynthetic process, valine biosynthetic process		4 iron, 4 sulfur cluster binding, dihydroxy-acid dehydratase activity, metal ion binding	3,93	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI04895	gi 389730996	103	11,205	2Fe-2S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	electron transport chain		2 iron, 2 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding	3,86	Ferredoxin [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO91267	gi 159030372	473	53,04	ATP-binding, Nucleotide-binding	glutamine biosynthetic process, nitrogen fixation	cytoplasm	ATP binding, glutamate-ammonia ligase activity	3,35	glnA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI03993	gi 389732000	456	49,73		Phage tail sheath protein			3,21	Phage tail sheath protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO88672	gi 159030975	749	82,6	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity	3,14	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1/ psaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAE11903	gi 38348662	136	14,776		gas vesicle	gas vesicle, vacuole, vesicle membrane	structural molecule activity	3,07	gas vesicle protein GvpJ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
AAA88634	gi 154573	733	81,637	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore, Iron, Iron-sulfur, Magnesium, Metal-binding	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity	2,97	chlorophyll a/b apoprotein [Synechococcus sp.]
CCH91132	gi 389680157	191	21,195		response to stress			2,73	General stress protein 16U [Microcystis

(continuação)

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/116	Proteínas
									aeruginosa PCC 9432]
CAO89299	gi 159027205	502	53,979	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	2,70	atpA / ATP synthase subunit alpha, membrane-bound, F1 sector [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH91355	gi 389679901	241	25,845	Zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity	2,66	Carbonic anhydrase [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CAO87588	gi 159029228	409	44,804	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity	2,47	Elongation factor Tu (EF-Tu) / tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88947	gi 159026435	303	33,381		peptidase activity		cysteine-type peptidase activity	2,27	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88566	gi 159030885	544	59,093	Magnesium, Metal-binding	carbohydrate metabolic process		intramolecular transferase activity, phosphotransferases, magnesium ion binding	2,24	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH98787	gi 389717064	144	15,76		peroxidase activity, peroxiredoxin activity		peroxidase activity, peroxiredoxin activity	2,19	putative peroxiredoxin bcp [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
YP_001658313	gi 166366040	508	55,898		photosynthetic electron transport chain	photosystem II	chlorophyll binding	2,16	photosystem II core light harvesting protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCI04196	gi 389731782	652	70,383		Carbon dioxide concentrating			2,11	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO88147	gi 159028676	159	17,69		fatty acid biosynthetic process, lipid A biosynthetic process	cytoplasm	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	2,01	fabZ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001660682	gi 166368409	351	38,743		iron transport			1,96	iron transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001661107	gi 166368834	144	15,746		antioxidant activity, peroxidase activity		antioxidant activity, peroxidase activity	1,94	bacterioferritin comigratory protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]/putative peroxiredoxin bcp
CCI05346	gi 389676976	320	35,54		light absorption, transport	phycobilisome	chloride ion binding	1,92	Orange carotenoid-binding protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO88327	gi 159030657	77	8,42		photosynthesis	photosystem I reaction center, thylakoid membrane		1,91	psaE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
AAAY34443	gi 63148628	179	21,184		gas vesicle organization	gas vesicle		1,89	gas vesicle structural protein [Microcystis sp. BC 8401]
CAO90265	gi 159029605	345	37,231	Manganese	Gluconeogenesis, Metal-binding	glycerol metabolic process, reductive pentose-phosphate cycle	fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase activity	1,80	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(continuação)

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/116	Proteínas
CAO90013	gi 159029027	390	42,663		catalytic activity		catalytic activity	1,79	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88754	gi 159025964	614	66,546	ATP, Nucleotide-binding	ATP binding, nucleoside-triphosphatase activity		ATP binding, nucleoside-triphosphatase activity	1,66	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659743	gi 166367470	164	18,123		photosynthesis	photosystem I reaction center		1,61	photosystem I subunit III [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO87008	gi 159028376	717	77,947	ATP, Magnesium, Metal-binding, RNA-binding, Nucleotide-binding	acetyl-CoA biosynthetic process, RNA processing, mRNA catabolic process, organic acid metabolic process	cytoplasm	ATP binding, 3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity, acetate kinase activity	1,60	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89837	gi 159028395	237	25,83	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	regulation of translation, translation	large ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	1,58	rplA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89973	gi 159028802	482	51,613	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	1,57	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659808	gi 166367535	103	11,084		carbon dioxide concentrating			1,57	carbon dioxide concentrating mechanism protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO89669	gi 159027866	136	14,659		response to stress			1,55	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
gi 159028287	CAO88098	320	35,524		light absorption		chloride ion binding	1,54	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87645	gi 159029497	292	32,213		photosynthesis	phycobilisome		1,51	cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]/ phycobilisome rod linker polypeptide
CAO87341	gi 159028535	563	58,947	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	1,48	groL2 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659290	gi 166367017	409	44,918	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	1,48	Elongation factor Tu (EF-Tu) /tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH98487	gi 389717414	668	72,277	Calcium, Magnesium, Metal-binding, Thiamine pyrophosphate	Transketolase			1,43	Transketolase (TK) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CAO87589	gi 159029229	691	75,744	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	1,39	fusA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/116	Proteínas
CAO88453	gi 159030775	541	57,566	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	1,35	groL1 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
NP_485782	gi 17229234	633	67,908	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress		ATP binding	1,27	dnaK gene product / molecular chaperone DnaK [Nostoc sp. PCC 7120]
CAO90156	gi 159029290	625	67,592	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	1,27	ftsH3/ ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659803	gi 166367530	471	52,544	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle		magnesium ion binding, monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	0,80	ribulose bisphosphate carboxylase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657856	gi 166365583	112	12,506		regulation of transcription, DNA-templated			0,76	anti-sigma f factor antagonist [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_722628	gi 113476567	181	20,639	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	0,75	rplE gene product [Trichodesmium erythraeum IMS101]
YP_001659801	gi 166367528	111	13,153		reductive pentose-phosphate cycle		monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	0,74	ribulose bisphosphate carboxylase small subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657460	gi 166365187	162	17,516	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		0,65	phycocyanin alpha subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657813	gi 166365540	560	60,274		integral component of membrane	transporter activity		0,65	porin type major outer membrane protein 1 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO86244	gi 159025950	399	44,55	FAD, Flavoprotein, NADP	ferredoxin-NADP+ reductase activity	phycobilisome	ferredoxin-NADP+ reductase activity	0,65	Ferredoxin--NADP reductase [Microcystis aeruginosa PCC 9807]unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001655636	gi 166363363	438	47,665		amino acid transport	outer membrane-bounded periplasmic space		0,64	ABC-type urea transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO86553	gi 159026621	172	18.159		protein folding		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	0,64	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001658523	gi 166366250	432	46,543	Magnesium, Metal-binding	glycolytic process	cell surfasse, extracellular region, phosphopyruvate hydratase complex	magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	0,60	phosphopyruvate hydratase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88879	gi 159026302	466	51,008		photosynthetic electron transport in photosystem II	light-harvesting complex, photosystem II	chlorophyll binding, electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport	0,59	psbC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

(conclusão)

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	114/116	Proteínas
							pathway of photosynthesis activity		
CAO86279	gi 159026025	351	38,051		aromatic amino acid family biosynthetic process		aldehyde-lyase activity, transferase activity	0,50	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001655623	gi 166363350	616	65,547		integral component of membrane, transporter activity	integral component of membrane	transporter activity	0,47	porin type major outer membrane protein 2 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001656041	gi 166363768	161	17,319	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		0,46	apcA / allophycocyanin subunit alpha [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657459	gi 166365186	172	18,164	Bile pigment, Chromophore	mannitol transport, oxidation-reduction process, photosynthesis	phycobilisome		0,46	phycocyanin beta subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
AAA27284	gi 86606865	563	58,947	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding, response to stress	cytoplasm	ATP binding	0,31	groL2 [Microcystis aeruginosa/ chaperonin 60 PCC 7806]
YP_001659383	gi 166367110	160	16,723		photosynthesis	integral component of membrane, photosystem I reaction center, thylakoid membrane		0,30	photosystem I reaction center protein subunit XI [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659994	gi 166367721	575	63,834		metallopeptidase activity		metallopeptidase activity	0,30	secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001660757	gi 166368484	212	22,685	RNA-binding, rRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome	0,29	50S ribosomal protein L3/ rplC [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCH98893	gi 389716930	149	16,473	ATP-binding, Magnesium, Metal-binding, Nucleotide-binding	CTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process, UTP biosynthetic process	cytoplasm	ATP binding, metal ion binding, nucleoside diphosphate kinase activity	0,27	Nucleoside diphosphate kinase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]

Tabela 10. Proteínas expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguida de análise no programa Mascot e busca no banco de proteínas geral do NCBI. Comparação entre as diferentes linhagens na fase exponencial tardia de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na linhagem tóxica (marcador 115)

(continua)

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	115/117	Proteínas
CAO89837	gi 159028395	237	25,83	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	regulation of translation, translation	large ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	362,65	rplA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001660682	gi 166368409	351	38,743		iron transport	None.		296,46	iron transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	115/117	Proteínas
AAAY34443	gi 63148628	179	21,184		gas vesicle organization	gas vesicle		197,49	gas vesicle structural protein [Microcystis sp. BC 8401]
YP_001656376	gi 166364103	634	67,746	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress	ATP binding	Acts as a chaperon	189,06	molecular chaperone DnaK [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88327	gi 159030657	77	8,42		photosynthesis	photosystem I reaction center, thylakoid membrane		173,53	psaE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659290	gi 166367017	409	44,918	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	126,01	Elongation factor Tu (EF-Tu) /tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH95263	gi 389675643	277	29,823		Photosynthesis, photosystem II stabilization	cell outer membrane, extrinsic component of membrane, integral component of membrane, photosystem II oxygen evolving complex	calcium ion binding	111,42	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide [Microcystis aeruginosa PCC 9432]/psbO [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659803	gi 166367530	471	52,544	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle		magnesium ion binding, monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	73,10	ribulose bisphosphate carboxylase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88098	gi 159028287	320	35,52		light absorption, transport		chloride ion binding	25,91	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
NP_485782	gi 17229234	633	67,908	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress		ATP binding	18,43	dnaK gene product / molecular chaperone DnaK [Nostoc sp. PCC 7120]
CCI05346	gi 389676976	320	35,54		light absorption, transport	phycobilisome	chloride ion binding	13,17	Orange carotenoid-binding protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO88672	gi 159030975	749	82,6	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity	10,19	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1/ psaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90156	gi 159029290	625	67,592	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	9,76	ftsH3/ ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659801	gi 166367528		111		reductive pentose-phosphate cycle		monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	9,26	ribulose bisphosphate carboxylase small subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO90410	gi 159030029	561	59,181	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	isoleucine biosynthetic process, valine biosynthetic process		4 iron, 4 sulfur cluster binding, dihydroxy-acid dehydratase activity, metal ion binding	8,86	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI04196	gi 389731782	652	70,383		Carbon dioxide concentrating			8,49	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [Microcystis aeruginosa

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	115/117	Proteínas
									PCC 9443]
CCH98787	gi 389717064	144	15,76		peroxidase activity, peroxiredoxin activity		peroxidase activity, peroxiredoxin activity	8,47	putative peroxiredoxin bcp [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CAE11903	gi 38348662	136	14,776		gas vesicle	gas vesicle, vacuole, vesicle membrane	structural molecule activity	8,20	gas vesicle protein GvpJ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90265	gi 159029605	345	37,231	Manganese	Gluconeogenesis, Metal- binding	glycerol metabolic process, reductive pentose-phosphate cycle	fructose 1,6-bisphosphate 1- phosphatase activity	7,89	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88453	gi 159030775	541	57,566	ATP-binding, Nucleotide- binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	7,62	groL1 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657 459	gi 166365186	172	18,164	Bile pigment, Chromophore	mannitol transport, oxidation-reduction process, photosynthesis	phycobilisome		7,42	phycocyanin beta subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO86279	gi 159026025	351	38,051		aromatic amino acid family biosynthetic process		aldehyde-lyase activity, transferase activity	7,17	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88879	gi 159026302	466	51,008		photosynthetic electron transport in photosystem II	light-harvesting complex, photosystem II	chlorophyll binding, electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity	6,78	psbC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88754	gi 159025964	614	66,546	ATP, Nucleotide- binding	ATP binding, nucleoside- triphosphatase activity		ATP binding, nucleoside- triphosphatase activity	6,76	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87008	gi 159028376	717	77,947	ATP, Magnesium, Metal-binding, RNA-binding, Nucleotide- binding	acetyl-CoA biosynthetic process, RNA processing, mRNA catabolic process, organic acid metabolic process	cytoplasm	ATP binding, 3'-5'- exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity, acetate kinase activity	6,34	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87589	gi 159029229	691	75,744	GTP-binding, Nucleotide- binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	6,20	fusA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89973	gi 159028802	482	51,613	ATP-binding, Nucleotide- binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton- transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	6,08	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88947	gi 159026435	303	33,381		cysteine-type peptidase activity		cysteine-type peptidase activity	5,70	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91151	gi 159030256	338	36,438		glucose metabolic process		NAD binding, NADP	5,36	unnamed protein product [Microcystis

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	115/117	Proteínas
							binding, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor		aeruginosa PCC 7806]
CAO89619	gi 159027749	425	45,991	NAD	one-carbon metabolic process	cytoplasm	adenosylhomocysteinase activity	5,25	ahcY [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_722628	gi 113476567	181	20,639	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	5,24	rplE gene product [Trichodesmium erythraeum IMS101]
CAO89807	gi 159028200	242	27,404	RNA-binding, rRNA-binding	translation	small ribosomal subunit	mRNA binding, rRNA binding, structural constituent of ribosome	5,17	rpsC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001661107	gi 166368834	144	15,746		antioxidant activity, peroxidase activity		antioxidant activity, peroxidase activity	5,15	bacterioferritin comigratory protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]/putative peroxiredoxin bcp
AAA27284	gi 86606865	563	58,947	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding, response to stress	cytoplasm	ATP binding	5,13	groL2 [Microcystis aeruginosa/ chaperonin 60 PCC 7806]
NP_439981	gi 16329253	718	77,831	Magnesium, Metal-binding, RNA-binding	RNA processing, mRNA catabolic process	cytoplasm	3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity	4,87	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase [Synechocystis sp. PCC 6803]
YP_001657813	gi 166365540	560	60,274		integral component of membrane	transporter activity		4,76	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO88566	gi 159030885	544	59,093	Magnesium, Metal-binding	carbohydrate metabolic process		intramolecular transferase activity, phosphotransferases, magnesium ion binding	4,75	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88147	gi 159028676	159	17,69		fatty acid biosynthetic process, lipid A biosynthetic process	cytoplasm	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	4,66	fabZ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH91355	gi 389679901	241	25,845	Zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity	4,66	Carbonic anhydrase [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
YP_001659743	gi 166367470	164	18,123		photosynthesis	photosystem I reaction center		4,39	photosystem I subunit III [Microcystis aeruginosa NIES-843]
AAA88634	gi 154573	733	81,637	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore, Iron, Iron-sulfur, Magnesium, Metal-binding	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity	4,36	chlorophyll a/b apoprotein [Synechococcus sp.]

(continuação)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	115/117	Proteínas
YP_001657460	gi 166365187	162	17,516	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		4,13	phycocyanin alpha subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001656041	gi 166363768	161	17,319	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		4,10	apcA / allophycocyanin subunit alpha [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659383	gi 166367110	160	16,723		photosynthesis	integral component of membrane, photosystem I reaction center, thylakoid membrane		3,99	photosystem I reaction center protein subunit XI [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001655623	gi 166363350	616	65,547		transporter activity	integral component of membrane	transporter activity	3,81	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO89299	gi 159027205	502	53,979	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	3,64	atpA / ATP synthase subunit alpha, membrane-bound, F1 sector [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657856	gi 166365583	112	12,506		regulation of transcription, DNA-templated			3,48	anti-sigma f factor antagonist [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO90383	gi 159030003	732	78,543		carbohydrate metabolic process		aldehyde-lyase activity	3,47	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
S16200	gi 97733	28,381			carbohydrate metabolic process			3,40	photosystem I iron-sulfur protein psaC - Calothrix sp. (PCC 7601)
CCl03993	gi 389732000	456	49,73		Phage tail sheath protein			3,40	Phage tail sheath protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCl04895	gi 389730996	103	11,205	2Fe-2S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	electron transport chain		2 iron, 2 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding	3,35	Ferredoxin [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO87645	gi 159029497	292	32,213		photosynthesis	phycobilisome		3,34	cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]/ phycobilisome rod linker polypeptide
CAO89669	gi 159027866	136	14,659		response to stress			3,33	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91267	gi 159030372	473	53,04	ATP-binding, Nucleotide-binding	glutamine biosynthetic process, nitrogen fixation	cytoplasm	ATP binding, glutamate-ammonia ligase activity	3,30	glnA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
NP_441966	gi 16331238	81	8,828	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem I	photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding, oxidoreductase activity	2,98	photosystem I subunit VII [Synechocystis sp. PCC 6803]

(conclusão)

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	115/117	Proteínas
CCH98893	gi 389716930	149	16,473	ATP-binding, Magnesium, Metal-binding, Nucleotide-binding	CTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process, UTP biosynthetic process	cytoplasm	ATP binding, metal ion binding, nucleoside diphosphate kinase activity	2,83	Nucleoside diphosphate kinase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CAO89332	gi 159027237	333	37,775	ATP-binding, Nucleotide-binding	carbohydrate metabolic process		ATP binding, phosphoribulokinase activity	2,82	prK [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001658523	gi 166366250	432	46,543	Magnesium, Metal-binding	glycolytic process	cell surfasse, extracellular region, phosphopyruvate hydratase complex	magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	2,67	phosphopyruvate hydratase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCH91132	gi 389680157	191	21,195		response to stress			2,59	General stress protein 16U [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH98487	gi 389717414	668	72,277	Calcium, Magnesium, Metal-binding, Thiamine pyrophosphate	Transketolase		metal ion binding, transketolase activity	2,32	Transketolase (TK) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
YP_001658313	gi 166366040	508	55,898		photosynthetic electron transport chain	photosystem II	chlorophyll binding	2,30	photosystem II core light harvesting protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001655636	gi 166363363	438	47,665		amino acid transport	outer membrane-bounded periplasmic space		2,27	ABC-type urea transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CCI03033	gi 389733164	564	60,784		integral component of membrane	transporter activity		2,06	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
YP_001659808	gi 166367535	103	11,084		carbon dioxide concentrating			1,97	carbon dioxide concentrating mechanism protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO90013	gi 159029027	390	42,663		catalytic activity		catalytic activity	1,74	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCI03504	gi 389732587	575	63,821		metallopeptidase activity		metallopeptidase activity	1,61	Predicted secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CAO86244	gi 159025950	399	44,55	FAD, Flavoprotein, NADP	ferredoxin-NADP+ reductase activity	phycobilisome	ferredoxin-NADP+ reductase activity	1,50	Ferredoxin--NADP reductase [Microcystis aeruginosa PCC 9807]unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001660757	gi 166368484	212	22,685	RNA-binding, rRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome	1,43	50S ribosomal protein L3/ rplC [Microcystis aeruginosa NIES-843]
CAO86696	gi 159026977	199	21,817		metal ion binding, superoxide dismutase activity		metal ion binding, superoxide dismutase activity	1,41	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86553	gi 159026621	172	18.159		protein folding		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	1,37	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

A análise de componentes principais (ACP), considerando as diferentes linhagens de *M. aeruginosa* (tóxica e não tóxica), nas diferentes fases de crescimento (exponencial e exponencial tardia), resumiu 80,5% da variabilidade conjunta dos dados em seus dois primeiros componentes (figura 38, tabela 11). Do lado positivo do eixo 1, estão ordenados todos os parâmetros associados à linhagem não tóxica (figura 38, tabela 11). Do lado negativo do eixo 1, estão ordenados todos os parâmetros associados à linhagem tóxica (figura 38, tabela 11). O eixo 2 ordenou, do lado positivo, a fase exponencial tardia de crescimento, enquanto do lado negativo a fase exponencial (figura 38).

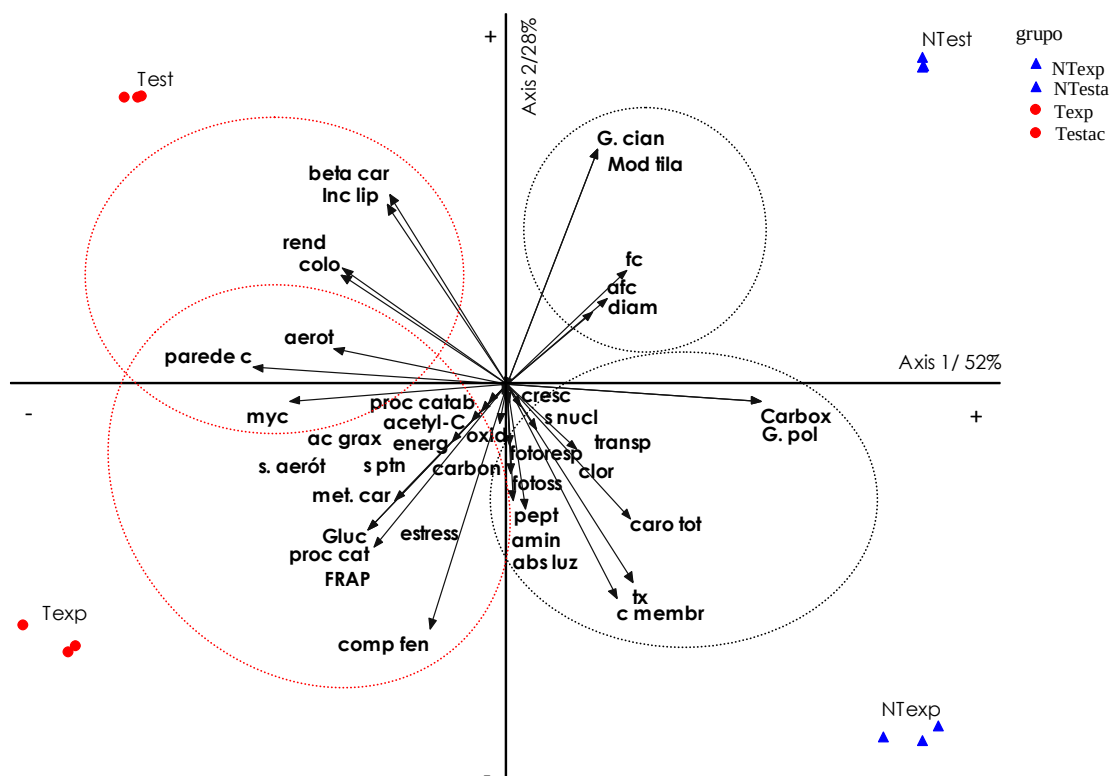


Figura 38. Ordenação biplot pela análise dos componentes principais (APC) com base nas diferentes fases de crescimento (exponencial e exponencial tardia), para as linhagens tóxica e não tóxica de *M. aeruginosa*, 39 parâmetros, abreviações conforme tabela 11

Tabela 11. Síntese dos resultados da APC realizada a partir de 39 parâmetros (n= 3). Coeficientes de correlação de Pearson com base nas diferentes fases de crescimento (exponencial e exponencial tardia), para as linhagens tóxica e não tóxica de *M. aeruginosa*

Processos biológicos	Eixo 1	Eixo 2
Taxa de crescimento (tx)	,569	-,661
Rendimento celular (rend)	-,685	,358
Tamanho das colônias (colo)	-,796	,385
Espessura da parede celular (parede celular)	-,997	,048
Tamanho do diâmetro celular (diam)	,629	,387
Quantidade de aerótopos (aerot)	-,885	,133
Quantidade de carboxissomos (carbox)	,997	-,048
Quantidade de grânulos de cianoficinas (G. cian)	,433	,834
Quantidade de grânulos de polifosfato (G. pol)	,997	-,048
Quantidade de inclusões lipídicas (Inc lip)	-,667	,736
Modificações no tilácoides (mod tila)	,433	,834
Potencial de compostos fenólicos (Comp fen)	-,362	-,852
Potencial de redução do ferro (FRAP)	-,743	-,668
Concentração de clorofila (clor) total	,407	-,278
Concentração de carotenóides totais (caro total)	,751	-,607
Concentração de betacaroteno (beta carot)	-,572	,683
Concentração de aloficocianina (afc)	,596	,375
Concentração de ficocianina (fc)	,662	,461
Concentração de microcistinas (mcy)	-,993	-,058
Proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos (met. Car)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas à fotossíntese (fotos)	,058	-,998
Proteínas relacionadas ao estresse (estresse)	-,479	-,736
Proteínas relacionadas à absorção de luz (abs. luz)	,188	-,974
Proteínas relacionadas aos processos de carbono (Carbon)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas ao componente de membrana (c membr)	,514	-,740
Proteínas relacionadas à organização dos aerótopos (aerót)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas ao transporte (transp)	,156	-,983
Proteínas relacionadas a peptidases (pept)	,047	-,999
Proteínas relacionadas à síntese de aminoácidos (amin)	,070	-,997
Proteínas relacionadas à síntese de ácidos graxos (ac grax)	-,188	-,956
Proteínas relacionadas aos processos catalíticos (proc cat)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas aos processos de oxidação-redução (oxidativo)	-,239	-,933
Proteínas relacionadas à síntese de glutamina (gluc)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas à síntese de nucleotídeos (s nucl.)	,569	-,661
Proteínas relacionadas à síntese de Acetilcoenzima A (acetyl-C)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas à síntese de proteínas (s ptn)	-,512	-,693
Proteínas relacionadas à síntese de energia (energ)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas à fotorrespiração (Fotoresp)	,569	-,661
Proteínas relacionadas ao processo catabólico (proc cat)	-,631	-,485
Proteínas relacionadas ao crescimento celular (cresc)	,493	-,766
Porcentagem de variância explicada	52	52
Porcentagem de variância acumulada	28	80

O fato da linhagem não tóxica possuir metabolismo mais ativo na fase exponencial, com maior número de proteínas mais expressas, reflete a maior taxa de crescimento observada nesta fase e no momento da coleta (5 dias), em comparação com a linhagem tóxica (figuras 33 e 34). O crescimento mais acentuado da linhagem não tóxica correspondeu também a um maior acúmulo de proteínas relacionadas ao próprio crescimento e à síntese de nucleotídeos e aminoácidos (figura 38). Notou-se ainda a maior síntese de peptidases, cuja atividade pode estar ligada à demanda por síntese e remodelamento do peptidoglicano durante a divisão celular.

Também de acordo com esta situação, houve expressão significativa de componentes de membrana e funções dedicadas ao transporte. A linhagem não tóxica apresentou-se mais ativa na captação de íons (figuras 36 e 38, tabela 11) importantes para o funcionamento de muitas enzimas, fato observado também por Tonietto et al. (2012). Em cianobactérias, a barreira mecânica em função das membranas e da parede celular afeta a permeabilidade de várias moléculas grandes, permitindo a entrada apenas de íons, provavelmente porque compostos orgânicos são sintetizados pela própria célula (Hoiczky et al., 2000). Proteínas integrais de membrana também foram mais expressas na linhagem não tóxica, como porinas (figuras 36 e 38, tabela 11). As porinas conferem permeabilidade à membrana externa, pois permitem o transporte de nutrientes e metabólitos para dentro e para fora da célula e sua síntese é regulada por diversos fatores ambientais (Hoiczky & Hansel, 2000).

A linhagem não tóxica apresentou também maior expressão de proteínas envolvidas no transporte ativo de uréia. A uréia pode ser proveniente da degradação de proteínas a aminoácidos e estes últimos sofrem oxidação formando uréia. Os transportadores do tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*) para uréia, estão localizados na membrana externa, limitados ao espaço periplasmático da célula. Uma vez concentrada no interior da célula, a uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) é degradada pela enzima urease, que requer como cofator o níquel para exercer sua função, liberando duas moléculas de íons amônio (NH_4^+) e uma de dióxido de carbono (CO_2) para cada molécula hidrolisada. Subsequentemente, estes compostos são utilizados em processos bioquímicos no interior da célula (Solomon et al., 2007). Sendo assim, a uréia é uma fonte potencial de nitrogênio para as cianobactérias que possuem urease (Collier et al., 1999). A utilização de uréia como fonte de nitrogênio, com alta atividade de urease já foi documentada na literatura para *M. aeruginosa* (Solomon et al., 2007; Finlay et al., 2010; Belisle, 2014).

A expressão dessas proteínas de transporte em maior quantidade pela linhagem não tóxica pode estar relacionada com o maior tamanho celular. Neste estudo, a linhagem não tóxica apresentou diâmetro celular maior do que a linhagem tóxica, o que também foi observado por Tonietto (2009). Além disso, a espessura da parede celular da linhagem tóxica foi maior que a não tóxica, indicando diferenças estruturais que poderiam refletir na capacidade ou em estratégias de transporte de nutrientes diferentes entre as linhagens.

Ainda de acordo com o quadro de crescimento e metabolismo ativo na fase exponencial da linhagem não tóxica, houve expressão significativa de funções dedicadas à obtenção de energia e metabolismo energético (absorção de luz, fotossíntese e respiração).

A proteína PsbC foi mais expressa nesta condição e sua função está relacionada às clorofilas e carotenóides (luteína, neoxantina e violaxantina), que também foram mais expressos na linhagem não tóxica (Bricker & Frankel, 2002; Guskov et al., 2009). Embora diversos trabalhos tenham demonstrado a transcrição dos genes *psbA*, *psbD-psbC* em resposta à fotoinibição (Durnford & Falkowski, 1997; Pfannschmidt et al., 1999; Trebitsh et al., 2000; El Bissati & Kirilovsky, 2001; Guskov et al., 2009), pouco é conhecido acerca da regulação destes produtos em resposta a outros sinais ambientais (Dias, 2005). Em cianobactérias, PsbC e PsbB parecem agir como potenciadores dos processos de evolução do oxigênio (Bricker & Frankel, 2002).

As proteínas envolvidas na absorção de luz foram mais expressas na linhagem não tóxica na fase exponencial de crescimento (figuras 36 e 38). Em paralelo, esta linhagem apresentou maiores concentrações de carotenóides totais (figuras 23 e 38). O β -caroteno não foi o carotenóide majoritário, deste modo o aumento da síntese de carotenóides na linhagem não tóxica na fase exponencial pode estar relacionado à proteção contra o dano oxidativo durante a fotossíntese (Young & Frank, 1996).

Estes dados podem ser interpretados como uma menor dependência de luz da linhagem não tóxica se comparada à tóxica, considerando-se ainda que colônias da não tóxica permaneceram distribuídas no meio ou no fundo do volume de cultura e os maiores valores de pigmentos acessórios, clorofila *a*, eficiência fotossintética e rendimento de extinção fotoquímica desta linhagem.

As linhagens possuíam ainda diferenças na fase exponencial no acúmulo de carboxissomos e grânulos de polifosfato; estas estruturas foram observadas em maior número na linhagem não tóxica, indicando portanto maior ênfase desta linhagem na fixação de CO₂.

pelos carboxissomos e disponibilidade do uso de reservas dos grânulos de polifosfato como fonte de energia para a síntese de ATP (Allen, 1984).

Quanto à linhagem tóxica em crescimento exponencial, também foram observadas funções associadas ao metabolismo energético ativo (síntese de ATP, Acetil-CoA, de proteínas, utilização de carbono e processos catalíticos), que foram mais expressas na linhagem tóxica do que na não tóxica na mesma fase (figuras 36 e 38). A maior incidência de processos catabólicos na linhagem tóxica pode estar ligada ao próprio processo de síntese de proteínas. Pode-se especular que essas diferenças estejam associadas à produção de um pool de proteínas, o que inclui a atividade de síntese de microcistina (figuras 36 e 38), indicando que a cepa tóxica investiu recursos produzindo proteínas em detrimento da duplicação celular, cuja taxa foi menor do que a da linhagem não tóxica no mesmo momento.

As linhagens tóxica e não tóxica, neste estudo, apresentaram diferenças no metabolismo de nitrogênio, o que pode ou não estar relacionado à diferença quanto à síntese de microcistinas. Diferentemente da linhagem não tóxica, a linhagem tóxica utilizou outra via para assimilação do íon amônio (NH_4^+), aumentando a expressão de enzima responsável pela biossíntese de glutamina (codificada pelo gene *glnA*). A atividade da glutamina sintetase é regulada em todos os organismos e fornece o ponto crítico de entrada no metabolismo do nitrogênio no estado reduzido (Nelson & Cox, 2002). O nitrogênio reduzido na forma de NH_4^+ é assimilado primeiro em aminoácidos e depois em outras biomoléculas que o contêm (Nelson & Cox, 2002). A glutamina sintetase catalisa a síntese de glutamina fazendo a conversão do glutamato para íon amônio (Merrick & Edwards, 1995; Moreno-Vivián et al., 1999; Richardson et al., 2001).

Houve maior expressão de proteínas relacionadas à síntese de ácidos graxos na linhagem tóxica em fase exponencial do que na não tóxica. A membrana plasmática, que regula o tráfico intracelular também desempenha papel fundamental na adaptação a alterações ambientais (Huang et al., 2006). Alteração na permeabilidade da membrana foi observada em *Synechocystis* devido ao aumento na proporção de ácidos graxos saturados de cadeia longa e no teor de proteínas de membrana (Huang et al., 2006). Os ácidos graxos saturados diminuem a fluidez das membranas (Moreira et al., 2002). Deste modo, menor fluidez da membrana observada na linhagem tóxica pode estar relacionado à quantidade de ácidos graxos saturados, que participam da composição dos seus fosfolipídios.

A expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e aerótopos foi mais alta na linhagem tóxica, em ambas as fases de crescimento. Os polissacarídeos são os principais componentes da mucilagem nas cianobactérias e em *M. aeruginosa* são representados por manose e glicose (Martin et al., 1989; Plude et al., 1991; Forni et al., 1997). A linhagem tóxica formou colônias flutuantes com numerosas células incorporadas na mucilagem, 150-800µm diâmetro na fase exponencial e 400µm a 1850µm na fase exponencial tardia de crescimento. Em contraste, a linhagem não tóxica exibiu colônias pequenas, com poucas células, não flutuantes. Deste modo, o tamanho das colônias e a presença de aerótopos na linhagem tóxica em ambas as fases de crescimento devem estar relacionados à maior dependência de luz, o que está de acordo com o fato de suas colônias se manterem sempre na superfície, ou seja, mais expostas à luz.

Alta intensidade luminosa reduz a expressão de genes que codificam proteínas que estão envolvidas nas reações fotoquímicas e absorção da luz em cianobactérias (Rai et al., 2013). Huang et al. (2002) observaram que a expressão de genes que codificam proteínas do aparato fotossintético vitais diminuíram quase 50% em relação ao nível do controle (*psbO*, *psbV*, *psbU*) em altas intensidades de luz. No presente estudo, *PsbO* foi mais expressa na fase exponencial de crescimento da linhagem tóxica quando comparado com a não tóxica. Isso é condizente com o fato de que a linhagem tóxica poderia ser mais tolerante a luz, uma vez que as linhagens possuíam biomassa relativamente reduzida e, portanto, ambas ficariam mais expostas à incidência de luz nas células.

A absorção do excesso de energia luminosa além do que pode ser utilizada na fotossíntese pode resultar em danos fotooxidativos (Latifi et al., 2009). Consequentemente, os organismos fotossintéticos desenvolveram mecanismos de proteção para dissipar o excesso de energia captada (Wilson et al., 2010). Em resposta a mudanças na quantidade ou qualidade da luz, as cianobactérias modulam a abundância de clorofila, ficobilissomos, e carotenóides e geram antioxidantes e enzimas envolvidas na eliminação de radicais (Vass et al., 1996). Isso condiz com a análise proteômica, com os dados ultraestruturais, morfológicos e bioquímicos, que mostraram que o sistema protetor contra a fotooxidação é mais atuante na linhagem tóxica (figura 38). A presença de polifenóis, redutores de ferro e βcaroteno, substâncias reconhecidas como fotoprotetoras, endossa esta hipótese (figuras 23, 27, 28 e tabela 11). A expressão de βcaroteno foi maior na linhagem tóxica, em condições de alta incidência luminosa este composto é rapidamente convertido a uma forma estável, xantofilas (Wilson et

al., 2008). O β caroteno é transformado quando a energia luminosa absorvida pelo organismo supera a capacidade de fotossíntese, sendo a forma de proteger contra a fotoinibição (Wilson et al., 2008). Deste modo, está envolvido na extinção não fotoquímica regulada (NPQ), que em cianobactérias é crucial para continuação da fotossíntese em condições de alta incidência de luz (Wilson et al., 2006; Pilbrow et al., 2012). A linhagem tóxica produziu mais β caroteno na fase exponencial de crescimento do que outros carotenóides. Isso indica uma adaptação desta linhagem às condições de cultivo, reforçada pelo aumento relativo na síntese de proteínas relacionadas ao estresse.

As linhagens tóxica e não tóxica também parecem ter se comportado de forma distinta ao passar da fase exponencial para a exponencial tardia e nesta última fase, exibindo perfis diferentes de proteínas (figuras 33 e 34). Sob limitação nutricional, as estruturas intracelulares mudam consideravelmente, por exemplo, há degradação dos tilacóides e acúmulo de inclusões celulares (Schwarz & Forchhammer, 2005; Dagnino et al., 2006). As mudanças em longo prazo das células em cultivo dependem da síntese de "proteínas de adaptação", relacionadas a alterações no desenvolvimento e metabolismo celular (Gao et al., 2009; Rai et al., 2013).

Na fase exponencial de crescimento, ambas as linhagens apresentaram sistema de membranas tilacoidais tipo padrão, disperso por todo o citoplasma. Contudo, na fase exponencial tardia a linhagem não tóxica apresentou células com diferentes distribuições dos tilacóides. O estresse oxidativo foi atribuído como o principal agente causador de vários tipos de reorganizações estruturais e funcionais nos sistemas tilacoidais de cianobactérias (Pinevich, 1991; Baulina, 2012). A proteína D1 estava mais expressa em ambas as linhagens na fase exponencial tardia de crescimento. Aparatos fotossintéticos, especialmente associados ao PSII das proteínas D1 e D2 são mais propensos a estes danos (Rai et al., 2013). Quando as cianobactérias são expostas à luz forte e à fotoinibição, a proteína D1 danificada é substituída por uma proteína D1 recém-sintetizada para a manutenção da homeostase do PS-II (Nixon et al., 2010). Se continuada, a fotoinibição reversível muda para fotoinibição irreversível e a proteína D1 não é mais sintetizada (Murata & Suzuki, 2006; Allakhverdiev et al., 2010). Acredita-se que a fluidez das membranas dos tilacóides nas cianobactérias é controlada de modo a manter as membranas nas condições ótimas para a proteína D1 (Inoue et al., 2001).

Quanto às taxas de crescimento, a situação inverteu-se na fase exponencial tardia (17^o dia) em comparação com a exponencial: a linhagem tóxica passou a ter maior taxa de

crescimento, o que resultou em maior rendimento ao final do cultivo. De acordo, esta linhagem apresentou o metabolismo mais ativo e maior expressão de proteínas. Na análise proteômica, todas as funções identificadas estavam mais expressas na linhagem tóxica em relação à não tóxica. Incluem-se aí proteínas responsáveis pelo crescimento celular, obtenção de energia (absorção de luz, fotossíntese, respiração) e metabolismo energético (metabolismo de carboidratos e carbono), síntese de componentes celulares como proteínas, nucleotídeos, aminoácidos e de ácidos graxos. Também se destacaram funções de transporte, como componentes de membrana.

A alta síntese de proteínas constituintes de aerótopos esteve totalmente de acordo com a abundância destas estruturas observada por microscopia eletrônica.

Finalmente, proteínas relacionadas ao estresse e processos de oxidação-redução também foram mais expressas, o que pode ser relacionado com maior capacidade de fotoproteção e maior atividade antioxidante também constatadas nesta situação. De fato, a linhagem tóxica mostrou ainda maior rendimento de extinção não-fotoquímica regulada e não regulada, atributos relacionados à maior dependência de luz, juntamente com menores concentrações de pigmentos acessórios, e maior exposição à luz. A flutuabilidade das colônias também contribuiu para isso, graças ao maior tamanho das colônias se comparada à linhagem não tóxica.

A linhagem não tóxica apresentou as seguintes características marcantes na fase exponencial tardia: maior diâmetro celular, maior conteúdo de grânulos de cianoficina, e de pigmentos ficocianina e de aloficocianina (figura 38). Os grânulos de cianoficinas servem como reservatório e controle dinâmico de nitrogênio (Simon, 1971; Simon & Weathers, 1976), cuja concentração depende do suprimento deste elemento no ambiente e das demandas metabólicas das células (Perry & Staley, 1997). Na privação de nitrogênio são os primeiros a serem degradados para a síntese de aerótopos (Whitton & Potts, 2000). Entretanto, neste estudo, encontramos correlação negativa entre a síntese de aerótopos e o volume dos grânulos de cianoficinas. Esta mesma correlação foi observada por Šejnohová (2008) em *Microcystis* bentônicas.

O principal papel biológico das ficobiliproteínas é o de receptores de luz durante o processo fotossintético, contudo estas moléculas também atuam como reserva de nitrogênio, visto que são seletivamente degradadas quando as células são expostas à deficiência deste nutriente (Sloth et al., 2006). Deste modo, a linhagem não tóxica exibiu habilidade de

maximizar acúmulo nitrogenado, com a vantagem de tornar o nitrogênio fixado sempre disponível. Na natureza esta característica é uma adaptação extremamente importante e prove capacidade competitiva superior a de outros microrganismos (Mackerras et al., 1990).

Na fase exponencial tardia as linhagens apresentaram estratégias distintas para absorção de luz, com variações nos teores de pigmentos, atividades antioxidantes e parâmetros fotossintéticos. A linhagem tóxica exibiu atributos relacionados à maior dependência de luz, como menores concentrações de pigmentos acessórios, maiores valores de antioxidantes e maiores valores de rendimento de extinção não-fotoquímica regulada e não regulada. Enquanto isso, a linhagem não tóxica exibiu atributos relacionados à menor dependência de luz, como maiores valores de pigmentos acessórios, clorofila *a*, eficiência fotossintética e rendimento de extinção fotoquímica. Sendo assim, na natureza, essas diferentes estratégias encontradas para absorção de luz devem proporcionar condições favoráveis para que linhagens tóxicas e não tóxicas compartilhem do mesmo ambiente.

6 Considerações finais

As duas linhagens comparadas neste estudo tiveram estratégias bem diferentes para lidar com duas condições fisiológicas diferentes representadas pelas fases exponencial e exponencial tardia de crescimento. Isso pode ser devido à variabilidade fenotípica (de base genética) entre as duas linhagens que têm potencial para explorar de forma distinta o seu ambiente. Esta variabilidade pode suplantir a diferença pontual que é a capacidade ou não de síntese de microcistina.

Foi fundamental neste estudo usar múltiplas abordagens incluindo morfologia e ultraestrutura assim como aspectos fisiológicos revelados pelo perfil de pigmentos, perfis de expressão diferencial de proteínas, atividades fotossintética e antioxidante. As informações ultraestruturais refletiram muito bem os dados obtidos na análise proteômica. Só foi possível entender e explicar muitos dos resultados obtidos quando analisamos em conjunto todos estes parâmetros.

Diferenças marcantes foram observadas:

1. No tamanho das colônias, densidade de células, distribuição das células nas colônias;
2. Diferentes graus de flutuabilidade relacionada aos aerótopos;

3. Diferentes padrões de pigmentos;
4. Diferenças nas quantidades e disposição de tilacóides;
5. Diferenças na distribuição e quantidade de grânulos e outras inclusões celulares;
6. Diferenças no perfil de toxinas.

Todos estes aspectos têm como possível consequência o fato de as linhagens interagirem ('sentirem') de forma diferente em relação à incidência de luz e a aproveitarem de formas bem distintas. Embora sob condições controladas de cultivo as linhagens estivessem expostas à mesma condição de luz, a forma como esta energia é aproveitada é diferente em cada caso.

A disponibilidade de nutrientes proporciona um metabolismo mais ativo e a capacidade de aumentar a taxa de divisão celular, mas traz como consequência a necessidade de contornar danos oxidativos, o que também ficou claro pela constatação das diferentes atividades antioxidantes das células em cultura.

Outro aspecto notado é que, uma vez adquiridos os nutrientes e sintetizados os compostos celulares, estes podem ser usados de forma diferente, como pode ser observado de acordo com diferenças em grânulos e inclusões de reserva.

Uma vez que, assim como em outros estudos semelhantes, nenhum dos aspectos estudados foi evidentemente relacionado à presença de microcistina, não se pode afirmar que esta molécula foi determinante para as diferenças observadas entre as duas linhagens. As diferenças observadas devem estar muito mais associadas às necessidades ecológicas de explorarem nichos próximos, mas distintos de cada linhagem, principalmente em relação à irradiância.

Ainda assim algumas observações podem ser relacionadas com dados da literatura. A microcistina tem sido apresentada como molécula com função intracelular de proteção a uma variedade de formas de estresse (principalmente oxidativo) (Alexova et al., 2011a; Zilliges et al., 2011; Meissner et al., 2014). Isso poderia estar relacionado à maior demanda energética para produção de toxina, principalmente na fase exponencial de crescimento (Tonietto et al., 2012). Embora neste estudo não tenhamos testado nenhuma limitação nutricional, ou exposição a algum fator de estresse, a linhagem tóxica mostrou-se mais ativa em condições mais limitantes de crescimento (fase exponencial tardia), suportando maior atividade metabólica, do que a não tóxica e manteve maior atividade antioxidante por uma série de vias

de atuação (pigmentos acessórios, compostos fenólicos, síntese de determinadas proteínas etc). Estes estudos mais recentes com abordagens sistêmicas têm indicado que a microcistina poderia ter um papel protetor ou estabilizador dentro da célula, contra o “efeito colateral” da aceleração do metabolismo, que é o estresse oxidativo, suportando assim nas células produtoras maior capacidade metabólica com relativamente menor dano.

7 REFERÊNCIAS

- Abalde, J.; Betancourt, L.; Torres, E.; Cid, A. & Barwell, C.** 1998. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, v. 136: 109-120.
- Agha, R.; Cirés, S.; Wörmer, L. & Quesada, A.** 2013. Limited stability of microcystins in oligopeptide compositions of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria): implications in the definition of chemotypes. *Toxins*, v. 5: 1089-1104.
- Al-Hasan, R. H.; Ali, A. M. & Radwan, S. S.** 1989. Effects of light and dark incubation on the lipid and fatty acid composition of marine cyanobacteria. *Microbiology*, v. 135: 865-872.
- Albertsson, P. A.** 1982. Interaction between lumenal sides of the thylakoid membrane. *FEBS Lett*, v. 149: 186-190.
- Alexova, R.; Fujii, M.; Birch, D.; Cheng, J.; Waite, T. D.; Ferrari, B. C. & Neilan, B. A.** 2011a. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environmental Microbiology*, v. 13: 1064-1077.
- Alexova, R.; Haynes, P. A.; Ferrari, B. C. & Neilan, B. A.** 2011b. Comparative protein expression in different strains of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 10: M110.003749.
- Allakhverdiev, S. I.; Tomo, T.; Shimada, Y.; Kindo, H.; Nagao, R.; Klimov, V. V. & Mimuro, M.** 2010. Redox potential of pheophytin a in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107: 3924-3929.
- Allen, M. M.** 1968. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*, v. 4: 1-13.
- Allen, M. M.** 1984. Cyanobacterial cell inclusions. *Annu Rev Microbiol*, v. 38: 1-25.
- Allen, M. M.; Hutchison, F. & Weathers, P. J.** 1980. Cyanophycin granule polypeptide formation and degradation in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J Bacteriol*, v. 141: 687-693.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. & Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215: 403-410.
- Anjos, F. M.; Bittencourt-Oliveira, M. C.; Zajac, M. P.; Hiller, S.; Christian, B.; Erler, K.; Luckas, B. & Pinto, E.** 2006. Detection of harmful cyanobacteria and their toxins by both PCR amplification and LC-MS during a bloom event. *Toxicon*, v. 48: 239-245.
- Ansari, A. A.; Gill, S. S.; Lanza, G. R. & Rast, W.** 2011. *Eutrophication: causes, consequences and control*, Springer, Índia.
- Ariño, X.; Ortega-Calvo, J. J.; Hernandez-Marine, M. & Saiz-Jimenez, C.** 1995. Effect of sulfur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909. *Archives of microbiology*, v. 163: 447-453.

- Arment, A. R. & Carmichael, W. W.** 1996. Evidence that microcystin is a thio-template product. *Journal of Phycology*, v. 32: 591-597.
- Avakyan, A. A. & Baulina, O. I.** 1972. The ultrastructural organization of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* kuetz. Emend. Elenk in connection with toxicogenesis. *Zh. Mikrobiol. Epidem. Immuno.*, v. 49: 106-109.
- Azevedo, M. T. P. & Sant'Anna, C. L.** 2003. *Sphaerocavum*, a new genus of planktic Cyanobacteria from continental water bodies in Brazil. *Algological Studies*, v. 109: 79-92.
- Azevedo, S. M. F. O. & Brandão, C. C. S.** 2003. Cianobactéria tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília.
- Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W.; Jochimsen, E. M.; Rinehart, K. L.; Lau, S.; Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K.** 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru, Brazil. *Toxicology*, v. 181: 441-446.
- Azevedo, S. M. F. O.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W. & Namikoshi, M.** 1994. First report of microcystins from a brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, v. 6: 261-265.
- Babica, P.; Blaha, L. & Marsalek, B.** 2006. Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology*, v. 42: 9-20.
- Badger, M. R.; Hanson, D. T. & Price, G. D.** 2002. Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Functional Plant Biology*, v. 29: 407-416.
- Badger, M. R. & Price, G. D.** 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot*, v. 54 609-622.
- Badger, M. R.; Price, G. D.; Long, B. M. & Woodger, F. J.** 2006. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J Exp Bot*, v. 57: 249-265.
- Bailey, S. & Grossman, A.** 2008. Photoprotection in Cyanobacteria: Regulation of Light Harvesting†. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84: 1410-1420.
- Balkwill, D. L.; Nierzwicki-Bauer, S. A. & Stevens, S. E. J.** 1984. Ultrastructure of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* before and during reactivation of a stationary culture. *Cytobios*, v. 39: 135-149.
- Baulina, O. I.** 2012. *Ultrastructural Plasticity of Cyanobacteria*, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Belisle, B. S.** 2014. Urea as a nitrogen source for *Microcystis aeruginosa*. UTK Microbiology Department, University of Tennessee, Knoxville.
- Bennett, A. & Bogorad, L.** 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, v. 58: 419-435.
- Berlinck, R. G. S. & Kossuga, M. H.** 2005. Natural guanidine derivatives. *Natural Product Reports*, v. 22: 516-550.
- Birnboim, H. C. & Doly, J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, v. 7: 1513-1523.

- Bishop, C. T.; Anet, E. F. L. J. & Gorham, P. R.** 1959. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37: 453-471.
- Bittencourt-Oliveira, M. C.; Oliveira, M. C. & Bolch, C. J. S.** 2001. Genetic variability of brazilian satrains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria / Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA). Journal of Phycology, v. 37: 810-818.
- Bortoli, S.** 2011. Investigação da biossíntese de toxinas produzidas por cepas de cianobactérias. (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Botes, D. P.; Tuiman, A. A.; Wessels, P. L.; Viljoen, C. C.; Kruger, H.; Williams, D. H.; Santikarn, S.; Smith, R. J. & Hammond, S. J.** 1984. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions, v. 1: 2311-2318.
- Böttcher, G.; Chorus, I.; Ewald, S.; Hintze, T. & Walz, N.** 2001. Lightlimited growth and microcystin concentration of *Planktothrix agardhii* and *Microcystis aeruginosa* in turbidostats. In: Chorus, I. (Ed.). Cyanotoxins: Occurrence, effects, controlling factors. Springer, Heidelberg Berlin, pp. 115-133.
- Branco, C. W. C. & Senna, P. A. C.** 1994. Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. Algological Studies, v. 75: 85-96.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E. & Berset, C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, v. 28: 25-30.
- Brasil.** 2001. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº. 274, de 29-XI-2000. Revisa os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília, DF, 25.I.2001. Seção I, v. 18: 70-71.
- Brasil.** 2004. Ministério da Saúde. Portaria nº. 518, de 25-III-2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 26.III.2004, Seção I,, v. 59: 266-270.
- Brasil.** 2005. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA no 357 de 17-III-2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Seção I, v. 53: 58-63.
- Brasil.** 2011. Ministério da Saúde. Portaria nº. 2.914, de 12-XII-2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Seção I, v. 239: 39-49.
- Braun, E. & Bachofen, R.** 2004. Homoserine-lactones and microcystin in cyanobacterial assemblages in Swiss lakes. Hydrobiologia, v. 522: 271-280.

- Briand, E.; Bormans, M.; Quiblier, C.; Salencon, M. J. & Humbert, J. F.** 2012. Evidence of the cost of the production of microcystins by *Microcystis aeruginosa* under differing light and nitrate environmental conditions. PLoS ONE, v. 7: e29981.
- Bricker, T. M. & Frankel, L. K.** 2002. The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. Photosynthesis Research, v. 72: 131-146.
- Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. D. G. & Saura-calixto, F. D.** 2006. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP), Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H.** 2004. Carotenoids, Birkhäuser Basel, Switzerland.
- Burja, A. M.; Banaigs, B.; Abou-Mansour, E.; Burgess, J. G. & Wright, P. C.** 2001. Marine cyanobacteria: a prolific source of natural products. Tetrahedron, v. 57: 9347-9377.
- Butterwick, C.; Heaney, S. I. & Talling, J. F.** 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. Tropical Freshwater Biology, v. 50: 291-300.
- Callegari-Jacques, S. M.** 2003. Bioestatística: princípios e aplicações, Artmed, Porto Alegre.
- Cano-Europa, E.; Ortiz-Butrón, R.; Gallardo-Casas, C. A.; Blas-Valdivia, V.; Pineda-Reynoso, M.; Olvera-Ramírez, R. & Franco-Colin, M.** 2010. Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. Journal of Applied Phycology, v. 22: 495-501.
- Carmichael, W. W.** 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. A Review Journal of Applied Bacteriology, v. 72: 445-459.
- Carmichael, W. W.** 1994. The toxins of cyanobacteria. Scientific American, v. 270: 78-86.
- Carmichael, W. W.** 1997. The cyanotoxins. In: Callow, J. A. (Ed.). Advances in botanical research. Academic Press, San Diego, pp. 211-256.
- Carmichael, W. W.** 2001. Health effects of toxin-producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". Human and Ecological Risk Assessment, v. 7: 1393-1407.
- Carmichael, W. W.** 2008. A world view - One-hundred twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria - Where do we go from here? In: Hudnell, K. H. (Ed.). Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 105-120.
- Carmichael, W. W.; Azevedo, S. M.; An, J. S.; Molica, R. J.; Jochimsen, E. M.; Lau, S.; Rinehart, K. L.; Shaw, G. R. & Eaglesham, G. K.** 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environmental Health Perspectives, v. 109: 663-668.
- Carmichael, W. W.; Beasley, V.; Bunner, D. L.; Eloff, J. N.; Falconer, I.; Gorham, P.; Harada, K.; Krishnamurthy, T.; Yu, M. J.; Moore, R. E. & et al.** 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon, v. 26: 971-973.

- Carneiro, R. L.; Dorr, F. A.; Dorr, F.; Bortoli, S.; Delherbe, N.; Vasquez, M. & Pinto, E.** 2012. Co-occurrence of microcystin and microginin congeners in Brazilian strains of *Microcystis* sp. FEMS Microbiology Ecology, v. 82: 692-702.
- Carvalho, L. R.; Pipole, F.; Werner, V. R.; Laughinghouse IV, H. D.; Camargo, A. C. M.; Rangel, M.; Konno, K. & Sant'Anna, C. L.** 2008. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology v. 39: 761-769.
- Carvalho, M. C.; Agujaro, L. F.; Pires, D. A. & Picoli, C.** 2013. Manual de cianobactérias planctônicas: Legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais, CETESB, São Paulo.
- CETESB.** 1998. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 1997, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo.
- CETESB.** 2002. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2001, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo.
- CETESB.** 2005. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2004, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo.
- Chorus, I. & Bartram, J.** 1999. Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, World Health Organization, London.
- Christiansen, G.; Fastner, J.; Erhard, M.; Borner, T. & Dittmann, E.** 2003. Microcystin biosynthesis in planktothrix: genes, evolution, and manipulation. J Bacteriol, v. 185: 564-572.
- Christiansen, G.; Molitor, C.; Philmus, B. & Kurmayer, R.** 2008. Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. Mol Biol Evol, v. 25: 1695-1704.
- Chu, Z. S.; Jin, X. C.; Yan, F.; Zheng, S. F.; Pang, Y. & Zeng, Q. R.** 2007. Effects of EDTA and iron on growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. China Environmental Science/ Huan Jing Ke XueHuan Jing Ke Xue, v. 11: 2457-2461.
- Codd, G. A.** 1995. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. Water Science and Technology, v. 32: 149-156.
- Collier, J. L.; Brahamsha, B. & Palenik, B.** 1999. The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. Microbiology, v. 145 (Pt 2): 447-459.
- Costa, I. A. S.; Azevedo, S. M. F. O.; Senna, P. A. C.; Bernardo, R. R.; Costa, S. M. & Chellappa, N. T.** 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a brazilian semiarid reservoir. Brazilian Journal of Biology, v. 66: 211-219.
- Costa, S. M. & Azevedo, S. M. F. O.** 1994. Implantação de um banco de culturas de cianofíceas tóxicas. Iheringia - Série Botânica, v. 45: 69-74.
- Cox, P. A.; Banack, S. A.; Murch, S. J.; Rasmussen, U.; Tien, G.; Bidigare, R. R.; Metcalf, J.; Morrison, L. F.; Codd, G. A. & Bergman, B.** 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, v. 102: 5074-5078.
- D'Agostino, P. M.; Song, X.; Neilan, B. A. & Moffitt, M. C.** 2014. Comparative proteomics reveals that a saxitoxin-producing and a nontoxic strain of *Anabaena circinalis* are two different ecotypes. *J Proteome Res*, v. 13: 1474-1484.
- Dagnino, D.; de Abreu Meireles, D. & de Aquino Almeida, J. C.** 2006. Growth of nutrient-replete *Microcystis* PCC 7806 cultures is inhibited by an extracellular signal produced by chlorotic cultures. *Environmental Microbiology*, v. 8: 30-36.
- Davis, T. W.; Berry, D. L.; Boyer, G. L. & Gobler, C. J.** 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, v. 8: 715-725.
- Day, J. G.; Benson, E. E.; Harding, K.; Knowles, B.; Idowu, M.; Bremner, D.; Santos, L.; Santos, F.; Friedl, T.; Lorenz, M.; Lukesova, A.; Elster, J.; Lukavsky, J.; Herdman, M.; Rippka, R. & Hall, T.** 2005. Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a Pan-European scientific and biotechnological resource (the COBRA project). *Cryo Letters*, v. 26: 231-238.
- Deblois, C. P. & Juneau, P.** 2010. Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances. *Harmful Algae*, v. 9: 18-24.
- Dembinskat, M. E. & Allen, M. M.** 1988. Cyanophycin granule size variation in *Aphanocapsa*. *Journal of General Microbiology*, v. 134: 295-298.
- Dias, J. M. R.** 2005. Expressão de genes cloroplásticos e atividade do fotossistema II em plantas de cana-de-açúcar submetidas à salinidade. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade estadual do norte fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes - RJ.
- Ding, Y.; Song, L. & Sedmak, B.** 2013. UVB radiation as a potential selective factor favoring microcystin producing bloom forming Cyanobacteria. *PLoS ONE*, v. 8: e73919.
- Dittmann, E. & Börner, T.** 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 203: 192-200.
- Dittmann, E.; Christiansen, G.; Börner, T.; Neilan, B. A.; Fastner, J. & Rippka, R.** 1999. Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria. In: Peschek, G. A., Löffelhardt, W., *et al* (Ed.). *The Phototrophic Prokaryotes*. Springer US, pp. 615-621.
- Dittmann, E.; Erhard, M.; Kaebernick, M.; Scheler, C.; Neilan, B. A.; von Dohren, H. & Börner, T.** 2001. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Microbiology*, v. 147: 3113-3119.
- Dittmann, E.; Fewer, D. P. & Neilan, B. A.** 2012. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37: 23-43.
- Dittmann, E.; Neilan, B. A.; Erhard, M.; von Dohren, H. & Börner, T.** 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin

- production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol Microbiol*, v. 26: 779-787.
- Dittmann, E. & Wiegand, C.** 2006. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 50: 7-17.
- Dogo, C. R.; Bruni, F. M.; Elias, F.; Rangel, M.; Pantoja, P. A.; Sant'anna, C. L.; Lima, C.; Lopes-Ferreira, M. & de Carvalho, L. R.** 2011. Inflammatory effects of the toxic cyanobacterium *Geitlerinema amphibium*. *Toxicon*, v. 58: 464-470.
- Downing, T. G.; Meyer, C.; Gehringer, M. M. & van de Venter, M.** 2005a. Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environ Toxicol*, v. 20: 257-262.
- Downing, T. G.; Sember, C. S.; Gehringer, M. M. & Leukes, W.** 2005b. Medium N:P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *M. aeruginosa* UV027. *Microb Ecol*, v. 49: 468-473.
- Durnford, D. G. & Falkowski, P. G.** 1997. Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynthesis Research*, v. 53: 229-241.
- Dziallas, C. & Grossart, H. P.** 2011. Increasing oxygen radicals and water temperature select for toxic *Microcystis* sp. *PLoS ONE*, v. 6: e25569.
- Edge, R.; McGarvey, D. J. & Truscott, T. G.** 1997. The carotenoids as anti-oxidants--a review. *J Photochem Photobiol B*, v. 41: 189-200.
- El Bissati, K. & Kirilovsky, D.** 2001. Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC 6803. A redox control mechanism. *Plant Physiol*, v. 125: 1988-2000.
- Ewing, B. & Green, P.** 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, v. 8: 186-194.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. C. & Green, P.** 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, v. 8: 175-185.
- Falconer, I. R.** 1994. Health implications of cyanobacterial (blue-green algal) toxins. *In*: Australian Centre for Water Quality Research, Toxic cyanobacteria - a global perspective, Adelaide, pp. 2-6.
- Falconer, I. R.** 2005. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Fastner, J.; Erhard, M. & von Döhren, H.** 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*, v. 67: 5069-5076.
- Ferrão-Filho, A. S.; Azevedo, S. M. F. O. & DeMott, W. R.** 2000. Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology*, v. 45: 1-19.
- Ferrão-Filho, A. S.; Soares, M. C.; de Freitas Magalhaes, V. & Azevedo, S. M.** 2009. Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 72: 479-489.

- Fewer, D. P.; Rouhiainen, L.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Laakso, K.; Wang, H. & Sivonen, K.** 2007. Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC evolutionary biology*, v. 7: 183.
- Findley, D. L.; Walne, P. L. & Holton, R. W.** 1970. The effects of light intensity on the ultrastructure of *Chlorogloea fritschii* mitra grown at high temperature. *Journal of Phycology*, v. 6: 182-188.
- Finlay, K.; Patoine, A.; Donald, D. B.; Bogard, M. J. & Leavitt, P. R.** 2010. Experimental evidence that pollution with urea can degrade water quality in phosphorus-rich lakes of the Northern Great Plains. *Limnology and Oceanography*, v. 55: 1213-1230.
- Fiore, M. F.; Alvarenga, D. O. & Silva-Stenico, M. E.** 2011. Genética de cionotoxinas. *Microbiologia in foco*, v. 12: 24-35.
- Fogg, G. E. & Thake, B.** 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, The University of Wisconsin Press Ltd., London.
- Forni, C.; Telo', F. R. & Caiola, M. G.** 1997. Comparative analysis of the polysaccharides produced by different species of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanophyta). *Phycologia*, v. 36: 181-185.
- Francis, G.** 1878. Poisonous australian lake. *Nature*, v. 18: 11-12.
- Frankmole, W. P.; Larsen, L. K.; Caplan, F. R.; Patterson, G. M.; Knubel, G.; Levine, I. A. & Moore, R. E.** 1992. Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I. Isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 45: 1451-1457.
- Fuhs, G. W.** 1973. Cytochemical examination of blue-green algae. In: Carr, N. G. & Whitton, B. A. (Ed.). *The biology of blue-green algae*. University of California Press, pp. 117-143.
- Fujii, M.; Rose, A. L. & Waite, T. D.** 2011. Iron uptake by toxic and nontoxic strains of *Microcystis aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, v. 77: 7068-7071.
- Funari, E. & Testai, E.** 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical reviews in toxicology*, v. 38: 97-125.
- Gan, N.; Xiao, Y.; Zhu, L.; Wu, Z.; Liu, J.; Hu, C. & Song, L.** 2012. The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental Microbiology*, v. 14: 730-742.
- Gao, Y.; Xiong, W.; Li, X. B.; Gao, C. F.; Zhang, Y. L.; Li, H. & Wu, Q. Y.** 2009. Identification of the proteomic changes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 following prolonged UV-B irradiation. *J Exp Bot*, v. 60: 1141-1154.
- Gehringer, M. M. & Wannicke, N.** 2014. Climate change and regulation of hepatotoxin production in Cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 88: 1-25.
- Genovese, M. I.; Santos, R. J.; Hassimotto, N. M. A. & Lajolo, F. M.** 2003. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39: 167-169.
- Gerbersdorf, S. U.** 2006. An advanced technique for immuno-labelling of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (cyanobacteria):

- implementations of an experiment with varying light scenarios and culture densities. *Toxicon*, v. 47: 218-228.
- Ginn, H. P.; Pearson, L. A. & Neilan, B. A.** 2010. NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Applied and environmental microbiology*, v. 76: 4362-4368.
- Glazer, A. N.** 1981. Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: Hatch, M. D. & Boardman, N. K. (Ed.). *The biochemistry of plants*. Academic Press, New York, pp. 51-96
- Gliwicz, Z. M. B.** 2003. Between hazards of starvation and risk of predation *The Ecology of Offshore Animals*, Ecology Institute, Luhe.
- Golecki, J. R. & Drews, G.** 1974. Zur struktur der blualgen-zellwand. Gefrierätzuntersuchungen an normalen und extrahierten zellwänden von *Anabaena variabilis*. *Cytobiologie*, v. 8: 213-227.
- Gordon, D.; Abajian, C. & Green, P.** 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research*, v. 8: 195-202.
- Graves, P. R. & Haystead, T. A.** 2003. A functional proteomics approach to signal transduction. *Recent Prog Horm Res*, v. 58: 1-24.
- Gromov, B. V.; Vepritskiy, A. A.; Titova, N. N.; Mamkayeva, K. A. & Alexandrova, O. V.** 1991. Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CALU 892 (cyanobacterium). *Journal of Applied Phycology*, v. 3: 55-59.
- Grossman, A.** 2003. A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. *Photosynthesis Research*, v. 76: 207-215.
- Grzebyk, D. & Berland, B.** 1995. Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research*, v. 18: 1837-1849.
- Gusev, M. V.** 1962. Effect of dissolved oxygen on the development of blue-green algae. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, v. 147: 947-950.
- Guskov, A.; Kern, J.; Gabdulkhakov, A.; Broser, M.; Zouni, A. & Saenger, W.** 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol*, v. 16: 334-342.
- Haeghele, A. D.; Gillette, C.; O'Neill, C.; Wolfe, P.; Heimendinger, J.; Sedlacek, S. & Thompson, H. J.** 2000. Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 9: 421-425.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 1989. *Free radicals in biology and medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C.** 1999. Free radical, other reactive species and disease. In: Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (Ed.). *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, pp. 617-783.
- Hansson, L.-A.; Gustafsson, S.; Rengefors, K. & Bomark, L.** 2007. Cyanobacterial chemical warfare affects zooplankton community composition. *Freshwater Biology*, v. 52: 1290-1301.

- Harada, K.** 2004. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 52: 889-899.
- Harada, K.; Matsuura, K.; Suzuki, M.; Oka, H.; Watanabe, M. F.; Oishi, S.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R. & Carmichael, W. W.** 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, v. 448: 275-283.
- Hardie, L. P.; Balkwill, D. L. & Stevens, S. E.** 1983. Effects of iron starvation on the physiology of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Applied and environmental microbiology*, v. 45: 999-1006.
- Harke, M. J. & Gobler, C. J.** 2013. Global transcriptional responses of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter. *PLoS ONE*, v. 8: e69834.
- Heisler, J.; Glibert, P. M.; Burkholder, J. M.; Anderson, D. M.; Cochlan, W.; Dennison, W. C.; Dortch, Q.; Gobler, C. J.; Heil, C. A.; Humphries, E.; Lewitus, A.; Magnien, R.; Marshall, H. G.; Sellner, K.; Stockwell, D. A.; Stoecker, D. K. & Suddleson, M.** 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, v. 8: 3-13.
- Hesse, K.; Dittmann, E. & Börner, T.** 2001. Consequences of impaired microcystin production for light-dependent growth and pigmentation of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 37: 39-43.
- Hesse, K. & Kohl, J. G.** 2001. Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*. In: Chorus, I. (Ed.). *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany, pp. 152-158.
- Hirooka, E. Y.; Pinotti, M. H. P.; Tsutsumi, T.; Yoshida, F. & Ueno, Y.** 1999. Survey of Microcystins in water between 1995 and 1996 in Paraná, Brazil using ELISA. *Natural Toxins*, v. 7: 103-109.
- Hoagland, P.; Anderson, D. M.; Kaoru, Y. & White, A. W.** 2002. The economic effects of harmful algal blooms in the United States: Estimates, assessment issues, and information needs. *Estuaries*, v. 25: 819-837.
- Hoiczky, E. & Hansel, A.** 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol*, v. 182: 1191-1199.
- Hoiczky, E.; Roggenkamp, A.; Reichenbecher, M.; Lupas, A. & Heesemann, J.** 2000. Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo j*, v. 19: 5989-5999.
- Honda, R. Y.** 2005. Estudos taxonômicos e de desenvolvimento in vitro de *Microcystis* spp (Cyanobacteria) isoladas de corpos d'água do estado de São Paulo. (Mestrado). Seção de Ficologia, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Honda, R. Y.; Mercante, C. T. J.; Santos, J. M. V.; Esteves, K. E.; Cabianca, M. A. A. & Azevedo, M. T. P.** 2006. Cianotoxinas em pesqueiros da região metropolitana de são paulo. In: Esteves, K. E. & Sant'anna, C. L. (Ed.). *Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. Um estudo da Região Metropolitana de São Paulo*. Editora Rima, São Carlos, pp. 105-120.

- Horst, G. P.; Sarnelle, O.; White, J. D.; Hamilton, S. K.; Kaul, R. B. & Bressie, J. D.** 2014. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, v. 54: 188-198.
- Huang, D.; Ou, B. & Prior, R. L.** 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, v. 53: 1841-1856.
- Huang, F.; Fulda, S.; Hagemann, M. & Norling, B.** 2006. Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics*, v. 6: 910-920.
- Huang, F.; Parmryd, I.; Nilsson, F.; Persson, A. L.; Pakrasi, H. B.; Andersson, B. & Norling, B.** 2002. Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: identification of plasma membrane proteins. *Mol Cell Proteomics*, v. 1: 956-966.
- Hudnell, H. K.** 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs, Springer, New York.
- Hudnell, H. K. & Dortch, Q.** 2008. A synopsis of research needs identified at the interagency, international symposium on cyanobacterial harmful algal blooms (ISOC-FHAB). In: Hudnell, H. K. (Ed.). *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 17-43.
- Huertas, I. E.; Rouco, M.; López-Rodas, V. & Costas, E.** 2011. Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*.
- Hyenstrand, P.; Blomqvist, P. & Pettersson, A.** 1998. Factors determining cyanobacterial success in aquatic systems - a literature review. *Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol* v. 51: 41-62.
- Ibelings, B. W. & Chorus, I.** 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: a review. *Environmental pollution*, v. 150: 177-192.
- Imamoglu, E.; Dalay, M. C. & Sukan, F. V.** 2009. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *N Biotechnol*, v. 26: 199-204.
- Inoue, N.; Taira, Y.; Kashino, Y.; Koike, H. & Satoh, K.** 2001. Acclimation of a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803 to the growth temperature. *Science Access*, v. 3: -.
- IPCC.** 2014. Intergovernmental panel on climate change - fifth assessment report. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/>>. Acesso em: 15-XII-2014.
- Ishida, K.; Kato, T.; Murakami, M.; Watanabe, M. & Watanabe, M. F.** 2000. Microginins, zinc metalloproteases inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, v. 56: 8643-8656.
- Jacinavicius, F. R.; Gama-Jr, W. A.; Azevedo, M. T. P. & Sant'Anna, C. L.** 2013. Manual para cultivo de cianobactérias, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Jacobson, L. & Halmann, M.** 1982. Polyphosphate metabolism in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, v. 4: 481-488.

- Jahnichen, S.; Ihle, T.; Petzoldt, T. & Benndorf, J.** 2007. Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and environmental microbiology*, v. 73: 6994-7002.
- Jähnichen, S.; Long, B. M. & Petzoldt, T.** 2011. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa*: Direct regulation by multiple environmental factors. *Harmful Algae*, v. 12: 95-104.
- Jähnichen, S.; Petzoldt, T. & Benndorf, J.** 2001. Evidence for control of microcystin dynamics in bautzen reservoir (Germany) by cyanobacterial population growth rates and dissolved inorganic carbon. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 150: 177-196.
- Jang, M. H. & Takamura, N.** 2007. Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*, v. 49: 727-733.
- Jardim, F. A.; Fonseca, Y. M. F.; Vianna, L. N. L.; Azevedo, S. M. F. & C., C. P. H.** 2001. Primeira ocorrência de cianobactérias tóxicas em um reservatório da COPASA - Minas Gerais - Brasil. *BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas*, v. 9: 83-91.
- Jardim, F. A.; Machado, J. N. A.; Schembri, M. C. A. C.; Azevedo, S. M. F. O. & Sperling, E. V.** 2000. A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água - Minas Gerais - Brasil. *In, CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL*, Porto Alegre, RS (Brasil), pp. 1-11.
- Jardim, F. A. & Viana, T. H.** 2003. Análise de algas - Cianobactérias e cianotoxinas como parâmetro de controle do tratamento da água para abastecimento. *In, Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, n. 22, Joinville, pp. 30.
- Jaspars, M. & Lawton, L. A.** 1998. Cyanobacteria - a novel source of pharmaceuticals. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, v. 1: 77-84.
- Jassby, A. D. & Platt, T.** 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, v. 21: 540-547.
- Ji, Y., Lu, G., Chen, G., Huang, B., Zhang, X., Shen, K. & Wu, S.** 2011. Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF- κ B /iNOS Pathway in INS-1 Cells., *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12(7), 4722-4734.
- Jochimsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J. S.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E. M.; Antunes, M. B. C.; Melo-Filho, D. A.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S. T.; Azevedo, S. M. F. O. & Jarvis, W. R.** 1998. Liver failure and death following exposure to microcystins toxins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, v. 338: 873-888.
- Jodlowska, S. & Latala, A.** 2003. Simultaneous separation of chlorophylls and carotenoids by RP-HPLC in some algae and cyanobacteria from the southern Baltic. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, v. 32: 81-89.
- Jöhnk, D. K.; Huisman, J.; Sharples, J. M.; Sommeijer, B.; Visser, P. & Stroom, J.** 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*, v. 14: 495-512.

- Johnson, E. A. & Schroeder, W. A.** 1995. Microbial carotenoids. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, v. 11: 297-326.
- Jones, D. D. & Jost, M.** 1970. Isolation and chemical characterization of gas-vacuole membranes from *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenkin. *Arch Mikrobiol*, v. 70: 43-64.
- Jost, M. & Zehnder, A.** 1966. Die gasvakuolen der blualge *Microcystis aeruginosa*. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, v. 28: 1-3.
- Juttner, F. & Luthi, H.** 2008. Topology and enhanced toxicity of bound microcystins in *Microcystis* PCC 7806. *Toxicon*, v. 51: 388-397.
- Kaebernick, M.; Dittmann, E.; Börner, T. & Neilan, B. A.** 2002. Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. *Applied and environmental microbiology*, v. 68: 449-455.
- Kaebernick, M. & Neilan, B. A.** 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 35: 1-9.
- Kaebernick, M.; Neilan, B. A.; Börner, T. & Dittmann, E.** 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and environmental microbiology*, v. 66: 3387-3392.
- Kang, C. D.; Lee, J. S.; Park, T. H. & Sim, S. J.** 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 74: 987-994.
- Kaplan, A.; Harel, M.; Kaplan-Levy, R. N.; Hadas, O.; Sukenik, A. & Dittmann, E.** 2012. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Frontiers in Microbiology*, v. 3: 138.
- Kardinaal, W. E. A.; Tonk, L.; Janse, I.; Hol, S.; Slot, P.; Huisman, J. & Visser, P. M.** 2007. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and environmental microbiology*, v. 73: 2939-2946.
- Kardinaal, W. E. A. & Visser, P. M.** 2005. Dynamics of cyanobacterial toxins: sources of variability in microcystin concentrations. *In: Huisman, J., Matthijs, H. C. P., et al* (Ed.). *Harmful cyanobacteria*. Springer, Dordrecht, pp. 41-63.
- Kearns, K. D. & Hunter, M. D.** 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. *Environmental Microbiology*, v. 2: 291-297.
- Kehr, J. C.; Zilliges, Y.; Springer, A.; Disney, M. D.; Ratner, D. D.; Bouchier, C.; Seeberger, P. H.; de Marsac, N. T. & Dittmann, E.** 2006. A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Mol Microbiol*, v. 59: 893-906.
- Kessel, M.** 1978. A unique crystalline wall layer in the cyanobacterium *Microcystis marginata*. *J Ultrastruct Res*, v. 62: 203-212.
- Kim, H. R.; Kim, C. K.; Ahn, T. S.; Yoo, S. A. & Lee, D. H.** 2005. Effects of temperature and light on microcystin synthetase gene transcription in *Microcystis aeruginosa*. *Key Engineering Materials*, v. 277-279: 606-611.
- Klebahn, H.** 1895. Gasvakuolen, ein Bestandteil der Zellen der wasserblütebildenden *Phycochromaceen*. *Flora*, v. 80: 241-282.

- Kling, H. J.; Laughinghouse IV, H. D.; Šmarda, J.; Komárek, J.; Acreman, J.; Bruun, K.; Watson, S. B. & Chen, F.** 2012. A new red colonial *Pseudanabaena* (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) from North American large lakes. *Fottea*, Olomouc, v. 12: 327-339.
- Komárek J. & Anagnostidis K.** 1998: Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. - In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H. & Mollenhauer D. (eds): *Süsswasserflora von Mitteleuropa* 19:1 548pp, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.
- Komárek, J.** 2003. Coccoid and colonial Cyanobacteria. In: Wehr, J. D. & Sheath, R. G. (Ed.). *Freshwater algae of North America: Ecology and Classification*. Academic Press, Asterdam, pp.
- Komárek, J. & Hauer, T.** 2014. CyanoDB.cz: The on-line database of cyanobacterial genera. České Budějovice, República Tcheca: University of South Bohemia. Disponível em: <<http://www.cyanodb.cz/>>. Acesso em: 24 de dezembro de 2014.
- Kosten, S.; Huszar, V. L. M.; Bécares, E.; Costa, L. S.; van Donk, E.; Hansson, L. A.; Jeppesen, E.; Kruk, C.; Lacerot, G.; Mazzeo, N.; De Meester, L.; Moss, B.; Lürling, M.; Nöges, T.; Romo, S. & Scheffer, M.** 2012. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*, v. 18: 118-126.
- Kromkamp, J.** 1987. Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 21: 457-465.
- Krüger, G. H. J. & Eloff, J. N.** 1977. The influence of light intensity on the growth of different *Microcystis* isolates. *Journal of the Limnological Society of Southern Africa*, v. 3: 21-25.
- Krüger, G. H. J.; Eloff, J. N. & Pretorius, J. A.** 1981. Morphological changes in toxic and non-toxic *Microcystis* isolates at different irradiance levels. *Journal of Phycology*, v. 17: 52-56.
- Kuiper-Goodman, T.; Falconer, I. & Fitzgerald, J.** 1999. Human health aspects. In: Chorus, I. & Bartram, J. (Ed.). *Toxic cyanobacteria in water - A guide to their Public Health consequences, monitoring and management*. E&FN spon, Londres, pp. 113-153.
- Kumiko S., Tomoharu S., Reiji K., Norihiro K., Maiko T., Tomoko O., Naoki S., Tetsuji N. & Yoshiaki I.** 2014. Effects of the Amino Acid Constituents of Microcystin Variants on Cytotoxicity to Primary Cultured Rat Hepatocytes, v. 6(1):168-179.
- Kumar, K.; Mella-Herrera, R. A. & Golden, J. W.** 2010. Cyanobacterial Heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 2: a000315.
- Kuniyoshi, T. M.; Gonzalez, A.; Lopez-Gomollon, S.; Valladares, A.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. & Peleato, M. L.** 2011. 2-oxoglutarate enhances NtcA binding activity to promoter regions of the microcystin synthesis gene cluster. *FEBS Lett*, v. 585: 3921-3926.
- Kuniyoshi, T. M.; Sevilla, E.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. & Peleato, M. L.** 2013. Phosphate deficiency (N/P 40:1) induces *mcyD* transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 65: 120-124.

- Kurmayer, R.** 2011. The toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strains 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *Journal of Phycology*, v. 47: 200-207.
- Kurmayer, R.; Christiansen, G. & Chorus, I.** 2003. The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and environmental microbiology*, v. 69: 787-795.
- Kurmayer, R.; Dittmann, E.; Fastner, J. & Chorus, I.** 2002. Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb Ecol*, v. 43: 107-118.
- Lambert, T. W.; Holmes, C. F. B. & Hrudey, S. E.** 1996. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research*, v. 30: 1411-1422.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, pp. 115-175.
- Lang, N. J.** 1968. The fine structure of blue-green algae. *Annual review of microbiology*, v. 22: 15-46.
- Lange, W.** 1976. Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. *Canadian journal of microbiology*, v. 22: 1181-1185.
- Latifi, A.; Ruiz, M. & Zhang, C. C.** 2009. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 33: 258-278.
- Lawry, N. H. & Simon, R. D.** 1982. The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae. *Journal of Phycology*, v. 18: 391-399.
- Leão, P. N.; Engene, N.; Antunes, A.; Gerwick, W. H. & Vasconcelos, V.** 2012. The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports*, v. 29: 372-391.
- Leao, P. N.; Vasconcelos, M. T. & Vasconcelos, V. M.** 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical reviews in microbiology*, v. 35: 271-282.
- Lee, R. E.** 2008. Cyanobacteria. In: Lee, R. E. (Ed.). *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 33-80.
- Leflaive, J. & Ten-Hage, L.** 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*, v. 52: 199-214.
- Lehmann, H. & Jost, M.** 1971. Kinetics of the assembly of gas vacuoles in the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elekin. *Archiv fur Mikrobiologie*, v. 79: 59-68.
- Li, H.; Sherman, D. M.; Bao, S. & Sherman, L. A.** 2001. Pattern of cyanophycin accumulation in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing cyanobacteria. *Arch Microbiol*, v. 176: 9-18.
- Li, Y. L.; Sommerfeld, M.; Chen, F. & Hu, Q.** 2010. Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, v. 22: 253-263.

- Lima, V.** 2012. Ficobilissoma. Disponível em: <<http://bioquimicaufal.blogspot.com.br/2012/11/aula-09.html>>. Acesso em: 29-XII-2014.
- Liu, H.; Finch, J. W.; Luongo, J. A.; Li, G. Z. & Gebler, J. C.** 2006. Development of an online two-dimensional nano-scale liquid chromatography/mass spectrometry method for improved chromatographic performance and hydrophobic peptide recovery. *Journal of chromatography. A*, v. 1135: 43-51.
- Long, B. M.; Jones, G. J. & Orr, P. T.** 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Applied and environmental microbiology*, v. 67: 278-283.
- Lourenço, S. O.** 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações, Rima, São Carlos.
- Lukač, M. & Aegerter, R.** 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, v. 31: 293-305.
- Lundell, D. J.; Glazer, A. N.; Melis, A. & Malkin, R.** 1985. Characterization of a cyanobacterial photosystem I complex. *J Biol Chem*, v. 260: 646-654.
- Lurling, M.** 2003. *Daphnia* growth on microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa* in different mixtures with the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Limnology and Oceanography*, v. 48: 2214-2220.
- Lyck, S.** 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, v. 26: 727-736.
- MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G. & Garg, M. L.** 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of Science of Food Agriculture*, v. 86: 2046-2056.
- Mackerras, A. H.; de Chazal, N. M. & D. Smith, G. D.** 1990. Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308. *Microbiology*, v. 136: 2057-2065.
- Madhyastha, H. K.; Sivashankari, S. & Vatsala, T. M.** 2009. C-phycocyanin from *Spirulina fussiformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43: 221-224.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V. & Clark, D. P.** 2010. *Microbiologia de Brock*. 12 ed., Artmed, Porto Alegre.
- Magalhaes, V. F.; Soares, R. M. & Azevedo, S. M.** 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, v. 39: 1077-1085.
- Makower, K.; Schuurmans, J. M.; Groth, D.; Zilliges, Y.; Matthijs, H. C. & Dittmann, E.** 2015. Transcriptomics aided dissection of the intracellular and the extracellular role of microcystin in *M. aeruginosa* PCC 7806. *Applied and environmental microbiology*, v. 81: 544-554.
- Mann, N. H.** 2000. Detecting the Environment. In: Whitton, B. A. & Potts, M. (Ed.). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 367-388.

- Margalef, R.** 1997. Our Biosphere. In: Kinne, O. (Ed.). Excellence in ecology books. Institute of Ecology, Oldendorf, pp. 176-178.
- Martin-Luna, B.; Sevilla, E.; Hernandez, J. A.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. & Peleato, M. L.** 2006. Fur from *Microcystis aeruginosa* binds in vitro promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Phytochemistry*, v. 67: 876-881.
- Martin, C.; Codd, G. A.; Siegelman, H. W. & Weckesser, J.** 1989. Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains. *Archives of microbiology*, v. 152: 90-94.
- Matsuda, H.; Okino, T.; Murakami, M. & Yamaguchi, Y.** 1996. Aeruginosins 102-A and B, new thrombin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis viridis* (NIES-102). *Tetrahedron*, v. 52: 14501-14506.
- Matthiensen, A.; Beattie, K. A.; Yunes, J. S.; Kaya, K. & Codd, G. A.** 2000. [D-Leu1] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochemistry*, v. 55: 383-387.
- McCune, B. & Mefford, M. J.** 2011. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data. Version 6.08, MjM Software, Gleneden Beach, OR.
- Meissner, K.; Dittmann, E. & Borner, T.** 1996. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes. *FEMS Microbiol Lett*, v. 135: 295-303.
- Meissner, S.; Fastner, J. & Dittmann, E.** 2013. Microcystin production revisited: conjugate formation makes a major contribution. *Environmental Microbiology*, v. 15: 1810-1820.
- Meissner, S.; Steinhauser, D. & Dittmann, E.** 2014. Metabolomic analysis indicates a pivotal role of the hepatotoxin microcystin in high light adaptation of *Microcystis*. *Environ Microbiol*, v. DOI: 10.1111/1462-2920.12565.
- Melgaço, M. J.** 2007. Efeitos da disponibilidade de luz e limitação de nutrientes sobre a competição entre cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. (Mestrado). Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Merrick, M. J. & Edwards, R. A.** 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev*, v. 59: 604-622.
- Merzlyak, M. N.** 1989. Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes. *Itogi nauki i tekhniki. Ser Fiziol Rast*, v. 113: 107-122.
- Miller, L. S. & Holt, S. C.** 1977. Effect of carbon dioxide on pigment and membrane content in *Synechococcus lividus*. *Arch Microbiol*, v. 115: 185-198.
- Milne, I.; Lindner, D.; Bayer, M.; Husmeier, D.; McGuire, G.; Marshall, D. F. & Wright, F.** 2009. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics*, v. 25: 126-127.
- Minillo, A.; Ferreira, A. H. F.; Yogui, G. T. & Yunes, J. S.** 2000. Concentração de microcistinas e toxicidade nas formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da Lagoa dos Patos, RS. In: E.L.G. Espindola, C. M. R. B. &

- Paschoal, O. R., M.B.C. Bohrer & A.L. Oliveira Neto (Ed.). Ecotoxicologia - Perspectivas para o Século XXI. RIMA Editora, São Carlos, pp. 521-533.
- Miskiewicz, E.; Ivanov, A. G.; Williams, J. P.; Khan, M. U.; Falk, S. & Huner, N. P.** 2000. Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, *Plectonema boryanum* UTEX 485, to temperature and light. Plant and Cell Physiology, v. 41: 767-775.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, v. 7: 405-410.
- Mlouka, A.; Comte, K.; Castets, A. M.; Bouchier, C. & Tandeau de Marsac, N.** 2004. The gas vesicle gene cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA rearrangements that lead to loss of cell buoyancy. J Bacteriol, v. 186: 2355-2365.
- Molica, R. & Azevedo, S.** 2009. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. Oecologia Brasiliensis, v. 13: 229-246.
- Molot, L. A.; Li, G.; Findlay, D. L. & Watson, S. B.** 2010. Iron-mediated suppression of bloom-forming cyanobacteria by oxine in a eutrophic lake. Freshwater Biology, v. 55: 1102-1117.
- Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N. & Borsarelli, C. D.** 2002. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 75: 353-361.
- Montenegro, M. A.; Rios Ade, O.; Mercadante, A. Z.; Nazareno, M. A. & Borsarelli, C. D.** 2004. Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. J Agric Food Chem, v. 52: 367-373.
- Moreira, N. X.; Curi, R. & Mancini Filho, J.** 2002. Fatty acids: a review. J. Brazilian Soc. Food Nutr., v. 24: 105-123.
- Moreno-Vivián, C.; Cabello, P.; Martínez-Luque, M.; Blasco, R. & Castillo, F.** 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. J Bacteriol, v. 181: 6573-6584.
- Msagati, T. A.; Siame, B. A. & Shushu, D. D.** 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. Aquatic Toxicology, v. 78: 382-397.
- Mur, L. R.; skulberg, O. M. & Utkilen, H. C.** 1999. Cyanobacteria in the Environment. In: Chorus, I. & Bartram, J. (Ed.). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. E&FN Spon, New York, pp. 15-40.
- Murata, N. & Suzuki, I.** 2006. Exploitation of genomic sequences in a systematic analysis to access how cyanobacteria sense environmental stress. J Exp Bot, v. 57: 235-247.
- Nalewajko, C. & Murphy, T. P.** 2001. Effects of temperature, and availability of nitrogen and phosphorus on the abundance of *Anabaena* and *Microcystis* in Lake Biwa, Japan: an experimental approach. Limnology, v. 2: 45-48.
- Namikoshi, M. & Rinehart, K. L.** 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. Journal of Industrial Microbiology, v. 17: 373-384.

- Neilan, B. A.; Dittmann, E.; Rouhiainen, L.; Bass, R. A.; Schaub, V.; Sivonen, K. & Börner, T.** 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol*, v. 181: 4089-4097.
- Neilan, B. A.; Jacobs, D.; Del Dot, T.; Blackall, L. L.; Hawkins, P. R.; Cox, P. T. & Goodman, A. E.** 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International journal of systematic bacteriology*, v. 47: 693-697.
- Neilan, B. A.; Pearson, L. A.; Muenchhoff, J.; Moffitt, M. C. & Dittmann, E.** 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, v. 15: 1239-1253.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M.** 2002. *Lehninger princípios de bioquímica*, Sarvier, São Paulo.
- Nikitina, K. A.; Bogorov, L. V. & Gusev, M. V.** 1974. The cellular ultrastructure of obligate phototrophic blue-green alga *Anabaena variabilis* in cultures dying in the dark. *Mikrobiologiya*, v. 43: 1079-1083.
- Nishizawa, A.; Arshad, A. B.; Nishizawa, T.; Asayama, M.; Fujii, K.; Nakano, T.; Harada, K. & Shirai, M.** 2007. Cloning and characterization of a new hetero-gene cluster of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K-139. *The Journal of general and applied microbiology*, v. 53: 17-27.
- Nishizawa, T.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K. & Shirai, M.** 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J Biochem*, v. 126: 520-529.
- Nishizawa, T.; Ueda, A.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K.; Ochi, K. & Shirai, M.** 2000. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J Biochem*, v. 127: 779-789.
- Nixon, P. J.; Michoux, F.; Yu, J.; Boehm, M. & Komenda, J.** 2010. Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Annals of Botany*, v. 106: 1-16.
- Niyogi, K. K.; Björkman, O. & Grossman, A. R.** 1997. The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94: 14162-14167.
- Nubel, U.; Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G.** 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, v. 63: 3327-3332.
- O'Neil, J. M.; Davis, T. W.; Burford, M. A. & Gobler, C. J.** 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, v. 14: 313-334.
- OECD.** 2005. Emerging risks to water supplies: Best practice for improved management and preparedness to protect public health. Disponível em: < www.oecd.org/sti/biotechnology>. Acesso em: 23-XII-2014.
- Ohkawa, H.; Price, G. D.; Badger, M. R. & Ogawa, T.** 2000. Mutation of *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃ – Uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol*, v. 182: 2591-2596.

- Oliveira, C. A.** 2012. Caracterização da produção de pigmentos e da atividade antioxidante de *Nostoc* spp. sob diferentes intensidades luminosas. Microbiologia agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Oliver, R. L. & Ganf, G. G.** 2000. Freshwater Blooms. In: Whitton, B. A. & Potts, M. (Ed.). The ecology of Cyanobacteria. The diversity in time and space. Kluwer, Dordrecht, pp. 149-194.
- Onofreiová, L.; Vašíčková, J.; Klejdus, B.; Stratil, P.; Mišurcová, L.; Kráčmar, S.; Kopecký, J. & Vacek, J.** 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 51: 464-470.
- Orr, P. T. & Jones, G. J.** 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. Limnology and Oceanography, v. 43: 1604-1614.
- Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Matsumoto, S. & Watanabe, M. M.** 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. The Journal of general and applied microbiology, v. 46: 39-50.
- Ow, S. Y. & Wright, P. C.** 2009. Current trends in high throughput proteomics in cyanobacteria. FEBS Lett, v. 583: 1744-1752.
- Oyaizu, M.** 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, v. 44: 307-315.
- Paerl, H. W. & Huisman, J.** 2008. Blooms like it hot. Science v. 320: 57-58.
- Paerl, H. W. & Otten, T. G.** 2013. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. Microb Ecol, v. 65: 995-1010.
- Pankratz, H. S. & Bowen, C. C.** 1963. Cytology of blue-green algae. I. The cells of *Symploca muscorum*. American Journal of Botany, v. 50: 387-399.
- Park, H.-D.; Iwami, C.; Watanabe, M. F.; Harada, K.-I.; Okino, T. & Hayashi, H.** 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991–1994). Environmental Toxicology and Water Quality, v. 13: 61-72.
- Park, H. D.; Watanabe, M. F.; Harda, K.; Nagai, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M. & Hayashi, H.** 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. Natural Toxins, v. 1: 353-360.
- Paul, V. J.** 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: Hudnell, H. K. (Ed.). Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Springer, New York, pp. 239-257.
- Pearson, L. A.; Hisbergues, M.; Borner, T.; Dittmann, E. & Neilan, B. A.** 2004. Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Applied and environmental microbiology, v. 70: 6370-6378.

- Pearson, L. A.; Mihali, T.; Moffitt, M.; Kellmann, R. & Neilan, B.** 2010. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. *Marine Drugs*, v. 8: 1650-1680.
- Pegram, R. A.; Humpage, A. R.; Neilan, B. A.; Runnegar, M. T.; Nichols, T.; Thacker, R. W.; Pflugmacher, S.; Etheridge, S. M. & Love, A. H.** 2008. Cyanotoxins Workgroup Report. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 619: 317-381.
- Penn, K.; Wang, J.; Fernando, S. C. & Thompson, J. R.** 2014. Secondary metabolite gene expression and interplay of bacterial functions in a tropical freshwater cyanobacterial bloom. *Isme j*, v. 8: 1866-1878.
- Peperzak, L.** 2003. Climate change and harmful algal blooms in the North Sea. *Acta Oecologica*, v. 24: 139-144.
- Pereira, D. A. & Giani, A.** 2014. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 88: 175-183.
- Perry, J. J. & Staley, J. T.** 1997. *Microbiology: dynamics and diversity*, Saunders College Publishing, Orlando.
- Pfannschmidt, T.; Nilsson, A. & Allen, J. F.** 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, v. 397: 625-628.
- Pietsch, J.; Bornmann, K. & Schmidt, W.** 2002. Relevance of Intra- and Extracellular Cyanotoxins for Drinking Water Treatment. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, v. 30: 7-15.
- Pilbrow, J.; Garama, D. & Carne, A.** 2012. Carotenoid-binding proteins; accessories to carotenoid function. *Acta Biochim Pol*, v. 59: 163-165.
- Pimentel, J. S. & Giani, A.** 2014. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. *Applied and environmental microbiology*, v. 80: 5836-5843.
- Pinevich, A. V.** 1991. Membrane apparatus of cyanobacteria: its organization, morpho-functional dynamics, biogenesis, mutational variability and evolution. Institute of Microbiology, Russian Academy of Science, Moscow.
- Pinevich, A. V.** 1997. Intracytoplasmic membrane structures in bacteria. *Endocytobiosis and Cell Research*, v. 12: 9-40.
- Pinevich, A. V.** 2006. *Microbiology. Biology of prokaryotes*, University of St. Petersburg, St. Petersburg.
- Pinevich, A. V. & Topchieva, L. V.** 1991. Autonomy of cyanobacterial intracellular membranes: electron cytochemical studies of *Synechocystis* sp. *Microbiology*, v. 60: 358-362.
- Pinho, G. L. L.; Moura da Rosa, C.; Yunes, J. S.; Luquet, C. M.; Biachini, A. & Monserrat, J. M.** 2003. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 135: 459-468.
- Pires, J.; Torres, P. & Chow, F.** 2014a. Ensaio antioxidante: captura do radical livre DPPH, Instituto de Biociências - USP, São Paulo.

- Pires, J.; Torres, P. & Chow, F.** 2014b. Ensaio da atividade antioxidante pelo método do Folin-Ciocalteu, Instituto de Biociências - USP, São Paulo.
- Pires, J.; Torres, P. & Chow, F.** 2014c. Ensaio de redução do ferro (FRAP), Instituto de Biociências - USP, São Paulo.
- Plude, J. L.; Parker, D. L.; Schommer, O. J.; Timmerman, R. J.; Hagstrom, S. A.; Joers, J. M. & Hnasko, R.** 1991. Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. Applied and environmental microbiology, v. 57: 1696-1700.
- Pojidaeva, E.; Zinchenko, V.; Shestakov, S. V. & Sokolenko, A.** 2004. Involvement of the SppA1 peptidase in acclimation to saturating light intensities in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J Bacteriol, v. 186: 3991-3999.
- Porfírio, Z.; Ribeiro, M. P.; Estevam, C. S.; Houly, R. L. S. & Sant'Ana, A. E. G.** 1999. Hepatosplenomegaly caused by an extract of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* bloom collected in the Manguaba Lagoon, Alagoas - Brazil. Revista de Microbiologia, v. 30: 278-285.
- Porter, G.; Tredwell, C. J.; Searle, G. F. W. & Barber, J.** 1978. Picosecond timeresolved energy transfer in *Porphyridium cruentum*. Part I. In the intact chloroplast. Biochimica et Biophysica Acta, v. 501: 532-545.
- Price, G. D.; Badger, M. R.; Woodger, F. J. & Long, B. M.** 2008. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂ - concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. J Exp Bot, v. 59: 1441-1461.
- Qiu, B. & Gao, K.** 2002. Effects of CO₂ enrichment on the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae): physiological responses and relationships with the availability of dissolved inorganic carbon. Journal of Phycology, v. 38: 721-729.
- Rai, S.; Pandey, S.; Shrivastava, A. K.; Singh, K. S.; Agrawal, C. & Rai, L. C.** 2013. Understanding the mechanisms of abiotic stress management in cyanobacteria with special reference to proteomics. In: Srivastava, A. K., Rai, A. N., et al (Ed.). Stress biology of cyanobacteria. Molecular mechanisms to cellular responses, pp. 93-112.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J.** 2007. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology, Tracer v.1.5. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>. Acesso em: 30-XII-2014.
- Rantala, A.; Fewer, D. P.; Hisbergues, M.; Rouhiainen, L.; Vaitomaa, J.; Borner, T. & Sivonen, K.** 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101: 568-573.
- Rapala, J.; Sivonen, K.; Lyra, C. & Niemelä, S. I.** 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. Applied Environmental Microbiology, v. 64: 2206-2212.
- Raps, S.; Wyman, K.; Siegelman, H. W. & Falkowski, P. G.** 1983. Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. Plant Physiol, v. 72: 829-832.
- Reading, N. C. & Sperandio, V.** 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiol Lett, v. 254: 1-11.

- Rebouças, A. C.; Braga, B. & Tundisi, J. G.** 1999. Águas Doces no Brasil, Instituto de Estudos Avançados da USP/ACB, São Paulo.
- Repka, S.; Meyerhöfer, M.; von Bröckel, K. & Sivonen, K.** 2004. Associations of cyanobacterial toxin, nodularin, with environmental factors and zooplankton in the baltic sea. *Microb Ecol*, v. 47: 350-358.
- Reynolds, C. S.** 2006. Ecology of phytoplankton (ecology, biodiversity and conservation), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Reynolds, C. S.** 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia*, v. 578: 37-45.
- Reynolds, C. S.; Jaworski, G. H. M.; Cmiech, H. A. & Leedale, G. F.** 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis Aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin, The Royal Society London.
- Reynolds, C. S. & Walsby, A. E.** 1975. Water-blooms. *Biological Reviews*, v. 50: 437-481.
- Reynolds, J. M.** 1997. An introduction to applied and environmental geophysics, Wiley, Michigan.
- Richardson, D. J.; Berks, B. C.; Russell, D. A.; Spiro, S. & Taylor, C. J.** 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol Life Sci*, v. 58: 165-178.
- Rios, A. O.; Antunes, L. M. G. & Bianchi, M. L. P.** 2009. Protection by carotenoids against free radicals generated during the treatment of cancer with cisplatin. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 20: 343-350.
- Rippka, R.** 1979. Isolation and purification of cyanobacteria. *In*: Pacher, L. & Glazer, A. N. (Ed.). *Cyanobacteria Methods in Enzymology*. Blackwell, pp. 3-27.
- Robarts, R. D. & Zohary, T.** 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 21: 391-399.
- Rohrlack, T.; Dittmann, E.; Börner, T. & Christoffersen, K.** 2001. Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. *Applied and environmental microbiology*, v. 67: 3523-3529.
- Rohrlack, T.; Dittmann, E.; Henning, M.; Börner, T. & Kohl, J.-G.** 1999. Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, v. 65: 737-739.
- Rohrlack, T. & Utkilen, H.** 2007. Effects of nutrient and light availability on production of bioactive anabaenopeptins and microviridin by the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Hydrobiologia*, v. 583: 231-240.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19: 1572-1574.
- Ross, P. L.; Huang, Y. N.; Marchese, J. N.; Williamson, B.; Parker, K.; Hattan, S.; Khainovski, N.; Pillai, S.; Dey, S.; Daniels, S.; Purkayastha, S.; Juhasz, P.; Martin, S.; Bartlett-Jones, M.; He, F.; Jacobson, A. & Pappin, D. J.** 2004.

- Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, v. 3: 1154-1169.
- Rouco, M.; Lopez-Rodas, V.; Flores-Moya, A. & Costas, E.** 2011. Evolutionary changes in growth rate and toxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* under a scenario of eutrophication and temperature increase. *Microb Ecol*, v. 62: 265-273.
- Rouhiainen, L.; Vakkilainen, T.; Siemer, B. L.; Buikema, W.; Haselkorn, R. & Sivonen, K.** 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and environmental microbiology*, v. 70: 686-692.
- Rücker, J.; Kohl, J.-G. & Kaiser, K.** 1995. Responses of carotenoids and chlorophylls to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, v. 77: 51-65.
- Rueckert, A. & Cary, S. C.** 2009. Use of an armored RNA standard to measure microcystin synthetase E gene expression in toxic *Microcystis* sp. by reverse-transcription QPCR. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 7: 509-520.
- Rufino, M. S. M.; E., A. R.; S., B. E.; M., M. S.; G., S. C.; J., P.-J. & Sura-Calixto, F. D.** 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE.
- Sá, L. L. C.; Vieira, J. M. S.; Mendes, R. A.; Pinheiro, S. C. C.; Vale, E. R.; Alves, F. A. S.; Jesus, I. M.; Santos, E. C. O. & Costa, V. B.** 2010. Occurrence of toxic cyanobacterial bloom in the left margin of the Tapajós river, in the Municipality of Santarém (Pará State, Brazil). *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1: 159-166.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandh, G.; El-Shehawy, R.; Diez, B. & Bergman, B.** 2009. Temporal separation of cell division and diazotrophy in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. *FEMS Microbiol Lett*, v. 295: 281-288.
- Sant'anna, C. L.; Azevedo, M. T. P.; Werner, V. R.; Dogo, C. R.; Rios, F. R. & Carvalho, L. R.** 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, v. 126: 249-263.
- Sant'Anna, C. L.; de Carvalho, L. R.; Fiore, M. F.; Silva-Stenico, M. E.; Lorenzi, A. S.; Rios, F. R.; Konno, K.; Garcia, C. & Lagos, N.** 2011. Highly toxic *Microcystis aeruginosa* strain, isolated from Sao Paulo-Brazil, produce hepatotoxins and paralytic shellfish poison neurotoxins. *Neurotoxicity Research*, v. 19: 389-402.
- Santos, M. E. V.** 2009a. Efeito do exudato na autoregulação fisiológica de *Microcystis* sp. (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Santos, P. V.** 2009b. Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implantação no crescimento de culturas e na reprodução de microcistinas. (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos.

- Sarnelle, O.; Gustafsson, S. & Hansson, L.-A.** 2010. Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore *Daphnia*. *Journal of Plankton Research*, v. 32: 471-477.
- Schafer, L.; Sandmann, M.; Woitsch, S. & Sandmann, G.** 2006. Coordinate up-regulation of carotenoid biosynthesis as a response to light stress in *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Environ*, v. 29: 1349-1356.
- Schatz, D.; Keren, Y.; Hadas, O.; Carmeli, S.; Sukenik, A. & Kaplan, A.** 2005. Ecological implications of the emergence of non-toxic subcultures from toxic *Microcystis* strains. *Environmental Microbiology*, v. 7: 798-805.
- Schatz, D.; Keren, Y.; Vardi, A.; Sukenik, A.; Carmeli, S.; Borner, T.; Dittmann, E. & Kaplan, A.** 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environmental Microbiology*, v. 9: 965-970.
- Schmetterer, G.; Peschek, G. A. & Sleytr, U. B.** 1983. Thylakoid degradation during photooxidative bleaching of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Protoplasma*, v. 115: 202-207.
- Schmidt, C. & Urlaub, H.** 2009. iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative quantification. *Methods in molecular biology*, v. 564: 207-226.
- Schmidt, E. C.; Scariot, L. A.; Rover, T. & Bouzon, Z. L.** 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron*, v. 40: 860-869.
- Schwarz, R. & Forchhammer, K.** 2005. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology*, v. 151: 2503-2514.
- Sciuto, K.; Moro, I.; La Rocca, N.; Marcolongo, G.; Primon, A.; Rascio, N. & Andreoli, C.** 2008. Thylakoid features of a filamentous cyanobacterium grown under different light and temperature conditions. In, 7th European workshop on molecular biology of Cyanobacteria, České Budejovice, Czech Republic, pp. 23.
- Sedmak, B. & Elerseck, T.** 2006. Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplanktons. *Microb Ecol*, v. 51: 508-515.
- Šejnohová, L.** 2008. *Microcystis*. New findings in peptide production, autecology and taxonomy by cyanobacterium *Microcystis*. (Ph.D.). Czech Academy of Sciences, Institute of Botany, Brno.
- Sendersky, E.; Lahmi, R.; Shaltiel, J.; Perelman, A. & Schwarz, R.** 2005. NblC, a novel component required for pigment degradation during starvation in *Synechococcus* PCC 7942. *Mol Microbiol*, v. 58: 659-668.
- Serra, D. R.** 2012. Resposta de *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales - Rhodophyta) a estímulos de irradiação in vitro. Programa de Botânica, Universidade de São Paulo,
- Sevilla, E.; Martin-Luna, B.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. & Peleato, M. L.** 2012. An active photosynthetic electron transfer chain required for mcyD transcription and microcystin synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*, v. 21: 811-819.

- Sevilla, E.; Martin-Luna, B.; Vela, L.; Bes, M. T.; Fillat, M. F. & Peleato, M. L.** 2008. Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environ Microbiol*, v. 10: 2476-2483.
- Sevilla, E.; Martin-Luna, B.; Vela, L.; Bes, M. T.; Peleato, M. L. & Fillat, M. F.** 2010. Microcystin-LR synthesis as response to nitrogen: transcriptional analysis of the mcyD gene in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Ecotoxicology*, v. 19: 1167-1173.
- Shadforth, I. P.; Dunkley, T. P.; Lilley, K. S. & Bessant, C.** 2005. i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. *BMC Genomics*, v. 6: 145.
- Shapiro, J.** 1990. Current beliefs regarding dominance of blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, v. 24: 38-54.
- Sharif, D. I.; Gallon, J.; Smith, C. J. & Dudley, E.** 2008. Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *Isme j*, v. 2: 1171-1182.
- Sherman, D. M. & Sherman, L. A.** 1983. Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastructure of *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol*, v. 156: 393-401.
- Shi, L.; Carmichael, W. W. & Miller, I.** 1995. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of microbiology*, v. 163: 7-15.
- Silva-Stenico, M. E.; Kaneno, R.; Zambuzi, F. A.; Vaz, M. G.; Alvarenga, D. O. & Fiore, M. F.** 2013a. Natural products from cyanobacteria with antimicrobial and antitumor activity. *Curr Pharm Biotechnol*, v. 14: 820-828.
- Silva-Stenico, M. E.; Lorenzi, A. S.; Teschke, O.; Pamplona Silva, C. S.; Etchegaray, A. & Fiore, M. F.** 2013b. Antimicrobial Cyanopeptide Action on Bacterial Cells Observed with Atomic Force Microscopy. *Current Nanoscience*, v. 9: 141-148.
- Silva-Stenico, M. E.; Rigonato, J.; Leal, M. G.; Vaz, M. G.; Andreote, A. P. & Fiore, M. F.** 2012. Non-ribosomal halogenated protease inhibitors from cyanobacterial isolates as attractive drug targets. *Current medicinal chemistry*, v. 19: 5205-5213.
- Silva-Stenico, M. E.; Silva, C. S.; Lorenzi, A. S.; Shishido, T. K.; Etchegaray, A.; Lira, S. P.; Moraes, L. A. & Fiore, M. F.** 2011. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*, v. 166: 161-175.
- Simon, R. D.** 1971. cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: A reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 68: 265-267.
- Simon, R. D.** 1973. The effect of chloramphenicol on the production of cyanophycin granule polypeptide in the blue green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch Mikrobiol*, v. 92: 115-122.
- Simon, R. D. & Weathers, P.** 1976. Determination of the structure of the novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in Cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 420: 165-176.
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A.** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16: 144-158.

- Sirenko, L. A.** 1972. Physiological fundamentals of reproduction of the blue-green algae in reservoirs, Naukova Dumka, Kiev.
- Sirenko, L. A.; Chernousova, V. M.; Arendarchuk, V. V. & Kozitskaya, V. N.** 1969. Factors of mass development of blue-green algae. *Hydrobiological Journal*, v. 5: 1-8.
- Sitoki, L.; Kurmayer, R. & Rott, E.** 2012. Spatial variation of phytoplankton composition, biovolume, and resulting microcystin concentrations in the Nyanza Gulf (Lake Victoria, Kenya). *Hydrobiologia*, v. 691: 109-122.
- Sivonen, K.** 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and environmental microbiology*, v. 56: 2658-2666.
- Sivonen, K.** 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, v. 35: 12-24.
- Sivonen, K. & Jones, G.** 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. & Bartram, J. (Ed.). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, New York, pp. 41-111.
- Sloth, J. K.; Wiebe, M. G. & Eriksen, N. T.** 2006. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38: 168-175.
- Smith, R. V. & Peat, A.** 1967. Comparative structure of the gas-vacuoles of blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie*, v. 57: 111-122.
- Smol, J. P.** 2002. Pollution of lakes and rivers: A paleoenvironmental perspective. 1. ed., Arnold, London.
- Soares, M. C.; Lurling, M.; Panosso, R. & Huszar, V.** 2009. Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life-history characteristics of the grazer *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 72: 1183-1189.
- Solomon, C. M.; Alexander, J. A. & Glibert, P. M.** 2007. Measuring urease activity in aquatic environmental samples. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 5: 280-288.
- Sommer, U. & Lewandowska, A.** 2011. Climate change and the phytoplankton spring bloom: warming and overwintering zooplankton have similar effects on phytoplankton. *Global Change Biology*, v. 17: 154-162.
- Sotero-Santos, R. B.; Silva, C. R.; Verani, N. F.; Nonaka, K. O. & Rocha, O.** 2006. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tiete River, Sao Paulo, Brazil). *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 64: 163-170.
- Sözer, O.** 2011. Carotenoids assist in assembly and functions of photosynthetic complexes in cyanobacteria. (Ph.D.). Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences University of Szeged, Szeged.
- Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G.** 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annual review of microbiology*, v. 31: 225-274.
- Stanne, T. M.; Pojidaeva, E.; Andersson, F. I. & Clarke, A. K.** 2007. Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria. *J Biol Chem*, v. 282: 14394-14402.

- Steiger, S.; Schäfer, L. & Sandmann, G.** 1999. High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 52: 14-18.
- Stevens, S. E., Jr.; Balkwill, D. L. & Paone, D. A. M.** 1981. The effects of nitrogen limitation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Archives of microbiology*, v. 130: 204-212.
- Stevens, S. E., Jr.; Nierzwicki-Bauer, S. A. & Balkwill, D. L.** 1985. Effect of nitrogen starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J Bacteriol*, v. 161: 1215-1218.
- Stoeckenius, W. & Kunau, W. H.** 1968. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. *The Journal of Cell Biology*, v. 38: 337-357.
- Straub, C.; Quillardet, P.; Vergalli, J.; de Marsac, N. T. & Humbert, J. F.** 2011. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PLoS ONE*, v. 6: e16208.
- Suleimanova, S. S. & Mineeva, L. A.** 1981. Effect of high light intensity upon growth and pigmentation content of cyanobacteria under conditions of photoauto- and photoheterotrophic cultivation. *Vestnik Moskovskogo Universiteta Ser 16 Biologiya*, v. 1: 42-47.
- Sun, J. & Liu, D.** 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, v. 25: 1331-1346.
- Sun, L.; Wang, S. & Qiao, Z.** 2006. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Biotechnol*, v. 121: 563-569.
- Swift, S.; Downie, J. A.; Whitehead, N. A.; Barnard, A. M.; Salmond, G. P. & Williams, P.** 2001. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Advances in microbial physiology*, v. 45: 199-270.
- Szalontai, B.; Nishiyama, Y.; Gombos, Z. & Murata, N.** 2000. Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803: The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1509: 409-419.
- Takaichi, S. & Mochimaru, M.** 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 64: 2607-2619.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, v. 28: 2731-2739.
- Tanaka, S.; Kerfeld, C. A.; Sawaya, M. R.; Cai, F.; Heinhorst, S.; Cannon, G. C. & Yeates, T. O.** 2008. Atomic-level models of the bacterial carboxysome shell. *Science*, v. 319: 1083-1086.
- Tandeau de Marsac, N. & Houmard, J.** 1993. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol Lett*, v. 104: 119-189.

- Tandon, M.; Thirumeignanam, D. & Rai, S. N.** 2008. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, Dairy Cattle Nutrition Division, N. D. R. I, Kamal, India.
- Tasaka, Y.; Gombos, Z.; Nishiyama, Y.; Mohanty, P.; Ohba, T.; Ohki, K. & Murata, N.** 1996. Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *The EMBO Journal*, v. 15: 6416-6425.
- Taton, A.; Grubisic, S.; Brambilla, E.; De Wit, R. & Wilmotte, A.** 2003. Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Applied and environmental microbiology*, v. 69: 5157-5169.
- Teixeira, M. G.; Costa, M. C.; de Carvalho, V. L.; Pereira, M. S. & Hage, E.** 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization*, v. 27: 244-253.
- Teixeira, M. R.** 2009. Assessing the health risk of flotation-nanofiltration sequence for cyanobacteria and cyanotoxin removal in drinking water. *In: Gault, P. M. & Marler, H. J. (Ed.). Handbook on cyanobacteria: Biochemistry, biotechnology and applications.* Nova Science Publishers, New York, pp. 349-398.
- Telfer, A.; Dhami, S.; Bishop, S. M.; Phillips, D. & Barber, J.** 1994. beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry*, v. 33: 14469-14474.
- Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T. & Neilan, B. A.** 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide/polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, v. 7: 753-764.
- Tillett, D.; Parker, D. L. & Neilan, B. A.** 2001. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) phylogenies. *Applied and environmental microbiology*, v. 67: 2810-2818.
- Toepel, J.; McDermott, J. E.; Summerfield, T. C. & Sherman, L. A.** 2009. Transcriptional analysis of the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142 grown under short day/night cycles. *Journal of Phycology*, v. 45: 610-620.
- Tonietto, A.** 2009. Investigação proteômica comparativa entre a cepa tóxica *Microcystis aeruginosa* PCC 7820 e a cepa não tóxica *Microcystis aeruginosa* NIVA CYA 43 (Cyanobacteria). Programa Ciências Genômicas e Biotecnologia, UCB, Brasília.
- Tonietto, A.; Petriz, B. A.; Araújo, W. C.; Mehta, A.; Magalhães, B. S. & Franco, O. L.** 2012. Comparative proteomics between natural *Microcystis* isolates with a focus on microcystin synthesis. *Proteome Science*, v. 10: 38-38.
- Tonk, L.; Bosch, K.; Visser, P. M. & Huisman, J.** 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 46: 117-123.
- Tonk, L.; Visser, P. M.; Christiansen, G.; Dittmann, E.; Snelder, E. O. F. M.; Wiedner, C.; Mur, L. R. & Huisman, J.** 2005. The microcystin composition of the

- cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. Applied and environmental microbiology, v. 71: 5177-5181.
- Tran, T. D. C.; Bernard, C.; Ammar, M.; Chaouch, S. & Comte, K.** 2013. Heat Shock Transcriptional Responses in an MC-Producing Cyanobacterium (*Planktothrix agardhii*) and Its MC-Deficient Mutant under High Light Conditions. PLoS ONE, v. 8: e73198.
- Trebitsh, T.; Levitan, A.; Sofer, A. & Danon, A.** 2000. Translation of chloroplast psba mrna is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. Molecular and Cellular Biology, v. 20: 1116-1123.
- Tundisi, J. G.** 2003. Água no século XXI: enfrentando a escassez, Rima, São Carlos.
- Tundisi, J. G.; Matsumura-Tundisi, T.; Abe, D. S.; Rocha, O. & Starling, F.** 2006. Limnologia de águas interiores: impactos, conservação e recuperação de ecossistemas aquáticos. In: Rebouças, A. C., Braga, B., *et al* (Ed.). Águas Doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação. Escrituras Editora, São Paulo, pp. 203-240.
- Tundisi, J. G. & Tundisi, M. T.** 2008. Limnologia, Oficina de Textos, São Paulo.
- UNESCO.** 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water, Printed by Imprimerie Rolland-Paris Paris.
- Utkilen, H. & Gjølme, N.** 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. Applied and environmental microbiology, v. 58: 1321-1325.
- van Apeldoorn, M. E.; van Egmond, H. P.; Speijers, G. J. A. & Bakker, G. J. I.** 2007. Review: Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition & Food Research, v. 51: 7-60.
- van de Waal, D. B.; Verspagen, J. M.; Finke, J. F.; Vournazou, V.; Immers, A. K.; Kardinaal, W. E.; Tonk, L.; Becker, S.; Van Donk, E.; Visser, P. M. & Huisman, J.** 2011. Reversal in competitive dominance of a toxic versus non-toxic cyanobacterium in response to rising CO₂. Isme j, v. 5: 1438-1450.
- van der Westhuizen, A. J. & Eloff, J. N.** 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). Planta, v. 163: 55-59.
- van Eykelenburg, C.** 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 45: 369-390.
- van Eykelenburg, C.** 1980. Ecophysiological studies on *Spirulina platensis*. Effect of temperature, light intensity and nitrate concentration on growth and ultrastructure. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 46: 113-127.
- Vasconcelos, L. & Fay, P.** 1974. Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*. I. The effect of nitrogen starvation. Archiv fur Mikrobiologie, v. 96: 271-279.
- Vass, I.; Sass, L.; Spetea, C.; Bakou, A.; Ghanotakis, D. F. & Petrouleas, V.** 1996. Uv-b-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by epr and

- chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochemistry*, v. 35: 8964-8973.
- Vezie, C.; Rapala, J.; Vaitomaa, J.; Seitsonen, J. & Sivonen, K.** 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microb Ecol*, v. 43: 443-454.
- Via-Ordorika, L.; Fastner, J.; Kurmayer, R.; Hisbergues, M.; Dittmann, E.; Komarek, J.; Erhard, M. & Chorus, I.** 2004. Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27: 592-602.
- Villa, F. A.; Lieske, K. & Gerwick, L.** 2010. Selective MyD88-dependent pathway inhibition by the cyanobacterial natural product malyngamide F acetate. *European Journal of Pharmacology*, v. 629: 140-146.
- Visser, P. M.; Ibelings, B. W.; Mur, L. R. & Walsby, A. E.** 2005. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. In: Huisman, J., Matthijs, H. C. P., *et al* (Ed.). *Harmful cyanobacteria*, Aquatic ecology series. Springer, Dordrecht, pp. 109-142.
- von Sperling, M.** 2006. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed., DESA-UFGM, Belo Horizonte.
- Walsby, A. E.** 1969. The permeability of blue-green algal gas vacuole membranes to gas. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 173: 235-255.
- Walsby, A. E.** 1971. The pressure relationships of gas vacuoles.
- Walsby, A. E.** 1972. Structure and function of gas vacuoles. *Bacteriological Reviews*, v. 36: 1-32.
- Walsby, A. E.** 1994. Gas Vesicles. *Microbiol Rev*, v. 58: 94-144.
- Wang, W.; Vignani, R.; Scali, M. & Cresti, M.** 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, v. 27: 2782-2786.
- Wanner, G.; Henkelmann, G.; Schmidt, A. & Köst, H. P.** 1986. Nitrogen and sulfur saturation of the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. An ultrastructural, morphometrical and biochemical comparison. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 41: 741-750.
- Watanabe, M.** 1996. Production of microcystins. In: Watanabe, M. F., Harada, K., *et al* (Ed.). *Toxic Microcystis*. CRC Press, New York, pp.
- Watanabe, M. F. & Oishi, S.** 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and environmental microbiology*, v. 49: 1342-1344.
- Watanabe, M. F.; Watanabe, M.; Kato, T.; Harada, K. I. & Suzuki, M.** 1991. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green algae, cyanobacteria). *The botanical magazine*, v. 104: 49-57.
- Waterman, P. G. & Mole, S.** 1995. Extraction and chemical quantification. In: Waterman, P. G. & Mole, S. (Ed.). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 66-103.

- Waters, C. M. & Bassler, B. L.** 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 21: 319-346.
- Watkinson, A. J.; O'Neil, J. M. & Dennison, W. C.** 2005. Ecophysiology of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae) in Moreton Bay, Australia. *Harmful Algae*, v. 4: 697-715.
- Welker, M.; Marsalek, B.; Sejnohova, L. & von Dohren, H.** 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides*, v. 27: 2090-2103.
- Welker, M.; Šejnohová, L.; Némethová, D.; Döhren, H. v.; Jarkovský, J. & Maršálek, B.** 2007. Seasonal shifts in chemotype composition of *Microcystis* sp. communities in the pelagial and the sediment of a shallow reservoir. *Limnology and Oceanography*, v. 8: 609-619.
- Welker, M. & von Döhren, H.** 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30: 530-563.
- Westrick, J. A.; Szlag, D. C.; Southwell, B. J. & Sinclair, J.** 2010. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 397: 1705-1714.
- Whitton, B. A.** 2008. Cyanobacterial diversity in relation to the environment. *In*: Evangelista, V., Barsanti, L., *et al* (Ed.). *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. Springer Science, Netherlands, pp. 17-43.
- Whitton, B. A. & Potts, M.** 2000. The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Whitton, B. A. & Potts, M.** 2012. Introduction to the cyanobacteria. *In*: Whitton, B. A. (Ed.). *Ecology of Cyanobacteria II Their Diversity in Space and Time*. Springer, New York, pp. 760.
- Wiedner, C.; Visser, P. M.; Fastner, J.; Metcalf, J. S.; Codd, G. A. & Mur, L. R.** 2003. Effects of light on the microcystin content of *Microcystis* strain PCC 7806. *Applied and environmental microbiology*, v. 69: 1475-1481.
- Wiegand, C. & Pflugmacher, S.** 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 203: 201-218.
- Wilmotte, A.** 1988. Growth and morphological variability of six strains of *Phormidium* cf. *ectocarpi* Gomont (Cyanophyceae) cultivated under different temperatures and light intensities. *Archives of Hydrobiology Algological Studies*, v. 50-53: 35-46.
- Wilson, A.; Kinney, J. N.; Zwart, P. H.; Punginelli, C.; D'Haene, S.; Perreau, F.; Klein, M. G.; Kirilovsky, D. & Kerfeld, C. A.** 2010. Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria. *J Biol Chem*, v. 285: 18364-18375.
- Wilson, A.; Punginelli, C.; Gall, A.; Bonetti, C.; Alexandre, M.; Routaboul, J. M.; Kerfeld, C. A.; van Grondelle, R.; Robert, B.; Kennis, J. T. & Kirilovsky, D.** 2008. A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105: 12075-12080.

- Wilson, A. E.; Sarnelle, O. & Tillmanns, A. R.** 2006. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. *Limnology and Oceanography*, v. 51: 1915–1924.
- Winder, M. & Sommer, U.** 2012. Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia*, v. 698: 5-16.
- Wrasidlo, W.; Mielgo, A.; Torres, V. A.; Barbero, S.; Stoletov, K.; Suyama, T. L.; Klemke, R. L.; Gerwick, W. H.; Carson, D. A. & Stupack, D. G.** 2008. The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105: 2313-2318.
- Wyman, M. & Fay, P.** 1986. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria) ii. The influence of light quality.
- Yamamoto, Y. & Nakahara, H.** 2005. The formation and degradation of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* blooms: the importance of pH, water temperature, and day length. *Limnology*, v. 6: 1-6.
- Yamauchi, R.; Miyake, N.; Inoue, H. & Kato, K.** 1993. Products formed by peroxy radical oxidation of β -carotene. *J Agric Food Chem*, v. 41: 708-713.
- Yeates, T. O.; Kerfeld, C. A.; Heinhorst, S.; Cannon, G. C. & Shively, J. M.** 2008. Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6: 681-691.
- Young, A. J. & Frank, H. A.** 1996. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J Photochem Photobiol B*, v. 36: 3-15.
- Young, F. M.; Thomson, C.; Metcalf, J. S.; Lucocq, J. M. & Codd, G. A.** 2005. Immunogold localisation of microcystins in cryosectioned cells of *Microcystis*. *Journal of Structural Biology*, v. 151: 208-214.
- Yunes, J. S.; Matthiensen, A.; Parise, M.; Salomon, P. S.; Raggett, S. L.; Beattie, K. A. & Codd, G. A.** 1998. *Microcystis aeruginosa* growth stages and the occurrence of microcystins in Patos Lagoon, Southern Brazil. In: Reguera, B., Blanco, J., et al (Ed.). Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, pp. 18-21.
- Yunes, J. S.; Salomon, P. S.; Matthiensen, A.; Beattie, K. A.; Raggett, S. L. & Codd, G. A.** 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon Estuary, southern Brazil. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, v. 5: 223-229.
- Zagatto, P. A. & Aragão, M. A.** 1992. Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), São Paulo.
- Zagatto, P. A.; Aragão, M. A.; Domingues, D. F.; Buratini, S. V. & Araujo, R. P. A.** 1998. Avaliação ecotoxicológica do reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase à problemática das algas tóxicas e algicidas. In: Congresso Latino-Americano de Ficologia, Anais do Congresso Latino-Americano de Ficologia, São Paulo, SP, pp. 63-81.
- Zagatto, P. A.; Buratini, S. V.; Aragao, M. A. & Ferrao-Filho, A. S.** 2012. Neurotoxicity of two *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) strains to mice, *Daphnia*, and fish. *Environ Toxicol Chem*, v. 31: 857-862.

- Zar, J. H.** 1999. Biostatistical Analysis, Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Zegura, B.; Straser, A. & Filipic, M.** 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat Res*, v. 727: 16-41.
- Zhang, M.; Kong, F.; Tan, X.; Yang, Z.; Cao, H. & Xing, P.** 2007. Biochemical, morphological, and genetic variations in *Microcystis aeruginosa* due to colony disaggregation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23: 663-670.
- Zheng, L.; Xie, P.; Li, Y. L.; Yang, H.; Wang, S. B. & Guo, N. C.** 2004. Variation of intracellular and extracellular microcystins in a shallow, hypereutrophic subtropical chinese lake with dense cyanobacterial blooms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 73: 698-706.
- Zilliges, Y.; Kehr, J. C.; Meissner, S.; Ishida, K.; Mikkat, S.; Hagemann, M.; Kaplan, A.; Börner, T. & Dittmann, E.** 2011. The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of *Microcystis* under Oxidative Stress Conditions. *PLoS ONE*, v. 6: e17615.
- Zilliges, Y.; Kehr, J. C.; Mikkat, S.; Bouchier, C.; de Marsac, N. T.; Börner, T. & Dittmann, E.** 2008. An extracellular glycoprotein is implicated in cell-cell contacts in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *J Bacteriol*, v. 190: 2871-2879.
- Zurawell, R. W.; Chen, H.; Burke, J. M. & Prepas, E. E.** 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, v. 8: 1-37.

ANEXO 1. RENDIMENTO DE PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS POR CADA LINHAGEM COM RELAÇÃO AO PESO SECO (CÉLULAS LIOFILIZADAS), PESO DO EXTRATO BRUTO E PESO DA FRAÇÃO 50:50

Nesta etapa não foi incluída a linhagem CCIBt3337, pois não se obteve biomassa suficiente para a extração, nem a linhagem CCIBt3452, por não apresentar características típicas de *M. aeruginosa*. Sendo assim, foram selecionadas para o estudo químico de produção de microcistinas as linhagens que apresentaram maior rendimento quanto à obtenção da fração 50:50: CCIBt 3106, 3109, 3194, 3202, 3212, 3453 e 3454. Apesar das linhagens CCIBt 3113, 3130 e 3226 também apresentarem biomassa e rendimento de extrato bruto elevados, não foram testadas quanto à toxicidade devido ao seu ínfimo rendimento de extrato pré purificado (figura 1.).

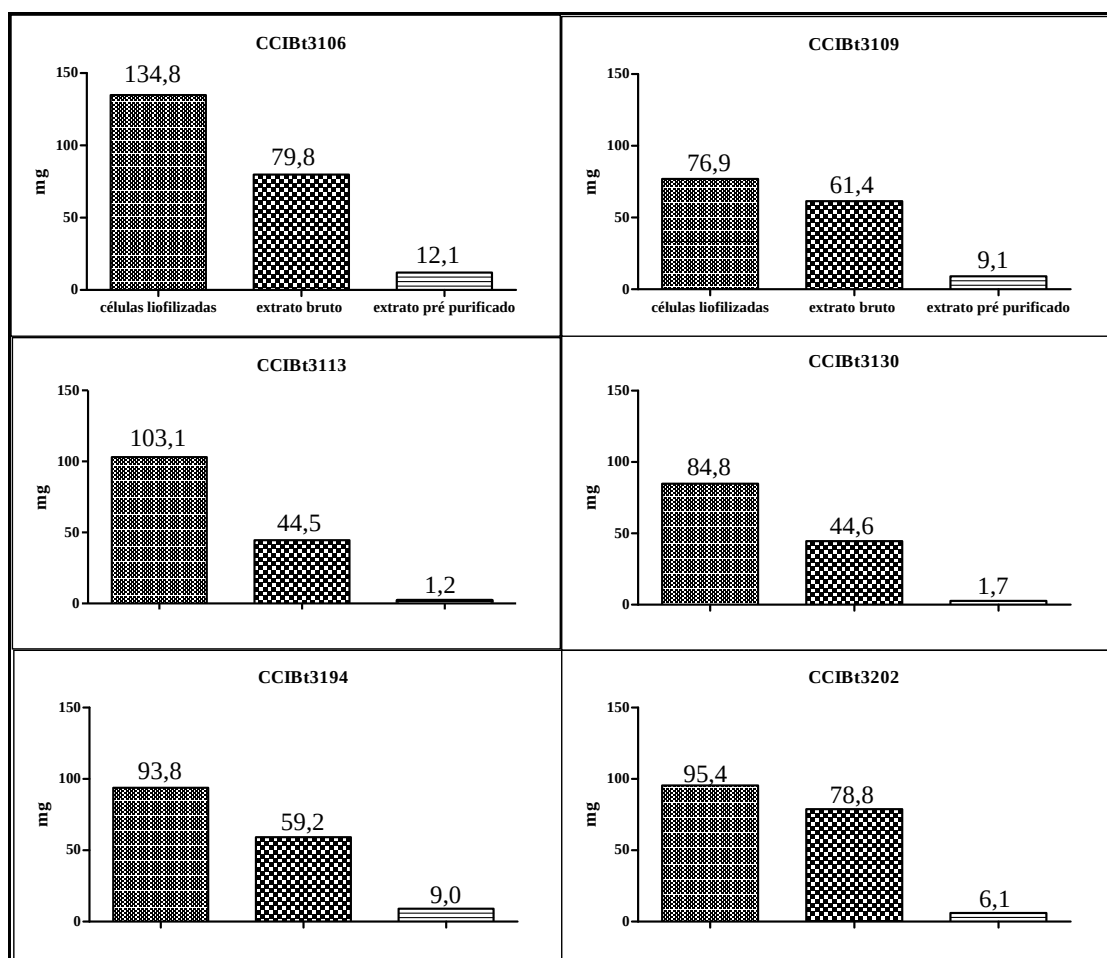
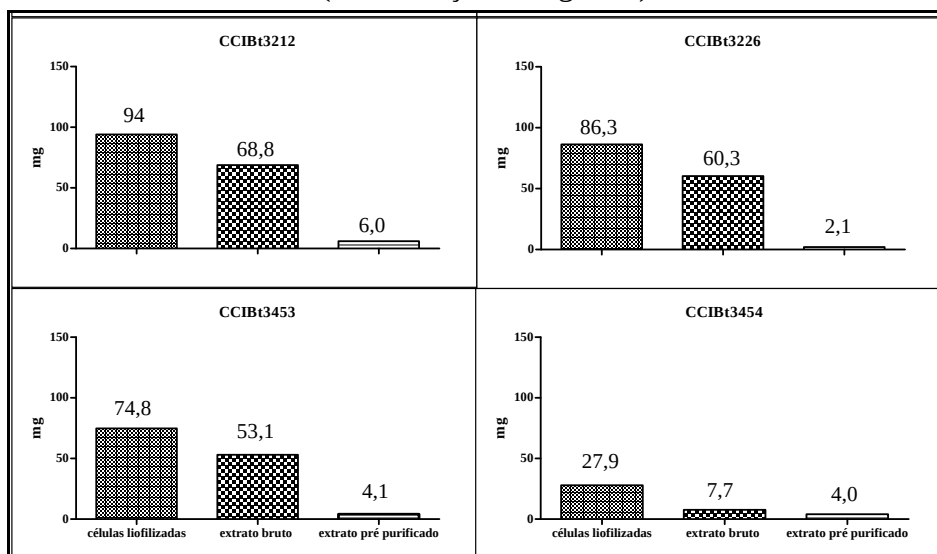


Figura - 1 Rendimento de produção de microcistinas de cada linhagem analisada com relação ao peso seco das células, do extrato bruto e da fração 50:50 (extrato pré-purificado).

(Continuação da figura 1)



ANEXO 2 - INSTRUMENTAÇÃO UTILIZADA E MÉTODOS APLICADOS PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS

A tabela 1 apresenta os instrumentos que foram utilizados no sistema de LC-MS/MS para análise das microcistinas.

Tabela - 1 Instrumentos utilizados para a análise de microcistinas, seus respectivos modelos e fabricante.

Instrumento	Modelo	Fabricante
HPLC – bomba	Agilent 1260 series	Agilent Technologies
HPLC – autoinjeter	Agilent 1260 series	Agilent Technologies
Detector DAD-UV/Vis	Agilent 1290 series	Agilent Technologies
Espectrômetro de massas	3200 QTrap	AB Sciex
Programa de aquisição dos dados	Analyst 1.5.2	AB Sciex

✓ Condições da análise cromatográfica:

Coluna cromatográfica : Protein-Peptide C18 (2,1 x 150 mm, 5 µm). Genesis

Gradiente de fase móvel :	Tempo (min.)	Fase A (%)	Fase B (%)
Fase móvel A: Água com 0,1% de ácido fórmico	3,0 (equil.)	95	5
	0,0	95	5
Fase móvel B: Acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico	0,5	95	5
	45	5	95
	50	95	5
	51	95	5

Temperatura da coluna : 25 °C

Volume de injeção : 10 µL

Fluxo da fase móvel : 0,3 mL/min.

Tempo de corrida : 51 min.

Solução de lavagem da agulha : ACN:H₂O (60:40)

✓ Reagentes utilizados

A tabela 2 apresenta os reagentes utilizados neste trabalho para análise das microcistinas.

Tabela - 2 Reagentes utilizados, seus respectivos fornecedores e especificações.

Reagente	Fornecedor	Especificações
Acetonitrila (ACN)	J.T.Baker	Grau HPLC
Água (H ₂ O)	Barnsted	Tipo 1, grau HPLC
Ácido Fórmico	Sigma-Aldrich	Grau LC-MS

✓ **Deteção por DAD-UV/Vis**

Todas as corridas cromatográficas foram monitoradas por sinal UV-Vis em três comprimentos de ondas distintos: 220 nm, 238 nm e 240 nm.

✓ **Condições do espectrômetro de massas:**

Fonte de Ionização : Turbo Ionspray (ESI - Electrospray)

Modo : Positivo

Modos de análise : 1- MS (faixa 400 a 1200 *m/z*) + MS/MS
 2- Precursor íon de 135 *m/z* (faixa de 400 a 600 *m/z*) + MS/MS (dupla carga)
 3- Precursor íon 135 *m/z* (faixa de 800 a 1200 *m/z*) + MS/MS (mono carga)

✓ **Parâmetros da fonte de ionização**

Abaixo estão apresentados os parâmetros da fonte de ionização:

Parâmetros	Valores
Curtain Gas	20 u.a
Ionspray Voltage	+5000V
Temperature	650°C
Gas 1	60 u.a
Gas 2	45 u.a

✓ **Padrão analítico teste para otimização do método de análise**

Duas soluções de padrões foram adquiridas junto ao Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (tabela 3):

- Solução contendo Microcistinas (LR, RR, LA, YR) na concentração de 10 µg/mL em solução 50% Metanol.
- Solução contendo Microcistina LR na concentração de 10 µg/mL em solução 50% Metanol.

Tabela - 3 Padrões analíticos de microcistinas

Substância	Fórmula	MW (g/mol)	Tempo de retenção (minutos)
Microcistina LR	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	994,5	21,1
Microcistina RR	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1037	18,4
Microcistina LA	C ₄₉ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	910,5	23,7
Microcistina YR	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1044,5	20,6

✓ **Modos de detecção por espectrometria de massas:**

As amostras foram injetadas em três modos de aquisição:

1- MS + MS/MS

Experimento 1:

Modo EMS positivo (*Enhanced Mass Spectrum*) – 1000 amu/sec

Faixa de m/z : 400 a 900

- Detecção dos compostos na faixa de m/z monitorada.

Experimento 2:

Modo ER (*Enhanced Resolution*) – 250 Da/sec

- Confirmação de m/z com melhor resolução.

Aplicação de critério para detecção (*IDA*) em modo MS/MS (Threshold 200000 cps)

Experimento 3:

Modo MS/MS (*Enhanced Product Ion*) – 1000 Da/sec

Faixa de m/z : 80 a 1200 (Rolling Collision Energy)

- Obtenção do espectro de fragmentação padrão do composto (m/z) de maior intensidade cromatográfica.

2- Precursor íon de 135 m/z (faixa de 400 a 600 m/z) + MS/MS

Experimento 1:

Modo *Precursor íon* do fragmento característico de m/z 135,1 (CE = 35eV)

Faixa de m/z : 400 a 600

- Detecção dos compostos com dupla carga $[M-2H]^{2+}$ na faixa de m/z monitorada.

Experimento 2:

Modo ER (*Enhanced Resolution*) – 250 Da/sec

- Confirmação de m/z com melhor resolução.

Aplicação de critério para detecção (IDA) em modo MS/MS (Threshold 3000 cps)

Experimento 3:

Modo MS/MS (*Enhanced Product Ion*) – 1000 Da/sec

Faixa de m/z : 80 a 1200(CE = 35 +/- 20 eV)

- Obtenção do espectro de fragmentação padrão do composto (m/z) de maior intensidade cromatográfica.

3- Precursor íon de 135 m/z (faixa de 800 a 1200 m/z)+ MS/MS

Experimento 1:

Modo *Precursor íon* do fragmento característico de m/z 135,1 (CE = 80eV)

Faixa de m/z : 400 a 600

- Detecção dos compostos com mono carga $[M-H]^+$ na faixa de m/z monitorada.

Experimento 2:

Modo ER (*Enhanced Resolution*) – 250 Da/sec

- Confirmação de m/z com melhor resolução.

Aplicação de critério para detecção (IDA) em modo MS/MS (Threshold 3000 cps)

Experimento 3:

Modo MS/MS (*Enhanced Product Ion*) – 1000 Da/sec

Faixa de m/z : 80 a 1200(CE = 70 +/- 20 eV)

- Obtenção do espectro de fragmentação padrão do composto (m/z) de maior intensidade cromatográfica.

ANEXO 3 - RESULTADOS DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS TESTADOS PARA ANÁLISE DE MICROCISTINAS

3.1. Análise de microcistinas por LC-MS/MS

Infusão do composto Microcistina LR

A infusão da solução de Microcistina LR na concentração de 1,0 µg/mL em solução de água / acetonitrila (1:1 v/v) + 0,1 % Ácido Fórmico no espectrômetro de massas permitiu a caracterização de fragmentação da molécula (MS/MS) e otimização do método (figuras 2, 3 e 4).

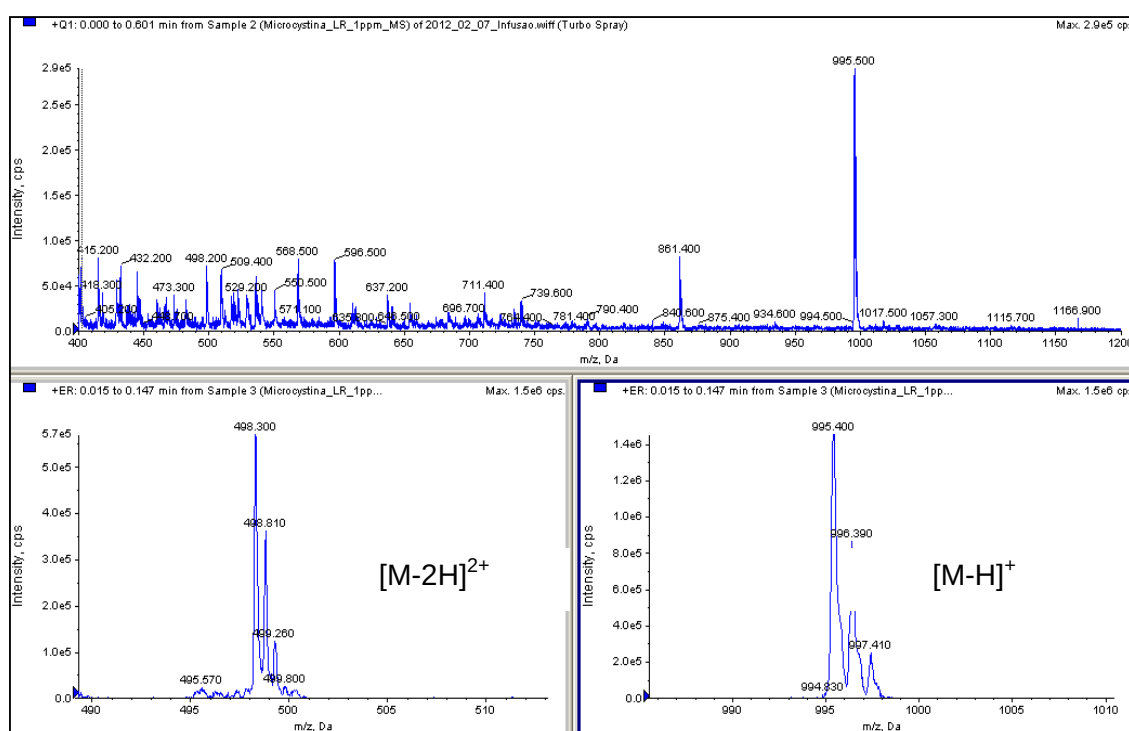


Figura - 2 **a)** Infusão do padrão de Microcistina LR a concentração 1,0 µg/mL. **b)** dupla carga e **c)** mono carga. Fluxo de infusão da solução: 10 µL/min

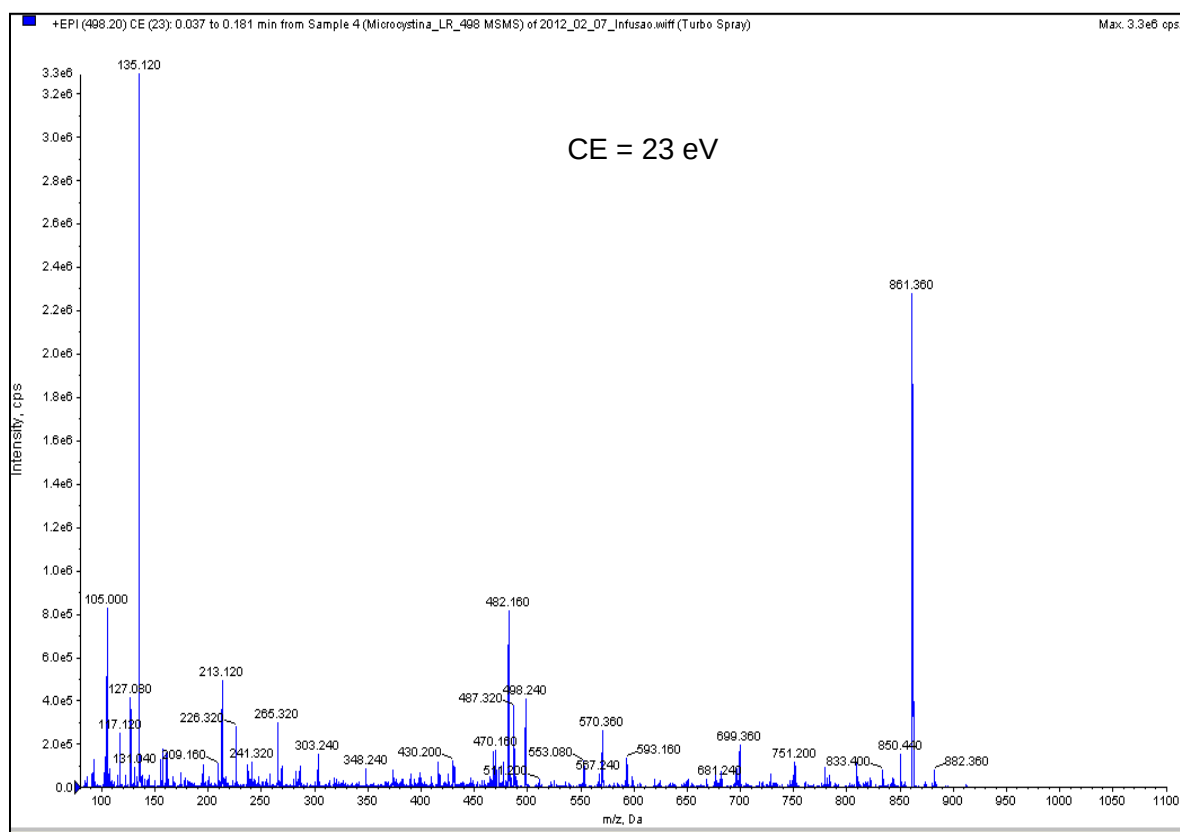


Figura - 3 Fragmentação do íon de m/z 498 (Microcistina LR - dupla carga).

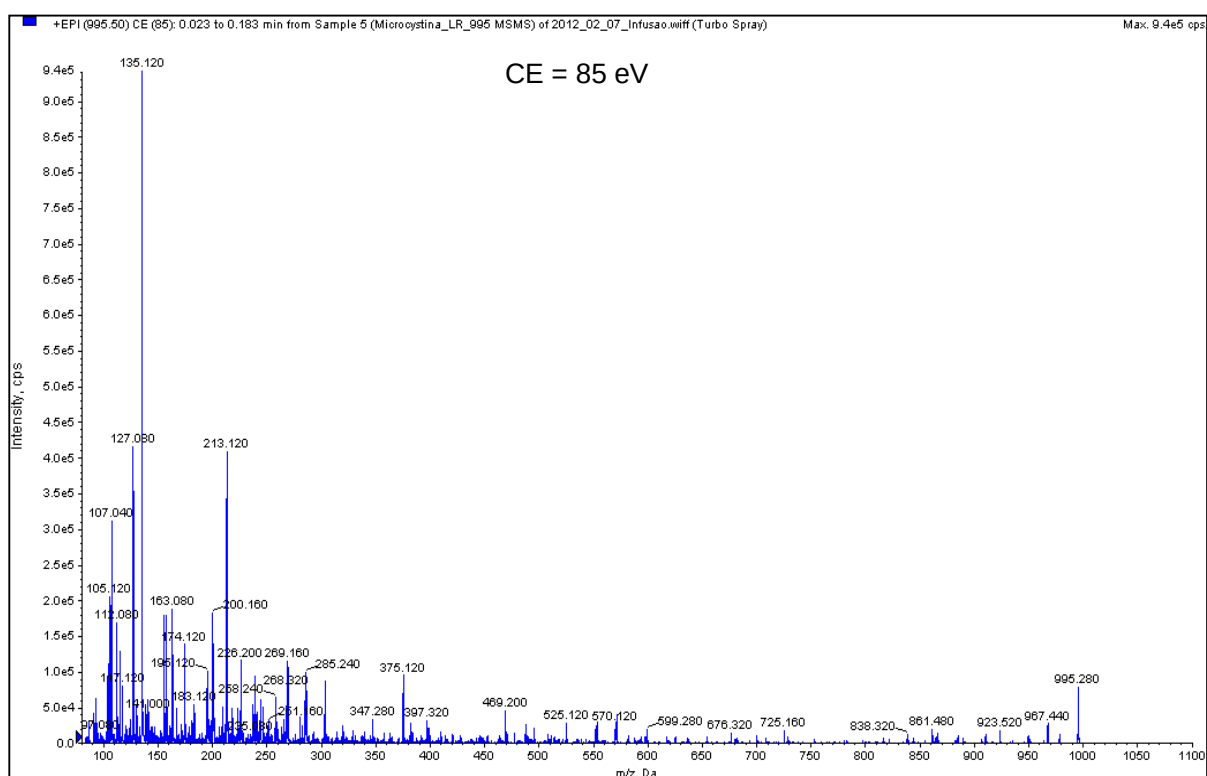


Figura - 4 Fragmentação do íon de m/z 995 (Microcistina LR - mono carga).

3.2.1. Injeção da solução padrão da mistura de microcistinas a concentração de 1,0 µg/mL (2,0 µg/mL de microcistinas LR) - Método 1 – MS + MS/MS

O método de MS + MS/MS foi otimizado para detectar mono e dupla carga de microcistinas. Este método conseguiu chegar a limites de detecção abaixo de 1,0 µg/mL.

A figura 5 apresenta o cromatograma do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS e o espectro de UV/vis.

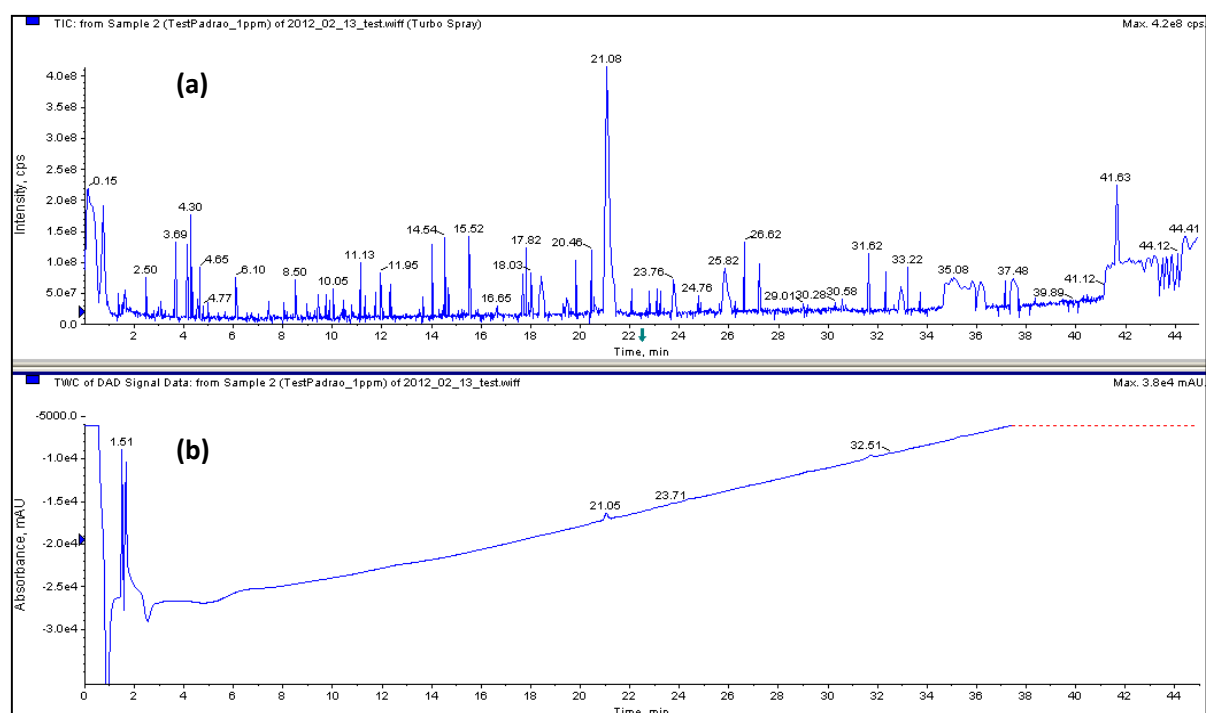


Figura - 5 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS **(a)**. Total Ion Chromatogram e **(b)** Sinal UV/Vis.

A figura 6 apresenta os cromatogramas do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS, pode-se observar a presença de mono (**Microcistina RR**) e dupla carga de microcistinas (**Microcistina LR**; **Microcistina LA**; Microcistina YR).

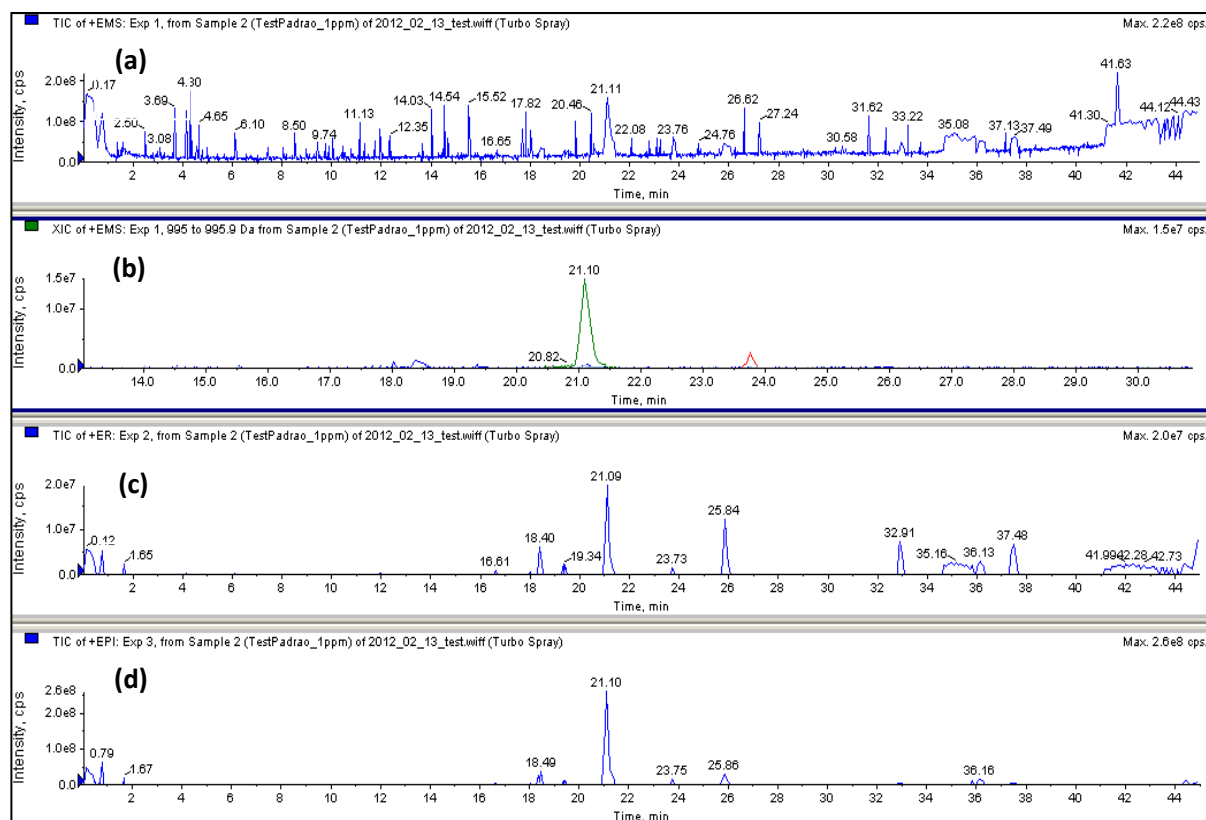


Figura - 6 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS **(a)**. TIC (Total Ion Chromatogram) MS; **(b)** XIC (Extract Ion Chromatogram) – m/z 519 (**Microcistina RR**, T.R = 18.4 min.); m/z 995 (**Microcistina LR**, T.R = 21,1 min.); m/z 910 (**Microcistina LA**, T.R = 23,7 min.); m/z 1045 (**Microcistina YR**, T.R = 20,5 min.). **(c)** TIC – Enhanced Resol. **(d)** TIC – MS/MS.

A figura 7 apresenta o espectro de massa em MS/MS do íon de m/z 519 para o padrão da microcistina RR com tempo de retenção de 18,4 minutos. Pode-se observar a fragmentação característica do íon $[M-2H]^{2+}$.

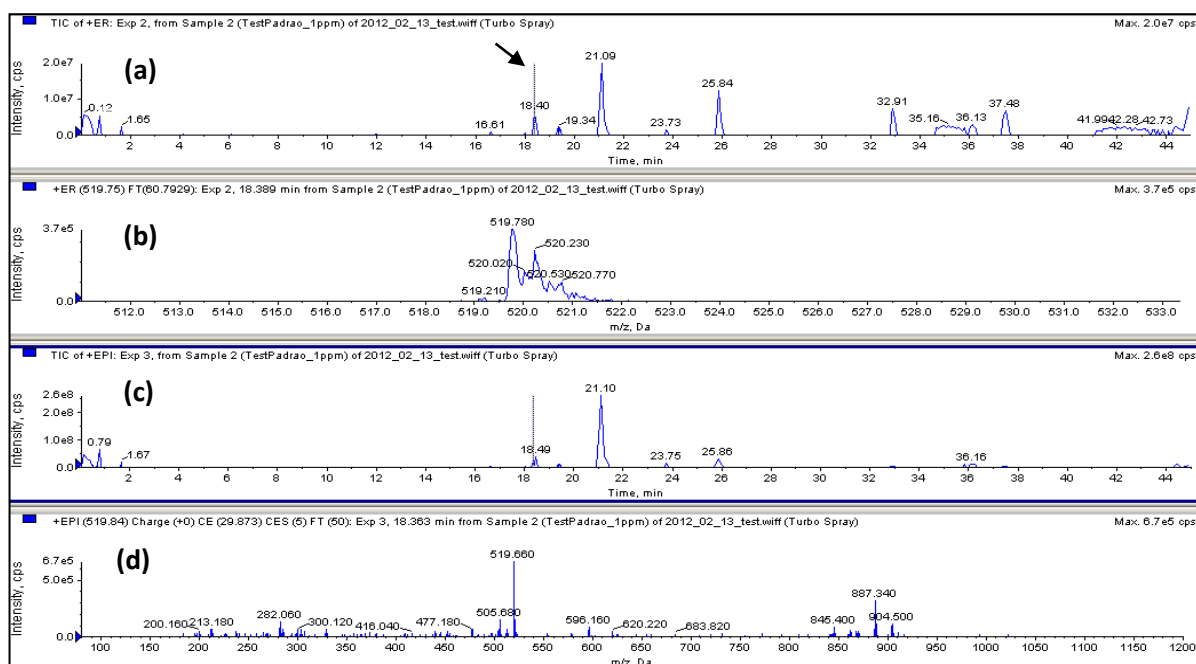


Figura - 7 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS **m/z 519 (Microcistina RR, T.R = 18.4 min.)** (a). TIC – Enhanced Resol. (ER) (b). Espectro de ER (dupla carga). (c) TIC – MS/MS. (d) Espectro de MS/MS

A figura 8 apresenta o espectro de massa em MS/MS do íon de m/z 995 para o padrão da microcistina LR com tempo de retenção de 21,1 minutos. Pode-se observar a fragmentação característica do íon $[M-H]^+$.

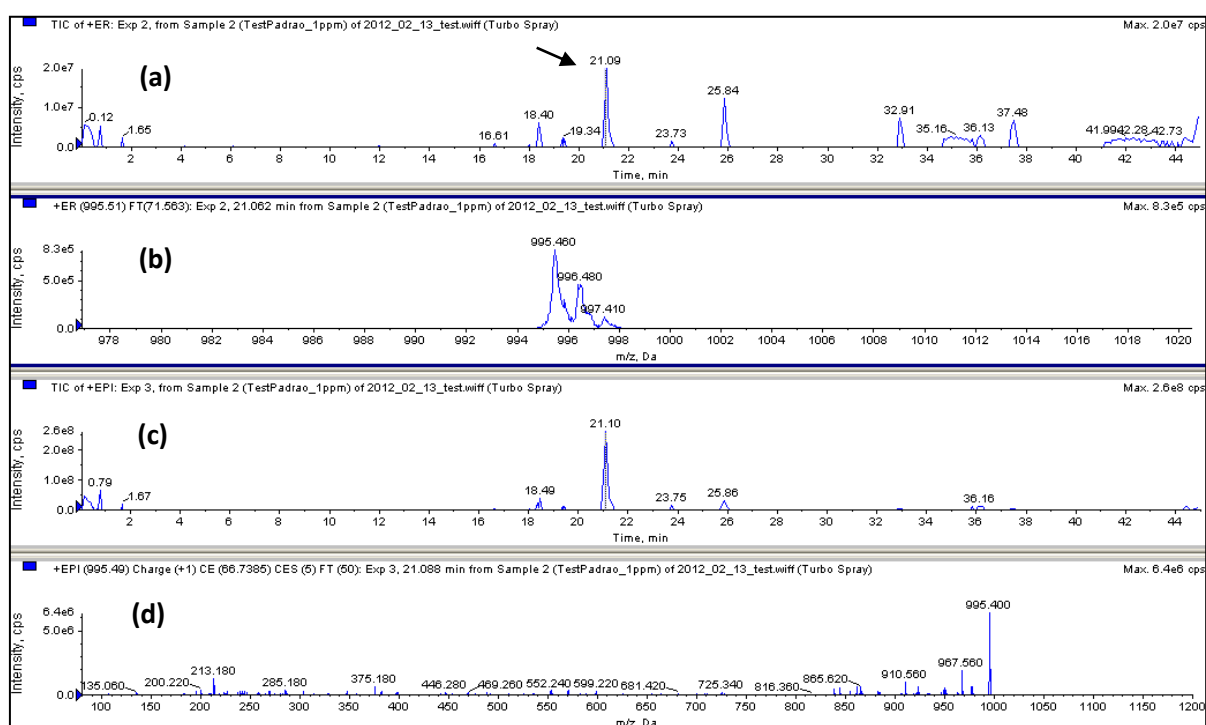


Figura - 8 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS - **m/z 995 (Microcistina LR, T.R = 21.1 min.)** (a). TIC – Enhanced Resol. (ER) (b). Espectro de ER (dupla carga). (c) TIC – MS/MS. (d) Espectro de MS/MS

A figura 9 apresenta o espectro de massa em MS/MS do íon de m/z 910 para o padrão da microcistina LA com tempo de retenção de 23,7 minutos. Pode-se observar a fragmentação característica do íon $[M-H]^+$.

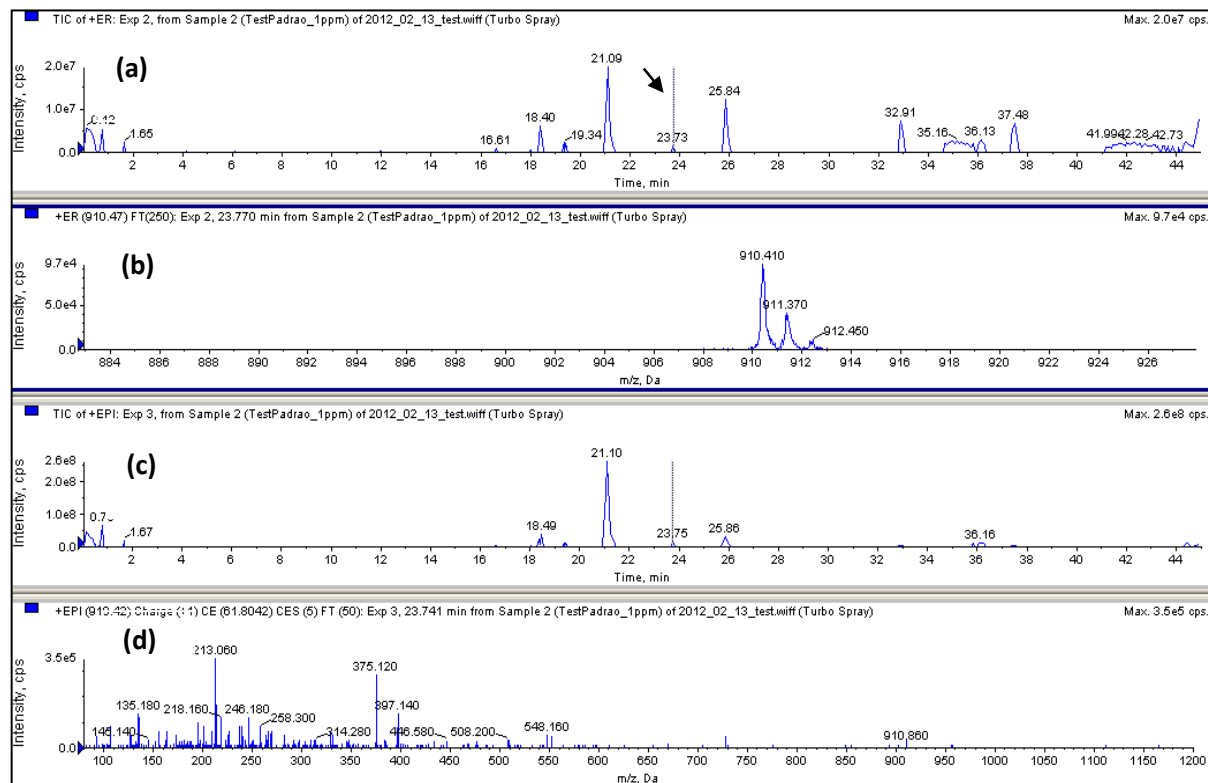


Figura - 9 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS - m/z 910 (Microcistina LA, T.R = 23,7 min.) **(a)**. TIC – Enhanced Resol. (ER) **(b)**. Espectro de ER (dupla carga). **(c)** TIC – MS/MS. **(d)** Espectro de MS/MS

A figura 10 apresenta o perfil do íon de m/z 1045 para o padrão da microcistina YR com tempo de retenção de 20,6 minutos. Devido ao sinal/ruído baixo, não foi possível obter o espectro de MS/MS e observar a fragmentação característica do íon $[M-H]^+$.

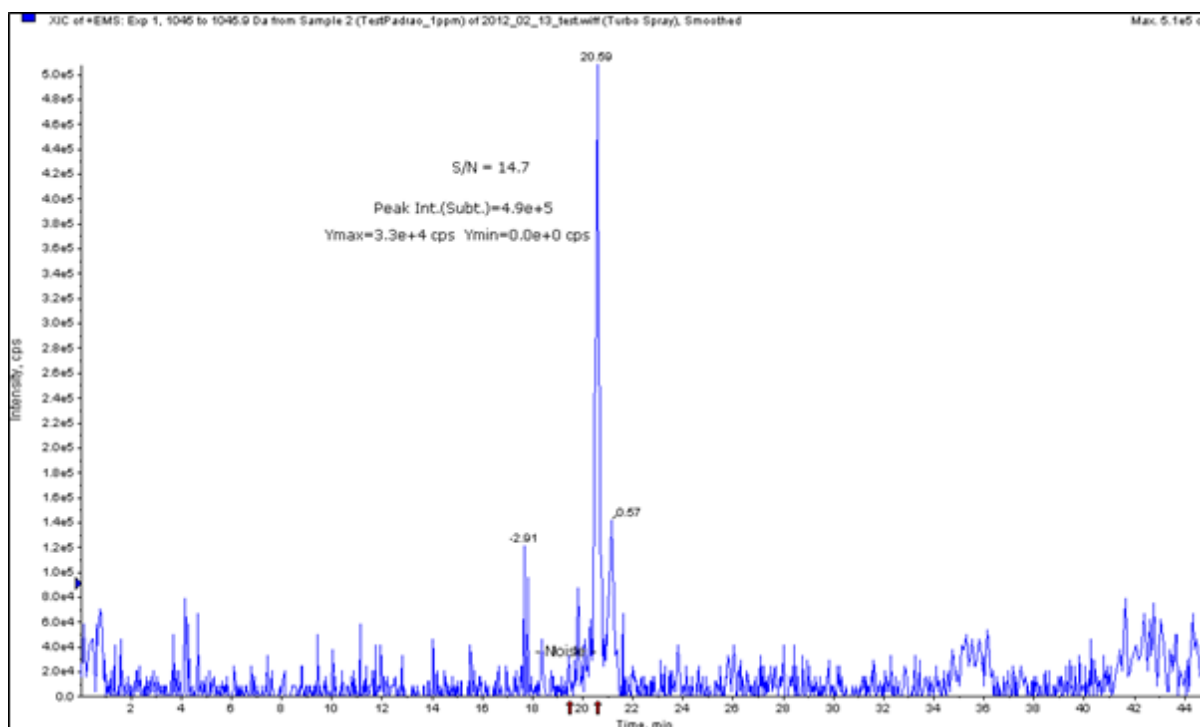


Figura - 10 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método MS + MS/MS (**Microcistina YR, T.R = 20,6 min.**) XIC **m/z 1045**. S/R (Sinal/Ruído) baixo, não foi possível obter as informações de ER e MS/M

3.2.2. Exemplo de injeção da solução padrão mistura de microcistinas a concentração de **1,0 µg/mL (2,0 µg/mL de Microcistina LR)** - Método 3 – Precursor íon 135 m/z (mono carga) + MS/MS

Na figura 11 pode-se observar a injeção do padrão da mistura de microcistinas no método precursor 135 m/z (mono carga)+MS/MS. Neste método, na concentração de 1,0 µg/mL das microcistinas injetada, somente o espectro de MS/MS da microcistina LR foi obtido. Não foi observado o sinal de mono carga referente ao composto microcistina RR, por isso o método 2 foi criado. Este método foi utilizado somente para as amostras estudadas e não para os padrões.

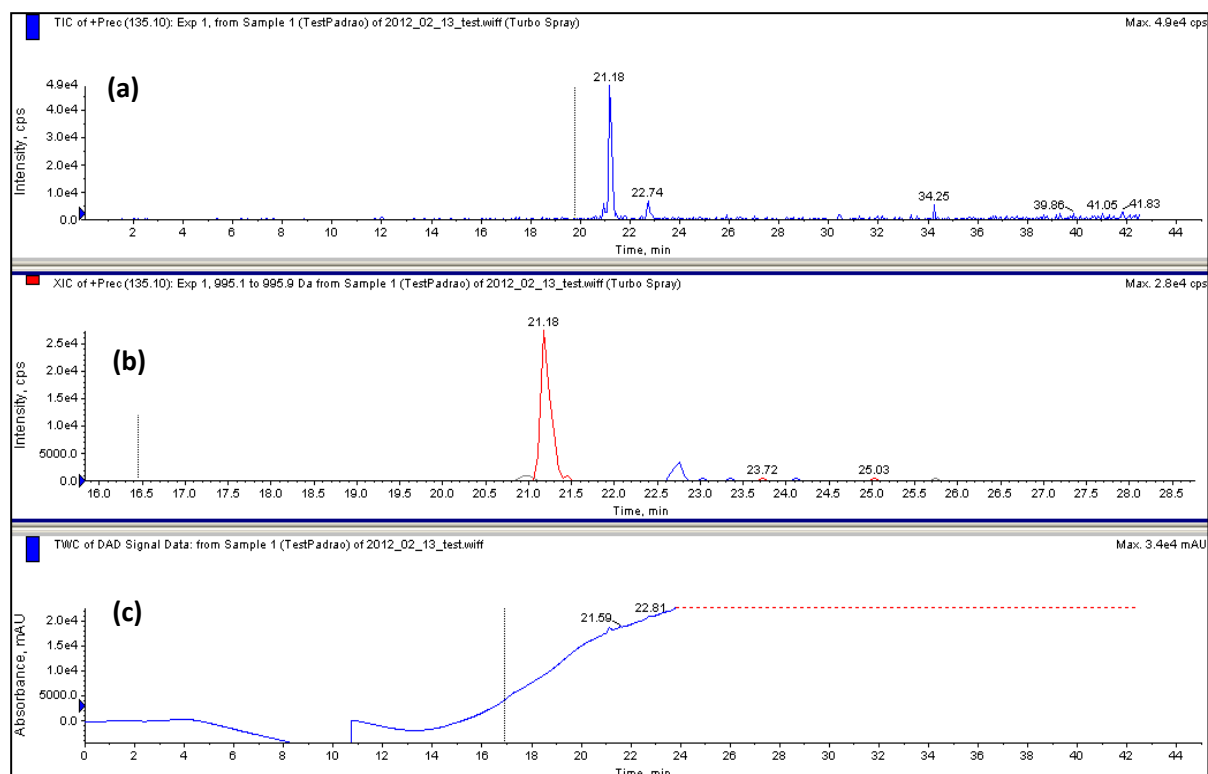


Figura - 11 Injeção do padrão da mistura de microcistinas no método Percurso 135 m/z (mono carga)+ MS/MS (a). TIC (Total Ion Chromatogram) MS; (b) XIC (Extract Ion Chromatogram) – m/z 1038 (Microcistina RR, T.R = 18.4 min. – não detectado); m/z 910 (Microcistina LA, T.R = 22,8 min.); m/z 995 (Microcistina LR, T.R = 21,1 min.); m/z 1045 (Microcistina YR, T.R = 20,9 min.). (c) Sinal UV-Vis.

3.3. Amostras analisadas quanto à toxicidade

Os métodos de detecção (1, 2 e 3) por espectrometria de massas desenvolvidos e otimizados foram adequados para detecção e confirmação dos compostos microcistinas nas formas mono e dupla carga a concentrações abaixo de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (referência MC-LR, método 1) até 1,0 $\mu\text{g/mL}$ por UV/Vis. O método de LC-MS/MS foi seletivo e sensível para busca de microcistinas nas amostras estudadas.

A tabela 4 apresenta as variantes de microcistinas produzidas por cada linhagem. Nas amostras analisadas foram detectados muitos compostos, dentre estes, peptídeos não identificados. Por ser uma classe de moléculas complexas, será realizado em colaboração com Dra. Luciana R. de Carvalho, Instituto de Botânica- SP, um estudo futuro para identificação e confirmação de compostos desconhecidos detectados nestas amostras, pois há indícios de novas formas de microcistinas. Os dados de MS e MS/MS servirão como base para identificação destes compostos. As microcistinas formam isoformas, metabólitos, adultos de sódio (+22 Da e +11 Da p/ dupla carga) e potássio (+38 Da para +19 p/ dupla

carga), fator que deve ser levado em consideração para evitar falsos positivos e identificação errônea. Como o objetivo dessa etapa do trabalho foi selecionar uma linhagem tóxica e outra não tóxica e a quantidade de informações geradas nas análises das sete amostras foi grande e complexa, neste anexo mostraremos os resultados com detalhes apenas para as linhagens selecionadas.

Tabela - 4 Sumário dos resultados obtidos quanto à identificação de microcistinas. N/D = Não Detectado. X = Confirmado. Cinza = Composto mais abundante.

Amostra	Método	Composto	m/z	T.R. (min)	Sinal XIC (cps)	Espectro de ER	Espectro de MS/MS	Sinal UV/Vis (mAU)
Conc. Padrão 1 ppm	1	MC-RR	519	18,4	1180000	X	X	N/D
Conc. Padrão 1 ppm		MC-YR	1045	20,6	4960000	N/D	N/D	N/D
Conc. Padrão 2 ppm		MC-LR	995	21,1	12900000	X	X	781
Conc. Padrão 1 ppm		MC-LA	910	23,7	1880000	X	X	84
Conc. Padrão 1 ppm	3	MC-RR	519	18,4	N/D	N/D	N/D	N/D
Conc. Padrão 1 ppm		MC-YR	1045	20,6	1000	N/D	N/D	N/D
Conc. Padrão 2 ppm		MC-LR	995	21,1	28000	X	X	930
Conc. Padrão 1 ppm		MC-LA	910	23,7	3500	N/D	N/D	118
3194_430	1	MC-RR	519	18,6	8600000	X	X	1271
		MC-YR	1045	20,7	1200000	N/D	N/D	N/D
		MC-LR	995	21,3	1760000	N/D	N/D	108
	2	MC-RR	519	18,8	81000	X	X	1105
		MC-LR	498	21,3	2000	N/D	N/D	88
	3	MC-RR	1038	18,6	1000			1104
		MC-YR	1045	20,7	625	N/D	N/D	N/D
		MC-LR	995	21,3	1751			188
	1							
	2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	3							
3202_432	1	MC-YR	1045	20,7	1760000	N/D	N/D	43000
		MC-LR	995	21	7100000	X	X	
		MC-LA	910	23,8	966000	X	N/D	N/D
		?	945	16,3		X	X	131
		?	1108	17,5		X	X	
		?	1086,3	17,7		X	X	1960
		?	973,4	18,5		X	X	
		?	742,4	18,7		X	X	1416
		MC-?	1027,6	18,8		X	X	
		MC-?	1029,5	19,05		X	X	339
		Dupla carga	1047,9	19,6		X	X	N/D
		Dupla carga	892	19,8		X	X	N/D
		Dupla carga	818,3	19,9		X	X	N/D
		[L-MeSer7]MCYST-LR	1013,4	20,5		X	X	632
		Modif. MC-LR	981,4	21,5		X	X	N/D
		Modif. MC-LR	1009,5	22,1		X	X	1327
	2	?	1002,4	24,7		X	X	2105
		MC-LR	498	21,1	520000	X	X	54657
		[L-MeSer7]MCYST-LR	506	17,9		X	N/D	15325
		MC-?	515,2	19,2		X	N/D	1900
		MC-?	518,2	20,6		X	X	N/D
		MC-? + Na+	517,3	20,9		X	X	229
		MC-LR + Na+	491,3	21,2		X	X	N/D
		Modif. MC-LR + Na+	509,2	21,5		X	X	N/D
		MC-?	502,3	21,4 e 21,8		X	X	N/D
		Modif. MC-LR	505,3	22,1		X	X	1146
		Modif. MC-LR	520,7	24,7		X	X	1923
		MC-LR	995	21,1	1560000	X	X	55360
		MC-?	1011,4	20,9		X	X	N/D
		Modif. MC-LR	981,4	21,3		X	X	N/D
		[D-Asp3,Dha7]MCYST-LR	967,4	21,7		X	X	N/D
		Modif. MC-LR	1009,4	22,2		X	X	1183
	3	MC-?	1002,4	24,7		X	X	1192

Tabela 4. Continuação

Amostra	Método	Composto	m/z	T.R. (min)	Sinal XIC (cps)	Espectro de ER	Espectro de MS/MS	Sinal UV/Vis (mAU)
3109_433	1	MC-RR	520 e 1038	18,1	87000000	X	X	34854
		MC-YR	1045	20,6	56000000	X	X	32040
		MC-LR	995	21,1	15000000	X	X	3845
		MC-LA	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
		Modif. MC-RR	512,8	17,8		X	X	9546
		Modif. MC-RR	1044,5	18,6		X	X	N/D
		MC-?	1029,4	21,9		X	X	8140
		MC-WR	1068,4	22,4		X	X	7739
		MC-?	1072,4	22,3		X	X	
	2	MC-RR	519,9	18,2	1700000	X	X	
		MC-YR	523,1	20,7	310000	X	X	
		MC-LR	498 e 509	21,1	41000	X	X	
		Modif. MC-RR	519,1	19,4	182000	X	X	3219
		Modif. MC-RR	512,8	17,8		X	X	
		Modif. MC-RR	512,8	19,2		X	X	
		MC-?	515,2	22		X	X	
		MC-WR	534,7	22,4		X	X	
	3	MC-RR	1038	18,3	100000	X	X	
		MC-YR	1045	20,8	208000	X	X	
		MC-LR	995	21,1	87000	X	X	
		Modif. MC-RR	1038	19,4	7000	X	X	
		MC-RR + Na+ ?	1061,2	20		X	X	
		MC-?	1100,2	21,1		X	X	5250
		MC-?	1029,4	22		X	X	
		MC-WR	1068,4	22,4		X	X	
3454_434	1	MC-RR	519 e 1038	18,5	20000000	X	X	14952
		MC-YR	1045	20,7	74000000	X	X	53761
		MC-LR	995	21,2	84000	X	X	3011
		Modif. MC-RR	519	19,4	1000000	X	X	coelhudo
		MC-? + Na+	527,7	13,3		X	X	
		MC-?	1016,4	13,5		X	X	788
		MC-?	499,8	13,8		X	X	
		MC-RR + Na+ ?	1061,4	16,2		X	X	N/D
		MC-?	1031,3	16,7		X	X	672
		MC-?	1044,4	18,8		X	X	coelhudo
		MC-?	1029,4	19,2		X	X	coelhudo
		MC-? + Na+	505,3	19,3		X	X	677
		MC-?	530,8	19,5		X	X	677
		MC-?	1045,4	19,6		X	X	coelhudo
		MC-?	1061,4	19,9		X	X	1140
		?	911,3	21,1		X	X	coelhudo
		?	1084,3	21,5		X	X	369
		MC-?	1029,5	21,9		X	X	1928
		MC-WR	1068,3	22,4		X	X	4200
	2	MC-RR	519,9	18,2	850000	X	X	
		MC-YR	523,1	20,7	490000	X	X	
		MC-LR	498	21,2	11000	X	X	
		Modif. MC-RR	512,7	18,2		X	X	
		MC-?	515,2	22		X	X	
		MC-WR	534,2	22,6		X	X	
	3	MC-RR	1038	18,7	42000	X	X	
		MC-YR	1045	20,8	1100000	X	X	
		MC-LR	995	21,1	8500	X	X	
		MC-RR + Na+ ?	1061,4	20,1		X	X	
		Modif. MC-YR	1031,2	20,5				
		MC-?	1029,5	21,9		X	X	
		MC-WR	1068,3	22,4		X	X	

Tabela 4. Continuação

Amostra	Método	Composto	m/z	T.R. (min)	Sinal XIC (cps)	Espectro de ER	Espectro de MS/MS	Sinal UV/Vis (mAU)
3212_435	1	MC-LR	995	21,2	70000000	X	X	52352
		MC-?	1011,4	17,9		X	X	512
		?	959,4	18,3		X	X	1269
		Dupla carga	871,5	18,5		X	X	1908
		?	987,5	19,9		X	X	806
		[L-MeSer7]MCYST-LR	1013,4	20,3		X	X	511
	2	Modif. MC-LR	1009,5	21,9		X	X	2080
		MC-LR	498	21,2	480000	X	X	
		MC-?	506,2	18,5		X	Baixo	
		MC-LR + K+	517,2	20,9		X	X	
		Modif. MC -LR + Na+	491,3	21,4		X	X	
		Modif. MC-LR	505,2	21,8		X	X	
	3	MC-LR	995	21,2	1400000	X	X	
		[L-MeSer7]MCYST-LR	1013,4	20,5				
		Modif. MC -LR	981,4	21,4				
		Modif. MC-LR	1009,4	22,1				
3453_436	1	MC-LR	995	21,1	81000000	X	X	71196
		Dupla carga	880,4	17,4		X	X	3612
		MC-?	1011,1	17,7		X	X	N/D
		MC-?	959,3	18,4		X	X	1226
		MC-?	1005,4	18,6		X	X	829
		MC-?	987,5	19,8		X	X	104
		Modif. MC-LR	20,3	1013,4		X	X	615
		Modif. MC-LR	22,0	1009,5		X	X	3307
		Modif. MC-LR + Na+	24,1	509,4		X	X	N/D
	2	MC-LR	498	21,1	620000	X	X	
		Modif. MC-LR	506,5	17,4		X	X	
		Modif. MC-LR + Na+ ou K+ ???	523,5	17,9		X	X	
		Modif. MC-LR + Na+	505,3	18,4		X	X	
		Modif. MC-LR + Na+	491,4	21,4		X	X	
		Modif. MC-LR	22,0	505,5		X	X	
	3	MC-LR	995	21,1	1900000	X	X	
		Modif. MC-LR	1013,4	20,4		X	X	
		Modif. MC-LR	981,4	21,4		X	X	
		Modif. MC-LR	1009,3	22,0		X	X	

A tabela 5 e a figura 12 apresentam a concentração em porcentagem relativa das microcistinas de padrões conhecidos: LR, RR, YR e LA. A linhagem CCIBt3106 não foi reportada, pois microcistinas não foram detectadas. Pode-se observar a presença dos quatro tipos de microcistinas: na linhagem CCIBt 3194 encontramos MC-RR e, em menor concentração, as variantes YR e LR; na linhagem CCIBt 3202 ficou evidente a presença da MC-LR e, em menor concentração, a variante YR, seguido por traços da MC-LA; na linhagem CCIBt 3109 foram detectadas MCs-RR e YR, e em menor concentração, a variante LR; na linhagem CCIBt3454 a maior produção foi da MC-YR e em menor concentração foram detectadas as variantes RR e LR; as linhagens CCIBt 3212 e 3453 produziram apenas MC-LR. Sendo assim, a microcistina LR foi a única detectada em todas as amostras tóxicas estudadas.

Tabela - 5 Concentração em porcentagem relativa das variantes de microcistinas RR, YR, LR e LA para cada linhagem analisada.

Compostos	Concentração em %					
	Cepas					
	3194	3202	3109	3454	3212	3453
MC-RR	100	Zero	100	27.8	100	100
MC-YR	14	2.5	92	100	Zero	Zero
MC-LR	20.5	100	11	5.6	Zero	Zero
MC-LA	Zero	1.4	Zero	Zero	Zero	Zero

Preto = sinal em % relativa “Extract Ion Chromatogram” (XIC) – Método 1.

Azul = sinal em % relativa UV/Vis.

Amostra 3106 = microcistinas não detectadas.

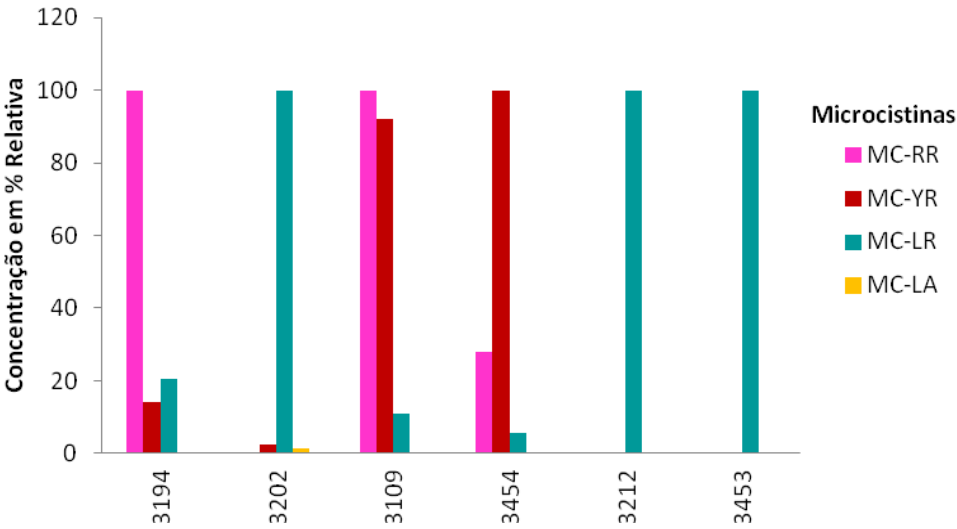


Figura - 12 Concentração em porcentagem relativa das variantes de microcistinas RR, YR, LR e LA para cada linhagem analisada.

Resultados da amostra CCIBt3194 – Método 1 – MS + MS/M

A figura 13 apresenta o cromatograma da amostra CCIBt3194 no método MS + MS/MS e o respectivo espectro de UV/vis. A figura 14 apresenta o “Extract Ion Chromatogram” - XIC dos compostos padrão conhecidos.

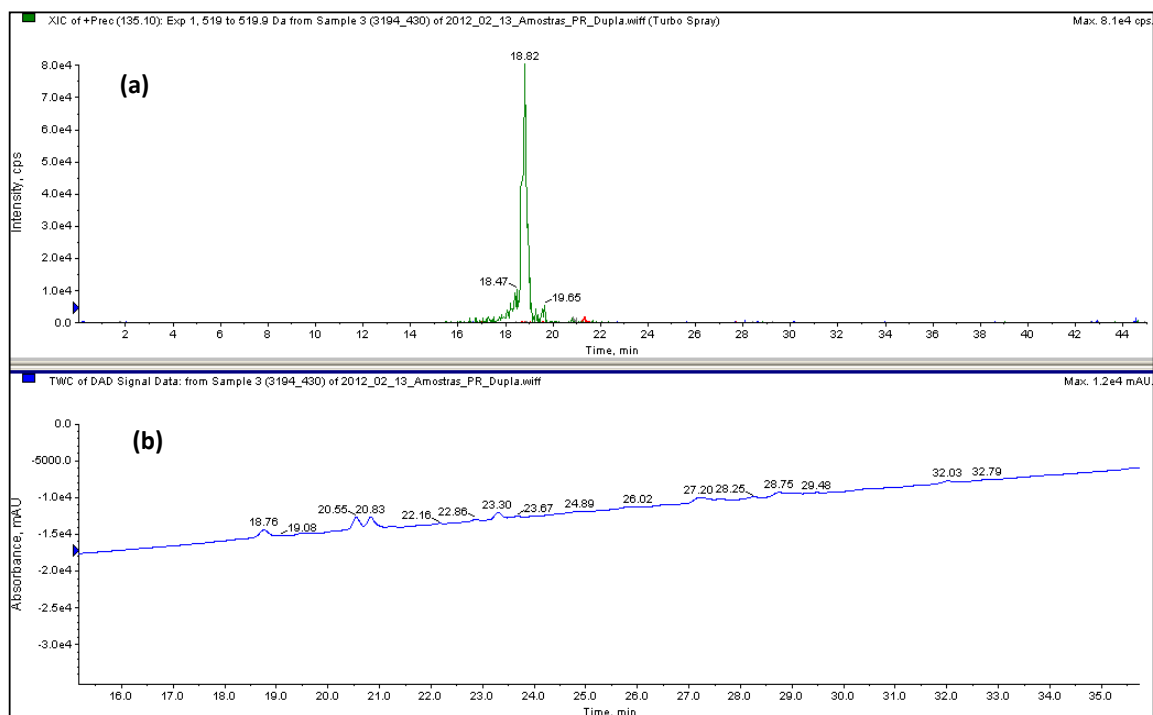


Figura - 13 (a) TIC – Método 1 e (b) Sinal UV/Vis.

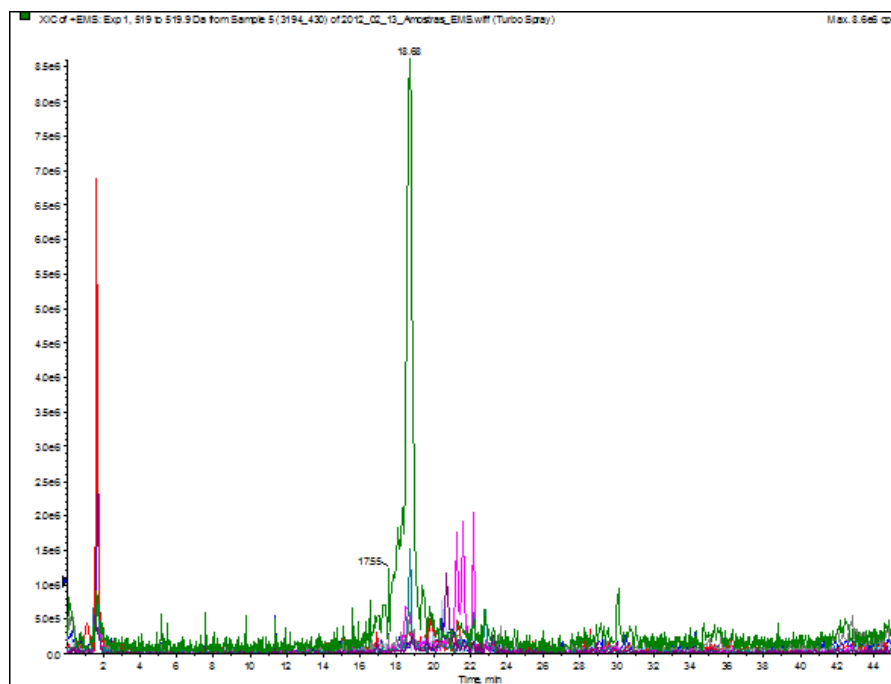


Figura - 14 XIC dos compostos padrão conhecidos. MC-RR (T.R = 18,6 min.) m/z = 519; MC-YR (T.R = 20,7 min.) m/z = 1045; MC-LR (T.R. = 21,3 min.) m/z = 995.

A figura 15 apresenta o espectro de massa em MS/MS do íon de m/z 519 correspondente a MC-RR com tempo de retenção de 18,7 minutos. É possível observar a fragmentação característica do íon $[M-2H]^{2+}$.

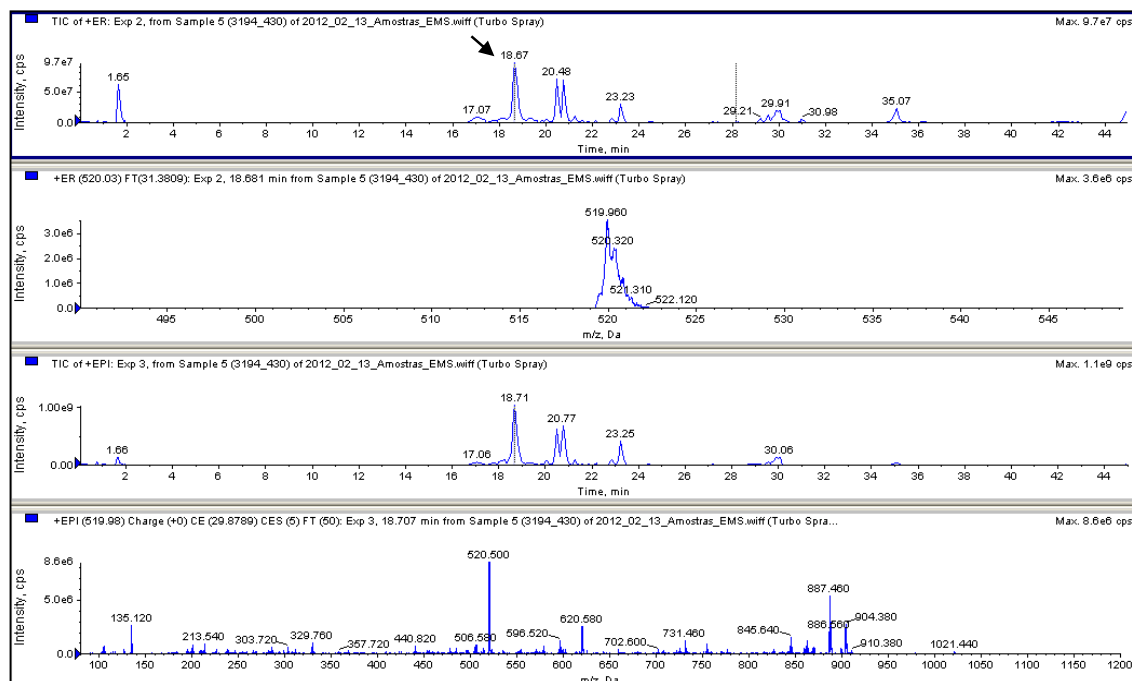


Figura - 15 Amostra – 3194 método MS + MS/MS - m/z 519 (MC-RR, T.R = 18,7 min.) (a). TIC – Enhanced Resol. (ER) (b). Espectro de ER (dupla carga). (c) TIC – MS/MS. (d) Espectro de MS/MS.

OBS. Para MC-LR e YR não obtivemos a confirmação de ER e MS/MS.

3.5.2. Resultados da amostra CCIBT3194 Método 2 – Precursor 135 (dupla carga) + MS/MS

A figura 16 apresenta o cromatograma da amostra CCIBT3194 no método precursor 135 (dupla carga) + MS/MS e o respectivo espectro de UV/vis.

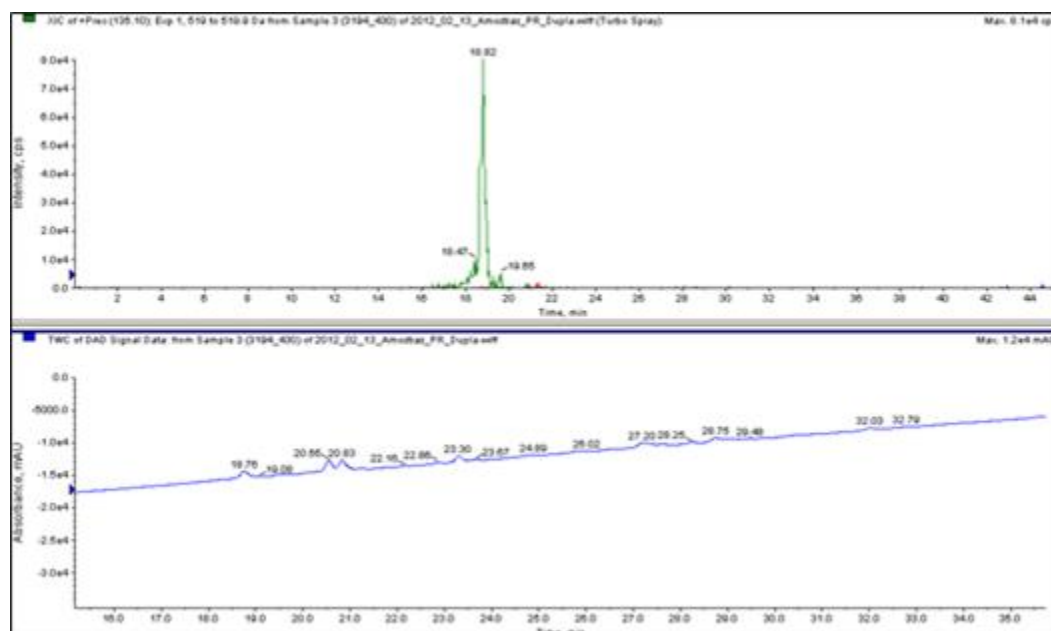


Figura - 16 Amostra CCIBt3194 - **(a)** XIC dos compostos padrão conhecidos. MC-RR (T.R = 18,6 min.) m/z = 519; MC-LR (T.R. = 21,3 min.) m/z = 498. **(b)** = Sinal UV/Vis (zoom)

A figura 17 apresenta o espectro de massa em MS/MS do íon de m/z 519 correspondente a MC-RR com tempo de retenção de 18,7 minutos. Pode-se observar a fragmentação característica do íon $[M-2H]^{2+}$.

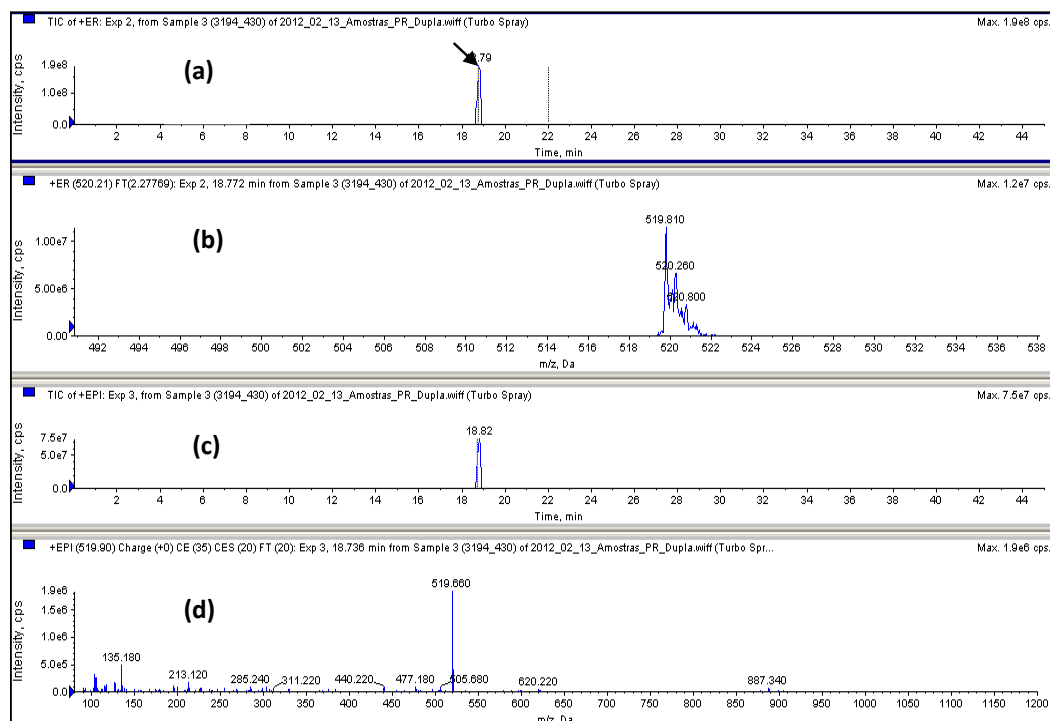


Figura - 17 Amostra CCIBt3194 método 2 (precursor 135 – dupla carga) - m/z 519 (MC-RR, T.R = 18,7 min.) **(a)**. TIC – Enhanced Resol. (ER) **(b)**. Espectro de ER (dupla carga). **(c)** TIC – MS/MS. **(d)** Espectro de MS/MS

OBS. Para as MC-LR e YR não obtivemos a confirmação de ER e MS/MS.

3.5.3. Resultados da amostra CCIBt3194 – Método 3 – Precursor 135 (mono carga) + MS/MS

Na figura 18 pode-se observar a injeção da amostra CCIBt3194 no método precursor 135 m/z (mono carga)+ MS/MS.

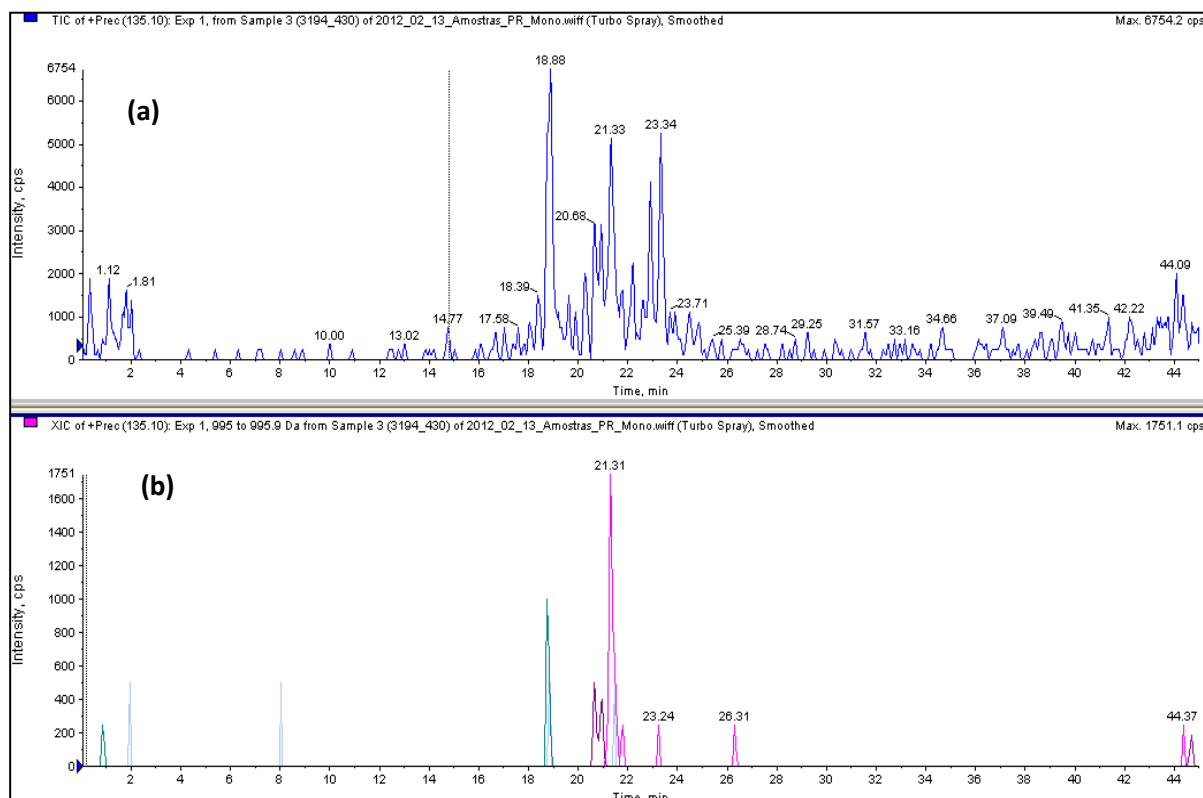


Figura - 18 Amostra 3194. (a) TIC – Método 3 e (b) XIC dos compostos padrão conhecidos. MC-RR (T.R = 18,6 min.) $m/z = 1038$; MC-YR (T.R = 20,7 min.) $m/z = 1045$; MC-LR (T.R. = 21,3 min.) $m/z = 995$

OBS. UV/Vis adquirido, mas não mostrado. ER e MS/MS não detectados, pois o sinal estava baixo.

3.4.Resultados da linhagem não tóxica selecionada

3.4.1. Resultado amostra CCIBt3106 – Método 1 – MS + MS/MS

A figura 19 apresenta o cromatograma da amostra CCIBT3106 no método MS + MS/MS e o respectivo espectro de UV/vis.

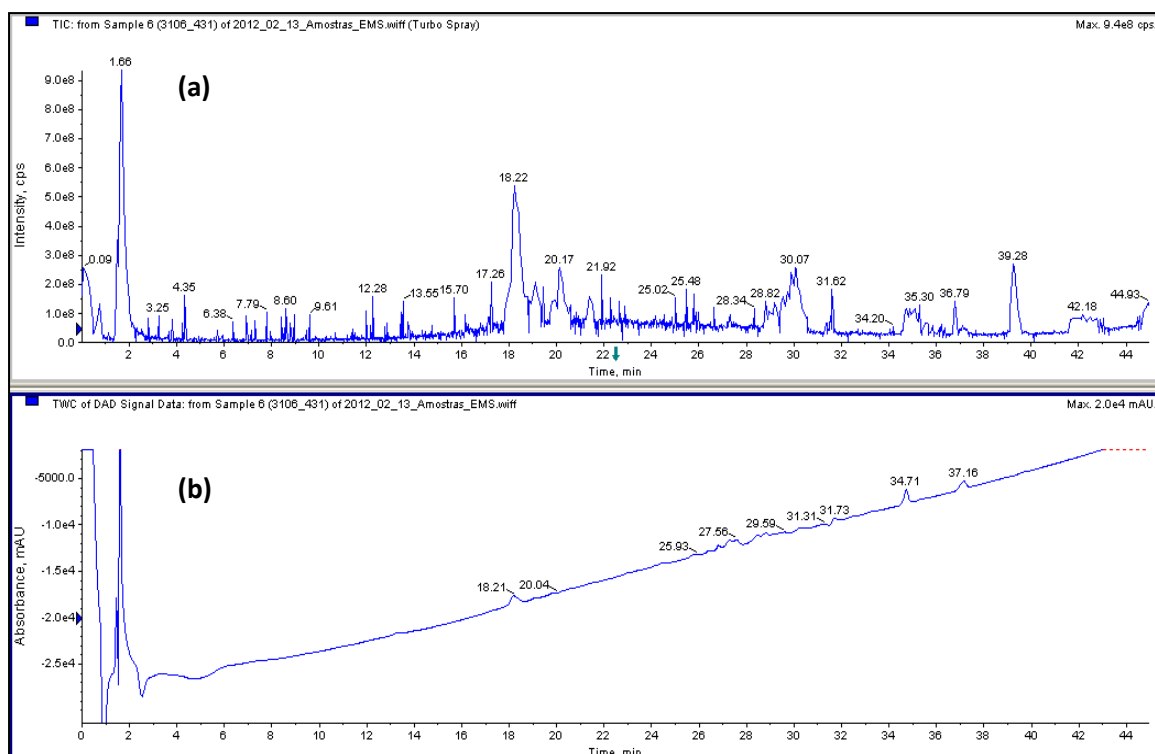


Figura - 19 (a) TIC – Método 1 e (b) Sinal UV/Vis.

A figura 20 apresenta o “Extract Ion Chromatogram” – **XIC**, pode-se observar que não houve a produção das MC padrão.

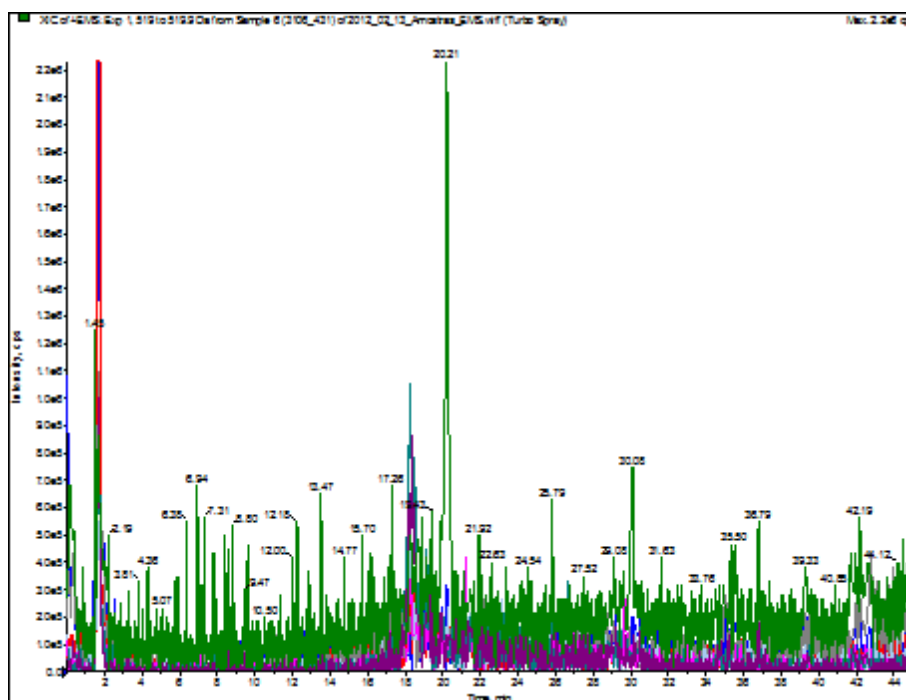


Figura - 20 MC Não detectadas.

3.4.2. Resultado amostra CCIBt3106 – Método 2 – Precursor 135 (dupla carga) + MS/MS.

A figura 21 apresenta o espectro de massa em MS/MS onde não foi encontrado nenhum íon de m/z correspondente a MC.

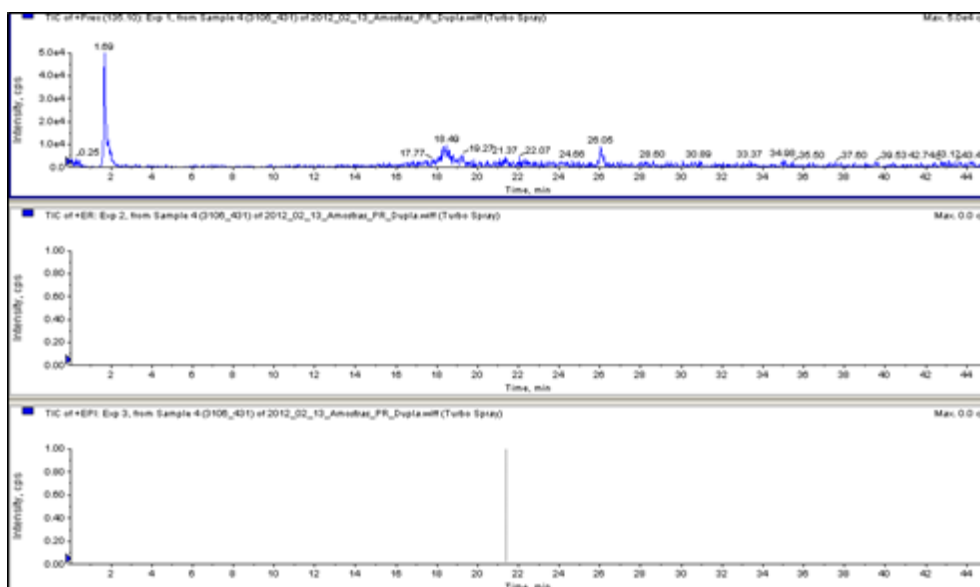


Figura - 21 MC não detectadas.

3.4.3. Resultado amostra CCIBt 3106 – Método 3 – Precursor 135 (mono carga) + MS/MS

Na figura 22 pode-se observar a injeção da amostra CCIBt3106 no método precursor 135 m/z (mono carga)+ MS/MS onde não foi encontrado nenhum íon de m/z correspondente a MC.

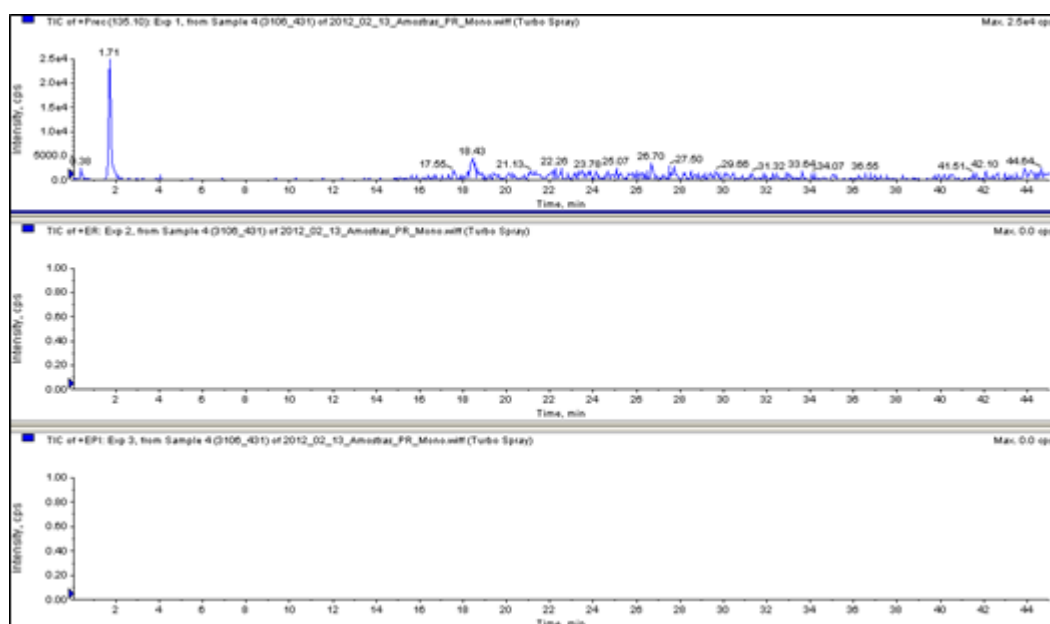


Figura - 22 MC não detectadas.

A tabela 6 apresenta as referências de massa/carga (m/z) empregadas neste trabalho

Tabela - 6 Referencia de m/z .

<i>Microcistinas</i>	<i>Peso molecular [M + H]⁺</i>	<i>Fórmula molecular</i>
MCYST-LA	909/910.3/ 910.06	C ₄₉ H ₆₇ N ₇ O ₁₂
MCYST-LAba	923/924	C ₄₇ H ₆₉ N ₇ O ₁₂
MCYST-LL	952	C ₄₉ H ₇₃ N ₇ O ₁₂
MCYST-AR	953/953.0919/952	C ₄₆ H ₆₈ N ₁₀ O ₁₂
MCYST-YA	959/960	C ₄₉ H ₆₅ N ₇ O ₁₃
[D-Asp3,Dha7]MCYST-LR	966/967	C ₄₇ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₂
[D-Asp3,L-Ser7]MCYST-EE(OMe)	969	C ₄₇ H ₆₃ N ₁₀ O ₁₂
[D-Asp3,Dha 7]MCYST -EE(OMe)	970	C ₄₈ H ₇₁ N ₇ O ₁₂
MCYST-LM	970.5	C ₄₈ H ₇₁ N ₇ O ₁₂
MCYST-VF	972	
dMeMCYST-LF	972.5	
[D-Asp3]MCYST -LR	980.5/981.5	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂
[Dha7]MCYST-LR	981.5/980	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂
dMeAdda5MCYST-LR	980/981.5	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂
[DMAdda5]MCYST -LR	981	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂
[Dha7]MCYST -EE(OMe)	984	
D-Asp3,Dha7]MCYST-E(OMe)E(OMe)	983/984	C ₄₇ H ₆₅ N ₇ O ₁₆
MCYST-LF	986.2	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₂
MCYST-LR	994/995.17/ 995.2	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
[D-Asp3,D-Glu(OCH3)6]MCYST-LR	995	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
[(6Z)-Adda5]MCYST -LR	995	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂
[Dha7]MCYST -E(OMe)E(OMe)	997/998	C ₄₈ H ₆₇ N ₇ O ₁₆
[L-Ser7]MCYST -LR	999	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃
[D-Asp3,L-Ser7]MCYST -XR	999	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃
MCYST-LY	1001/1002.2	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₃
[L-Ser7]MCYST-EE(OMe)	1002/ 1001	C ₄₇ H ₆₇ N ₇ O ₁₇
[D-Asp3,Ser7]MCYST -E(OMe)E(OMe)	1002/ 1001	C ₄₇ H ₆₇ N ₇ O ₁₇
MCYST-HilR	1009	
[D-Asp3,ADMAdda5]MCYST-LR	1008/1009	C ₄₉ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃
ADMAdda5]MCYST-XR	1009	
MCYST_LHArg (L-homoarginina)	1009.5	
[D-Glu(OCH3)6]MCYST -LR	1009	C ₅₀ H ₇₇ N ₁₀ O ₁₂
MAdda5, Dhb7)MCYST-LR	1009	

Tabela 6. Continuação

<i>Microcistinas</i>	<i>Peso molecular [M + H]⁺</i>	<i>Fórmula molecular</i>
[D-Asp3 ,Dha 7]MCYST-RR	1009/1010	C ₄₇ H ₇₁ N ₁₃ O ₁₂
MCYST_dMeLW	1011.5	
[L-MeSer7]MCYST-LR	1012/1013	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃
[Dha7]MCYST-FR	1015/1014	C ₅₁ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₂
[L-Ser7]MCYST-E(OMe)E(OMe)	1016/1015	C ₄₈ H ₆₉ N ₇ O ₁₇
Didemethylmicrocystin-YR	1017	
[ADMAdda5]MCYST-LR	1022/1,023	C ₅₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃
[D-Asp3,ADMAdda5]MCYST-LHar	1022/1023	C ₅₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃
[D-Asp3 MCYST-RR	1023	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂
[ADMAdda5]MCYST XR	1023	
[ADMAdda5]MCYST XHarr	1023	
[D-Asp3]MCYST-RR	1023/1024,5/1024,2	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂
[D-Asp3,(E)-Dhb7]MCYT-RR	1024.6	
[Dha7]MCYST-RR	1023/1024	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂
MCYST-LW	1025/ 1025.2	C ₅₄ H ₇₂ N ₈ O ₁₂
MCYST-FR	1028/1029	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂
MCYST-M(O)R	1028/1029	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃ S
[Dha7]MCYST-HphR	1029	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₂
MC-XY	1030.6	
[D-Asp3 ,Dha7]MCYST –HlyR	1031	C ₅₁ H ₇₁ N ₁₀ O ₁₃
[D-Asp3 ,Dha7]MCYST –HlyR	1031	
[D-Asp3]MCYST – YR	1031	
MCYST-YM(O)	1035/1036	C ₅₁ H ₆₉ N ₇ O ₁₄ S
[ADMAdda5]MCYST-LHar	1037/ 1036	C ₅₁ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₃
[ADMAdda5]MCYST-XHar	1037	
MCYST- RR	1037 / 1038	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂
[D-Asp ³ , D-Glu(OMe) ⁶]MCYST-RR	1037.5	

Tabela 6. Continuação

<i>Microcistinas</i>	<i>Peso molecular [M + H]⁺</i>	<i>Fórmula molecular</i>
[D-Leu1]MCYT-LR	1037	
(ADMAdda5)MCYST-LR	1038	
((6Z)-Adda5)MCYST -RR	1038	
[D-Ser1,ADMAdda5)MCYST-LR	1038/1039	C ₅₀ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₄
[ADMAdda5 ,MeSer7]MCYST -LR	1040/1041	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₄
[L-Ser7]MCYST -RR	1042	C ₄₈ H ₇₆ N ₁₃ O ₁₃
[D-Asp3 ,MeSer7)MCYST -RR	1042/ 1041	C ₄₈ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃
[D-Asp3 ,MeSer7)MCYST -RR[D-Asp3 ,MeSer7)MCYST -RR	1044.6/1045.19	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃
(D-Asp3)Mser7 -MCYST	1042.5	C ₄₈ H ₇₆ N ₁₃ O ₁₃
D-Asp3)MCYST -HtyR	1042	
Seco[D-Asp ³]MCYST-RR	1042.5	
[Dha7]MCYST-HtyR	1042/ 1045	C ₅₂ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃
MCYST- YR	1044/1045,6	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃
(D-Asp3)MCYST -HtyR	1044	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃
MCYST-{H4}YR	1049	
D-Glu(OC3H7O) 6 MYST-LR	1,052	C ₅₂ H ₈₀ N ₁₀ O ₁₃
[D-Glu-OC2H3 (CH3)OH6)MCYST-LR	1053	
[D-Asp3,ADMAdda5, Dhb7]MCYST-RR	1053	
[Hty2]microcystin-YR	1058.5	C ₅₃ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃
MCYST-HtyR	1058/1059	C ₅₃ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃
[L-Ser7]MCYST -HtyR	1063	C ₅₂ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₄
(DAsp)MC-WR	1053.6	
MCYST-WR	1067.9/1068.3	C ₅₄ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₂
[D-Asp3]MCYST-HtyR	1044	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃
[D-Asp3 ,ADMAdda5, Dhb7]MCYST -HtyR	1074	
[ADMAdda5]MCYST XR	1077	
[L-MeLan 7]MCYST -IR	1116	

ANEXO 4 - CURVAS DE CRESCIMENTO

Com base nas análises de toxinas foram selecionadas quatro linhagens para estabelecimento de curvas de crescimento. Em relação à escolha das cepas tóxicas, foram realizados estudos com as linhagens que apresentaram maior variedade de microcistinas confirmadas por meio dos padrões: CCIBt: 3109, 3194 e 3454. A linhagem CCIBt3106 foi a única que não apresentou microcistinas, por isto, foi selecionada como representante da linhagem não tóxica.

Na figura 23 pode-se observar a variação do crescimento de *M. aeruginosa* CCIBt 3106 (linhagem não tóxica) em relação às demais linhagens tóxicas CCIBt 3194, 3454 e 3109. Estas curvas serviram de base para a escolha da linhagem tóxica.

Com base nos dados apresentados, a linhagem tóxica selecionada foi a CCIBt3194, a qual apresentou variantes de microcistinas confirmadas por meio dos padrões (Tabela 9), maior taxa de crescimento e de rendimento celular. Além disso, as duas linhagens selecionadas, CCIBt 3106 (não tóxica) e CCIBT 3194 (tóxica), possuem variação de crescimento muito semelhante (figura 24a), o que facilita a interpretação e comparação dos demais resultados.

As outras duas linhagens tóxicas (CCIBt3109 e 3454) apresentaram baixa taxa de crescimento e maior variedade de microcistinas, inclusive variantes desconhecidas, o que poderia dificultar futuras interpretações e, por estes motivos, não serão utilizadas no presente trabalho.

A variação das dimensões celulares para cada linhagem de *M. aeruginosa* CCIBt 3106, 3109, 3194 e 3454 está apresentada na figura 27. O aspecto geral das culturas no primeiro dia do estudo e a cada cinco dias, documentado durante o estabelecimento da curva de crescimento, está ilustrado na figura 26.

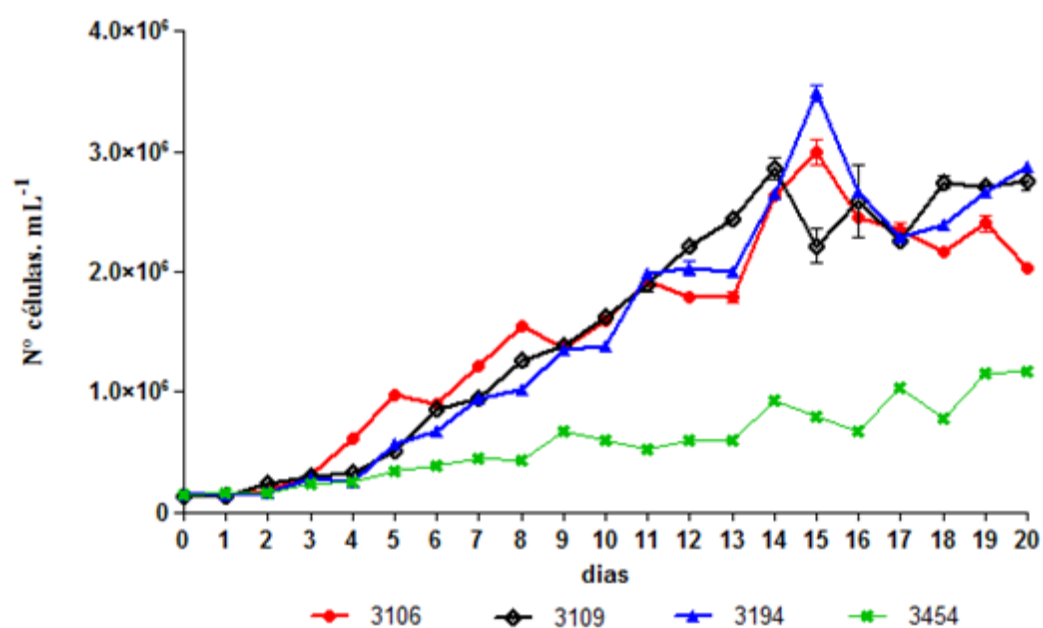


Figura - 23 Variação do crescimento de *M. aeruginosa* CCIBt 3106 (não tóxica), 3109, 3194 e 3454 por número de células. mL⁻¹. Barras indicam o desvio padrão das médias (n=3)

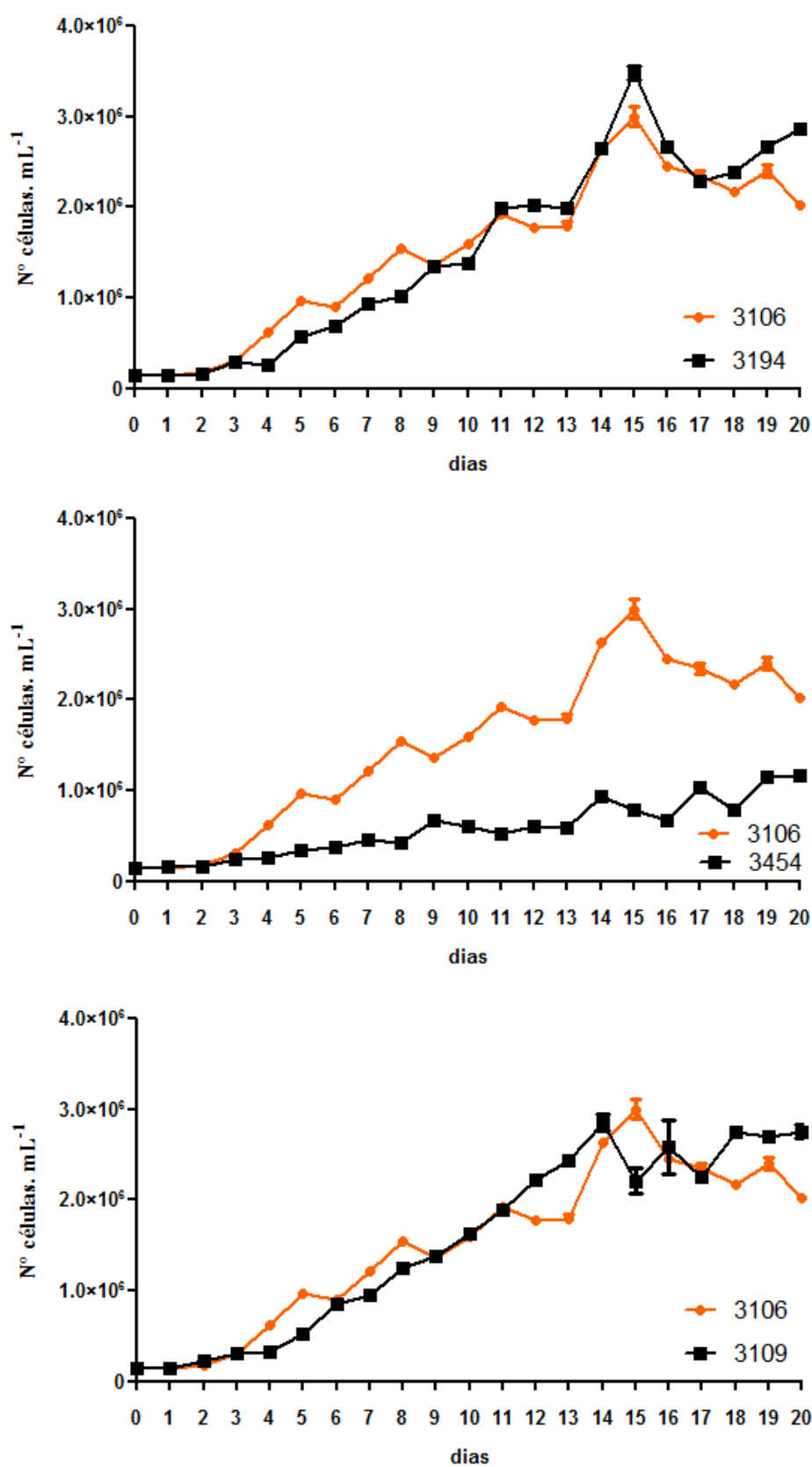


Figura - 24 Variação do crescimento de *M. aeruginosa* CCIBt 3106 linhagem não tóxica com as demais linhagens tóxicas CCIBt: 3194, 3454 e 3109, respectivamente. Barras indicam o desvio padrão das médias (n=3).

Tabela - 7 Taxa de crescimento (μ), tempo de duplicação (G) e rendimento celular máximo (R) de linhagens de *M. aeruginosa*. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$).

CCIBt	Fase exponencial (dia)	Taxa de Crescimento (μ)	Tempo de duplicação (G; dia ⁻¹)	Rendimento celular máximo (R; célula. mL ⁻¹)
3106	1 a 11	0,298 ^a	2,325 ^c	2998000 ^a
3109	4 a 14	0,196 ^b	3,532 ^b	2871000 ^a
3194	4 a 9	0,254 ^c	2,721 ^a	3483000 ^b
3454	2 a 7	0,197 ^b	3,538 ^b	1169000 ^c

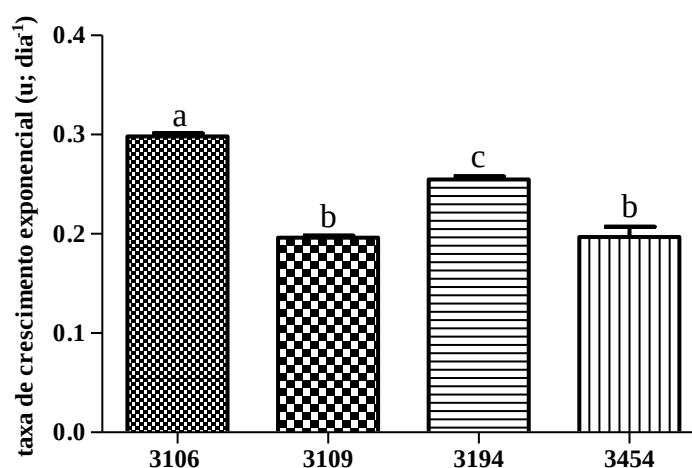


Figura - 25 Taxa de crescimento de linhagens CCIBt de *M. aeruginosa*. Valores médios (n=3). Barras indicam o desvio padrão. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$)

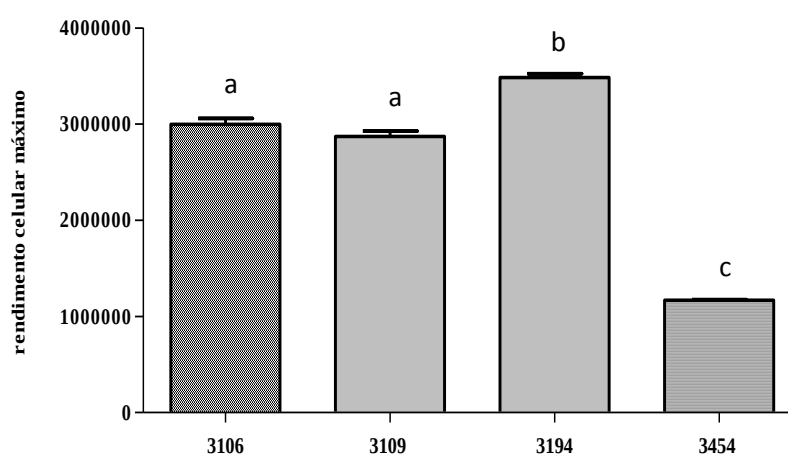


Figura - 26 Rendimento celular (R) de linhagens CCIBt de *M. aeruginosa*. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste de variância (ANOVA) fator único, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ($\alpha=0,05$)

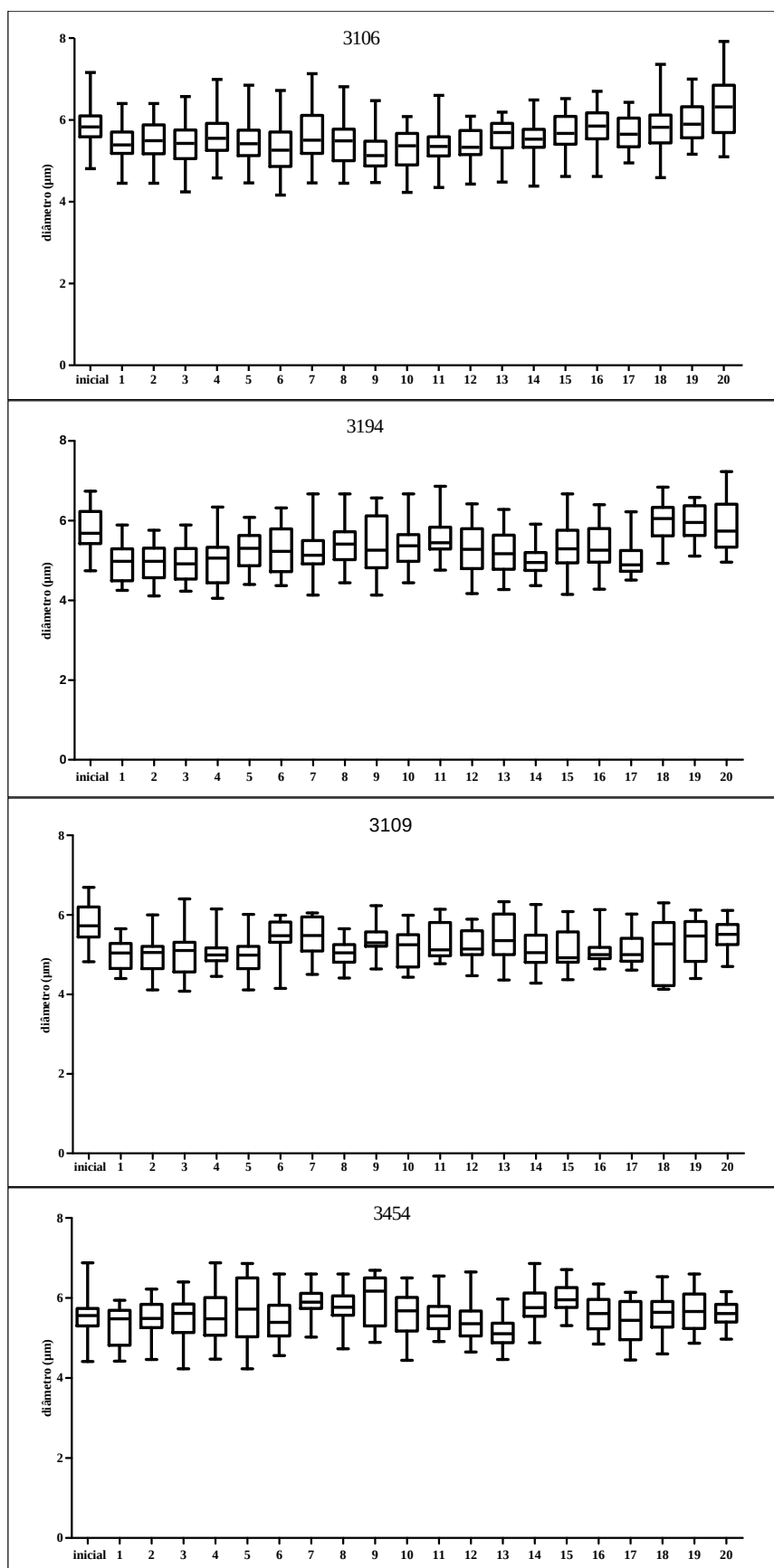


Figura - 27 Variação das dimensões celulares (μm) para cada linhagem de *M. aeruginosa* CCIBt 3106, 3109, 3194 e 3454. Média mais desvio padrão (caixa) e mínimo e máximo (barra) – “Whisker Box-Plot” (n=30).

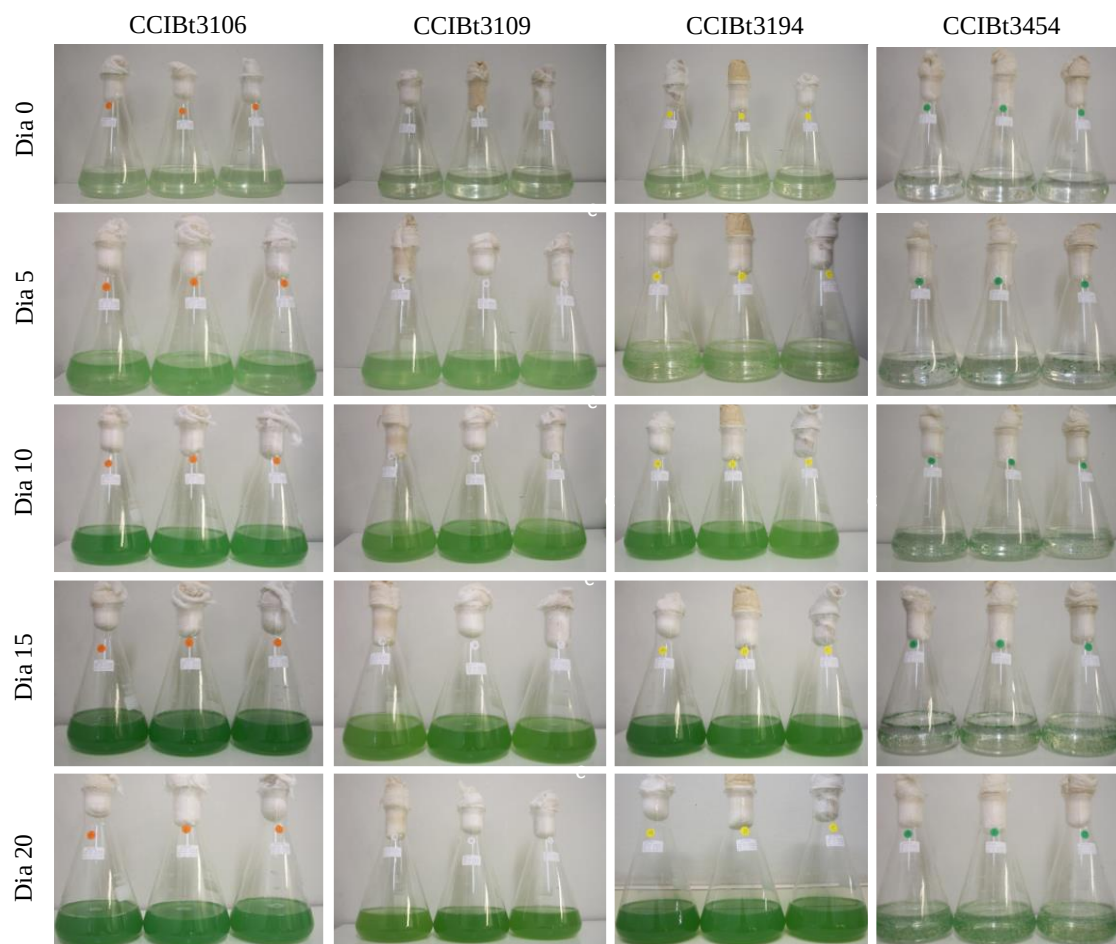


Figura - 28 Aspecto geral das culturas de *M. aeruginosa* durante as fases de crescimento.

ANEXO 5 - CONSTRUÇÃO DAS CURVAS PADRÃO

CURVA-PADRÃO DE MICROCISTINAS

As microcistinas foram quantificadas a partir da construção de uma curva analítica: no eixo y área do pico cromatográfico em 238 nm e no eixo X a respectiva concentração das microcistinas. Todas as curvas de calibração obtidas foram lineares, apresentando coeficiente de correlação (r) superior a 0,99. MCYR ($R^2 = 0.9996$), MCLA ($R^2 = 0.9994$), MCRR ($R^2 = 0.9987$) e MCLR ($R^2 = 0.9995$).

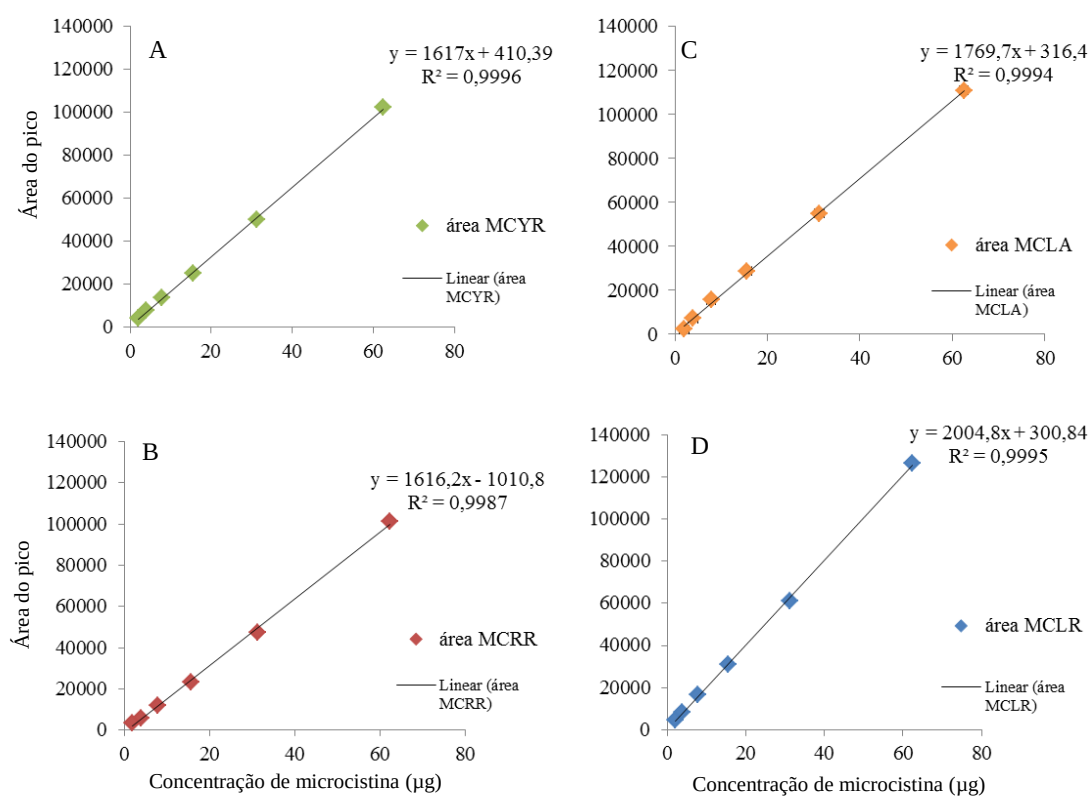


Figura - 29 Curvas de calibração construídas para quantificação das microcistinas. Análises realizadas por HPLC-DAD com padrões analíticos, em $\lambda = 238$ nm. Todas as curvas mostram a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação (R). **A)** Microcistina-YR; **B)** Microcistina-RR; **C)** Microcistina-LA; **D)** Microcistina-LR.

As figuras 30, 31, 32 e 33 apresentam o cromatograma de cada padrão estudado e seus respectivos espectros de UV, o monitoramento foi realizado em $\lambda = 238$ nm.

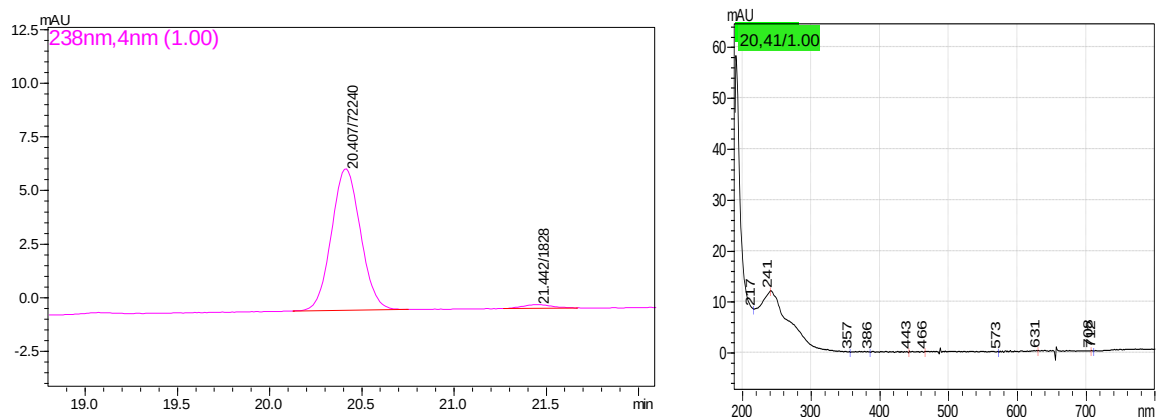


Figura - 30 Cromatograma do padrão da microcistina RR, seu espectro de UV, cujo Tempo de Retenção, nas condições descritas, é de 20,41 minutos.

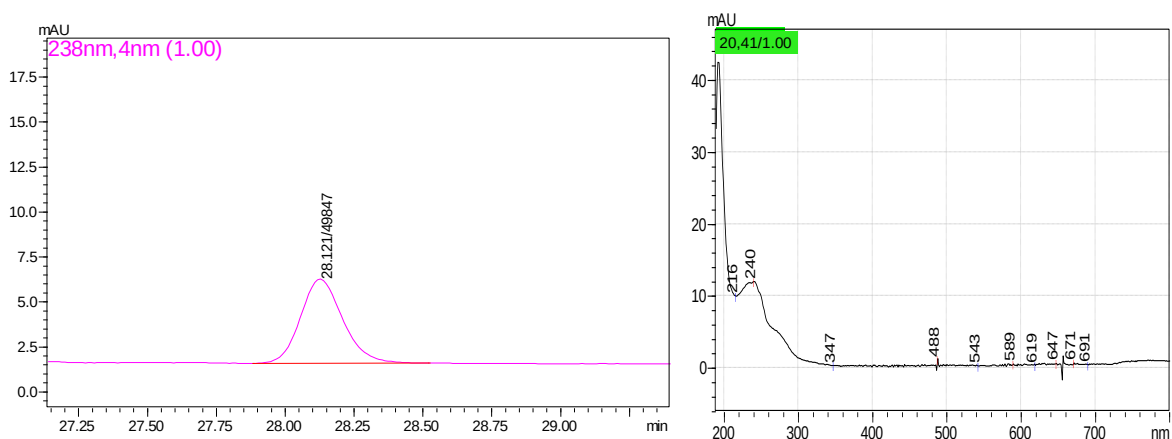


Figura - 31 Cromatograma do padrão da microcistina-YR e seu espectro de UV, cujo Tempo de Retenção, nas condições descritas, é de 28,12 minutos.

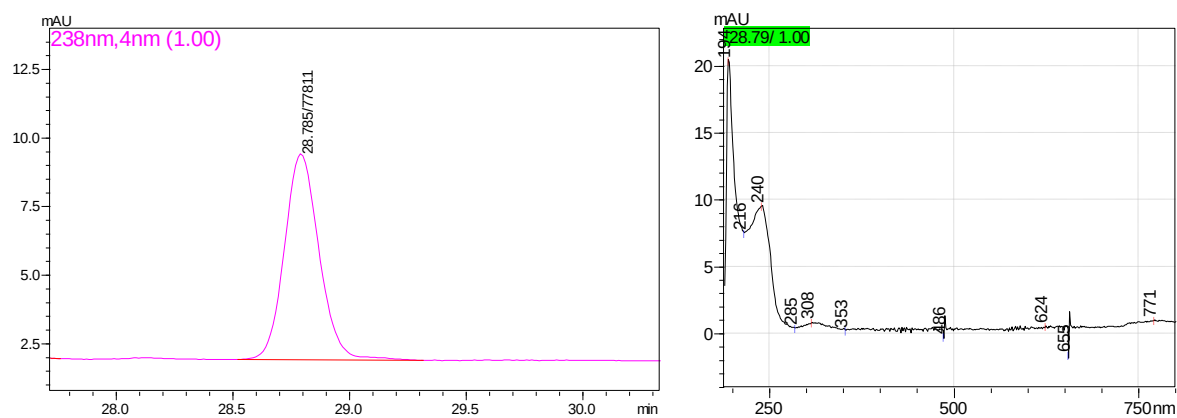


Figura - 32 Cromatograma do padrão da microcistina-LR, e seu espectro de UV, cujo tempo de Retenção, nas condições descritas, é de 28,79 minutos.

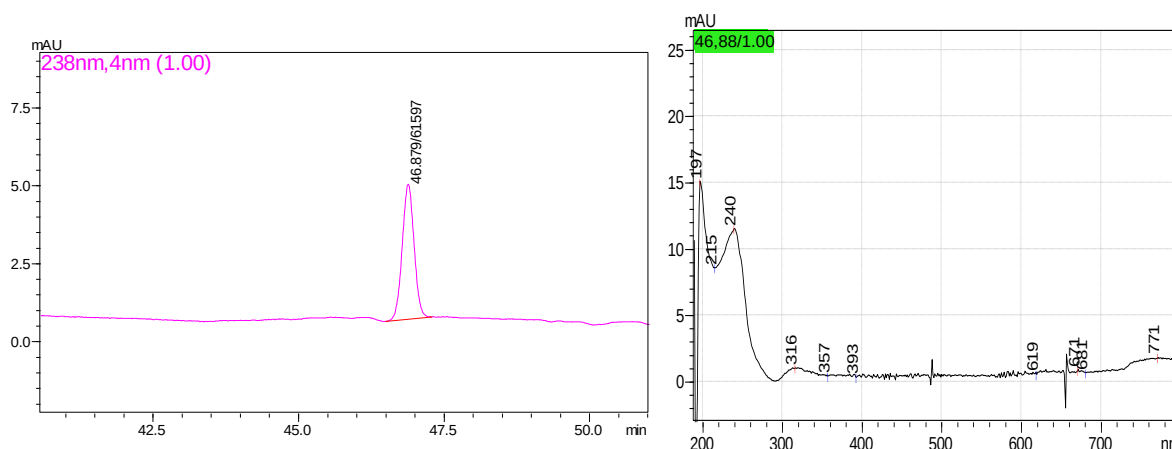


Figura - 33 Cromatograma do padrão da microcistina-LA e seu espectro de UV, cujo tempo de Retenção, nas condições descritas, é de 46,88 minutos.

CURVA PADRÃO DE CAROTENÓIDES

Os carotenóides foram quantificados a partir da construção de uma curva analítica construída com padrão analítico de β -caroteno. No eixo y área do pico cromatográfico em 451 nm e no eixo X a respectiva concentração do carotenóide. A curva de calibração obtida foi linear, apresentando coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 (figura 34).

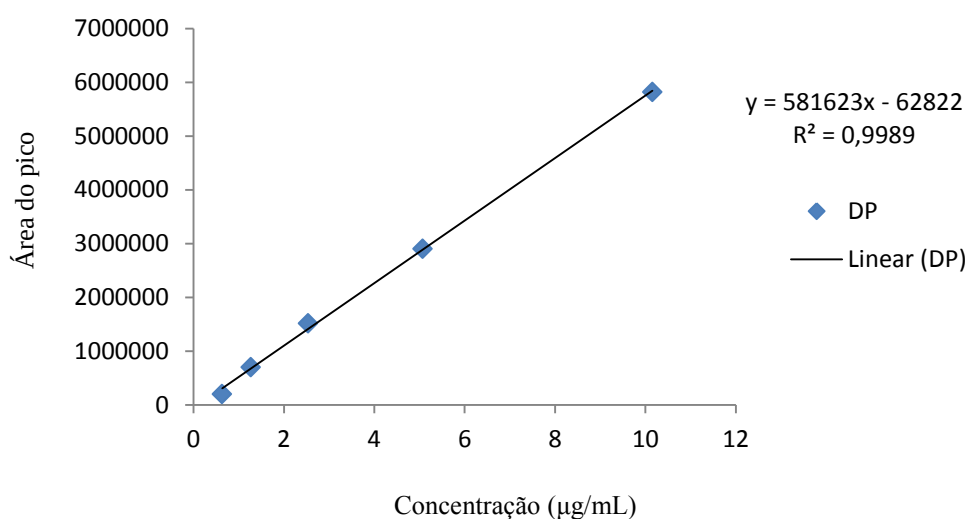


Figura - 34 Curva de calibração de carotenóides obtida com padrão analítico. Análises realizadas por HPLC-DAD em $\lambda = 451$ nm ($n=3$).

A figura 35 mostra os cromatogramas representativos dos carotenóides nas diferentes fases de crescimento, no qual podem ser visualizados vários picos.

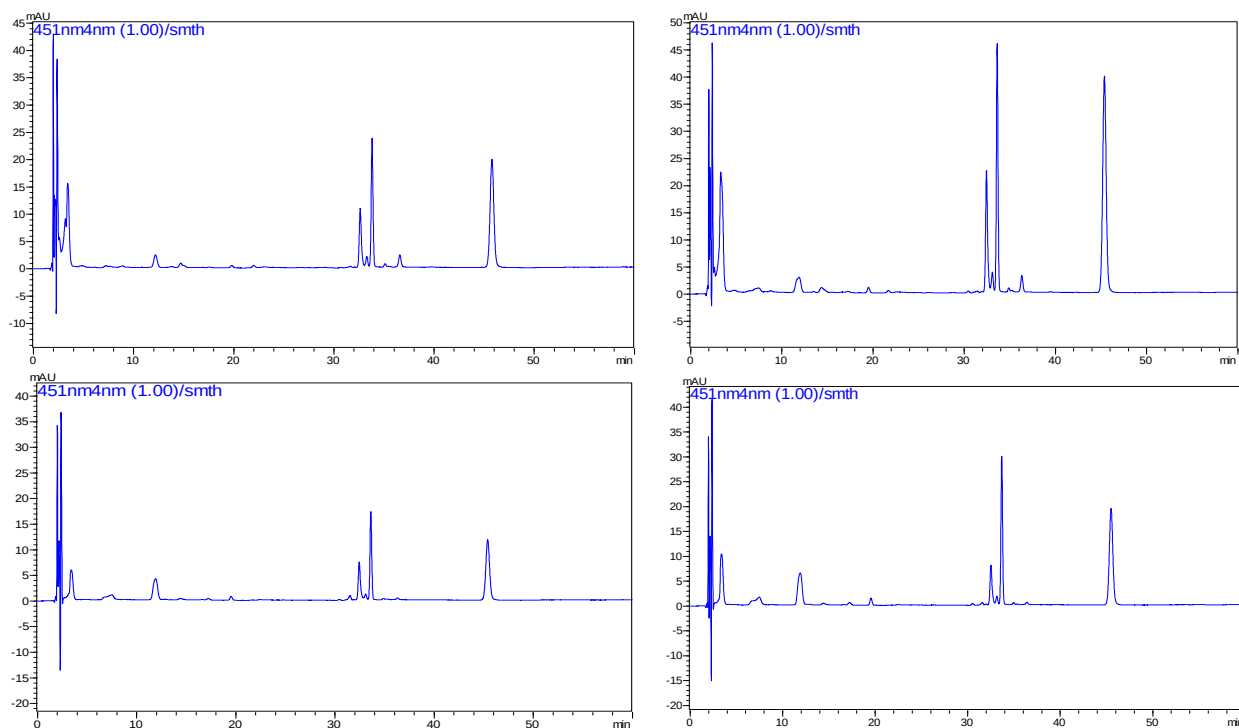


Figura - 35 Cromatogramas representativos obtidos por HPLC-DAD em $\lambda = 451$ nm para análise de carotenóides do extrato em acetona 90%: *Microcystis aeruginosa* CCIBt3194. A. Perfil cromatográfico da fase exponencial de crescimento; B. Perfil cromatográfico da fase exponencial tardia de crescimento. *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106. B. Perfil cromatográfico da fase exponencial de crescimento; C. Perfil cromatográfico da fase exponencial tardia de crescimento.

Para a quantificação dos carotenóides totais foram considerados todos os picos com espectro de absorção idêntico ao do β -caroteno (figura 36), e os valores foram expressos como fentograma de equivalentes de β -caroteno por célula.

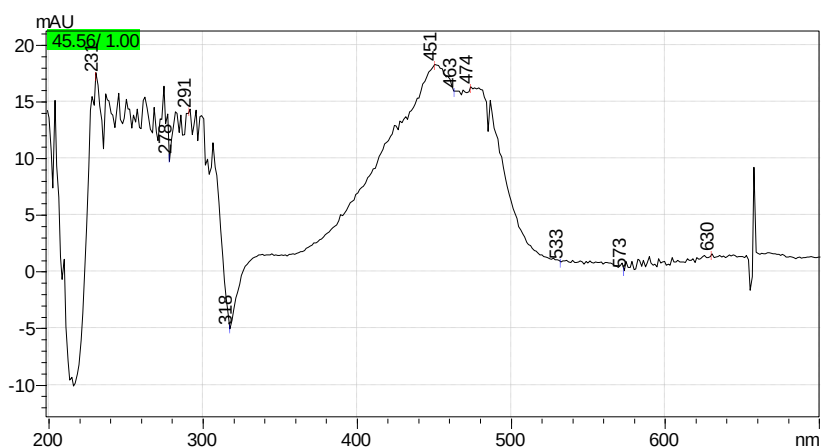


Figura - 36 Espectro de absorção do carotenóide β-caroteno, usado na identificação de carotenóides na análise de pigmentos por HPLC-DAD ($\lambda = 451$ nm).

CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS

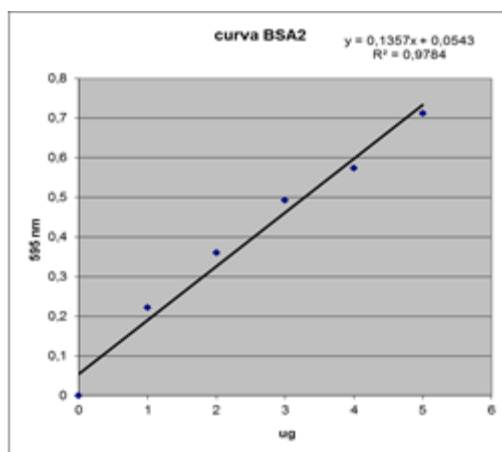


Figura - 37 Curva de calibração construída para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Análise realizada em $\lambda = 595$ nm, com padrão BSA. A curva mostra a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação ($R^2 = 0,97$).

CURVA DE CALIBRAÇÃO FRAP - FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

- 1) Solução estoque de ácido gálico 1 mg.mL^{-1} - solvente metanol ou DMSO 10%;
- 2) Diluição da solução estoque de ac. Gálico (Tabela 8).

Tabela - 8 Diluição de solução Estoque ácido Gálico para curva de calibração – método FRAP.

Ponto	Conc. diluição ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Conc. final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Metanol (μL)	Diluição solução Estoque ac. gálico (μL)
BRANCO	0	0	200	0
1	7,5	0,5	198,5	1,5
2	15	1,0	197	3
3	22,5	1,5	195,5	4,5
4	30	2,0	194	6
5	37,5	2,5	192,5	7,5
6	45	3,0	191	9
7	52,5	3,5	189,5	10,5

CURVA DE CALIBRAÇÃO PELO MÉTODO DO FOLIN-CIOCALTEU

- 1) A solução mãe foi preparada com ácido gálico 1 mg.mL^{-1} – solvente DMSO 10% ou metanol;
- 2) Dilui-se a solução mãe de ac. gálico em microtubos (200 μL) conforme Tabela 9.

Tabela - 9 Concentração de Ácido Gálico para curva de calibração – método Folin-Ciocalteu.

Ponto	Conc. diluição ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Conc. final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Metanol ou DMSO 10% (μL)	Diluição solução mãe ac. gálico (μL)
BRANCO	0	0	200	0
1	22,5	1,5	195,5	4,5
2	37,5	2,5	192,5	7,5
3	52,5	3,5	189,5	10,5
4	67,5	4,5	186,5	13,5
5	82,5	5,5	183,5	16,5
6	97,5	6,5	180,5	19,5
7	112,5	7,5	177,5	22,5
8	127,5	8,5	174,5	25,5

Curva de calibração DPPH

- 1) Solução mãe de ácido gálico 1 mg.mL^{-1} – solvente metanol ou DMSO 10%.
- 2) Diluiu-se a solução mãe de ácido gálico em microtubos (200 μL) conforme Tabela 10.

Tabela - 10 Concentração de Ácido Gálico para curva de calibração – método DPPH.

Ponto	Conc. diluição mãe (µg.mL-1)	Conc. final (µg.mL-1)	Metanol ou DMSO 10% (µL)	Diluição solução mãe ac. gálico (µL)
BRANCO	0	0	200	0
1	7,5	0,5	198,5	1,5
2	15	1,0	197	3
3	22,5	1,5	195,5	4,5
4	30	2,0	194	6
5	37,5	2,5	192,5	7,5
6	45	3,0	191	9

ANEXO 6 - OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DA ANÁLISE PROTEÔMICA

Extração de proteínas e preparação da amostra

As linhagens de *Microcystis aeruginosa* usadas para a otimização do método de extração foram MILJ-48 (coleção de linhagens do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Instituto de Biofísica, UFRJ), CCIBt 3194 e CCIBt 3106. Partiu-se de células liofilizadas ou de pellets de células congeladas a -80°C. Todos os métodos testados estão listados a seguir:

(1) Adaptação a partir de metodologia desenvolvida por Carneiro *et al.* (2011) para a análise proteômica por gel 2D da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*: as células foram ressuspensas em solução de lise (uréia 7M; tiouréia 2M; CHAPS 4%; PMSF 1 mM) e submetidas a ciclos alternados de congelamento (N₂ líquido) e descongelamento (37 °C). À suspensão resultante adicionou-se 7 volumes de acetona, ácido tricloroacético 10%, β-mercaptoetanol 0,07%, que foi misturada e mantida a -20 °C por uma noite. As proteínas precipitadas foram coletadas por centrifugação (15000 g, 45 min, 4 °C) e o precipitado lavado com acetona 90%, por 3 vezes. As proteínas foram solubilizadas por 1h a 25 °C em tampão 2D (solução de lise adicionada de DTT 40 mM; anfólitos 3-10) (IPG buffer, GE Healthcare). Seguiu-se uma centrifugação inicial (10000 g, 15 min, 4 °C), cujo sobrenadante foi coletado e centrifugado (70000g, 1 h, 4 °C). O sobrenadante resultante constituiu a amostra de proteínas solúveis que foram dosadas pelo método de Bradford (1976) e armazenadas a -20 °C.

(2) Adaptação da metodologia descrita para *Microcystis* baseada em Herbert *et al.* (2000) e Alexova *et al.* (2011), com pequenas alterações: células foram coletadas e ressuspensas em volume mínimo de água Milli-Q adicionada de 15 uM de PMSF e lisadas por ciclos alternados de congelamento (N₂ líquido) e descongelamento (37 °C). Adicionou-se os seguintes componentes para concentração final de 7M de uréia; 2M de tiouréia; 2% de CHAPS; 2% de ASB40 e 80 mM de ácido cítrico pH 4,0. Após 10 minutos à temperatura ambiente, os extratos foram centrifugados primeiro a 10000 g por 10 min e o sobrenadante recuperado centrifugado a 70000g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante resultante constituiu a amostra de proteínas solúveis que foram dosadas e armazenadas -20 °C.

(3) Metodologia descrita para a cianobactéria *Synechocystis* (Fulda *et al.*, 2006) e

usada também para *Microcystis* por Zilliges *et al.* (2011): células coletadas foram ressuspensas em HEPES 10 mM pH 7,0 com PMSF 1mM e lisadas por tratamento em um equipamento FastPrep (BIO101) na presença de uma matriz de lise (*glass beads*). Os extratos foram centrifugados primeiro a 3500 g por 10 min e o sobrenadante recuperado centrifugado a 70000 g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante resultante constituiu a amostra de proteínas solúveis que foram dosadas e armazenadas -20 °C.

(4) Adaptação de metodologia descrita para *Synechocystis* por Battchikova *et al.* (2010) e por Wegener *et al.* (2010), com pequenas modificações: células coletadas foram ressuspensas em HEPES 50 mM pH 7,5; SDS 0,1% e Triton 0,1% com PMSF 1mM e lisadas por tratamento em FastPrep (BIO101) na presença de matriz de lise (*glass beads*). Os extratos foram centrifugados primeiro a 3500 g por 10 min e o sobrenadante recuperado centrifugado a 70.000 g por 1 h a 4 °C. O sobrenadante resultante constituiu a amostra de proteínas solúveis que foram dosadas e armazenadas -20 °C.

As amostras de proteínas solúveis obtidas a partir dos métodos acima mencionados apresentaram baixa concentração de proteínas e por isso foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona e incubação a -20 °C. Após centrifugação para recuperar as proteínas (10000 g 15 min 4 °C), os precipitados continham pigmentos e para retirá-los foram feitas lavagens variadas, com base no descrito em Wang *et al.* (2006). As lavagens foram realizadas ressuspendendo os precipitados nas seguintes soluções, incubando em gelo por 15 min, seguido de centrifugação (10000 g 15 min 4 °C): metanol 80%, acetato de amônio 0,1 M, seguido de metanol 100%, seguido de etanol:acetona:ácido acético (50:50:1), seguido de acetona 80%. As proteínas foram então ressuspensas em tampão 2D, foram dosadas e armazenadas -20 °C.

(5) Outro método testado foi também baseado em Wang *et al.* (2006), descrito para tecido de plantas. Neste caso as células são lisadas na ausência de detergente e um grande número de lavagens é realizado a seguir com o objetivo de remover pigmentos, compostos fenólicos e outros interferentes. As células foram ressuspensas em HEPES 10 mM pH 7,5; PMSF 1mM; tiouréia 2M e uréia 7M e lisadas por tratamento em FastPrep (BIO101) na presença de matriz de lise (*glass beads*), nas seguintes condições: 4 ciclos de potência 6,5 por 45 segundos cada com intervalos no gelo. Os extratos foram centrifugados (10000 g, 5 min, 4 °C) para separar os

debris. Em seguida foram adicionados 7 volumes de acetona, ácido tricloroacético (TCA) 10%, e após agitação em vortex, as soluções foram incubadas no gelo durante 1 hora para precipitação das proteínas. As soluções foram centrifugadas (10000 g, por 15 minutos a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em 80% metanol com 0,1 M de acetato de amônio. Após agitação em vortex, as soluções foram incubadas no gelo por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas (10000 g, 15 min, 4 °C). Os pellets foram ressuspensos em acetona 80% e ficaram refrigerados a -20 °C, durante a noite. Posteriormente, foram centrifugados (10000 g, 15 min, 4 °C), os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram secos em banho-maria. Em seguida, foram ressuspensos em solução de sacarose 30%; SDS 2%; TrisHCl 0,1 M pH 8,0; DTT 100 µM. Adicionou-se 1 volume de fenol pH 8,0 e após agitação em vortex, as soluções foram incubadas no gelo por 5 minutos e centrifugadas (10000 g, 15 min, 4 °C). Transferiu-se a fase superior para outro tubo de 2 ml. Adicionou-se 5 volumes de metanol mais acetato de amônio 0,1 M. Após agitação em vortex, as soluções ficaram refrigeradas a -20 °C, durante o período noturno. As soluções foram centrifugadas (10000 g, 15 min, 4 °C) e os pellets foram lavados com etanol:acetona:ácido acético (50:50:1). Em seguida fez-se agitação em vortex e as soluções foram centrifugadas (10000 g, 15 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e em seguida os pellets foram lavados com metanol 100%. Após agitação em vortex, as soluções foram centrifugadas (10000 g, 15 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e em seguida os pellets foram lavados com acetona 80%. Os pellets foram secos em banho-maria. Os pellets foram armazenados secos ou ressuspensos em tampão 2D e proteínas solúveis que foram dosadas e armazenadas -20 °C.

A Tabela 11 resume os diversos testes realizados no intuito de estabelecer a melhor metodologia, com variações em cada etapa da preparação de amostras, com base em metodologias disponíveis na literatura, detalhados a cima.

Tabela - 11 Etapas do procedimento de purificação de proteínas solúveis de *M. aeruginosa* MILJ-48, CCIBt 3194 e CCIBt 3106 com variações testadas para obtenção de preparações para análise proteômica.

1. Lise de células				
(A) glass beads (Fulda <i>et al.</i> , 2006)		(B) ciclos de congelamento (N2 líquido) /descongelamento (37 °C) (Alexova <i>et al.</i> , 2011)		(C) glass beads (Wang <i>et al.</i> , 2006)
2. ressuspensão das células na etapa de lise				
(A) 7 M de uréia, 2 M de tiouréia; 4% de CHAPS (Carneiro <i>et al.</i> , 2011)	(B) 7M de uréia, 2 M de tiouréia; 2% de CHAPS; 2% de ASB40 e 80 mM de ácido cítrico pH 4,0 (Alexova <i>et al.</i> , 2011)	(C) HEPES 10 mM pH 7,0 + PMSF 1mM (Fulda <i>et al.</i> , 2006)	(D) HEPES 50 mM pH 7,5; SDS 0,1% e Triton 0,1% com PMSF 1 mM (Battchikova <i>et al.</i> , 2010)	(E) HEPES 10 mM pH 7,5, 2M de tiouréia; 7M de uréia, + PMSF 1 mM (Wang <i>et al.</i> , 2006)
3. Precipitação das proteínas e recuperação de proteínas (Wang <i>et al.</i> , 2006)				
4. Lavagens para remoção de pigmentos (Wang <i>et al.</i> , 2006)				
5. Ressuspensão do pellet de proteínas em tampão 2D (uréia 7 M; tiouréia 2 M; CHAPS 4%; anfólitos pH 4-7; DTT 40 mM)				
6 ultracentrifugação				
7. dosagem de proteínas				
Análise por gel 2D		Análise independente de gel		
8. kit 2D-clean up (GE lifetechnologies)		8. precipitação de 100 ug de proteínas		
9 ressuspensão		9 ressuspensão		
Tampão 2D		(A) solução do kit iTRAQ	(B) solução borato CHAPS	(C) Rapigest

▪ ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE UNI E BIDIMENSIONAL

A qualidade das preparações obtidas pelos diferentes métodos foi avaliada inicialmente por SDS-PAGE 12,5% realizada em tampão Tris Glicina SDS (Sambrook et al., 2001). Os géis foram corados com Coomassie blue G-250 e digitalizados e podem ser observados nas figuras 38 e 39.

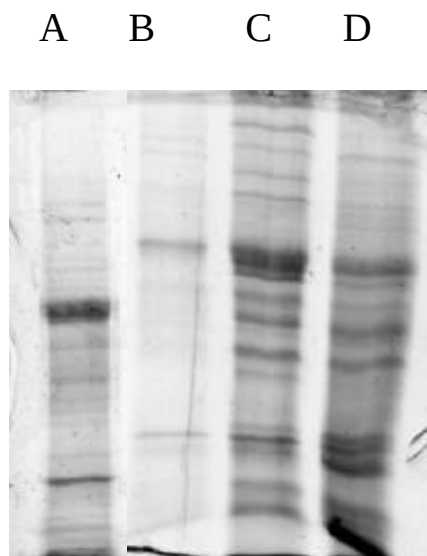


Figura - 38 SDS-PAGE 12,5% com preparações de proteínas de *M. aeruginosa* MILJ-48 resultantes dos procedimentos de purificação testados para análise proteômica. Gel corado por coomassie coloidal. (A) 7M de uréia, 2M de tiouréia, 2% de CHAPS, 2% de ASB40 e 80 mM de ácido cítrico pH 4,0 (Alexova *et al.*, 2011) (B) HEPES 50 mM pH 7,5, SDS 0,1% e Triton 0,1% com PMSF 1mM (Battchikova *et al.*, 2010) (C) HEPES 10 mM pH 7,0 + PMSF 1mM (Fulda *et al.*, 2006) (D) 7M de uréia, 2M de tiouréia, 4% de CHAPS (Carneiro *et al.*, 2011).

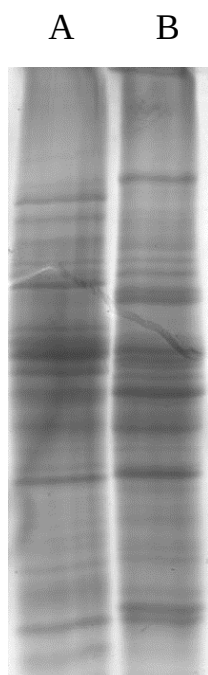


Figura - 39 SDS-PAGE 12,5% com preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 e CCIBt3106, resultantes dos procedimentos de purificação testados para análise proteômica. Gel corado por coomassie coloidal. (A) CCIBt3194 - HEPES 10 mM pH 7,5, 2 M tiouréia, 7 M uréia e PMSF 1mM + lavagens (Wang *et al.*, 2006) (B) CCIBt3106- HEPES 10 mM pH 7,5, 2 M tiouréia, 7 M uréia e PMSF 1mM + lavagens (Wang *et al.*, 2006).

Posteriormente, as preparações foram avaliadas em gel bidimensional. Alíquotas contendo 100 µg de proteína em tampão 2D foram purificadas com o *kit 2D-clean up* (GE Healthcare) e ressuspendidas no mesmo tampão e usadas para hidratar tiras de 7 cm, pH 4-7 (Immobiline Dry Strip; GE Healthcare) por 16 h à temperatura ambiente. Na primeira dimensão a focalização foi realizada em equipamento Multiphor II (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Após esta etapa, as proteínas foram reduzidas e alquiladas (as tiras foram equilibradas em DTT e iodoacetamida) e as tiras foram então colocadas sobre um gel de acrilamida 12,5% com SDS, conforme instruções do fabricante. A eletroforese foi realizada em tampão Tris Glicina com SDS (Sambrook *et al.*, 2001). Os géis foram corados com Coomassie blue G-250 e digitalizados e os resultados podem ser vistos n figura 40.

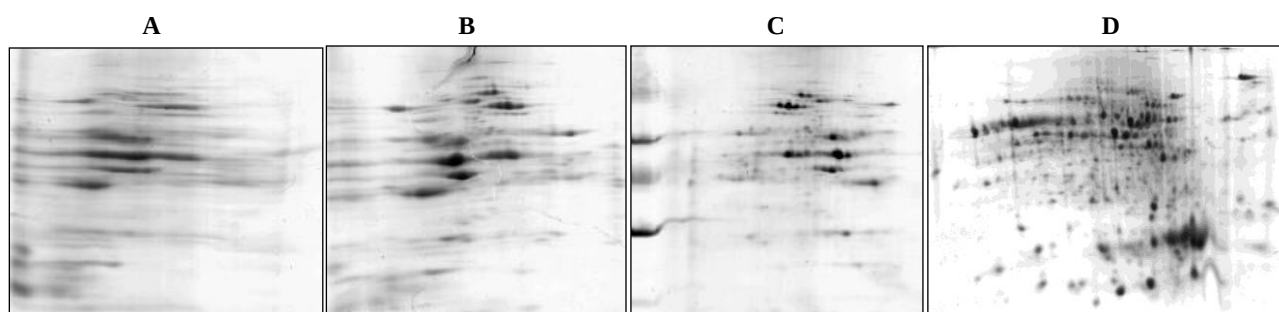


Figura - 40 Gel 2 D, 1ª dimensão tira 7 cm pH 4-7, 2ª dimensão SDS-PAGE 12,5%, com preparações de proteínas de *M. aeruginosa* MILJ-48 resultantes dos procedimentos de purificação testados para análise proteômica. Gel corado por coomassie coloidal. (A) preparações resultantes do procedimento de Battchikova *et al.*, 2010; (B) preparações resultantes do procedimento de Fulda *et al.* 2006, sem retirada de pigmentos por lavagens sucessivas das proteínas (C) mesma preparação com inclusão das lavagens para retirada de pigmentos (D) preparações resultantes do procedimento de Wang *et al.*, 2006.

PREPARO DE AMOSTRAS PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS:

Com base nestes resultados, optou-se em realizar a extração de proteínas pelo método de Wang *et al.* 2006, em que as células são lisadas na ausência de detergente, o que parece minimizar a co-purificação de interferentes como pigmentos. Além disso, este método inclui uma série de lavagens, permitindo a extração de proteínas solúveis sem pigmentos. Resultados representativos da recuperação de proteínas purificadas e do padrão de proteínas para cada linhagem encontram-se nas figuras 41 e 42.

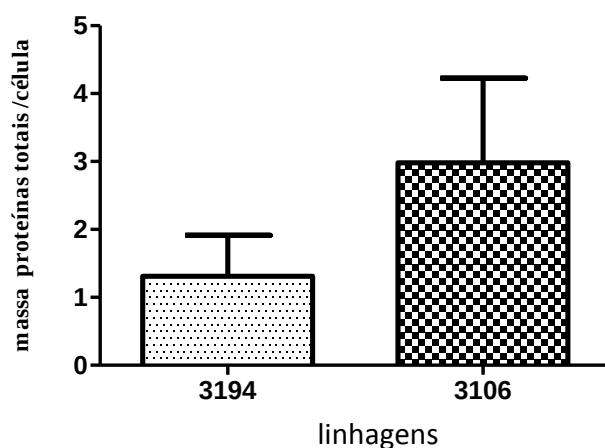


Figura - 41 Massa de proteínas totais por célula das linhagens de *M. aeruginosa* CCIBt3194 e CCIBt3106, para a fase exponencial de crescimento, extração segundo protocolo de Wang *et al.* 2006.

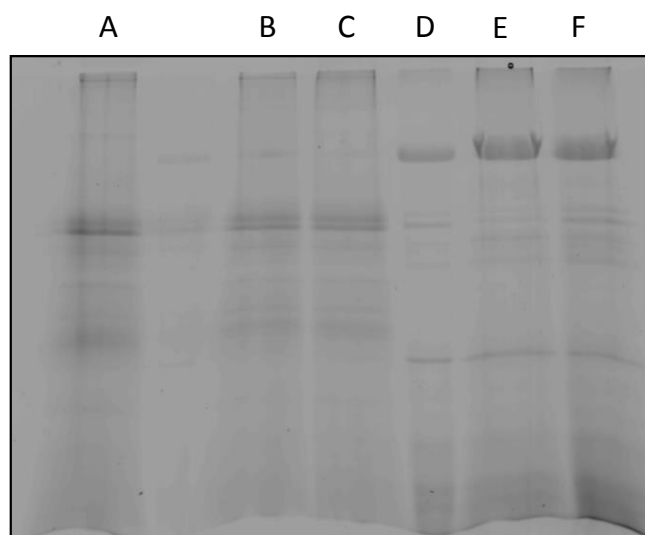


Figura - 42 SDS-PAGE 12,5% com preparações de proteínas de *M. aeruginosa*, resultantes dos procedimentos de purificação de Wang *et al.*, 2006 para análise proteômica da fase exponencial de crescimento. Gel corado por coomassie coloidal. (A) (B) (C) - replicas biológicas das proteínas extraídas de *M. aeruginosa* CCIBt3106; (D) (E) (F) - replicas biológicas das proteínas extraídas de *M. aeruginosa* CCIBt3194.

Para testar a eficácia da metodologia de extração de proteínas para se obter amostras para espectrometria de massas, foram feitas análises preliminares. No caso de amostras de extratos protéicos de *M. aeruginosa* (MILJ-48), obtidas pelo método 5 descrito acima, 100 µg de proteínas foram ressuspensos alternativamente em: solução de solubilização do kit iTRAQ, ou Borato/CHAPS (ácido bórico 0,3 M; CHAPS 0,1%; pH 8,0) ou Rapigest (Waters), com o objetivo de avaliar qual o melhor tampão para solubilização. Após solubilização, foi realizada dosagem de proteína, o que determinou baixa solubilização em Rapigest, sendo esta solução descartada. Seguiu-se assim a comparação entre a solubilização em solução de iTRAQ e borato/CHAPS.

Estas preparações foram digeridas com tripsina. Inicialmente houve redução, desnaturação das proteínas, bloqueio de cisteínas. Adicionou-se DTT para concentração final de 2,5 mM, e incubou-se a 50 °C por 10 min. Adicionou-se iodacetamida para concentração final de 10 mM, e incubou-se a 37 °C por 30 min. Mais uma vez adicionou-se DTT para concentração final de 2,5 mM, e incubou-se a 37 °C por 10 min. Por fim, adicionou-se tripsina (Promega sequencing grade), reconstituída segundo protocolado fabricante, para razão final 1:100 de tripsina:proteínas. Incubou-se a 37 °C por 16 h.

Estas amostras foram passadas em coluna *Oasis HLB extraction cardidge* (C18, Waters), seguindo o protocolo do fabricante. Eluições foram obtidas com metanol 50 e 100% e depois as amostras foram secas sob vácuo. As amostras foram ressuspensas em ácido fórmico/acetonitrila para análise por espectrometria de massas (MS).

Também foi comparado o fracionamento da amostra de peptídeos em cartucho *Oasis* (frações em 50 e 100% metanol) e a coluna de troca catiônica, frações em formiato de amônio. Neste último caso os peptídeos foram suspensos em Formiato de Amônio a 25 mM, passadas em coluna de troca catiônica *Poros 50S* (Whatman – 1823024), sendo as frações eluídas com as seguintes etapas: Step 1 – Formiato de amônio 50 mM (50 µL) + ACN 5% (50 µL) + 900 µL de H₂O; Step 2 – Formiato de amônio 100 mM (100 µL) + ACN 5% (50 µL) + 850 µL de H₂O; Step 3 – Formiato de amônio 150 mM (150 µL) + ACN 5% (50 µL) + 800 µL de H₂O; Step 4 – Formiato de amônio 200 mM (200 µL) + ACN 5% (50 µL) + 750 µL de H₂O; Step 5 – Formiato de amônio 200 mM (200 µL) + ACN 10% (100 µL) + 700 µL de H₂O; Step 6 – Formiato de

amônio 200 mM (200 uL) + ACN 20% (200 uL) + 600 uL de H₂O; Step 7 – Formiato de amônio 200 mM (200 uL) + ACN 30% (300 uL) + 500 uL de H₂O; Step 8 – Formiato de amônio 350 mM (350 uL) + ACN 50% (500 uL) + 150 uL de H₂O.

ANÁLISE PRELIMINAR POR MS

A análise das amostras foi realizada em um instrumento ESI-Q-ToF versão Micro (Waters), localizado na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Centro de Ciências de Saúde (UFRJ). O instrumento estava acoplado a um NanoUPLC (Nanoaquity, Waters). As configurações estabelecidas para espectrometria de massas assim como a configuração da corrida cromatográfica estão dispostas no anexo 7.

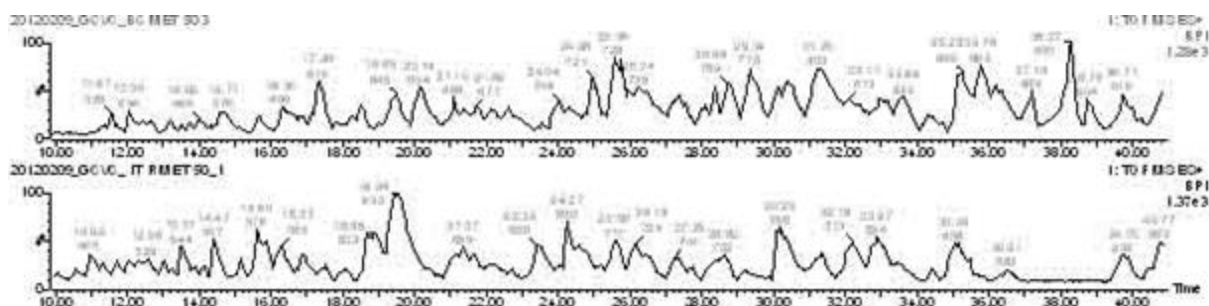


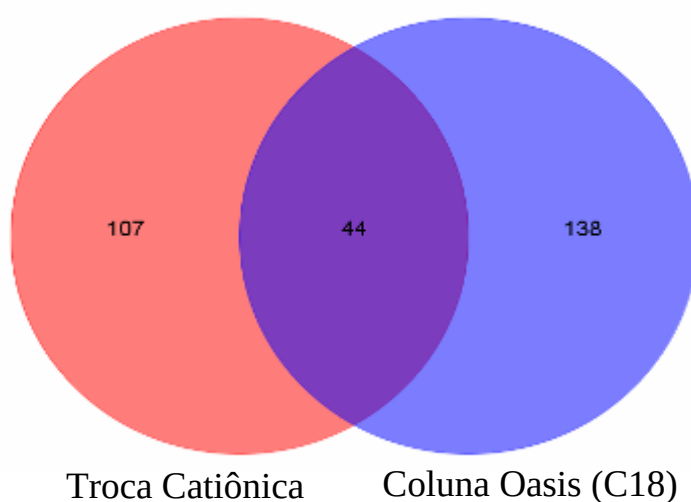
Figura - 43 Cromatogramas obtidos a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* MILJ-48 solubilizadas em tampão borato/CHAPS (BC), painel superior, ou tampão iTRAQ (ITR), painel inferior e fracionadas em C18 (*Oasis*).

Na figura 43 estão mostrados cromatogramas representativos, obtidos a partir de preparações de proteínas solubilizadas em tampão borato/CHAPS ou tampão iTRAQ e fracionadas em *Oasis HLB extraction cardidge* (C18, Waters). Como não se recuperou paptídeos a partir da suspensão em Rapigest e tendo-se concluído que borato/CHAPS ou solução de ressuspensão do *kit* iTRAQ forneceram resultados similares, optou-se por esta última, já que é a solução recomendada pelo *kit* de marcação.

IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E VALIDAÇÃO

Os arquivos brutos (.raw) obtidos das análises das amostras para a padronização de protocolos de solubilização e padronização de protocolo de marcação foram aplicados ao programa Peaks Studio 5.3 para a obtenção do número total de peptídeos por proteína, seguido da média de peptídeos encontrados em cada estratégia (protocolo de digestão). Todos os resultados (matches) foram conferidos visualmente em relação aos espectros originais obtidos, considerando identificações válidas somente aquelas cujas proteínas apresentavam três ou mais peptídeos diferentes, desde que pelo menos um apresentasse cinco resíduos sequenciados consecutivamente na série y/b ou ainda de forma complementar. Em caso de um número inferior a três peptídeos, foi confirmada como válida a identificação com presença de pelo menos um peptídeo com no mínimo sete resíduos de ácidos aminados sequenciados consecutivamente na série y e/ou b ou complementar. Também foi aceita como identificação válida a proteína com menos de três peptídeos, desde que um dos peptídeos apresentasse 100% de identidade exclusiva para a proteína identificada. A análise de identidade total ou parcial das sequências das proteínas identificadas neste estudo foi realizada através da ferramenta *Blast* no banco de dados Uniprot. Todos os resultados obtidos foram reavaliados utilizando o programa *Peaks DB* (Zhang *et al.* 2012) para o estabelecimento do número total de peptídeos e avaliação das respectivas médias de peptídeos obtidos em cada estratégia (Kao *et al.*, 2011).

A utilização de diferentes protocolos de solubilização, juntamente com a utilização da técnica de troca catiônica *off-line* permitiu a identificação de 289 proteínas, sendo 97 delas identificadas com mais de um peptídeo (Figura 44, Anexo 8). Uma solubilização satisfatória foi obtida utilizando tanto o tampão borato/CHAPS como o tampão de iTRAQ, o que pode ser observado nos cromatogramas obtidos para amostras submetidas a cada protocolo (Figura 43) e também pelo número de proteínas e peptídeos identificados a partir da utilização de cada tampão (tabelas no Anexo 8). O processo de fracionamento em coluna de troca catiônica foi relativamente bem sucedido, como pode ser constatado pelo número e proteínas identificadas (Figuras 44 e 45). Mas, tendo em vista a observação de poucas proteínas identificadas na fração não retida, a utilização do fracionamento da troca catiônica não possibilitou melhor identificação de proteínas do que a amostra fracionada em coluna *Oasis C18* com 50 e 100% de metanol, comparando a mesma amostra solubilizada com tampão iTRAQ e fracionada das duas formas.



Tampão solubil. iTRAQ 50 e 100% metOH

Figura - 44 Número de proteínas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* solubilizadas em tampão iTRAQ, comparando o fracionamento em troca catiônica e fracionamento em coluna *Oasis* (C18) em 50 e 100% de solução de metanol.



Figura - 45 Número de proteínas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* solubilizadas em tampão iTRAQ e fracionadas em troca catiônica, nas diferentes etapas de eluição. Total 152 proteínas.

Em suma, esta foi a metodologia estabelecida para preparo de amostras para análise por marcação: células coletadas foram extraídas conforme o protocolo de Wang *et al.*, 2006. As proteínas foram então ressuspensas em tampão 2D o que constituiu a amostra de proteínas solúveis que foi dosada. Alíquotas de 100 ug de proteínas foram novamente precipitados com

acetona TCA 10% e ressuspendidas em solução de solubilização do kit iTRAQ, para posterior digestão por tripsina e marcação.

MARCAÇÃO COM TAGS DE MASSA (KIT iTRAQ)

Inicialmente foi testada a metodologia com o kit de desenvolvimento iTRAQ (iTRAQ™ Reagents Methods Development Kit) que contém os reagentes iTRAQ 114 e 117 e uma mistura de seis proteínas: albumina sérica bovina, β -galactosidase, α -lactalbumina, β -lactoglobulina, lisozima e apotransferrina. Foi marcada a mesma proporção molar (1:1) das proteínas com tag 114 e 117. Os peptídeos foram purificados em coluna de troca catiônica (Pierce String Cation Exchange Spin Column, Thermo), seguido de *Oasis HLB extraction cardidge* (C18, Waters), seguindo os protocolos dos fabricantes. A eluição foi obtida com metanol e após secagem sob vácuo, a amostra foi ressuspendida em ácido fórmico/acetonitrila para análise por espectrometria de massas (MS), nas condições listadas no anexo 7.

Os arquivos brutos (.raw) obtidos da análise da amostra para a padronização de protocolo de marcação foram aplicados ao programa *MASCOT 2.3 Server* (Matrix Science), avaliando as relações obtidas das proteínas do *kit* de desenvolvimento para cada *tag* de marcação. Para a validação das proteínas e dos peptídeos identificados foram utilizados os mesmos parâmetros descritos acima. Os resultados encontram-se na tabela 12.

Tabela - 12 Identificação e quantificação relativa de proteínas a partir do kit de desenvolvimento iTRAQ

117/114		
0.850	gi 1311063	Chain I, Beta-Galactosidase (Chains I-P)
0.816	gi 223165	lactoglobulin beta
0.843	gi 1351907	RecName: Full=Serum albumin; AltName: Full=BSA; AltName: Allergen=Bos d 6; Flags: Precu
0.910	gi 386170777	beta-D-galactosidase [Escherichia coli 99.0741]
0.860	gi 74267962	ALB protein [Bos taurus]
0.778	gi 4557871	serotransferrin precursor [Homo sapiens]
0.743	gi 223780	lactoglobulin beta
1.095	gi 229157	lysozyme
---	gi 230338	Chain E, Structure Of The Trypsin-Binding Domain Of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, MARCAÇÃO (iTRAQ) E ANÁLISE POR MS/MS DE PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DAS LINHAGENS DE *M. AERUGINOSA* CCIBT3106 E CCIBT3194.

A partir de preparações de extratos protéicos das linhagens tóxica e não tóxica de *M. aeruginosa*, alíquotas de 30 ug de proteínas inicialmente dosadas em tampão 2D (7 M ureia; 2 M tioureia; 4% CHAPS; 40mM DTT) foram retiradas, sendo três réplicas de cultivo de cada linhagem em cada fase crescimento. As réplicas de cultivo foram reunidas constituindo assim uma amostra de 90 ug de proteína (*pool*) para cada linhagem para cada condição. Estas foram então precipitadas por adição de 7 volumes de etanol 50: acetona 50: acetato de amônio 0,1% e mantidas a -20 °C por uma noite. As proteínas foram coletadas por centrifugação (10000 g, 15 min, 4 °C). O precipitado foi lavado com acetona 80%, sendo ressuscitado nesta solução, agitado em vortex e a solução centrifugada (10000 g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet seco em *Speed-Vac*. Os pellets foram ressuscitados em 20 µL de solução de ressuspensão do *kit* iTRAQ. Em seguida foram realizadas as etapas de redução, desnaturação, bloqueio das cisteínas e digestão das proteínas como recomendado pelo *kit* iTRAQ. Para desnaturação e redução de proteínas adicionou-se 1 µL do reagente “Denaturant” do *kit* iTRAQ (1% SDS) e 2µL de “Reducing Agent” do *kit* iTRAQ (5 mM tris(2-carboxietilfosfina (TCEP)), incubou-se durante 60 minutos a 60 °C. Para alquilação das cisteínas: adicionou-se 1 µL de “Cystein Bloking Reagent” do *kit* iTRAQ,(10 mM s-methyl metanotiosulfonato (MMTS)) incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para digestão das proteínas adicionou-se tripsina (*Promega sequencing grade*, reconstituída em 25 mM bicarbonato de amônio pH 8, conforme instruções do fabricante), para uma proporção de tripsina: proteína = 1:100 (w/w) e incubou-se durante 20 horas a 37 °C, depois o material foi seco em *Speed-Vac* e congelado a -80 °C.

MARCAÇÃO COM TAGS DE MASSA (KIT iTRAQ)

A marcação foi feita de acordo com as instruções do fabricante do *kit* iTRAQ (iTRAQ™ Reagents Methods Kit). Utilizamos quatro reagentes de um *kit* iTRAQ 8plex: 115, 116, 117 e 118, sendo os isóbaros: (A) 115 linhagem CCIBt 3194, fase exponencial; (B) 116 linhagem CCIBt 3194, fase exponencial tardia; (C) 117 linhagem CCIBt 3106, fase exponencial e (D) 118 linhagem CCIBt 3106, fase exponencial tardia. As amostras de *M. aeruginosa* foram analisadas

em pools de triplicatas biológicas. Cada *pool* foi marcado com um reagente. Foram adicionados 8 μL de cada isóbaro nas respectivas amostras e a mistura incubada por 2 horas em 60 μL de tampão TEAB 0,1 M pH>8 contendo 60% de isopropanol. Ao final da reação as amostras foram transferidas para um único tubo em volume fixo de 40 μL e secas em *Speed-Vac*. Após marcação isobárica, os peptídeos marcados foram reunidos, secados à vácuo em *Speed-Vac* e purificados em coluna de troca catiônica.

FRACIONAMENTO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA CATIÔNICA FORTE (HPLC)

O pré-fracionamento dos peptídeos foi realizado utilizando uma coluna de PolySULFOETHYL A (PolyLC, Columbia, MD) com 5 μm , 100 $\mu\text{m} \times 2.1$ mm i.d., tamanho de poro 200 Å, em um sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent) com uma taxa de fluxo constante de 0,2 mL/min e um volume de injeção de 40 μL . Tampão A consistiu de 10 mM de KH_2PO_4 e 20 % de acetonitrila, pH 2,7 e tampão B consistiu de 10 mM de KH_2PO_4 , 20 % de acetonitrila, e 500 mM de KCl pH 2,7. O gradiente foi de 70 min, 100 % de tampão A, durante 5 min, 5-50 % de tampão B, durante 20 min, 50-100 % de tampão B, durante 10 min, 100 % de tampão B, durante 5 min, 100-0 % de tampão B, durante 1 minuto e 0% de tampão B por 29 min. O cromatograma foi monitorado com o detector de UV a 214, 230 e 280 nm. As frações foram recolhidas utilizando um coletor de fração de 1 min de intervalo por 70 min. As frações que eluíram contendo peptídeos marcados foram reunidas com base na intensidade do pico a 214 nm (no total quatro frações), secas a vácuo em *Speed-Vac* e armazenadas a -20 °C.

DESSALINIZAÇÃO

Os peptídeos (quatro frações) foram dessalinizados usando coluna de fase reversa (Oasis HLB Cartridge, Waters), como descrito anteriormente. Os peptídeos foram eluídos em metanol 100%, secos a vácuo em *Speed-Vac* e guardadas em refrigeração por -20 °C até seu uso.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR LC-MS/MS NO LNBIO (CNPq, CAMPINAS, SP)

Os peptídeos das quatro frações, foram analisados no espectrofotômetro de massas Electrospray ionization/(ESI-Q-TOF Premier) (Waters) acoplado a um sistema de nanocromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) ACQUITY™ (Waters) no LNBio, do

Centro Nacional de Pesquisa de Engenharia e Materiais (CNPEM), Campinas/São Paulo. Inicialmente, na corrida teste os peptídeos foram solubilizados em 90 μL de ácido fórmico 0,1%. Devido à baixa massa de peptídeos exibida no MS, preferiu-se concentrar a solução de peptídeos ressuspensando em apenas 15 μL de ácido fórmico 0,1%. Esta suspensão foi misturada em *vortex* e posteriormente centrifugada a 12.000 g por 5 min. As amostras foram fracionadas em uma coluna C18 de fase reversa utilizando água (solvente A) e acetonitrila 100% (solvente B) como fases móveis, em gradiente de 98% a 10% do solvente A., desenvolvido em 57 minutos; o fluxo foi de 5.000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os espectros em MS foram obtidos na faixa de massa de 100 a 2000 m/z , com tempo de busca de 1s e intervalos de 0,1s. Os espectros em MS/MS foram adquiridos na faixa de massa de 50 a 2000 m/z e com tempos de busca e intervalo iguais aos do modo MS. As amostras foram analisadas em modo *Data Dependent Acquisition* (DDA). Cada análise completa em modo MS foi seguida de 3 análises consecutivas em modo MS/MS, sendo selecionados para fragmentação os 3 íons mais intensos com múltiplas cargas e acima de um ponto de corte de 30 contagens por segundo. As energias de colisão para a fragmentação dos peptídeos foram ajustadas de acordo com os arquivos de reconhecimento de cargas para os íons peptídicos +2, +3 e +4 fornecidos pelo sistema *MassLynx* (versão 4.1, Waters).

BASE DE DADOS

Os espectros MS/MS obtidos a partir da fragmentação dos íons precursores foram processados utilizando o programa *Mascot Distiller* versão 2.3.2.0, 2009 (Matrix Science), tendo como parâmetros, deficiência de clivagem por tripsina, 1; modificação fixa, carbamidometilação de cisteína; modificação variável, oxidação de metionina e quantificação por iTRAQ. Para busca foi usado o banco de dados de *M. aeruginosa* (*Cyanobase*) e o banco de dados do NCBI. As identificações de proteínas foram estabelecidas pela detecção de pelo menos 3 íons fragmento por peptídeo, com mais de 2 peptídeos identificados por proteína. Um máximo de 4% de falso positivo foi permitido.

Como resultado, 104 proteínas foram identificadas como diferencialmente expressas, mas não foram validadas, sendo que 21 delas estavam presentes em mais de uma fração. Deste modo, obtivemos o total de 83 proteínas para validação e análise. Não se obteve o resultado esperado, poucas proteínas foram identificadas utilizando o equipamento ESI-Q-TOF Premier,

provavelmente devido à baixa recuperação de peptídeos, baixa eficiência de marcação ou baixa sensibilidade do equipamento.

O material remanescente foi analisado em um espectrofotômetro de massas QTOF-Micro na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Centro de Ciências de Saúde (UFRJ) para verificar se havia proteínas não digeridas na amostra, o que evidenciaria digestão ineficiente. Entretanto, esta última análise mostrou que não foi este o problema.

Para verificar as possíveis perdas dos peptídeos durante o processo de marcação com iTRAQ, as amostras pré e pós-marcação (uma fração representativa) foram analisadas no espectrofotômetro de massas **SYNAPTTM G1 HDMS (WATERS)** na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, Centro de Ciências de Saúde (UFRJ). Quanto ao material não marcado, os dados gerados demonstraram material mais do que suficiente para o nível de sensibilidade do aparelho. A contagem de TIC (Cromatograma de íons totais) em um dos *STEPS* de gradiente resultou em 10^4 . Quanto ao material marcado, os cromatogramas apresentaram perfis com diversos picos relativos aos isóbaros correspondentes. Portanto, a maior sensibilidade deste equipamento permitiu a análise de dados, o que não pode ser realizado de forma satisfatória no instrumento Q-TOF-premier do LNBio. Infelizmente, o material restante não foi suficiente para mais análises.

Deste modo, adequamos a metodologia para análise de novas amostras, porém para a marcação seguinte, descrita na seção de Metodologia da tese, modificamos o protocolo de digestão, utilizando tripsina em concentração mais elevada (ptn:tripsina = 1:50, contra 1:100 na etapa anterior) e a massa inicial do extrato de proteínas também foi aumentada, ao invés de 100 µg de proteínas, iniciamos o procedimento com 300 µg de amostra. Após análise destas novas amostras por espectrometria de massas, verificou-se que a metodologia de cromatografia das colunas acopladas ao espectrômetro de massas poderia ser melhorada. As frações com mais peptídeos foram as dos últimos *steps* de eluição da troca catiônica, que correspondem à maior concentração de sal e por isso foi adicionada uma etapa a mais. Com isso, obtivemos sucesso na análise, a quantidade de material foi satisfatória e o perfil cromatográfico mostrou boa “contagem de íons”.

ANEXO 7. PARÂMETROS UTILIZADOS NA ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS DA AMOSTRA EM SOLUÇÃO (Q-TOF ULTIMA – WATERS, Co) – Modo DDA.

Corrida cromatográfica

<i>Classificação</i>	<i>Definição</i>
<i>1. Características Gerais</i>	
1.1. Informações sobre a injeção da amostra	Volume de injeção 4,5 uL, temperatura da amostra 40C, partial loop
1.2. Time/Flow rate/Gradient running	Time(min) Flow Rate(µL/min) %A %B Curve 1. Initial 0.600 98.0 2.0 2. 5.00 0.600 90.0 10.0 6 3. 30.00 0.600 70.0 30.0 6 4. 40.00 0.600 40.0 60.0 6 5. 42.00 0.600 10.0 90.0 6 6. 45.00 0.600 98.0 2.0 6
1.3. Solventes	A – água B - Acetonitrila
1.4. Informações sobre fluxo	Lock mass – 0.200 uL/min Trapping Flow Rate: 20.000 µL/min Run time trapping – 10 min
1.5. Limites de Pressão	TrappingHighPressureLimit: 10000 psi
<i>2. Equipamentos</i>	
<i>2.1. Descrição da Coluna</i>	
2.1.1.Fabricante	NanoAcquity (Waters Corporation)
2.1.2. Modelo	UPLC
2.1.3. Modo de separação	Fase Reversa C18 – BEH 130 C18 (1,7 um 100x100) (Waters)
2.2.3. Acessórios adicionais	Coluna Trapping C18 - Symetry TM (5 um, 180x20) (Waters)

Espectrometria de Massas

<i>Classificação</i>	<i>Definição</i>
1. Características Gerais	
1.2. Informações sobre a injeção da amostra	Volume de injeção 4,5 uL, temperaturada amostra 4oC, partial loop
2. Lock spray Configuration	Reference Scan Frequency(sec) 30.000
	Reference Cone Voltage(V) 100.000
3.Detalhes Gerais de MS e MS/MS	Polarity ES+
	Calibration 1 Dynamic
	Capillary 3.47 3.50
	Cone votage 35
	Source Temp (°C) 100
	Collision Energy 10.0
	Pirani Pressure(mbar) 1.65e0
	Penning Pressure(mbar) OFF
	Tof Penning Pressure(mbar) 4.90e-7
	MSMS Start Mass 50.0
	MSMS End Mass 2000.0
	MSMS Scan Time (sec) 1.0
	MSMS Interscan Time (sec) 0.1
	Use Exclude Masses List NO
	Resolution 5200
	MCP 2000

ANEXO 8. PROTEÍNAS DE *M. AERUGINOSA* MILJ-48 IDENTIFICADAS A PARTIR DE PREPARAÇÕES SOLUBILIZADAS EM SOLUÇÃO DE iTRAQ OU SOLUÇÃO BORATO/CHAPS E ANALISADAS EM ESPECTROMETRO DE MASSAS (Q-TOF ULTIMA – WATERS, Co) – MODO DDA.

Lista de proteínas de MILJ48 identificadas a partir de solubilização em tampão iTRAQ

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
3	A8YF91 A8YF91_MICAE	307.06	54	18	18	525.439.609	13135	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcL PE=3 SV=1
1	A8YHP0 A8YHP0_MICAE	266.99	44	12	12	516.129.570	13182	AtpD protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=atpD PE=3 SV=1
220	A8YIX6 A8YIX6_MICAE	185.45	18	11	11	964.299.453	13709	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glgP PE=3 SV=1
4585	sp B0JVL8 RBL_MICAN	185.55	32	11	11	525.439.609	21939	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cbbL PE=3 SV=1
12	A8YD60 A8YD60_MICAE	249.63	21	8	8	539.787.305	13089	AtpA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=atpA PE=3 SV=1
9	A8YJM7 A8YJM7_MICAE	264.21	53	7	7	181.644.688	13234	CpcB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcB PE=3 SV=1
10	B0JHB5 B0JHB5_MICAN	264.21	53	7	7	181.644.688	13234	Phycocyanin beta subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcB1 PE=3 SV=1
660	A8YMR6 A8YMR6_MICAE	158.89	18	6	6	486.937.930	13233	Genome sequencing data, contig C328 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2181 PE=4 SV=1
661	B0JXJ4 B0JXJ4_MICAN	158.89	18	6	6	487.488.750	13233	Bicarbonate transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_19990 PE=4 SV=1
11	A8YG81 A8YG81_MICAE	179.46	22	5	5	355.238.203	13676	Similar to tr A0YZF1 A0YZF1_9CYAN Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5686 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
149	A8YGH0 A8YGH0_MICAE	73.94	13	5	5	779.469.453	12989	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pnp PE=3 SV=1
151	A8YFC4 A8YFC4_MICAE	141.97	40	5	5	172.015.938	13225	ApcB1 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcB1 PE=3 SV=1
152	B0JRU8 B0JRU8_MICAN	141.97	40	5	5	172.015.938	13225	Allophycocyanin beta subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcB PE=3 SV=1
2940	A8YM48 A8YM48_MICAE	135.05	16	5	5	530.399.727	13822	Glutamine synthetase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glnA PE=3 SV=1
3951	B0JXC2 B0JXC2_MICAN	135.05	16	5	5	530.529.766	13822	Glutamine synthetase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glnA PE=3 SV=1
221	B0JXL3 B0JXL3_MICAN	88.34	10	4	4	964.018.906	22160	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20180 PE=3 SV=1
537	A8YJZ4 A8YJZ4_MICAE	180.38	16	4	4	372.307.188	13032	GlpX protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glpX PE=3 SV=1
591	A8YLU5 A8YLU5_MICAE	194.59	38	4	4	218.887.793	13184	Genome sequencing data, contig C327 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1847 PE=4 SV=1
4590	sp B0JUI1 CH10_MICAN	150.71	52	4	4	107.292.773	12975	10 kDa chaperonin OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=groS PE=3 SV=1
291	A8YFD1 A8YFD1_MICAE	95.24	17	3	3	378.581.016	13806	Genome sequencing data, contig C304 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_875 PE=4 SV=1
587	A8YNA3 A8YNA3_MICAE	103.34	37	3	3	108.353.154	15890	10 kDa chaperonin OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=groS PE=3 SV=1
6656	B0JGF5 B0JGF5_MICAN	44.06	20	3	3	218.464.941	16043	Superoxide dismutase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=sodB PE=3 SV=1
7291	sp B0JJP7 ILVD_MICAN	98.17	10	3	3	590.839.336	13612	Dihydroxy-acid dehydratase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ilvD PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
13	A8YJM8 A8YJM8_MICAE	63.44	17	2	2	175.157.246	20037	CpcA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcA PE=3 SV=1
16	A8YIW2 A8YIW2_MICAE	45.58	7	2	2	448.041.562	13352	Elongation factor Tu OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tuf PE=3 SV=1
69	A8YFC5 A8YFC5_MICAE	136.18	23	2	2	173.627.012	13771	ApcA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcA PE=3 SV=1
70	B0JRU9 B0JRU9_MICAN	136.18	23	2	2	173.186.484	13771	Allophycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcA PE=3 SV=1
78	B0JGJ4 B0JGJ4_MICAN	100.40	17	2	2	178.415.254	14417	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ytfC PE=3 SV=1
79	A8YBJ2 A8YBJ2_MICAE	100.40	16	2	2	181.588.867	14417	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4807 PE=3 SV=1
296	A8YF71 A8YF71_MICAE	54.08	11	2	2	476.822.031	13797	Similar to P74390_SYNY3 Negative aliphatic amidase regulator OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5362 PE=4 SV=1
297	B0JPD3 B0JPD3_MICAN	54.08	11	2	2	476.652.148	13797	ABC-type urea transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_06220 PE=4 SV=1
550	A8YJ16 A8YJ16_MICAE	57.63	6	2	2	389.521.875	13022	FbaA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=fbaA PE=4 SV=1
551	B0JLP5 B0JLP5_MICAN	57.63	6	2	2	389.521.875	13022	Fructose-bisphosphate aldolase class II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fbaA PE=4 SV=1
621	B0JHN7 B0JHN7_MICAN	61.37	16	2	2	132.801.416	17696	Plastocyanin OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=petE PE=3 SV=1
762	A8YF87 A8YF87_MICAE	69.68	47	2	2	120.878.916	15950	CcmK protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ccmK PE=4 SV=1
930	B0JXB5 B0JXB5_MICAN	26.54	3	2	2	1.280.621.250	18580	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_19200 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
1064	A8YKU3 A8YKU3_MICAE	61.06	8	2	2	484.545.859	14351	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glgC PE=3 SV=1
1065	B0JJ15 B0JJ15_MICAN	61.06	8	2	2	484.185.117	14351	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glgC PE=3 SV=1
1524	Q9FDU1 Q9FDU1_MICAE	45.10	0	2	2	4.359.245.312	19506	Polyketide synthase OS=Microcystis aeruginosa GN=mcvD PE=4 SV=1
1900	Q9RNB2 Q9RNB2_MICAE	45.10	0	2	2	4.356.198.438	19506	McvD OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=mcvD PE=4 SV=1
1901	A8YJV8 A8YJV8_MICAE	45.10	0	2	2	4.361.114.375	19506	McvD protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=mcvD PE=4 SV=1
6655	A8Y9Y3 A8Y9Y3_MICAE	50.81	11	2	2	380.511.484	19958	Genome sequencing data, contig C236 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3116 PE=4 SV=1
7289	A8YCI8 A8YCI8_MICAE	44.22	28	2	2	218.165.098	13141	Superoxide dismutase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4715 PE=3 SV=1
7973	A8YBS4 A8YBS4_MICAE	53.61	10	2	2	343.125.430	14547	Cysteine synthase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cysK PE=3 SV=1
9482	B0JTK1 B0JTK1_MICAN	53.88	12	2	2	262.397.656	15947	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ppiB PE=3 SV=1
9483	A8YFA2 A8YFA2_MICAE	53.88	12	2	2	264.310.117	15947	Similar to tr Q4C9P7 Q4C9P7_CROWT Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2522 PE=3 SV=1
7	A8YLT2 A8YLT2_MICAE	41.46	5	1	1	364.375.352	13961	Similar to tr Q4BX75 Q4BX75_CROWT Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4508 PE=3 SV=1
8	B0JHH3 B0JHH3_MICAN	41.46	5	1	1	364.355.625	13961	NAD(P)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES- 843) GN=MAE_25030 PE=3 SV=1
14	B0JHB6 B0JHB6_MICAN	209.07	27	4	1	175.157.246	13407	Phycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcA1 PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
15	B0JWN3 B0JWN3_MICAN	211.38	35	6	1	354.697.891	19134	Water-soluble carotenoid protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_18910 PE=4 SV=1
73	A8YF93 A8YF93_MICAE	44.55	31	1	1	131.531.436	14586	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcS PE=4 SV=1
74	Q0P7L3 Q0P7L3_MICAE	44.55	31	1	1	131.531.436	14586	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit OS=Microcystis aeruginosa GN=rbcS PE=4 SV=1
75	B0JVL6 B0JVL6_MICAN	44.55	31	1	1	131.531.436	14586	Ribulose bisphosphate carboxylase small subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=rbcS PE=4 SV=1
99	D7R037 D7R037_MICAE	112.44	46	4	1	106.150.000	16005	Phycocyanin alpha subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa NIER 10039 GN=pcA PE=3 SV=1
110	D7R025 D7R025_MICAE	197.84	46	4	1	106.150.000	17758	Phycocyanin alpha subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa CBE-12 GN=pcA PE=3 SV=1
117	C1K7K8 C1K7K8_MICAE	182.47	46	4	1	106.010.137	13716	Phycocyanin alpha subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa NPCD-1 GN=cpcA PE=3 SV=1
143	Q6Q0U1 Q6Q0U1_MICAE	182.47	43	4	1	111.846.582	13716	CpcA (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa FACHB-907 PE=3 SV=1
150	B0JK61 B0JK61_MICAN	161.59	25	2	1	157.464.639	13406	Bacterioferritin comigratory protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60930 PE=4 SV=1
190	C7SLH7 C7SLH7_9BACT	84.29	35	3	1	106.680.625	17204	Phycocyanin alpha subunit (Fragment) OS=uncultured bacterium GN=cpcA PE=3 SV=1
219	B0JUY0 B0JUY0_MICAN	21.17	3	1	1	826.002.891	22865	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psaA PE=3 SV=1
292	A8YEM2 A8YEM2_MICAE	129.20	21	2	1	158.486.133	13018	Similar to tr Q10XN9 Q10XN9_TRIEI Redoxin OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3971 PE=4 SV=1
442	A0A7M2 A0A7M2_9CAUD	25.30	0	1	1	1.467.654.688	21807	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa phage Ma-LMM01 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
531	A8YA28 A8YA28_MICAE	37.35	1	1	1	1.503.441.562	20383	Similarity OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5316 PE=4 SV=1
588	A8YF86 A8YF86_MICAE	45.30	9	1	1	110.836.904	14238	Similar to tr Q4C8Y8 Q4C8Y8_CROWT Microcompartments protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5495 PE=4 SV=1
589	B0JVM3 B0JVM3_MICAN	45.30	9	1	1	110.836.904	14238	Carbon dioxide concentrating mechanism protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ccmK2 PE=4 SV=1
590	B0JJW9 B0JJW9_MICAN	27.27	0	1	1	5.308.229.375	13640	McnC protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=mcnC PE=4 SV=1
592	B0JNH5 B0JNH5_MICAN	87.49	9	1	1	219.158.008	21259	Thioredoxin peroxidase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_35830 PE=4 SV=1
595	A8YH74 A8YH74_MICAE	27.27	0	1	1	5.294.993.125	13640	Similar to tr Q9RAH4 Q9RAH4 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3135 PE=4 SV=1
602	A8YNL5 A8YNL5_MICAE	59.61	3	1	1	590.925.977	22348	Similar to tr Q7NE97 Q7NE97 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1650 PE=3 SV=1
603	B0JY16 B0JY16_MICAN	56.28	3	1	1	591.308.281	13523	Phosphoglucomutase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_52320 PE=3 SV=1
605	A8YFK3 A8YFK3_MICAE	27.46	6	1	1	477.318.945	14082	NrtA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=nrtA PE=4 SV=1
606	B0JUB4 B0JUB4_MICAN	27.46	6	1	1	477.637.930	14082	Nitrate transport protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_14800 PE=4 SV=1
610	B0JSE1 B0JSE1_MICAN	29.78	3	1	1	747.855.547	18384	Elongation factor G OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fus PE=3 SV=1
611	A8YIW3 A8YIW3_MICAE	29.78	3	1	1	757.437.891	18384	Elongation factor G OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=fusA PE=3 SV=1
652	D3G6Z5 D3G6Z5_MICAE	20.16	1	1	1	750.966.406	13544	Hsp90 OS=Microcystis aeruginosa NIES-298 GN=hsp90 PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
690	A8YIR5 A8YIR5_MICAE	22.84	1	1	1	916.648.047	16469	Probable phosphoketolase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2288 PE=3 SV=1
838	A8YBF4 A8YBF4_MICAE	24.55	5	1	1	267.296.504	17706	Genome sequencing data, contig C271 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5436 PE=3 SV=1
873	A8YE57 A8YE57_MICAE	36.17	3	1	1	531.621.836	20349	Similar to tr Q4C1F5 Q4C1F5_CROWT Peptidase U62 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4016 PE=4 SV=1
874	B0JMA8 B0JMA8_MICAN	36.17	3	1	1	531.952.539	20349	Putative modulator of DNA gyrase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_33710 PE=4 SV=1
1096	A8YAM3 A8YAM3_MICAE	28.22	1	1	1	1.300.649.922	18302	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4303 PE=3 SV=1
1097	B0JPR2 B0JPR2_MICAN	28.22	1	1	1	1.301.699.141	18302	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_38140 PE=3 SV=1
1407	B0JLA7 B0JLA7_MICAN	24.55	7	1	1	194.961.016	17706	DNA-binding ferritin-like protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_62840 PE=3 SV=1
1481	A8YE55 A8YE55_MICAE	32.00	4	1	1	480.240.703	19935	PmbA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pmbA PE=4 SV=1
1502	A8YBK7 A8YBK7_MICAE	38.63	1	1	1	687.238.359	18521	Similar to Q4BZ50_CROWT Acyl-CoA dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4594 PE=3 SV=1
1509	A8YNL1 A8YNL1_MICAE	28.35	1	1	1	1.634.068.906	19463	Similar to tr Q926M9 Q926M9 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1646 PE=4 SV=1
1541	A8YDA2 A8YDA2_MICAE	47.88	2	1	1	881.059.766	14271	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glgB PE=3 SV=1
1676	A8YF59 A8YF59_MICAE	20.45	2	1	1	296.619.609	18864	Genome sequencing data, contig C302 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4575 PE=4 SV=1
1677	B0JU72 B0JU72_MICAN	20.45	2	1	1	296.579.688	18864	Two-component response regulator OmpR subfamily OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_14380 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
1778	B0JQT0 B0JQT0_MICAN	39.38	5	1	1	360.873.086	19930	Delta-aminolevulinic acid dehydratase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=hemB PE=3 SV=1
1829	A8YCI0 A8YCI0_MICAE	53.48	3	1	1	543.164.727	14355	Genome sequencing data, contig C284 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4703 PE=4 SV=1
1856	A8YKF8 A8YKF8_MICAE	24.40	1	1	1	888.672.266	18363	Similar to tr P73619 P73619 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2113 PE=4 SV=1
1862	B0JUR2 B0JUR2_MICAN	22.36	2	1	1	772.237.266	13217	Ribonuclease II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_46880 PE=4 SV=1
1905	A8YMU3 A8YMU3_MICAE	21.17	2	1	1	787.055.859	18648	Similar to A0YUL6_9CYAN Peptidase C14 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1068 PE=4 SV=1
2298	A8YDT6 A8YDT6_MICAE	30.38	20	1	1	131.941.143	20820	Similar to tr Q7NES1 Q7NES1 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3487 PE=4 SV=1
2300	Q8KPY5 Q8KPY5_MICAE	26.07	12	1	1	73.342.427	19444	Phycocyanin beta subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa GN=pcB PE=3 SV=1
2379	B0JXS3 B0JXS3_MICAN	20.05	2	1	1	353.909.219	22489	Zinc ABC-transporter zinc-binding protein component OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20780 PE=3 SV=1
2413	B0JW93 B0JW93_MICAN	22.20	5	1	1	846.253.047	21716	Serine/threonine protein kinase with WD40 repeats OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_17510 PE=4 SV=1
2507	B0JMM4 B0JMM4_MICAN	22.84	1	1	1	918.420.391	16469	Probable phosphoketolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_34870 PE=3 SV=1
2925	B0JWX8 B0JWX8_MICAN	23.29	8	1	1	509.564.219	21933	Putative modulator of DNA gyrase peptidase U62 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_50430 PE=4 SV=1
2926	A8YEH8 A8YEH8_MICAE	23.29	8	1	1	510.454.219	21933	Similar to tr Q4BXU2 Q4BXU2_CROWT Peptidase U62 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4858 PE=4 SV=1
3017	B0JGZ9 B0JGZ9_MICAN	24.11	3	1	1	567.300.000	18740	Anthranilate synthetase alpha-subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=trpE PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
3507	B0JFU6 B0JFU6_MICAN	22.09	1	1	1	1.401.596.719	18255	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_21290 PE=4 SV=1
3544	B0JIZ2 B0JIZ2_MICAN	23.98	2	1	1	580.436.719	19383	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_58780 PE=4 SV=1
3952	A8YB36 A8YB36_MICAE	62.63	10	1	1	132.641.436	13039	Plastocyanin OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=petE PE=3 SV=1
4588	sp B0JSE0 EFTU_MICAN	33.19	4	1	1	449.183.086	20169	Elongation factor Tu OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=tuf PE=3 SV=1
4611	sp B0JVE7 G6PI_MICAN	40.54	1	1	1	581.133.711	18987	Glucose-6-phosphate isomerase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=pgi PE=3 SV=1
4621	A8YK40 A8YK40_MICAE	22.43	2	1	1	701.417.500	15978	Similar to tr P73196 P73196 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1255 PE=4 SV=1
4622	B0JQU8 B0JQU8_MICAN	22.43	2	1	1	718.716.641	15978	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_39950 PE=4 SV=1
4881	B0JLP7 B0JLP7_MICAN	20.98	4	1	1	450.448.359	16666	Periplasmic binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_32490 PE=4 SV=1
5307	B0JHQ0 B0JHQ0_MICAN	39.41	1	1	1	679.694.062	18221	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_56400 PE=4 SV=1
5782	A8YG72 A8YG72_MICAE	21.54	13	1	1	96.457.178	20744	Similar to tr Q1F637 Q1F637_9CHLR Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5677 PE=4 SV=1
6658	A8YK20 A8YK20_MICAE	36.22	5	1	1	349.870.742	20032	Cytosine-specific methyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1231 PE=3 SV=1
6659	A8YEF8 A8YEF8_MICAE	48.91	6	1	1	467.885.078	19986	Genome sequencing data, contig C299 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4614 PE=3 SV=1
6660	B0JPE1 B0JPE1_MICAN	46.76	5	1	1	381.011.406	21770	Carboxysome formation protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ccmA PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
6662	A8Y9Y9 A8Y9Y9_MICAE	38.81	4	1	1	440.144.492	20638	Sulfate adenylyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=sat PE=3 SV=1
6663	A8YJ06 A8YJ06_MICAE	31.81	12	1	1	251.899.160	19989	FabG2 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=fabG2 PE=3 SV=1
6664	B0JWU0 B0JWU0_MICAN	31.81	12	1	1	251.899.160	19989	PHA-specific acetoacetyl-CoA reductase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=phaB PE=3 SV=1
6665	B0JWI1 B0JWI1_MICAN	29.99	3	1	1	382.672.969	19527	Phosphate transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=sphX PE=4 SV=1
6666	B0JWU1 B0JWU1_MICAN	29.46	5	1	1	440.978.438	19685	PHA-specific beta-ketothiolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=phaA PE=3 SV=1
6668	B0JV69 B0JV69_MICAN	20.83	8	1	1	637.097.656	14530	Carboxypeptidase A2 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_15810 PE=4 SV=1
6669	A8YEG5 A8YEG5_MICAE	23.06	2	1	1	641.864.453	15913	Similar to tr P73902 P73902 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4844 PE=4 SV=1
6681	A8YIG2 A8YIG2_MICAE	20.23	1	1	1	524.502.695	20060	Similarity OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2074 PE=4 SV=1
6687	B0JGP1 B0JGP1_MICAN	69.29	6	1	1	401.257.109	22230	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_54850 PE=3 SV=1
6870	B0JRV9 B0JRV9_MICAN	62.17	10	1	1	161.138.135	13212	Cyanate lyase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cynS PE=3 SV=1
6880	A8YLZ6 A8YLZ6_MICAE	39.12	2	1	1	968.860.625	14629	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5378 PE=3 SV=1
7290	A8YM94 A8YM94_MICAE	29.43	5	1	1	361.634.180	21135	Delta-aminolevulinic acid dehydratase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_840 PE=3 SV=1
7327	B0JRV4 B0JRV4_MICAN	47.28	6	1	1	314.820.605	21876	Putative peptidase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_10320 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
7869	A8YLD2 A8YLD2_MICAE	69.29	6	1	1	401.627.812	22230	GuaB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=guaB PE=3 SV=1
7872	A8YEP8 A8YEP8_MICAE	28.42	4	1	1	459.907.617	14616	Adenosylhomocysteinase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ahcY PE=3 SV=1
7873	B0JWW0 B0JWW0_MICAN	32.71	4	1	1	459.908.086	22619	Adenosylhomocysteinase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ahcY PE=3 SV=1
7874	A8YBC7 A8YBC7_MICAE	28.86	3	1	1	732.935.234	22574	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=acsA PE=3 SV=1
7883	A8YBW1 A8YBW1_MICAE	22.37	3	1	1	483.953.164	22839	Similar to tr Q4C8B8 Q4C8B8_CROWT Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5349 PE=4 SV=1
7884	B0JPZ7 B0JPZ7_MICAN	22.37	3	1	1	483.772.617	22839	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_38990 PE=4 SV=1
7888	B0JKH9 B0JKH9_MICAN	20.64	4	1	1	876.256.562	22848	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_29460 PE=4 SV=1
7889	A8YN70 A8YN70_MICAE	20.38	8	1	1	180.094.844	22818	Genome sequencing data, contig C328 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_426 PE=4 SV=1
7893	sp B0JHI7 CCS1_MICAN	22.83	1	1	1	497.277.383	22407	Cytochrome c biogenesis protein CcsB OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ccsB PE=3 SV=1
8095	A8YFD8 A8YFD8_MICAE	44.69	10	1	1	161.658.486	16106	CynS protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cynS PE=3 SV=1
8507	A8YMR4 A8YMR4_MICAE	53.48	3	1	1	561.045.625	14355	Genome sequencing data, contig C328 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2185 PE=4 SV=1
8508	B0JGF9 B0JGF9_MICAN	26.51	2	1	1	881.249.766	16560	1,4-alpha-glucan branching enzyme GlgB OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glgB PE=3 SV=1
8512	A8YED3 A8YED3_MICAE	26.75	9	1	1	128.669.453	13107	Thioredoxin OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5139 PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
8517	B0JY36 B0JY36_MICAN	25.81	2	1	1	316.218.945	13076	Pseudouridine synthase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_52520 PE=3 SV=1
8519	A8YA36 A8YA36_MICAE	22.29	4	1	1	271.641.582	13258	Genome sequencing data, contig C243 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5299 PE=4 SV=1
8520	B0JX67 B0JX67_MICAN	22.51	4	1	1	241.883.926	13555	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_51320 PE=4 SV=1
8521	B0JSM4 B0JSM4_MICAN	21.47	2	1	1	433.483.906	14223	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_43600 PE=4 SV=1
8522	A8YF19 A8YF19_MICAE	21.47	2	1	1	436.688.281	14223	Similar to Q4CA91_CROWT S-layer homology region OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2447 PE=4 SV=1
8525	A8YEP1 A8YEP1_MICAE	20.12	2	1	1	457.370.664	13594	Similar to tr Q4C4X4 Q4C4X4_CROWT Von Willebrand factor OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3014 PE=4 SV=1
8529	B0JWX1 B0JWX1_MICAN	20.12	2	1	1	460.584.023	13594	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_50360 PE=4 SV=1
8538	B0JUH5 B0JUH5_MICAN	23.16	2	1	1	432.199.844	13820	Histidine kinase like sensor protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_46010 PE=4 SV=1
9484	B0JJD9 B0JJD9_MICAN	36.10	10	1	1	194.030.156	16066	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_27590 PE=4 SV=1
10321	B0JNB7 B0JNB7_MICAN	49.05	4	1	1	367.387.930	19344	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_04590 PE=3 SV=1
10322	B0JGB4 B0JGB4_MICAN	38.63	1	1	1	687.228.516	18521	Isovaleryl-CoA dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_22970 PE=3 SV=1
10323	B0JK51 B0JK51_MICAN	27.33	6	1	1	624.327.812	18600	Glycoside hydrolase family 57 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60830 PE=4 SV=1
10324	A8YCB2 A8YCB2_MICAE	23.22	10	1	1	384.624.453	17851	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=argC PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
10327	A0A7H5 A0A7H5_9CAUD	26.50	5	1	1	163.398.604	17608	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa phage Ma-LMM01 PE=4 SV=1
10330	A8YI43 A8YI43_MICAE	24.21	4	1	1	437.143.906	17854	Similar to tr Q44295 Q44295 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2545 PE=4 SV=1
10331	B0JK43 B0JK43_MICAN	24.21	4	1	1	437.475.000	17854	PBS lyase heat-like repeat OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60750 PE=4 SV=1
10334	A8YDS4 A8YDS4_MICAE	23.30	4	1	1	200.261.719	19263	50S ribosomal protein L25 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rplY PE=3 SV=1
10336	A8YJ62 A8YJ62_MICAE	22.50	11	1	1	163.837.842	18369	Nucleoside diphosphate kinase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ndk PE=3 SV=1
10342	B0JUN7 B0JUN7_MICAN	24.74	1	1	1	735.629.297	18278	M48B family peptidase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_46630 PE=4 SV=1

TOTAL – 161 PROTEÍNAS

Lista de proteínas de MILJ48 identificadas a partir de solubilização em tampão BORATO-CHAPS

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
9	A8YJM7 A8YJM7_MICAE	145.02	46	6	4	181.644.688	179	CpcB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcB PE=3 SV=1
10	B0JHB5 B0JHB5_MICAN	145.02	46	6	4	181.644.688	179	Phycocyanin beta subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcB1 PE=3 SV=1
18	O53093 O53093_MICAE	88.77	46	3	1	95.648.730	572	Phycocyanin beta subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa GN=pcB PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
112	Q9F9C6 Q9F9C6_MICAE	90.81	44	3	1	106.010.137	1390	Phycocyanin alpha subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa GN=pcA PE=3 SV=1
214	A8YBC6 A8YBC6_MICAE	89.93	43	3	3	88.422.598	1788	Photosystem I iron-sulfur center OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psaC PE=3 SV=1
13	A8YJM8 A8YJM8_MICAE	105.39	41	3	3	175.157.246	35	CpcA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcA PE=3 SV=1
14	B0JHB6 B0JHB6_MICAN	105.39	41	3	3	175.157.246	35	Phycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcA1 PE=3 SV=1
151	A8YFC4 A8YFC4_MICAE	99.78	40	4	2	172.015.938	3097	ApcB1 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcB1 PE=3 SV=1
2298	A8YDT6 A8YDT6_MICAE	38.92	38	2	1	73.342.427	6875	Similar to tr Q7NES1 Q7NES1 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3487 PE=4 SV=1
5	B0JHB8 B0JHB8_MICAN	137.44	35	6	1	320.880.176	269	Phycobilisome rod linker polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcC1 PE=4 SV=1
1	A8YHP0 A8YHP0_MICAE	146.89	35	9	9	516.129.570	478	AtpD protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=atpD PE=3 SV=1
6	A8YJM9 A8YJM9_MICAE	122.32	34	6	1	322.132.363	73	CpcI protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcI PE=4 SV=1
538	A8YMY6 A8YMY6_MICAE	91.99	34	2	1	84.195.586	857	Photosystem I reaction center subunit IV OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psaE PE=3 SV=1
588	A8YF86 A8YF86_MICAE	56.43	34	2	2	110.836.904	1768	Similar to tr Q4C8Y8 Q4C8Y8_CROWT Microcompartments protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5495 PE=4 SV=1
589	B0JVM3 B0JVM3_MICAN	56.43	34	2	2	110.836.904	1768	Carbon dioxide concentrating mechanism protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ccmK2 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
150	B0JK61 B0JK61_MICAN	65.68	32	2	1	157.464.639	3830	Bacterioferritin comigratory protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60930 PE=4 SV=1
73	A8YF93 A8YF93_MICAE	80.35	31	2	2	131.531.436	482	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcS PE=4 SV=1
156	A8YCE5 A8YCE5_MICAE	109.89	29	5	4	299.457.461	896	PsbO protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psbO PE=4 SV=1
157	B0JTE4 B0JTE4_MICAN	109.89	29	5	4	298.766.406	896	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psbO PE=4 SV=1
7	A8YLT2 A8YLT2_MICAE	119.45	28	6	6	364.375.352	466	Similar to tr Q4BX75 Q4BX75_CROWT Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4508 PE=3 SV=1
534	A8YFF3 A8YFF3_MICAE	115.01	28	6	2	286.945.117	1105	CpcG protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcG PE=4 SV=1
535	B0JVR3 B0JVR3_MICAN	115.01	28	6	2	286.945.117	1105	Phycobilisome rod-core linker polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcG PE=4 SV=1
292	A8YEM2 A8YEM2_MICAE	35.25	28	2	1	158.486.133	1443	Similar to tr Q10XN9 Q10XN9_TRIEI Redoxin OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3971 PE=4 SV=1
3	A8YF91 A8YF91_MICAE	126.12	27	8	8	525.439.609	234	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcL PE=3 SV=1
14	B0JHB6 B0JHB6_MICAN	97.23	26	3	1	175.157.246	1081	Phycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcA1 PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
591	A8YLU5 A8YLU5_MICAE	46.18	26	2	2	218.887.793	2095	Genome sequencing data, contig C327 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1847 PE=4 SV=1
592	B0JNH5 B0JNH5_MICAN	46.18	26	2	1	219.158.008	2095	Thioredoxin peroxidase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_35830 PE=4 SV=1
590	B0JJW9 B0JJW9_MICAN	28.05	25	1	2	218.887.793	722	McnC protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=mcnC PE=4 SV=1
587	A8YNA3 A8YNA3_MICAE	75.40	25	2	2	108.353.154	809	10 kDa chaperonin OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=groS PE=3 SV=1
11	A8YG81 A8YG81_MICAE	104.96	24	4	2	355.238.203	19	Similar to tr A0YZF1 A0YZF1_9CYAN Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5686 PE=4 SV=1
151	A8YFC4 A8YFC4_MICAE	36.28	24	2	4	172.015.938	142	ApcB1 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcB1 PE=3 SV=1
152	B0JRU8 B0JRU8_MICAN	36.28	24	2	2	172.015.938	142	Allophycocyanin beta subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcB PE=3 SV=1
69	A8YFC5 A8YFC5_MICAE	71.28	23	2	2	173.627.012	69	ApcA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcA PE=3 SV=1
70	B0JRU9 B0JRU9_MICAN	71.28	23	2	2	173.186.484	69	Allophycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcA PE=3 SV=1
1405	Q70JT1 Q70JT1_MICAE	60.01	23	2	1	194.961.016	2982	Gas vesicle structural protein 1 OS=Microcystis aeruginosa GN=gvpI PE=3 SV=1
548	A8YD92 A8YD92_MICAE	50.22	22	4	1	377.752.930	933	PrK protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=prK PE=4 SV=1
549	B0JPU3 B0JPU3_MICAN	50.22	22	4	2	378.583.398	933	Phosphoribulokinase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=prk PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
551	B0JLP5 B0JLP5_MICAN	44.06	22	2	1	100.442.803	1298	Fructose-bisphosphate aldolase class II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fbaA PE=4 SV=1
83	Q8VL96 Q8VL96_MICAE	47.39	22	2	1	100.302.939	7990	C-phycocyanin alpha subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa NIES-98 GN=cpcA PE=3 SV=1
304	B0JU03 B0JU03_MICAN	24.22	21	1	1	142.982.012	291	Transcriptional regulator OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_13690 PE=4 SV=1
598	B0JLH8 B0JLH8_MICAN	20.71	21	1	1	84.595.400	7811	Photosystem I reaction center subunit IV OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psaE PE=3 SV=1
2	B0JPC0 B0JPC0_MICAN	141.35	20	8	7	655.470.547	139	Porin type major outer membrane protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_06090 PE=4 SV=1
15	B0JWN3 B0JWN3_MICAN	91.87	20	3	1	354.697.891	397	Water-soluble carotenoid protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_18910 PE=4 SV=1
537	A8YJZ4 A8YJZ4_MICAE	85.72	20	6	2	372.307.188	746	GlpX protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glpX PE=3 SV=1
1901	A8YJV8 A8YJV8_MICAE	22.00	20	1	1	131.941.143	6771	McyD protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=mcyD PE=4 SV=1
216	A8YE22 A8YE22_MICAE	59.07	19	2	2	181.230.156	6887	PsaF protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psaF PE=4 SV=1
217	B0JUV3 B0JUV3_MICAN	35.60	19	2	2	181.230.156	7797	Photosystem I subunit III OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psaF PE=4 SV=1
2858	B0JGL2 B0JGL2_MICAN	22.05	18	1	1	156.198.066	7934	Hemolysin secretion protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_54560 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
3439	A8YAN7 A8YAN7_MICAE	44.83	18	1	1	156.237.988	8323	Photosystem II D2 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psbD PE=3 SV=1
78	B0JGJ4 B0JGJ4_MICAN	56.86	17	2	2	178.415.254	118	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ytfC PE=3 SV=1
1407	B0JLA7 B0JLA7_MICAN	50.89	16	1	1	194.961.016	3499	DNA-binding ferritin-like protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_62840 PE=3 SV=1
306	A8YKN2 A8YKN2_MICAE	23.55	14	1	1	172.487.480	160	50S ribosomal protein L9 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rplI PE=3 SV=1
307	D3G6Y7 D3G6Y7_MICAE	22.63	14	1	1	172.487.480	462	Hsp20-1 OS=Microcystis aeruginosa NIES-298 GN=hsp20-1 PE=3 SV=1
147	A8YAV2 A8YAV2_MICAE	94.87	13	4	1	415.430.039	916	Similar to Cter part of tr P73103 P73103_SYNY3 Slr1908 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4763 PE=4 SV=1
148	A8YGI8 A8YGI8_MICAE	48.34	12	2	2	258.387.012	281	50S ribosomal protein L1 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rplA PE=3 SV=1
679	B0JTZ6 B0JTZ6_MICAN	31.77	12	1	1		2998	Chaperone protein DnaK 1 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=dnaK PE=2 SV=1
838	A8YBF4 A8YBF4_MICAE	20.39	12	1	1	267.296.504	7007	Genome sequencing data, contig C271 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5436 PE=3 SV=1
17	A8YF14 A8YF14_MICAE	87.26	11	3	3	425.528.984	273	Phosphoglycerate kinase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pgk PE=3 SV=1
303	A8YG08 A8YG08_MICAE	24.22	11	1	1	142.841.133	291	Similar to tr P74426 P74426_SYNY3 SlI0359 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5963 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
300	A8YJ29 A8YJ29_MICAE	27.77	11	1	1	142.841.133	520	Genome sequencing data, contig C319 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3327 PE=4 SV=1
215	A8YAN9 A8YAN9_MICAE	54.97	11	2	2	510.076.406	849	PsbC protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psbC PE=4 SV=1
2303	B0JT46 B0JT46_MICAN	26.31	11	1	1	286.418.008	7045	Alpha/beta fold family hydrolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_12680 PE=4 SV=1
12	A8YD60 A8YD60_MICAE	98.95	10	4	4	539.787.305	31	AtpA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=atpA PE=3 SV=1
16	A8YIW2 A8YIW2_MICAE	103.97	10	3	3	448.041.562	265	Elongation factor Tu OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tuf PE=3 SV=1
615	A8YG01 A8YG01_MICAE	33.76	10	1	1	125.636.855	917	GlnB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glnB PE=3 SV=1
77	A8YGZ7 A8YGZ7_MICAE	69.97	10	3	3	589.470.859	1194	60 kDa chaperonin 1 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=groL2 PE=3 SV=1
622	A8YHJ4 A8YHJ4_MICAE	28.89	10	1	1	137.558.525	1831	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=petC PE=3 SV=1
1422	B0JST2 B0JST2_MICAN	22.87	10	1	1	120.300.615	3818	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_11540 PE=4 SV=1
153	D3G6Z1 D3G6Z1_MICAE	33.40	9	1	1	529.664.062	354	60 kDa chaperonin (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa NIES-298 GN=groEL PE=3 SV=1
223	A8YFB8 A8YFB8_MICAE	41.29	9	2	1	387.791.016	385	Genome sequencing data, contig C303 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3099 PE=4 SV=1
224	B0JHS8 B0JHS8_MICAN	41.29	9	2	2	387.429.375	385	Iron transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_56680

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
								PE=4 SV=1
72	B0JHB7 B0JHB7_MICAN	70.16	9	2	2	308.525.977	490	Phycobilisome rod linker polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpC2 PE=4 SV=1
639	B0JSW0 B0JSW0_MICAN	24.38	9	1	1	178.111.582	834	Cytochrome c-550 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psbV PE=3 SV=1
638	A8YKM5 A8YKM5_MICAE	24.67	9	1	1	178.111.582	1707	50S ribosomal protein L27 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rpMA PE=3 SV=1
621	B0JHN7 B0JHN7_MICAN	29.16	9	1	1	190.474.355	1857	Plastocyanin OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=petE PE=3 SV=1
220	A8YIX6 A8YIX6_MICAE	68.76	9	5	1	964.299.453	2180	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glgP PE=3 SV=1
287	B0JLU7 B0JLU7_MICAN	72.58	9	3	2	558.979.180	2765	Photosystem II core light harvesting protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psbB PE=4 SV=1
1411	A8YFZ7 A8YFZ7_MICAE	54.21	9	1	1	178.271.426	3615	50S ribosomal protein L2 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rplB PE=3 SV=1
2300	Q8KPY5 Q8KPY5_MICAE	38.57	9	1	1	312.732.207	7806	Phycocyanin beta subunit (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa GN=pcB PE=3 SV=1
293	A8YNW0 A8YNW0_MICAE	28.65	8	5	4	823.622.109	349	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psaB PE=3 SV=1
294	B0JUY1 B0JUY1_MICAN	28.65	8	5	4	823.321.875	349	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psaB PE=3 SV=1
289	A8YM76 A8YM76_MICAE	34.03	8	3	1	685.417.500	514	Similar to A0YNC4_9CYAN Hypothetical protein OS=Microcystis

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
								aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1054 PE=4 SV=1
218	A8YNV9 A8YNV9_MICAE	82.02	8	2	3	826.002.891	766	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psaA PE=3 SV=1
536	A8YHJ3 A8YHJ3_MICAE	120.85	8	2	2	350.672.148	932	Apocytochrome f OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=petA PE=3 SV=1
550	A8YJ16 A8YJ16_MICAE	44.06	8	1	1	389.521.875	1298	FbaA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=fbaA PE=4 SV=1
596	B0JVM2 B0JVM2_MICAN	23.95	8	1	1	121.179.170	1771	Carbon dioxide concentrating mechanism protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ccmK1 PE=4 SV=1
605	A8YFK3 A8YFK3_MICAE	31.58	8	2	1	477.318.945	3257	NrtA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=nrtA PE=4 SV=1
219	B0JUY0 B0JUY0_MICAN	90.17	7	3	1	826.002.891	2595	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psaA PE=3 SV=1
1416	A8YP28 A8YP28_MICAE	32.58	7	1	1	259.497.402	3756	Carbonic anhydrase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1547 PE=3 SV=1
288	A8YJK3 A8YJK3_MICAE	35.43	6	1	1	250.565.918	46	Cytochrome b6 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=petB PE=3 SV=1
607	A8YG00 A8YG00_MICAE	38.14	6	1	1	226.413.105	595	50S ribosomal protein L3 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rplC PE=3 SV=1
213	A8YNI2 A8YNI2_MICAE	61.38	6	2	2	722.631.250	1427	Similar to tr Q8YRU9 Q8YRU9 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1614 PE=3 SV=1
604	A8YF89 A8YF89_MICAE	41.20	6	3	1	706.475.234	1594	CcmM protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ccmM PE=4

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
								SV=1
984	B0JR69 B0JR69_MICAN	40.15	6	1	1	391.941.914	3759	Photosystem II D2 protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psbD1 PE=3 SV=1
1408	A8YH66 A8YH66_MICAE	38.40	6	1	1	523.426.875	3829	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=gnd PE=3 SV=1
930	B0JXB5 B0JXB5_MICAN	25.68	6	1	1	391.941.914	7884	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_19200 PE=4 SV=1
3449	A8YIH8 A8YIH8_MICAE	21.04	6	1	1	186.321.914	8148	ApcF protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcF PE=3 SV=1
2947	A8YI64 A8YI64_MICAE	23.30	6	1	1	391.941.914	8211	Genome sequencing data, contig C316 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4490 PE=4 SV=1
19	B0JH9 B0JH9_MICAN	88.54	6	3	1	602.742.266	8261	Porin type major outer membrane protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_27990 PE=4 SV=1
3441	A8YDP1 A8YDP1_MICAE	39.66	6	1	1	186.872.109	8490	PsaD protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psaD PE=4 SV=1
76	B0JMZ9 B0JMZ9_MICAN	67.19	5	2	2	585.005.078	353	60 kDa chaperonin 1 OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=groEL2 PE=3 SV=1
616	B0JI06 B0JI06_MICAN	33.76	5	1	1	742.737.500	917	Nitrogen regulatory protein P-II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glnB PE=3 SV=1
599	A8YCU3 A8YCU3_MICAE	49.28	5	1	1	350.677.500	1584	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rpoA PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
629	B0JMY8 B0JMY8_MICAN	25.82	5	1	1	317.871.367	1605	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_03300 PE=4 SV=1
626	B0JM67 B0JM67_MICAN	27.85	5	1	1	317.871.367	1679	Phosphoenolpyruvate synthase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_02620 PE=4 SV=1
8	B0JHH3 B0JHH3_MICAN	90.60	5	1	1	364.355.625	1844	NAD(P)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_25030 PE=3 SV=1
635	A8Y9R6 A8Y9R6_MICAE	21.87	5	1	1	445.226.055	2005	Ferredoxin--NADP reductase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5476 PE=3 SV=1
647	A8YM08 A8YM08_MICAE	22.03	5	1	1	138.819.795	2176	Asparagine--tRNA ligase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=asnS PE=3 SV=1
648	A8YLB7 A8YLB7_MICAE	22.36	5	1	1	138.029.111	2199	Similar to tr P74135 P74135 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3308 PE=4 SV=1
149	A8YGH0 A8YGH0_MICAE	65.56	5	2	2	779.469.453	3765	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ppn PE=3 SV=1
291	A8YFD1 A8YFD1_MICAE	33.52	4	1	1	378.581.016	101	Genome sequencing data, contig C304 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_875 PE=4 SV=1
321	B0JHL1 B0JHL1_MICAN	21.72	4	1	1	746.156.797	120	Elongation factor EF-G OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fus PE=4 SV=1
656	B0JVN6 B0JVN6_MICAN	21.11	4	1	1	486.937.930	690	Two-component sensor histidine kinase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_48070 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
606	B0JUB4 B0JUB4_MICAN	35.48	4	1	1	477.637.930	1680	Nitrate transport protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_14800 PE=4 SV=1
633	A8YJG9 A8YJG9_MICAE	25.14	4	1	1	722.320.547	1930	Chaperone protein DnaJ OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=dnaJ PE=3 SV=1
660	A8YMR6 A8YMR6_MICAE	20.18	4	1	1	486.937.930	2204	Genome sequencing data, contig C328 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2181 PE=4 SV=1
1413	A8YI71 A8YI71_MICAE	39.38	4	1	1	675.916.719	2468	Cytochrome c-550 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=psbV PE=3 SV=1
661	B0JXJ4 B0JXJ4_MICAN	39.41	4	1	1	677.465.078	2673	Bicarbonate transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_19990 PE=4 SV=1
1414	A8YJ23 A8YJ23_MICAE	37.41	4	1	1	675.676.484	3321	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH 5 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ftsH3 PE=3 SV=1
1418	A8YFL0 A8YFL0_MICAE	23.60	4	1	1	675.421.016	3813	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH 2 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ftsH2 PE=3 SV=1
634	B0JUD1 B0JUD1_MICAN	31.95	4	1	1	722.320.547	7560	Transketolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_14970 PE=3 SV=1
296	A8YF71 A8YF71_MICAE	27.34	3	1	1	476.822.031	80	Similar to P74390_SYNY3 Negative aliphatic amidase regulator OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5362 PE=4 SV=1
297	B0JPD3 B0JPD3_MICAN	27.34	3	1	1	476.652.148	80	ABC-type urea transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_06220 PE=4 SV=1
146	A8YC96 A8YC96_MICAE	56.75	3	2	2	1.010.631.094	280	ApcE protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcE PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
602	A8YNL5 A8YNL5_MICAE	46.00	3	1	1	590.925.977	1193	Similar to tr Q7NE97 Q7NE97 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1650 PE=3 SV=1
624	A8YB14 A8YB14_MICAE	28.09	3	1	1	899.898.906	1386	Similar to tr Q3VKM6 Q3VKM6_9CHLB Peptidase C1A OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4732 PE=4 SV=1
623	A8YCU2 A8YCU2_MICAE	28.03	3	1	1	333.808.867	1516	30S ribosomal protein S11 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rpsK PE=3 SV=1
625	A8YM69 A8YM69_MICAE	27.85	3	1	1	900.098.828	1679	PpsA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ppsA PE=4 SV=1
873	A8YE57 A8YE57_MICAE	31.87	3	1	1	531.952.539	2781	Similar to tr Q4C1F5 Q4C1F5_CROWT Peptidase U62 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4016 PE=4 SV=1
1424	B0JMT7 B0JMT7_MICAN	21.54	3	1	1	439.941.523	3579	Thioredoxin OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=trxA PE=3 SV=1
297	B0JPD3 B0JPD3_MICAN	44.80	3	1	1	476.652.148	8052	ABC-type urea transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_06220 PE=4 SV=1
3450	B0JFY1 B0JFY1_MICAN	21.04	3	1	1	838.517.500	8148	Phycobilisome core component OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcF PE=3 SV=1
297	B0JPD3 B0JPD3_MICAN	44.57	3	1	1	255.962.070	8674	ABC-type urea transport system substrate-binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_06220 PE=4 SV=1
309	B0JJB5 B0JJB5_MICAN	22.28	2	1	1	426.188.242	94	Transposase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_27350 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
319	B0JQH8 B0JQH8_MICAN	22.72	2	1	1	746.156.797	343	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_08150 PE=4 SV=1
643	A8YKJ3 A8YKJ3_MICAE	24.58	2	1	1	437.136.836	852	Alanine racemase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=alr PE=3 SV=1
631	B0JSZ7 B0JSZ7_MICAN	25.46	2	1	1	406.249.609	922	Magnesium protoporphyrin IX chelatase subunit H OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=chlH PE=4 SV=1
617	A8YFK5 A8YFK5_MICAE	32.20	2	1	1	742.737.500	1157	NrtC protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=nrtC PE=3 SV=1
618	B0JUB2 B0JUB2_MICAN	32.20	2	1	1	743.097.344	1157	Nitrate/nitrite transport system ATP- binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ntcC PE=3 SV=1
619	A8YMR8 A8YMR8_MICAE	32.20	2	1	1	749.945.078	1157	NrtC protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=nrtC PE=3 SV=1
620	B0JXJ6 B0JXJ6_MICAN	32.20	2	1	1	749.663.906	1157	Bicarbonate transport system ATP- binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20010 PE=3 SV=1
610	B0JSE1 B0JSE1_MICAN	37.48	2	1	1	747.855.547	1603	Elongation factor G OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fus PE=3 SV=1
608	A8YK80 A8YK80_MICAE	37.85	2	1	1	914.948.516	1655	ClpC protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=clpC PE=3 SV=1
609	B0JJ69 B0JJ69_MICAN	37.85	2	1	1	747.855.547	1655	ATP-dependent Clp protease ATPase subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_59550 PE=3 SV=1
632	D3G6Z0 D3G6Z0_MICAE	25.14	2	1	1	405.688.906	1930	Chaperone protein DnaJ OS=Microcystis aeruginosa NIES-298 GN=dnaJ PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
321	B0JHL1 B0JHL1_MICAN	50.07	2	1	1	746.156.797	2032	Elongation factor EF-G OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fus PE=4 SV=1
594	A8YC59 A8YC59_MICAE	50.07	2	1	1	746.897.500	2032	Genome sequencing data, contig C281 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_718 PE=4 SV=1
1425	B0JTX5 B0JTX5_MICAN	21.13	2	1	1	668.189.062	2306	Probable peptidase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_13410 PE=4 SV=1
2308	B0JP33 B0JP33_MICAN	21.17	2	1	1	489.713.125	7206	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_05220 PE=4 SV=1
2448	B0JT18 B0JT18_MICAN	22.56	2	1	1	1.347.875.625	7705	Putative peptidase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_12400 PE=3 SV=1
2853	A8YNN5 A8YNN5_MICAE	25.47	2	1	1	1.346.754.688	7706	Chromosome partition protein Smc OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=smc PE=3 SV=1
603	B0JY16 B0JY16_MICAN	23.59	2	1	3	706.475.234	7761	Phosphoglucosyltransferase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_52320 PE=3 SV=1
630	A8YK98 A8YK98_MICAE	25.46	1	1	1	1.482.856.719	922	Genome sequencing data, contig C323 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_3758 PE=4 SV=1
649	B0JV56 B0JV56_MICAN	22.36	1	1	1	850.771.094	2199	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_15680 PE=4 SV=1
451	B0JN72 B0JN72_MICAN	22.87	1	1	1	1.503.441.562	2309	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_04140 PE=4 SV=1
1421	A8YA03 A8YA03_MICAE	22.87	1	1	1	1.508.974.531	2309	Similar to tr P73260 P73260 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5337 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
874	B0JMA8 B0JMA8_MICAN	31.87	1	1	1	1.280.621.250	2781	Putative modulator of DNA gyrase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_33710 PE=4 SV=1
1420	B0JUX7 B0JUX7_MICAN	28.21	1	1	1	963.774.922	3398	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_47530 PE=4 SV=1
1427	B0JK65 B0JK65_MICAN	20.42	1	1	1	1.634.068.906	3596	Na ⁺ /H ⁺ antiporter OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60970 PE=4 SV=1
629	B0JMY8 B0JMY8_MICAN	40.35	1	1	1	1.481.193.438	3789	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_03300 PE=4 SV=1
1096	A8YAM3 A8YAM3_MICAE	24.26	1	1	1	1.301.699.141	7060	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4303 PE=3 SV=1
2318	A8YLR4 A8YLR4_MICAE	26.35	1	1	1	707.993.047	7407	Genome sequencing data, contig C326 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_904 PE=4 SV=1
2323	B0JW12 B0JW12_MICAN	26.35	1	1	1	616.039.922	7407	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_49330 PE=4 SV=1
531	A8YA28 A8YA28_MICAE	21.50	1	1	6	1.503.441.562	7420	Similarity OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5316 PE=4 SV=1
2338	A8YIX0 A8YIX0_MICAE	27.24	1	1	1	615.277.656	7423	MetG protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=metG PE=3 SV=1
2339	B0JSE9 B0JSE9_MICAN	27.24	1	1	1	2.567.092.344	7423	Methionyl-tRNA synthetase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=metS PE=3 SV=1
1509	A8YNL1 A8YNL1_MICAE	29.36	1	1	1	1.634.068.906	7442	Similar to tr Q926M9 Q926M9 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1646 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
2857	B0JJG1 B0JJG1_MICAN	22.02	1	1	1	708.513.750	7892	Short-chain dehydrogenase/reductase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_27810 PE=4 SV=1
3451	B0JQE4 B0JQE4_MICAN	20.26	1	1		1.060.060.547	8356	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_07810 PE=4 SV=1
2878	B0JH00 B0JH00_MICAN	39.66	1	1	1	1.573.444.062	8490	Photosystem I subunit II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psaD PE=4 SV=1
2854	B0JSN6 B0JSN6_MICAN	25.47	0	1	1	1.789.243.594	7706	Chromosome partition protein Smc OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=smc PE=3 SV=1

TOTAL - 162

Lista de proteínas de MILJ48 identificadas a partir de solubilização em tampão iTRAQ e fracionadas por troca catiônica

LAVAGEM COM FORMIATO DE AMONIO FRACAO S0

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
1	A8YFC3 A8YFC3_MICAE	31.35	22	1	1	7806.224	2298	Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcC PE=3 SV=1
2	B0JUM2 B0JUM2_MICAN	40.39	4	1	1	35391.0234	2376	NAD-dependent epimerase/dehydratase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_46480 PE=4 SV=1
3	A8YJZ4 A8YJZ4_MICAE	36.28	3	1	1	37230.7188	2328	GlpX protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glpX PE=3 SV=1

TOTAL - 3 IDENTIFICAÇÕES

FRACAO S1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
194	B0JR27 B0JR27_MICAN	21.16	3	1	1	27915.63	3	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_40740 PE=4 SV=1
41	A8YFF3 A8YFF3_MICAE	44.65	8	1	1	28694.51	97	CpcG protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcG PE=4 SV=1
46	A8YF87 A8YF87_MICAE	31.66	15	1	1	12087.89	137	CcmK protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ccmK PE=4 SV=1
155	A8YF86 A8YF86_MICAE	31.66	8	1	1	11083.69	137	Similar to tr Q4C8Y8 Q4C8Y8_CROWT Microcompartments protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5495 PE=4 SV=1
165	B0JNP3 B0JNP3_MICAN	28.7	5	1	1	23549.51	243	Peroxiredoxin OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_36510 PE=4 SV=1
135	A8YP28 A8YP28_MICAE	41.36	5	1	1	25949.74	308	Carbonic anhydrase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1547 PE=3 SV=1
180	A8YNH0 A8YNH0_MICAE	22.43	5	1	1	28372.5	407	Genome sequencing data, contig C328 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_670 PE=4 SV=1
176	A8YN93 A8YN93_MICAE	24.65	4	1	1	44976.68	456	LL-diaminopimelate aminotransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=dapL PE=3 SV=1
142	A8YAD8 A8YAD8_MICAE	36.32	13	1	1	14187	467	AbrB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=AbrB PE=4 SV=1
130	B0JI06 B0JI06_MICAN	51.87	10	1	1	12563.69	468	Nitrogen regulatory protein P-II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glnB PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
107	B1Q3B9 B1Q3B9_MICAE	67.9	3	1	1	49318.45	473	DNA-directed RNA polymerase (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa LMM9508-2 GN=rpoC1 PE=3 SV=1
28	A8YGH0 A8YGH0_MICAE	48.45	5	1	1	77946.95	562	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pnp PE=3 SV=1
133	A8YF89 A8YF89_MICAE	50.19	2	1	1	70647.52	566	CcmM protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ccmM PE=4 SV=1
12	B0JV10 B0JV10_MICAN	70.61	9	3	3	52342.69	643	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_15220 PE=3 SV=1
190	B0JIP5 B0JIP5_MICAN	21.71	4	1	1	20042.42	855	Transposase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_27210 PE=4 SV=1
123	B0JR71 B0JR71_MICAN	61.7	8	1	1	17483.63	886	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_41180 PE=4 SV=1
124	A8Y9T9 A8Y9T9_MICAE	60.05	7	1	1	21677.6	914	Q70JU0_MICAE Gas vesicle structural protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5952 PE=4 SV=1
150	A8YF91 A8YF91_MICAE	35.92	6	3	3	52543.96	942	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcl PE=3 SV=1
131	B4XVM0 B4XVM0_MICAE	51.46	4	1	1	30347.54	991	Elongation factor Tu (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tufA PE=4 SV=1
19	B0JSE1 B0JSE1_MICAN	53.14	6	1	1	74785.55	1006	Elongation factor G OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fus PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
157	A8YJ62 A8YJ62_MICAE	31.25	11	1	1	16383.78	1033	Nucleoside diphosphate kinase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ndk PE=3 SV=1
145	A8YBD1 A8YBD1_MICAE	35.29	8	1	1	22828.23	1072	Similar to tr A0YTQ2 A0YTQ2_9CYAN Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_6461 PE=4 SV=1
137	A8YM76 A8YM76_MICAE	40.15	2	1	1	68541.75	1102	Similar to A0YNC4_9CYAN Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1054 PE=4 SV=1
29	A8YJM9 A8YJM9_MICAE	60.03	15	2	2	32213.24	1131	CpcI protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcI PE=4 SV=1
122	A8YFQ7 A8YFQ7_MICAE	63.8	11	1	1	18633.75	1132	IsiB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=isiB PE=4 SV=1
146	A8YA93 A8YA93_MICAE	35.28	4	1	1	43274.43	1158	Genome sequencing data, contig C248 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_395 PE=4 SV=1
158	A8YCB2 A8YCB2_MICAE	31.21	4	1	1	38462.45	1199	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=argC PE=3 SV=1
106	B0JRV9 B0JRV9_MICAN	71.21	10	1	1	16113.81	1201	Cyanate lyase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cynS PE=3 SV=1
139	A8YMQ2 A8YMQ2_MICAE	39.51	2	1	1	60715.42	1219	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=guaA PE=3 SV=1
160	B0JU03 B0JU03_MICAN	23.12	34	1	1	14298.2	1433	Transcriptional regulator OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_13690 PE=4 SV=1
172	A8YL31 A8YL31_MICAN	25.66	2	1	1	78543.23	1549	Similar to tr Q55517 Q55517 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_280 PE=4

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
	E							SV=1
186	B0JW83 B0JW83_MICAN	22.49	2	1	1	41963.82	1724	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_17410 PE=3 SV=1
203	A8YJP0 A8YJP0_MICAE	20.31	7	1	1	13887.04	1736	Similarity OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4236 PE=4 SV=1
22	B0JUD1 B0JUD1_MICAN	50.89	9	5	5	72232.05	1855	Transketolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_14970 PE=3 SV=1
154	B0JGG6 B0JGG6_MICAN	32.86	4	1	1	33506.43	1863	Ornithine carbamoyltransferase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=argF PE=3 SV=1
152	A8YFC4 A8YFC4_MICAE	34	11	1	1	17201.59	1940	ApcB1 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcB1 PE=3 SV=1
134	A8YMD4 A8YMD4_MICAE	50.1	5	1	1	31633.65	2020	DapA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=dapA PE=3 SV=1
33	A8YC96 A8YC96_MICAE	20.05	6	1	1	101063.1	2022	ApcE protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcE PE=4 SV=1
197	B0JL51 B0JL51_MICAN	21.04	3	1	1	28631.36	2131	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_62280 PE=4 SV=1
128	B0JQE9 B0JQE9_MICAN	59.44	4	1	1	48833.55	2162	Malic enzyme OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_07860 PE=3 SV=1
141	A8YKX3 A8YKX3_MICAE	39.46	4	1	1	44540.45	2236	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ispG PE=3 SV=1

TOTAL – 44 IDENTIFICAÇÕES

FRAÇÃO S2

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
14	B0JLP5 B0JLP5_MICAN	73.2	8	3	3	38952.19	176	Fructose-bisphosphate aldolase class II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fbaA PE=4 SV=1
6	A8YD92 A8YD92_MICAE	87.53	21	3	3	37775.29	246	PrK protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=prK PE=4 SV=1
5	A8YF14 A8YF14_MICAE	145.99	15	5	5	42552.9	259	Phosphoglycerate kinase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pgk PE=3 SV=1
16	A8YG81 A8YG81_MICAE	110.46	24	2	2	35523.82	276	Similar to tr A0YZF1 A0YZF1_9CYAN Hypothetical protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5686 PE=4 SV=1
2	B0JXL3 B0JXL3_MICAN	144.41	13	7	7	96401.89	329	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20180 PE=3 SV=1
7	A8YJZ4 A8YJZ4_MICAE	108.35	17	5	5	37230.72	344	GlpX protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glpX PE=3 SV=1
45	A8YKU3 A8YKU3_MICAE	88.86	7	1	1	48454.59	396	Glucose-1-phosphate adenyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glgC PE=3 SV=1
18	A8YLU5 A8YLU5_MICAE	88.35	27	2	2	21888.78	430	Genome sequencing data, contig C327 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1847 PE=4 SV=1
17	A8YEH9 A8YEH9_MICAE	99.53	4	2	2	118738.8	502	Carbamoyl-phosphate synthase large chain OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=carB PE=3 SV=1
15	A8YE80 A8YE80_MICAE	83.31	15	2	2	43006.8	569	Transaldolase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tal PE=3 SV=1
31	A8YCI8 A8YCI8_MICAE	95.9	16	2	2	21816.51	583	Superoxide dismutase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4715 PE=3 SV=1
3	A8YLT2 A8YLT2_MICAE	181.12	29	6	6	36437.54	645	Similar to tr Q4BX75 Q4BX75_CROWT Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4508

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
								PE=3 SV=1
36	A8YJM8 A8YJM8_MICAE	72.27	18	1	1	17515.72	1031	CpcA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcA PE=3 SV=1
9	A8YFC5 A8YFC5_MICAE	95.45	17	3	3	17362.7	1654	ApcA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcA PE=3 SV=1
25	A8YD60 A8YD60_MICAE	101.17	9	2	2	53978.73	1820	AtpA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=atpA PE=3 SV=1
39	A8YM48 A8YM48_MICAE	72.72	8	1	1	53039.97	2163	Glutamine synthetase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glnA PE=3 SV=1
48	A8YF93 A8YF93_MICAE	94.5	15	1	1	13153.14	2175	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcS PE=4 SV=1

FRACAO S3

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
194	B0JR27 B0JR27_MICAN	21.16	3	1	1	27915.63	3	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_40740 PE=4 SV=1
41	A8YFF3 A8YFF3_MICAE	44.65	8	1	1	28694.51	97	CpcG protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=cpcG PE=4 SV=1
46	A8YF87 A8YF87_MICAE	31.66	15	1	1	12087.89	137	CcmK protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ccmK PE=4 SV=1
164	A8YD49 A8YD49_MICAE	28.7	5	1	1	23491.48	243	Similar to tr Q4C4F7 Q4C4F7_CROWT Peroxidase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5966 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
135	A8YP28 A8YP28_MICAE	41.36	5	1	1	25949.74	308	Carbonic anhydrase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_1547 PE=3 SV=1
180	A8YNH0 A8YNH0_MICAE	22.43	5	1	1	28372.5	407	Genome sequencing data, contig C328 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_670 PE=4 SV=1
176	A8YN93 A8YN93_MICAE	24.65	4	1	1	44976.68	456	LL-diaminopimelate aminotransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=dapL PE=3 SV=1
142	A8YAD8 A8YAD8_MICAE	36.32	13	1	1	14187	467	AbrB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=AbrB PE=4 SV=1
130	B0JI06 B0JI06_MICAN	51.87	10	1	1	12563.69	468	Nitrogen regulatory protein P-II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glnB PE=3 SV=1
107	B1Q3B9 B1Q3B9_MICAE	67.9	3	1	1	49318.45	473	DNA-directed RNA polymerase (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa LMM9508-2 GN=rpoC1 PE=3 SV=1
28	A8YGH0 A8YGH0_MICAE	48.45	5	1	1	77946.95	562	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pnp PE=3 SV=1
133	A8YF89 A8YF89_MICAE	50.19	2	1	1	70647.52	566	CcmM protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ccmM PE=4 SV=1
11	A8YH66 A8YH66_MICAE	70.61	9	3	3	52419.75	643	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=gnd PE=3 SV=1
190	B0JIP5 B0JIP5_MICAN	21.71	4	1	1	20042.42	855	Transposase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_27210 PE=4 SV=1
123	B0JR71 B0JR71_MICAN	61.7	8	1	1	17483.63	886	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_41180 PE=4 SV=1
124	A8Y9T9 A8Y9T9_MICAE	60.05	7	1	1	21677.6	914	Q70JU0_MICAE Gas vesicle structural protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5952 PE=4 SV=1
150	A8YF91 A8YF91_MICAE	35.92	6	3	3	52543.96	942	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=rbcl PE=3 SV=1
131	B4XVM0 B4XVM0_MICAE	51.46	4	1	1	30347.54	991	Elongation factor Tu (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tufA PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
19	B0JSE1 B0JSE1_MICAN	53.14	6	1	1	74785.55	1006	Elongation factor G OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fus PE=3 SV=1
157	A8YJ62 A8YJ62_MICAE	31.25	11	1	1	16383.78	1033	Nucleoside diphosphate kinase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ndk PE=3 SV=1
143	B0JJ31 B0JJ31_MICAN	35.29	9	1	1	21996.14	1072	CP12 polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_59170 PE=4 SV=1
138	B0JKF0 B0JKF0_MICAN	40.15	2	1	1	68537.85	1102	Transketolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_61820 PE=4 SV=1
30	B0JHB8 B0JHB8_MICAN	60.03	15	2	2	32088.02	1131	Phycobilisome rod linker polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcC1 PE=4 SV=1
122	A8YFQ7 A8YFQ7_MICAE	63.8	11	1	1	18633.75	1132	IsiB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=isiB PE=4 SV=1
146	A8YA93 A8YA93_MICAE	35.28	4	1	1	43274.43	1158	Genome sequencing data, contig C248 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_395 PE=4 SV=1
158	A8YCB2 A8YCB2_MICAE	31.21	4	1	1	38462.45	1199	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=argC PE=3 SV=1
106	B0JRV9 B0JRV9_MICAN	71.21	10	1	1	16113.81	1201	Cyanate lyase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cynS PE=3 SV=1
140	B0JW58 B0JW58_MICAN	39.51	2	1	1	60816.52	1219	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=guaA PE=3 SV=1
159	A8YG08 A8YG08_MICAE	23.12	34	1	1	14284.11	1433	Similar to tr P74426 P74426_SYNY3 Sll0359 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_5963 PE=4 SV=1
172	A8YL31 A8YL31_MICAE	25.66	2	1	1	78543.23	1549	Similar to tr Q55517 Q55517 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_280 PE=4 SV=1
186	B0JW83 B0JW83_MICAN	22.49	2	1	1	41963.82	1724	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_17410 PE=3 SV=1
203	A8YJP0 A8YJP0_MICAE	20.31	7	1	1	13887.04	1736	Similarity OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_4236 PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
22	B0JUD1 B0JUD1_MICAN	50.89	9	5	5	72232.05	1855	Transketolase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_14970 PE=3 SV=1
154	B0JGG6 B0JGG6_MICAN	32.86	4	1	1	33506.43	1863	Ornithine carbamoyltransferase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=argF PE=3 SV=1
152	A8YFC4 A8YFC4_MICAE	34	11	1	1	17201.59	1940	ApcB1 protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcB1 PE=3 SV=1
134	A8YMD4 A8YMD4_MICAE	50.1	5	1	1	31633.65	2020	DapA protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=dapA PE=3 SV=1
33	A8YC96 A8YC96_MICAE	20.05	6	1	1	101063.1	2022	ApcE protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=apcE PE=4 SV=1
197	B0JL51 B0JL51_MICAN	21.04	3	1	1	28631.36	2131	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_62280 PE=4 SV=1
128	B0JQE9 B0JQE9_MICAN	59.44	4	1	1	48833.55	2162	Malic enzyme OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_07860 PE=3 SV=1
141	A8YKX3 A8YKX3_MICAE	39.46	4	1	1	44540.45	2236	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=ispG PE=3 SV=1

FRACAO S4

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
2269	B0JGZ9 B0JGZ9_MICAN	60.75	2	1	1	56730.0000	2401	Anthranilate synthetase alpha-subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=trpE PE=4 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
2267	B0JJC6 B0JJC6_MICAN	78.14	1	1	1	94963.3750	2428	Cyanophycin synthetase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cphA PE=4 SV=1
4	B0JHH3 B0JHH3_MICAN	98.94	5	2	2	36435.5625	2429	NAD(P)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_25030 PE=3 SV=1
2273	B0JSV7 B0JSV7_MICAN	29.14	2	1	1	55629.6328	2435	Putative oxidoreductase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_11790 PE=4 SV=1
6	A8YD92 A8YD92_MICAE	71.78	3	1	1	37775.2930	2444	PrK protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=prK PE=4 SV=1
2271	B0JPE1 B0JPE1_MICAN	29.96	3	1	1	38101.1406	2445	Carboxysome formation protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ccmA PE=4 SV=1
1279	A8YGS2 A8YGS2_MICAE	25.19	3	1	1	52496.0469	2461	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=icd PE=3 SV=1
122	A8YFQ7 A8YFQ7_MICAE	69.28	6	1	1	18633.7539	2466	IsiB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=isiB PE=4 SV=1
14	B0JLP5 B0JLP5_MICAN	53.95	3	1	1	38952.1875	2500	Fructose-bisphosphate aldolase class II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fbaA PE=4 SV=1

FRACAO S5

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
2428	B0JQK5 B0JQK5_MICAN	23.87	3	1	1	21169.3867	2749	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_08420 PE=4 SV=1
2429	B0JMP5 B0JMP5_MICAN	22.31	2	1	1	28004.5918	2754	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_35080 PE=4 SV=1
42	B0JVR3 B0JVR3_MICAN	37.09	6	2	2	28694.5117	2762	Phycobilisome rod-core linker polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcG PE=4 SV=1
153	B0JRU8 B0JRU8_MICAN	33.12	4	1	1	17201.5938	2826	Allophycocyanin beta subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcB PE=3 SV=1
2341	B0JLP7 B0JLP7_MICAN	22.15	1	1	1	45044.8359	2931	Periplasmic binding protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_32490 PE=4 SV=1
151	Q0P7L5 Q0P7L5_MICAE	50.26	3	2	2	52543.9609	3008	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa GN=rbcl1 PE=3 SV=1
2418	B0JJZ6 B0JJZ6_MICAN	62.46	3	1	1	41688.5234	3029	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60280 PE=4 SV=1
2424	B0JSC4 B0JSC4_MICAN	23.95	3	1	1	37946.6211	3035	Thiamine-phosphate pyrophosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=thiE PE=3 SV=1

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
2419	A8YL02 A8YL02_MICAE	51.28	7	1	1	25217.0859	3069	Nox protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=nox PE=4 SV=1
2275	B0JMM6 B0JMM6_MICAN	37.20	3	1	1	36848.0977	3070	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_34890 PE=3 SV=1
131	B4XVM0 B4XVM0_MICAE	40.12	8	2	2	30347.5410	3107	Elongation factor Tu (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tufA PE=4 SV=1
2	B0JXL3 B0JXL3_MICAN	74.77	4	2	2	96401.8906	3109	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20180 PE=3 SV=1
10	B0JRU9 B0JRU9_MICAN	102.65	14	1	1	17318.6484	3121	Allophycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcA PE=3 SV=1
2425	B0JS54 B0JS54_MICAN	23.52	2	1	1	32831.9727	3335	Glycosyl transferase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_41900 PE=4 SV=1
30	B0JHB8 B0JHB8_MICAN	62.85	3	1	1	32088.0176	3346	Phycobilisome rod linker polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcC1 PE=4 SV=1
122	A8YFQ7 A8YFQ7_MICAE	22.21	11	1	1	18633.7539	3516	IsiB protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=isiB PE=4 SV=1

FRACAO S6

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
2722	B0JHA1 B0JHA1_MICAN	88.49	6	1	1	37636.5938	3743	Tryptophanyl-tRNA synthetase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=trpS PE=3 SV=1
2724	B0JLE4 B0JLE4_MICAN	51.43	4	1	1	41512.6094	3818	Cobalamin synthesis protein cobW homolog OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_31460 PE=4 SV=1
2418	B0JJZ6 B0JJZ6_MICAN	50.74	4	1	1	41688.5234	3787	Putative uncharacterized protein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_60280 PE=4 SV=1
2725	A8YJ19 A8YJ19_MICAE	44.12	2	1	1	51321.8477	3676	Probable cytosol aminopeptidase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pepA PE=3 SV=1
2	B0JXL3 B0JXL3_MICAN	29.95	5	2	2	96401.8906	3791	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20180 PE=3 SV=1
153	B0JRU8 B0JRU8_MICAN	23.50	4	1	1	17201.5938	3556	Allophycocyanin beta subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=apcB PE=3 SV=1
132	A8YIW2 A8YIW2_MICAE	20.87	5	1	1	44804.1562	3834	Elongation factor Tu OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tuf PE=3 SV=1

FRACAO S7

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
7	A8YJZ4 A8YJZ4_MICAE	20.22	2	1	1	37230.7188	3905	GlpX protein OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=glpX PE=3 SV=1
14	B0JLP5 B0JLP5_MICAN	51.11	3	1	1	38952.1875	3920	Fructose-bisphosphate aldolase class II OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=fbaA PE=4 SV=1
2725	A8YJ19 A8YJ19_MICAE	49.64	2	1	1	51321.8477	3954	Probable cytosol aminopeptidase OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=pepA PE=3 SV=1
2331	B0JKC9 B0JKC9_MICAN	45.95	2	1	1	63509.9375	3996	Flavoprotein OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_61610 PE=4 SV=1
2450	B0JNQ8 B0JNQ8_MICAN	40.25	6	1	1	12259.9102	4025	Putative uncharacterized protein

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
								OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_36660 PE=4 SV=1
2756	B0JMX7 B0JMX7_MICAN	29.09	1	1	1	60317.2109	4043	Mechanosensitive ion channel OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_03190 PE=4 SV=1
2888	B0JTE4 B0JTE4_MICAN	47.52	3	1	1	29876.6406	4053	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=psbO PE=4 SV=1
2	B0JXL3 B0JXL3_MICAN	51.58	2	1	1	96401.8906	4110	Phosphorylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_20180 PE=3 SV=1
37	B0JHB6 B0JHB6_MICAN	49.08	9	1	1	17515.7246	4111	Phycocyanin alpha subunit OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=cpcA1 PE=3 SV=1
2889	A8YK18 A8YK18_MICAE	23.61	7	1	1	23029.3613	4147	Potassium-transporting ATPase C chain OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=kdpC1 PE=3 SV=1
151	Q0P7L5 Q0P7L5_MICAE	22.23	6	1	1	52543.9609	4149	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa GN=rbcL1 PE=3 SV=1

FRACAO S8

Protein ID	Accession	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Mass	Best Unique Peptide	Description
151	Q0P7L5 Q0P7L5_MICAE	74.75	4	2	2	52543.9609	4304	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit OS=Microcystis aeruginosa GN=rbcL1 PE=3 SV=1
3060	B0JMA8 B0JMA8_MICAN	68.01	5	1	1	53195.2539	4661	Putative modulator of DNA gyrase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=MAE_33710 PE=4 SV=1
191	A8YHQ4 A8YHQ4_MICAE	63.82	4	1	1	56842.1953	4994	Genome sequencing data, contig C314 OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=IPF_2871 PE=4 SV=1
131	B4XVM0 B4XVM0_MICAE	60.04	11	2	2	30347.5410	4268	Elongation factor Tu (Fragment) OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tufA PE=4 SV=1

132	A8YIW2 A8YIW2_MICAE	60.04	7	2	2	44804.1562	4268	Elongation factor Tu OS=Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN=tuf PE=3 SV=1
51	B0JJI5 B0JJI5_MICAN	40.66	4	1	1	48418.5117	4310	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=glgC PE=3 SV=1
3066	B0JPY0 B0JPY0_MICAN	31.71	1	1	1	117010.5312	4726	Phosphoenolpyruvate carboxylase OS=Microcystis aeruginosa (strain NIES-843) GN=ppc PE=3 SV=1

ANEXO 9 - PROTEÍNAS DE *M. AERUGINOSA* CCIBt3106 E CCIBt3194 IDENTIFICADAS COMO DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS A PARTIR DE PREPARAÇÕES SOLUBILIZADAS EM SOLUÇÃO DE iTRAQ, MARCADAS COM iTRAQ 115, 116, 117, 118 E FRACIONADAS EM TROCA CATIONICA, SEGUIDA DE ANÁLISE EM ESI-Q-TOF PREMIER

Tabela - 13 Lista de proteínas de *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt 3194 (tóxica), identificadas a partir de solubilização em tampão iTRAQ e fracionamento por troca catiônica (Fração 1), sendo os marcadores: (a) 117, linhagem CCIBt3106, fase exponencial e (b) 118, linhagem CCIBt3106, fase exponencial tardia; (c) 115, linhagem CCIBt3194, fase exponencial e (d) 116, linhagem CCIBt3194, fase exponencial tardia.

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
1.933	4.316	2.321	36.026	gi 159027940	ccmK [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
---	1252.661	1.029	---	gi 159028215	unnamed protein product [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]

Tabela - 14 Lista de proteínas de *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt 3194 (tóxica), identificadas a partir de solubilização em tampão iTRAQ e fracionamento por troca catiônica, (Fração 2), sendo os marcadores: (a) 117, linhagem CCIBt3106, fase exponencial e (b) 118, linhagem CCIBt3106, fase exponencial tardia; (c) 115, linhagem CCIBt3194, fase exponencial e (d) 116, linhagem CCIBt3194, fase exponencial tardia.

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
2.558	---	3.762	9.892	gi 159027940	ccmK [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
0.575	0.647	0.535	0.584	gi 159029495	cpcB [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
3.581	0.664	4.336	0.583	gi 159027205	atpA [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
0.141	---	1.538	---	gi 159028287	unnamed protein product [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]
1.66	1.263	3.199	2.742	gi 159030975	psaA [<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806]

Tabela - 15 Lista de proteínas de *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt 3194 (tóxica), identificadas a partir de solubilização em tampão iTRAQ e fracionamento por troca catiônica (Fração 3), sendo os marcadores: (a) 117, linhagem CCIBt3106, fase exponencial e (b) 118, linhagem CCIBt3106, fase exponencial tardia; (c) 115, linhagem CCIBt3194, fase exponencial e (d) 116, linhagem CCIBt3194, fase exponencial tardia.

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
0.738	---	3.584	---	Gi 389731744	Similar to tr P74534 P74534 [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.096	---	1.894	---	Gi 389732587	Predicted secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.726	0.179	1.821	0.253	Gi 389676370	C-phycocyanin alpha chain [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
0.302	0.137	2.931	0.696	Gi 389679319	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
0.324	0.219	2.886	0.631	Gi 166085723	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
0.128	0.225	1.803	0.374	Gi 389732586	conserved hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.113	0.225	2.112	0.374	Gi 389801182	conserved hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9807]
0.352	0.725	3.165	0.893	Gi 389678843	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
0.419	0.622	0.831	0.733	Gi 159029495	cpcB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.602	0.224	2.609	0.441	Gi 112821111	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.522	0.235	0.535	0.231	Gi 166086141	allophycocyanin alpha subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
0.408	1.602	3.158	0.636	Gi 389733164	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.534	0.235	0.515	0.231	Gi 159027979	apcA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
3.248	0.91	4.537	0.707	Gi 159027205	atpA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.52	0.123	2.079	0.586	Gi 166085736	ABC-type urea transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
0.931	0.178	1.655	0.317	Gi 159027724	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.262	---	7.837	---	Gi 389831550	Carbon dioxide-concentrating mechanism protein CcmK [Microcystis aeruginosa PCC 9809]
0.806	0.367	1.241	0.613	Gi 166088413	photosystem II core light harvesting protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
1.672	---	6.99	---	Gi 159027939	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.259	---	2.363	---	Gi 159028287	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
14.652	0.465	2.608	0.169	Gi 159029228	tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.45	0.443	1.682	0.322	Gi 159028802	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.362	0.168	1.396	0.747	Gi 513473813	Phage tail sheath protein [Microcystis aeruginosa SPC 777]
2.509	0.33	3.608	0.546	Gi 159026933	psbO [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.612	0.504	0.456	0.473	Gi 389679771	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
1.042	---	3.559	---	Gi 159030975	psaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
13.578	2.464	2.754	0.608	Gi 159030657	psaE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
1.449	---	2.304	---	Gi 159027523	psaF [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
3.991	0.595	5.047	1.08	Gi 159028215	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.965	---	2.889	---	Gi 159026552	psaC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.922	0.257	1.496	0.529	Gi 389716230	5'-nucleotidase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
0.444	---	1.591	---	Gi 159026736	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.231	0.872	1.355	0.53	Gi 166089481	phosphoglycerate kinase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
0.517	0.833	1.311	0.685	Gi 159030976	psaB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.598	---	1.669	---	Gi 159029605	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
8.136	0.891	5.086	0.557	Gi 389732000	Phage tail sheath protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.347	0.211	4.291	0.891	Gi 159028057	nrtA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.556	---	2.266	---	Gi 159029166	rpoC2 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.67	0.632	2.538	0.601	Gi 389732416	10kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein) [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
2.077	0.425	5.186	1.696	Gi 159029317	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.2	---	4.969	---	Gi 166091324	hypothetical protein MAE_62100 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
39.023	12.369	3.416	0.209	Gi 389679647	hypothetical protein MICCA_1660001 [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
2.165	1.032	1.88	0.573	Gi 159028193	rpsH [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.463	0.604	1.251	0.616	Gi 159029497	cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.504	---	2.086	---	Gi 159028007	cpcG [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.932	---	---	0.288	Gi 513475565	Choline-sulfatase [Microcystis aeruginosa SPC 777]
1.507	0.255	1.812	0.307	Gi 389765838	conserved hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 7941]
2.33	---	1.947	---	Gi 38348657	structural protein GvpAI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.897	0.05	11.059	0.617	Gi 389718729	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family (fragment) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
2.238	---	3.171	---	Gi 389731782	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.078	---	2.39	---	Gi 159027978	apcB1 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.172	---	2.261	---	Gi 159028194	rplE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.25	---	0.551	---	Gi 159030269	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
---	0.001	0.012	---	Gi 159028192	rplF [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
178.555	12.369	3.014	0.209	Gi 513474931	hypothetical protein MAESPC_01844 [Microcystis aeruginosa SPC 777]
0.177	---	2.465	---	Gi 166086476	heat shock protein 70 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
12.788	1.204	1.668	0.157	Gi 159026193	AbrB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.2	---	1.408	---	Gi 389765768	hypothetical protein MICAD_3240025 [Microcystis aeruginosa PCC 7941]
6.189	0.694	5.839	0.655	Gi 159028196	rplN [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
5.822	1.321	1.411	0.32	Gi 166090782	iron transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
1.442	---	0.912	---	Gi 389732378	putative RNA-binding protein rbpB [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
2.827	---	1.146	---	Gi 159026883	apcE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.643	---	1.586	---	Gi 443334722	GTP cyclohydrolase I [Microcystis aeruginosa DIANCHI905]
2.595	---	3.641	---	Gi 159028190	rpsE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
---	---	---	---	Gi 159028242	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.955	---	2.372	---	Gi 159027762	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

Tabela - 16 Lista de proteínas de *Microcystis aeruginosa* CCIBt3106 (não tóxica) e CCIBt 3194 (tóxica), identificadas a partir de solubilização em tampão iTRAQ e fracionamento por troca catiônica (Fração 4), sendo os marcadores: (a) 117, linhagem CCIBt3106, fase exponencial e (b) 118, linhagem CCIBt3106, fase exponencial tardia; (c) 115, linhagem CCIBt3194, fase exponencial e (d) 116, linhagem CCIBt3194, fase exponencial tardia.

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
0.832	0.136	4.625	0.751	gi 389801182	conserved hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9807]
1.008	0.131	5.187	0.713	gi 389732586	conserved hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.234	0.087	2.326	0.552	gi 389732587	Predicted secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
---	---	---	---	gi 159029495	cpcB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.383	0.156	1.043	0.492	gi 112821111	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.478	0.338	1.317	0.993	gi 389679319	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
0.26	0.117	1.561	0.698	gi 389678843	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
1.82	---	2.104	---	gi 159028203	rplB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.346	0.117	3.542	0.698	gi 166087913	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
5.91	0.651	3.3	0.268	gi 159028215	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

115/117	116/118	115/116	117/118	Acesso	Descrição
0.579	---	1.681	---	gi 389676370	C-phycoyanin alpha chain [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
1.713	0.363	1.756	0.263	gi 159027237	prK [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
18.372	2.642	4.566	0.657	gi 513474931	hypothetical protein MAESPC_01844 [Microcystis aeruginosa SPC 777]
1.033	0.318	1.22	0.375	gi 159028287	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.169	0.429	1.576	0.558	gi 389679771	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
2.678	0.595	2.768	0.475	gi 159026933	psbO [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.788	1.423	1.608	1.769	gi 159029228	tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.07	---	4.922	---	gi 159027939	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.106	1.355	2.612	0.989	gi 159030975	psaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.462	0.159	1.129	0.504	gi 159029605	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.533	0.8	1.784	0.764	gi 389732416	10kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein) [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
0.656	0.442	0.885	0.597	gi 159027724	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.197	---	0.58	---	gi 166089483	photosystem I subunit XI [Microcystis aeruginosa NIES-843]
1.416	0.22	3.831	0.596	gi 389822812	Similar to tr P72798 P72798 [Microcystis aeruginosa PCC 9808]
2.996	1.773	2.206	1.305	gi 159029497	cpcl [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.328	0.629	2.03	0.315	gi 159028983	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
2.07	---	4.922	---	gi 166089907	carbon dioxide concentrating mechanism protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
---	---	---	---	gi 159028802	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
---	---	---	---	gi 159026621	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
1.014	---	1.898	---	gi 159029283	fbaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
0.774	0.435	1.47	0.827	gi 159027205	atpA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

ANEXO 10. PROTEÍNAS DE *M. AERUGINOSA* CCIBT3106 E CCIBT3194 IDENTIFICADAS COMO DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS A PARTIR DE PREPARAÇÕES SOLUBILIZADAS EM SOLUÇÃO DE iTRAQ, MARCADAS COM iTRAQ 115, 116, 117, 118 E FRACIONADAS EM TROCA CATIONICA, SEGUIDA DE ANÁLISE EM SYNAPT G1 E MASCOT COM BUSCA EM BANCO DE DADOS GERAL NCBI

Tabela - 17 Proteínas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBT3194 (tóxica) e CCIBT3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ, analisadas por espectrometria de massas seguida de busca em banco geral de proteínas do NCBI com o programa Mascot. Nesta tabela são apresentadas apenas as proteínas que possuem processo biológico definido.

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
AAA22070	gi 142187	325	34,875	Heme, Iron, Metal-binding	oxidation-reduction, process, photosynthesis	integral component of thylakoid membrane	electron carrier activity, heme binding, iron ion binding	50	40184	1 (1)	1 (1)	apocytochrome f precursor [Synechococcus sp. PCC 7002]
AAA27284	gi 154465	552	57,774	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding, response to stress	cytoplasm	ATP binding	132	69651	3 (3)	1 (1)	chaperonin 60 [Synechocystis sp.]
AAA88634	gi 154573	733	81,637	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore, Iron, Iron-sulfur, Magnesium, Metal-binding	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity	87	89334	1 (1)	1 (1)	chlorophyll a/b apoprotein [Synechococcus sp.]
AAC14719	gi 3088588	161	17,286	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		77		1 (1)	1 (1)	allophycocyanin alpha subunit [Synechococcus sp. PCC 7002]
AAD09838	gi 1079703	356	39,367	Calcium, Iron, Manganese, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem II, response to herbicide	integral component of membrane, photosystem II, thylakoid membrane	electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis	61	40219	3 (1)	2 (1)	D1 [Cyanotheca sp. ATCC 51142]

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
							activity, iron ion binding, oxidoreductase activity					
AAO61061	gi 28932488	194	21,948		carbon fixation		magnesium ion binding, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	64	25160	1 (1)	1 (1)	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [uncultured cyanobacterium]
AAV34443	gi 63148628	179	21,184		gas vesicle organization	gas vesicle		49	26647	1 (1)	1 (1)	gas vesicle structural protein [Microcystis sp. BC 8401]
ABK34499	gi 117394905	212	25,106		gas vesicle organization	gas vesicle		49	31480	1 (1)	1 (1)	gas vesicle protein C [uncultured Microcystis sp.]
BAB86974	gi 19909557	545	60,788	ATP-binding, Nucleotide-binding	DNA topological change	chromosome	ATP binding, DNA binding, DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity	37	70152	1 (1)	1 (1)	DNA gyrase subunit B [Synechococcus elongatus PCC 6301]
CAA05923	gi 2673678	93	9,637		photosynthesis	phycobilisome		73		2 (1)	2 (1)	phycocyanin beta subunit, partial [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAA05925	gi 2673681	93	9,651		photosynthesis	phycobilisome		202	10695	5 (3)	3 (2)	phycocyanin beta subunit [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAA28475	gi 11955	477	52,884	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle	Chloroplast, plastid	magnesium ion binding, monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	66	61220	2 (1)	1 (1)	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain
CAE11903	gi 38348662	136	14,776		gas vesicle	gas vesicle, vacuole, vesicle membrane	structural molecule activity	52	16592	1 (1)	1 (1)	gas vesicle protein GvpJ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86200	gi 159025877	176	18,954		nucleic acid binding, nucleotide binding		nucleic acid binding, nucleotide binding	37	25377	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86201	gi 159025878	236	24,827		pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch		ribose-5-phosphate isomerase activity	47	25377	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
CAO86244	gi 159025950	399	44,55	FAD, Flavoprotein, NADP	phycobilisome		ferredoxin-NADP+ reductase activity	46	52356	2 (1)	2 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86279	gi 159026025	351	38,051		aromatic amino acid family biosynthetic process		aldehyde-lyase activity, transferase activity	84	43078	2 (2)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86470	gi 159026538	265	30,057		translation	small ribosomal subunit	structural constituent of ribosome	60	34693	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86518	gi 159026585	243	26,847		cell redox homeostasis		electron carrier activity, protein disulfide oxidoreductase activity	57	31622	2 (1)	2 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86553	gi 159026621	172	18,159		protein folding		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	36	22148	2 (1)	2 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO86696	gi 159026977	199	21,817		metal ion binding, superoxide dismutase activity			62	25849	1(1)	1(1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87007	gi 159027635	118	12,867		cell redox homeostasis, glycerol ether metabolic process		protein disulfide oxidoreductase activity	53	16905	3 (1)	2 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87008	gi 159027636	401	43,66	ATP-	acetyl-CoA biosynthetic process	cytoplasm	ATP binding	53	16905	3 (1)	2 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87274	gi 159028376	717	77,947	Magnesium, Metal-binding, RNA-binding, Magnesium, Metalbinding, Nucleotide-binding	RNA processing, mRNA catabolic process, organic acid metabolic process	cytoplasm	3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity, acetate kinase activity, magnesium ion binding	50	90509	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87064	gi 159027851	136	15,344					147	18072	3 (3)	2 (2)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
												7806]
CAO87086	gi 159027924	437	47,682		amino acid transport	outer membrane-bounded periplasmic space		85	57921	2 (1)	2 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87103	gi 159027940	113	12,088		Carboxysome associated protein			74	13297	4 (2)	4 (2)	ccmK [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87105	gi 159027942	654	70,647		Carboxysome associated protein			177	80.661	2(2)	2(2)	ccmM [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87274	gi 159028376	717	77,947	Magnesium, Metal-binding, RNA-binding	RNA processing, mRNA catabolic process	cytoplasm	3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity	50	90509	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87341	gi 159028535	563	58,947	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	142		3(2)	2(2)	groL2 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87519	gi 159029159	253	26,755		histidine biosynthetic process	cytoplasm	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase activity	34	29568	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87588	gi 159029228	409	44,804	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity	166	52427	7 (4)	4 (1)	Elongation factor Tu (EF-Tu) /tuf [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87589	gi 159029229	691	75,744	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	100	89874	3 (2)	3 (2)	fusA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87645	gi 159029497	292	32,213		photosynthesis	phycobilisome		57	36194	2 (2)	2 (2)	cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]/ phycobilisome rod linker polypeptide

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
CAO87924	gi 159026415	330	36,349		hydrolase activity			62	41894	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO87939	gi 159027979	161	17,363	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		216	19527	3 (3)	2 (2)	apcA/allophycocyanin subunit alpha [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88147	gi 159028676	159	17,69		fatty acid biosynthetic process, lipid A biosynthetic process	cytoplasm	3-hydroxyoctanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase activity	54	21025	1 (1)	1 (1)	fabZ [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88327	gi 159030657	77	8,42		photosynthesis	photosystem I reaction center, thylakoid membrane		68	10848	1 (1)	1 (1)	psaE [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88453	gi 159030775	541	57,566	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein refolding	cytoplasm	ATP binding	70	71053	4 (4)	3 (3)	groL1 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88566	gi 159030885	544	59,093	Magnesium, Metal-binding	carbohydrate metabolic process		intramolecular transferase activity, phosphotransferases, magnesium ion binding	80	66799	2 (2)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88745	gi 159031042	241	25,95	Zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity, zinc ion binding	222	29618	3 (2)	3 (2)	Carbonic anhydrase [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CAO88754	gi 159025964	614	66,546	ATP, Nucleotide-binding	ATP binding, nucleoside-triphosphatase activity			96	76119	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88879	gi 159026302	466	51,008		photosynthetic electron transport in photosystem II	light-harvesting complex, photosystem II	chlorophyll binding, electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity	80	54413	2 (2)	1 (1)	psbC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
CAO88930	gi 159026401	247	27,516	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding, NAD, NADP, Plastoquinone	photosynthesis, light reaction, transport	thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity, iron ion binding, quinone binding	58	32245	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88947	gi 159026435	303	33,381		cysteine-type peptidase activity			56	38061	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89183	gi 159026933	277	29,946		photosynthesis photosystem II stabilization	cell outer membrane, extrinsic component of membrane, integral component of membrane, photosystem II oxygen evolving complex	calcium ion binding	79	34674	3 (1)	3 (1)	psbO [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89299	gi 159027205	502	53,979	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	222	62297	7 (6)	6 (5)	atpA/ATP synthase subunit alpha, membrane-bound, F1 sector [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89332	gi 159027237	333	37,775	ATP-binding, Nucleotide-binding	carbohydrate metabolic process		ATP binding, phosphoribulokinase activity	60	45586	1 (1)	1 (1)	prK [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89501	gi 159027537	1,524	167,276		glutamate biosynthetic process		glutamate synthase activity	49	19118	1 (1)	1 (1)	gltB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89544	gi 159027679	476	50,864	FAD, Flavoprotein, NAD	cell redox homeostasis		dihydrolipoyl dehydrogenase activity, flavin adenine dinucleotide binding	30	61192	1 (1)	1 (1)	lpdA/ Dihydrolipoyl dehydrogenase [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89619	gi 159027749	425	45,991	NAD	one-carbon metabolic process	cytoplasm	adenosylhomocysteine activity	58	53493	1 (1)	1 (1)	ahcY [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
CAO89669	gi 159027866	136	14,659		response to stress			54	16309	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89799	gi 159028192	186	19,872	RNA-binding, rRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome	50	25686	1 (1)	1 (1)	rpIF [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89807	gi 159028200	242	27,404	RNA-binding, rRNA-binding	translation	small ribosomal subunit	mRNA binding, rRNA binding, structural constituent of ribosome	78	31389	1 (1)	1 (1)	rpsC [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89810	gi 159028203	277	30,53	RNA-binding, rRNA-binding	translation	large ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome, transferase activity	54	36337	1 (1)	1 (1)	rpIB [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89837	gi 159028395	237	25,83	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	regulation of translation, translation	large ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding	60	31603	2 (1)	2 (1)	rpIA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89926	gi 159028755	328	35,067	Heme, Iron, Metal-binding	oxidation-reduction process, photosynthesis	integral component of thylakoid membrane	electron carrier activity, heme binding, iron ion binding	46	40659	2 (1)	2 (1)	petA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO89973	gi 159028802	482	51,613	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP hydrolysis coupled proton transport, plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport	proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1), thylakoid membrane	ATP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	171	58669	6 (4)	4 (3)	atpD [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90013	gi 159029027	390	42,663		catalytic activity			146	49605	3 (3)	2 (2)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90156	gi 159029290	625	67,592	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	88	79156	2 (2)	2 (2)	ftsH3 [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90183	gi 159029317	205	22,871		adenyl nucleotide binding			43	27650	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
CAO90265	gi 159029605	345	37,231	Manganese, Metal-binding	Gluconeogenesis, glycerol metabolic process, reductive pentose-phosphate cycle		fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase activity, metal ion binding, sedoheptulose-bisphosphatase activity	100	42442	4 (3)	2 (2)	glpX [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90383	gi 159030003	732	78,543		carbohydrate metabolic process		aldehyde-lyase activity	30	88458	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90410	gi 159030029	561	59,181	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	isoleucine biosynthetic process, valine biosynthetic process		4 iron, 4 sulfur cluster binding, dihydroxy-acid dehydratase activity, metal ion binding	62	66204	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO90756	gi 159029380	452	49,526	FAD, Flavoprotein, NADP	cell redox homeostasis, removal of superoxide radicals	cytoplasm	flavin adenine dinucleotide binding, thioredoxin-disulfide reductase activity	34	57680	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91151	gi 159030256	338	36,438		glucose metabolic process		NAD binding, NADP binding, oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	87	42987	2 (2)	2 (2)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91164	gi 159030269	199	21,889		antioxidant activity, peroxiredoxin activity			91	25359	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91224	gi 159030329	850	94,291	ATP-binding, DNA-binding, Nucleotide-binding	DNA topological change, DNA-dependent DNA replication	Chromosome, cytoplasm	ATP binding, DNA binding, DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity	28	105323	1 (1)	1 (1)	gyrA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91267	gi 159030372	473	53,04	ATP-binding, Nucleotide-	glutamine biosynthetic	cytoplasm	ATP binding, glutamate-	56	62104	1 (1)	1 (1)	glnA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
				binding	process, nitrogen fixation		ammonia ligase activity					
CAO91296	gi 159030400	633	68,542	Magnesium, Metal-binding, Thiamine pyrophosphate	metal ion binding, transferase activity			51	78693	2 (2)	2 (2)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91318	gi 159030417	328	36,163	Magnesium, Metal-binding, Zinc	porphyrin-containing compound biosynthetic process		metal ion binding, porphobilinogen synthase activity	49	41450	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO91361	gi 159030459	464	51,856		cell cycle, cell division, protein folding, protein transport	cytoplasm	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	29	62821	1 (1)	1 (1)	tig [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH91132	gi 389680157	191	21,195		response to stress			146		2(2)	2(2)	General stress protein 16U [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH91355	gi 389679901	241	25,845	Zinc	carbon utilization		carbonate dehydratase activity, zinc ion binding	111	29618	4 (4)	4 (4)	Carbonic anhydrase [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH91880	gi 389679319	619	65,904		integral component of membrane	transporter activity		136		3(1)	3(1)	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH92296	gi 389678843	563	60,526			integral component of membrane	transporter activity	64	64840	2 (1)	2 (1)	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH94795	gi 389676137	901	100,971		photosynthesis	phycobilisome		38	117169	1 (1)	1 (1)	Phycobilisome 100.5 kDa core-membrane linker polypeptide [Microcystis aeruginosa PCC 9432]
CCH95263	gi 389675643	277	29,823		Photosynthesis, photosystem II stabilization	cell outer membrane, extrinsic component of membrane, integral component of membrane, photosystem II oxygen evolving complex	calcium ion binding	102	34551	2 (2)	2 (2)	Photosystem II manganese-stabilizing polypeptide [Microcystis aeruginosa PCC 9432]/psbO [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CCH96503	gi 389719698	172	18,187		protein folding			46	22176	2 (1)	2 (1)	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CCH96866	gi 389719274	97	11,011		nucleic acid			84	13742	1 (1)	1 (1)	putative RNA-binding protein

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
					binding, nucleotide binding							rbpA [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CCH97357	gi 389718728	256	28,181		lysozyme activity			119	30643	1 (1)	1 (1)	Lysozyme g (modular protein) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CCH98487	gi 389717414	668	72,277	Calcium, Magnesium, Metal-binding, Thiamine pyrophosphate	metal ion binding, transketolase activity			75	83901	3 (3)	3 (3)	Transketolase (TK) [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CCH98787	gi 389717064	144	15,76		peroxidase activity, peroxiredoxin activity			72	19493	2 (1)	2 (1)	putative peroxiredoxin bcp [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CCH98893	gi 389716930	149	16,473	ATP-binding, Magnesium, Metal-binding, Nucleotide-binding	CTP biosynthetic process, GTP biosynthetic process, UTP biosynthetic process	cytoplasm	ATP binding, metal ion binding, nucleoside diphosphate kinase activity	72		1 (1)	1 (1)	Nucleoside diphosphate kinase [Microcystis aeruginosa PCC 9717]
CCIO2275	gi 389734017	384	41	Pyridoxal phosphate			oxidoreductase activity, pyridoxal phosphate binding	45	50146	1 (1)	1 (1)	Soluble hydrogenase 42 kDa subunit [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO2573	gi 389733688	285	30,395	Magnesium, Metal-binding	cellular aromatic compound metabolic process	citrate lyase complex	citrate (pro-3S)-lyase activity, metal ion binding	61	34819	1 (1)	1 (1)	Citrate (Pro-3S)-lyase [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO2575	gi 389733690	439	48,18		acetyl-CoA metabolic process	hydrolase activity, transferase activity		40	55026	1 (1)	1 (1)	Acetyl-CoA hydrolase/transferase [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO3033	gi 389733164	564	60,784		transporter activity	integral component of membrane		127	65097	4 (4)	3 (3)	conserved exported hypothetical protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO3504	gi 389732587	575	63,821		metallopeptidase activity			124	73275	9 (6)	6 (4)	Predicted secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO3671	gi 389732416	103	10,735		protein folding	cytoplasm	ATP binding	52	14075	2 (2)	2 (2)	10kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein) [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO3686	gi 389732378	100	11,225		nucleic acid binding, nucleotide binding			62	13347	2 (1)	2 (1)	putative RNA-binding protein rbpB [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCIO3993	gi 389732000	456	49,73		Phage tail sheath protein			73	57839	1 (1)	1 (1)	Phage tail sheath protein [Microcystis aeruginosa PCC

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
												9443]
CCI04196	gi 389731782	652	70,383		Carbon dioxide concentrating mechanism			100	80092	2 (2)	2 (2)	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmM [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCI04218	gi 389731744	188	20,214	Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	electron carrier activity, metal ion binding			114	22331	3 (2)	3 (2)	Similar to tr P74534 P74534 [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCI04895	gi 389730996	103	11,205	2Fe-2S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	electron transport chain		2 iron, 2 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding	143	13862	1 (1)	1 (1)	Ferredoxin [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCI05346	gi 389730366	320	35,54		light absorption, transport	phycobilisome	chloride ion binding	97	40568	3 (2)	2 (2)	Orange carotenoid-binding protein [Microcystis aeruginosa PCC 9443]
CCI09376	gi 389764301	440	47,719		ABC transporter			91	58519	2(1)	2(1)	ABC transporter nitrate-binding protein [Microcystis aeruginosa PCC 7941]
CCI17197	gi 389803949	399	44,593	FAD, Flavoprotein, NADP	ferredoxin-NADP+ reductase activity	phycobilisome		47	52095	1 (1)	1 (1)	Ferredoxin--NADP reductase [Microcystis aeruginosa PCC 9807]
CCI19429	gi 389801404	668	72,261	Calcium, Magnesium, Metal, Thiamine pyrophosphate	metal ion binding, transketolase activity			46	83885	2 (1)	2 (1)	Transketolase (TK) [Microcystis aeruginosa PCC 9807]
CYC6_MIC AE	gi 117927	81	8,421	Heme, Iron, Metal-binding	oxidation-reduction process, photosynthesis	thylakoid lumen	electron carrier activity, heme binding, iron ion binding	39	11245	1 (1)	1 (1)	RecName: Full=Cytochrome c6; AltName: Full=Cytochrome c-553; AltName: Full=Cytochrome c553; AltName: Full=Soluble cytochrome f
EFG_ARTP T	gi 119188	697	76,775	GTP-binding, Nucleotide-binding	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity		100	88775	1 (1)	1 (1)	RecName: Full=Elongation factor G; Short=EF-G
NP_439981	gi 16329253	718	77,831	Magnesium, Metal-binding, RNA-binding	RNA processing, mRNA catabolic process	cytoplasm	3'-5'-exoribonuclease activity, RNA binding, magnesium ion binding, polyribonucleotide nucleotidyltransferase activity	75	88264	2 (2)	1 (1)	polynucleotide phosphorylase/polyadenylase [Synechocystis sp. PCC 6803]

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
NP_440096	gi 16329368	103	11,135		carbon dioxide concentrating			61	12040	3 (1)	2 (1)	carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmK [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_440653	gi 16329925	173	18,241	RNA-binding, rRNA-binding	translation	small ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome	29	23402	1 (1)	1 (1)	30S ribosomal protein S5 [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_440812	gi 16330084	446	48,967		nitrate assimilation, transport	plasma membrane		51	58245	1 (1)	1 (1)	nitrate transporter [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_441641	gi 16330913	399	43,733	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, protein binding, translation elongation factor activity	108	52878	1(1)	1(1)	elongation factor Tu [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_441901	gi 16331173	223	24,631	Metal-binding	oxidoreductase activity			30	27538	1 (1)	1 (1)	hypothetical protein slr1926 [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_441966	gi 16331238	81	8,828	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem I	photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, electron carrier activity, metal ion binding, oxidoreductase activity	56	10453	3 (2)	2 (1)	photosystem I subunit VII [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_442079	gi 16331351	222	25,055	Heme, Iron, Metal-binding	Photosynthesis, respiratory electron transport chain	cytochrome b6f complex, integral component of membrane, thylakoid membrane	electron transporter, transferring electrons within cytochrome b6/f complex of photosystem II activity, heme binding, iron ion binding, oxidoreductase activity	79	27868	1(1)	1(1)	cytochrome B6 [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_442112	gi 16331384	821	91,174	ATP-binding, Nucleotide-binding	ATP binding, nucleoside-triphosphatase activity, peptidase activity			33	10728 7	1 (1)	1 (1)	ATP-dependent Clp protease regulatory subunit [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_442120	gi 16331392	470	52,491	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle		magnesium ion binding, monooxygenase activity, protein	67	59655	7 (1)	6 (1)	ribulose biphosphate carboxylase [Synechocystis sp. PCC 6803]

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
							binding, ribulose-bisphosphate carboxylase activity					
NP_442122	gi 16331394	113	13,239		reductive pentose-phosphate cycle		monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	33	15498	1 (1)	1 (1)	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain
NP_442699	gi 16331971	384	41,759	ATP-binding, Magnesium, Metal-binding	fructose 6-phosphate metabolic process, glycolytic process	6-phosphofructokinase complex	6-phosphofructokinase activity, ATP binding, metal ion binding	63	48489	1 (1)	1 (1)	6-phosphofructokinase [Synechocystis sp. PCC 6803]
NP_442995	gi 16332267	561	58,646	4Fe-4S, Iron, Iron-sulfur, Metal-binding	isoleucine biosynthetic process, valine biosynthetic process	4 iron, 4 sulfur cluster binding, dihydroxy-acid dehydratase activity, metal ion binding		27	66536	1 (1)	1 (1)	Dihydroxy-acid dehydratase
NP_484910	gi 17228362	114	12,318		carbon dioxide concentrating			95	13527	2 (1)	1 (1)	ccmK gene product [Nostoc sp. PCC 7120]
NP_485782	gi 17229234	633	67,908	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress		ATP binding	46	82910	1 (1)	1 (1)	dnaK gene product [Nostoc sp. PCC 7120]
NP_488171	gi 17231623	400	42,441	ATP-binding, Nucleotide-binding	glycolytic process	cytoplasm	ATP binding, phosphoglycerate kinase activity	52	52500	1 (1)	1 (1)	pgk gene product [Nostoc sp. PCC 7120]
NP_488227	gi 17231679	138	15,153		translation	ribosome	structural constituent of ribosome	56	18841	1 (1)	1 (1)	rpsI gene product [Nostoc sp. PCC 7120]
NP_488976	gi 17232428	645	70,102	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	cell division, protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	71	81664	1 (1)	1 (1)	ftsH gene product [Nostoc sp. PCC 7120]
NP_681910	gi 22298663	437	47,365		amino acid transport	outer membrane-bounded periplasmic space		45	56949	1 (1)	1 (1)	ABC transporter substrate-binding protein [Thermosynechococcus elongatus BP-1]
NP_892346	gi 33860785	618	66,746	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	cell division, protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	77	77139	1 (1)	1 (1)	cell division protein FtsH2 [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str. CCMP1986]
PHAB_AN	gi 129996	161	17,316	Bile pigment,	oxidation-reduction	phycobilisome		76	20089	1 (1)	1 (1)	RecName: Full=Allophycocyanin

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
ACY				Chromophore	process, photosynthesis, protein-chromophore linkage							beta chain
PSBA_SYN Y4	gi 131261	360	39,812	Calcium, Iron, Manganese, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem II, response to herbicide	integral component of membrane, photosystem II, thylakoid membrane	electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity, iron ion binding, oxidoreductase activity	61	40578	1 (1)	1 (1)	RecName: Full=Photosystem Q(B) protein; AltName: Full=32 kDa thylakoid membrane protein; AltName: Full=Photosystem II protein D1; Flags: Precursor
RBL_SYNP 2	32049	470	52,159	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle		magnesium ion binding, monooxygenase activity, ribulose-bisphosphate carboxylase activity	53	59324	3 (1)	3 (1)	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Synechococcus sp. (strain ATCC 27264 / PCC 7002 / PR-6))
S16200	gi 97733	247	28,381		carbohydrate metabolic process			47	10324	2 (1)	2 (1)	photosystem I iron-sulfur protein psaC - Calothrix sp. (PCC 7601)
YP_001655 623	gi 166363350	616	65,547		transporter activity	integral component of membrane		76	69553	3 (3)	3 (3)	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001655 636	gi 166363363	438	47,665		amino acid transport	outer membrane-bounded periplasmic space		154	58512	3 (3)	3 (3)	ABC-type urea transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001656 041	gi 166363768	161	17,319	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		192	19483	3 (2)	2 (1)	allophycocyanin subunit alpha [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001656 376	gi 166364103	634	67,746	ATP-binding, Nucleotide-binding	protein folding, response to stress	ATP binding	Acts as a chaperon	61	82187	1 (1)	1 (1)	molecular chaperone DnaK [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657 459	gi 166365186	172	18,164	Bile pigment, Chromophore	mannitol transport, oxidation-reduction process, photosynthesis	phycobilisome		189	19508	7 (3)	5 (2)	phycocyanin beta subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
YP_001657460	gi 166365187	162	17,516	Bile pigment, Chromophore	oxidation-reduction process, photosynthesis, protein-chromophore linkage	phycobilisome		191	20335	7 (7)	3 (3)	phycocyanin alpha subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657462	gi 166365189	292	32,088		photosynthesis	phycobilisome		108	36069	6 (3)	4 (3)	phycobilisome rod linker polypeptide [Microcystis aeruginosa NIES-843]/ cpcI [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001657813	gi 166365540	560	60,274		integral component of membrane	transporter activity		115	64284	4 (3)	3 (2)	porin type major outer membrane protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001657856	gi 166365583	112	12,506		regulation of transcription, DNA-templated			64	15890	1 (1)	1 (1)	anti-sigma f factor antagonist [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001658257	gi 166365984	202	23,123	RNA-binding, rRNA-binding	translation	small ribosomal subunit	rRNA binding, structural constituent of ribosome	40	26805	1 (1)	1 (1)	30S ribosomal protein S4 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001658281	gi 166366008	131	14,325		glycine decarboxylation via glycine cleavage system	glycine cleavage complex		26	15533	1 (1)	1 (1)	glycine cleavage system protein H [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001658313	gi 166366040	508	55,898		photosynthetic electron transport chain	photosystem II	chlorophyll binding	197	60167	5 (4)	4 (4)	photosystem II core light harvesting protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001658523	gi 166366250	432	46,543	Magnesium, Metal-binding	glycolytic process	cell surfasse, extracellular region, phosphopyruvate hydratase complex	magnesium ion binding, phosphopyruvate hydratase activity	48	52294	1 (1)	1 (1)	phosphopyruvate hydratase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659290	gi 166367017	409	44,918	GTP-binding, Nucleotide-binding	Protein biosynthesis	cytoplasm	GTP binding, GTPase activity, translation elongation factor activity	243	52845	12 (7)	8 (3)	elongation factor Tu [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659351	gi 166367078	391	43,124	Calcium, Schiff base	pentose-phosphate shunt	cytoplasm	calcium ion binding, sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glyceronetransferase activity	87	49974	1 (1)	1 (1)	transaldolase/EF-hand domain-containing protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
YP_001659383	gi 166367110	160	16,723		photosynthesis	integral component of membrane, photosystem I reaction center, thylakoid membrane		33	18280	2 (1)	2 (1)	photosystem I reaction center protein subunit XI [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659743	gi 166367470	164	18,123		photosynthesis	photosystem I reaction center		142	21245	4(2)	3(2)	photosystem I subunit III [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659801	gi 166367528	111	13,153		carboxylase			115	16325	1 (1)	1 (1)	ribulose biphosphate carboxylase small subunit [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659803	gi 166367530	471	52,544	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle		magnesium ion binding, monooxygenase activity, ribulose-biphosphate carboxylase activity	129	60363	3 (3)	3 (3)	ribulose bisophosphate carboxylase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659803	gi 166367532	471	52,544	Magnesium, Metal-binding	Photorespiration, reductive pentose-phosphate cycle		magnesium ion binding, monooxygenase activity, ribulose-biphosphate carboxylase activity	101	60363	5 (3)	4 (3)	ribulose bisophosphate carboxylase [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659808	gi 166367535	103	11,084		carbon dioxide concentrating			106	11989	2 (1)	2 (1)	carbon dioxide concentrating mechanism protein ccmK2 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659848	gi 166367575	250	28,695		photosynthesis	phycobilisome		182	32327	2 (2)	2 (2)	phycobilisome rod-core linker polypeptide [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001659994	gi 166367721	575	63,834		metallopeptidase activity			151	72680	7 (4)	5 (4)	secreted metalloprotease [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001660238	gi 166367965	910	93,817		metallopeptidase activity			44	100287	1 (1)	1 (1)	hypothetical protein MAE_52240 [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001660682	gi 166368409	351	38,743		iron transport			77	45762	4 (3)	4 (3)	iron transport system substrate-binding protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001660757	gi 166368484	212	22,685	RNA-binding, rRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome	124	29410	1 (1)	1 (1)	50S ribosomal protein L3 [Microcystis aeruginosa NIES-843]/rplc
YP_001660931	gi 166368658	197	21,996				adenyl nucleotide binding	89	27034	1 (1)	1 (1)	CP12 polypeptide [Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001661	gi 166368834	144	15,746		antioxidant			92	19479	2 (1)	2 (1)	bacterioferritin comigratory protein

Uniprot	NCBI	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
107					activity, peroxidase activity, peroxiredoxin activity, oxidoreductase activity							[Microcystis aeruginosa NIES-843]
YP_001866970	gi 186683774	351	39,177	Iron, Metal-binding	photosynthetic electron transport in photosystem II	integral component of membrane, photosystem II, thylakoid membrane	electron transporter, transferring electrons within the cyclic electron transport pathway of photosynthesis activity, iron ion binding, oxidoreductase activity	42	40461	1 (1)	1 (1)	photosystem II D2 protein (photosystem q(a) protein) [Nostoc punctiforme PCC 73102]
YP_003885406	gi 307150022	616	67,481	ATP-binding, Metal-binding, Nucleotide-binding, Zinc	protein catabolic process	integral component of membrane, thylakoid membrane	ATP binding, ATPase activity, metalloendopeptidase activity, zinc ion binding	65	74786	2 (2)	2 (2)	ATP-dependent metalloprotease FtsH [Cyanospora sp. PCC 7822]
YP_170845	gi 56750144	102	10,904		carbon dioxide concentrating			68	12114	1(1)	1(1)	Putative carboxysome assembly protein ccmK gene product [Synechococcus elongatus PCC 6301]
YP_722628	gi 113476567	181	20,639	RNA-binding, rRNA-binding, tRNA-binding	translation	ribosome	rRNA binding, structural constituent of ribosome, tRNA binding, zinc ion binding	31	27014	1 (1)	1 (1)	rplE gene product [Trichodesmium erythraeum IMS101]
CAO88672	gi 159030975	749	82,6	4Fe-4S, Chlorophyll, Chromophore, Iron, Iron-sulfur, Magnesium, Metal-binding	Photosynthesis, protein-chromophore linkage	integral component of membrane, photosystem I, thylakoid membrane	4 iron, 4 sulfur cluster binding, chlorophyll binding, electron carrier activity, magnesium ion binding, oxidoreductase activity	88	90032	1 (1)	1 (1)	psaA [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
YP_001659808	gi 166367535	103	11,084		carbon dioxide concentrating			106	11989	2 (1)	2 (1)	carbon dioxide concentrating mechanism protein [Microcystis aeruginosa NIES-843]

Uniprot	NCBi	aa	Mass (Da)	Ligand	Biological_process	Cellular component	Molecular function	Score	Mass	Matches	Sequences	Proteínas
CAO88531	gi 159030852	668	72.263		metal ion binding	Calcium, Magnesium, Metal-binding , Thiamine, pyrophosphate		82	83583	2 (1)	2 (1)	Transketolase/unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88947	gi 159026435	303	33,381		cysteine-type peptidase activity			56	38061	1 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]
CAO88098	gi 159028287	320	35.524		light absorption		chloride ion binding	61	40552	2 (1)	1 (1)	unnamed protein product [Microcystis aeruginosa PCC 7806]

ANEXO 11 - PROTEÍNAS DE *M. AERUGINOSA* CCIBT3106 E CCIBT3194 IDENTIFICADAS COMO DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS A PARTIR DE PREPARAÇÕES SOLUBILIZADAS EM SOLUÇÃO DE iTRAQ, MARCADAS COM iTRAQ 115, 116, 117, 118 E FRACIONADAS EM TROCA CATIONICA, SEGUIDA DE ANÁLISE EM SYNAPT G1 E PROTEINLYNX COM BUSCA EM BANCO DE DADOS DE *MICROCYSTIS* (UNIPROT)

Tabela - 18 Proteínas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBT3194 (tóxica) e CCIBT3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ, analisadas por espectrometria de massas seguida de busca em banco de proteínas do gênero *Microcystis* com o programa ProteinLynx. Em itálico as proteínas identificadas também usando Mascot e banco geral do NCBI

Descrição	Score
<i>10kDa chaperonin OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN groS PE 3 SV 1</i>	11,92
16,6 kDa small heat shock protein OS Microcystis aeruginosa PCC 9809 GN hspA PE 3 SV 1	9,36
2-Cys peroxiredoxin BAS1 OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN C789 5445 PE 4 SV 1	9,22
<i>30S ribosomal protein S3 OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN rpsC PE 3 SV 1</i>	9,27
<i>50S ribosomal protein L5 OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN rplE PE 3 SV 1</i>	10,83
5'-nucleotidase OS Microcystis aeruginosa PCC 9701 GN MICAK 750007 PE 3 SV 1	9,62
<i>60kDa chaperonin OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN groL PE 3 SV 1</i>	9,63
6-phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 01398 PE 3 SV 1	9,22
8'-apo-beta-carotenal 15 15 oxygenase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 04405 PE 4 SV 1	9,73
<i>ABC transporter nitrate binding protein NrtA OS Microcystis aeruginosa PCC 9701 GN nrtA PE 4 SV 1</i>	11,93
<i>ABC type urea transport system substrate binding protein OS Microcystis aeruginosa strain NIES 843 GN MAE 0</i>	9,21
Acyl-CoA dehydrogenase OS Microcystis sp T1 4 GN MICAI 3090006 PE 4 SV 1	10,44
Addiction module toxin Modular protein OS Microcystis aeruginosa PCC 9808 GN MICAG 1940005 PE 4 SV 1	11,23
Adenine-specific methylase like OS Microcystis aeruginosa PCC 9807 GN MICAF 2700002 PE 4 SV 1	11,75
<i>Adenosylhomocysteinase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN ahcY PE 3 SV 1</i>	9,22
Alcohol dehydrogenase GroES like domain protein OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN yjgB PE 3 SV 1	9,23
Aliphatic amidase expression regulating protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 00546 PE 4 SV 1	9,21
<i>Allophycocyanin alpha chain OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 00658 PE 3 SV 1</i>	10,54
<i>ApcA protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN apcA PE 3 SV 1</i>	9,22

Descrição	Score
Apocarotenoid-15,15'-oxygenase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN O53 1113 PE 4 SV 1	9,73
<i>Apocytochrome f</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9806 GN <i>petA</i> PE 3 SV 1	9,35
Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 03480 PE 3 SV 1	10,83
<i>ATP synthase subunit beta</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN <i>atpD</i> PE 3 SV 1	11,23
<i>ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN <i>ftsH</i> PE 3 SV 1	9,22
<i>Bacterioferritin comigratory protein</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN MAE 60930 PE 4 SV 1	11,23
Bicarbonate transport system substrate binding protein OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN <i>cmpA</i> PE 4 SV 1	9,44
Bicarbonate-binding protein CmpA OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN <i>cmpA</i> PE 4 SV 1	9,44
Bifunctional 2 3 cyclic nucleotide 2 phosphodiesterase 3 nucleotidase protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC77	9,6
<i>Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmK 2</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN <i>ccmK2</i> PE 4 SV	9,67
<i>Carbonic anhydrase</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 03429 PE 3 SV 1	9,22
Carboxysome formation protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN <i>ccmA</i> PE 4 SV 1	9,07
Cell envelope related function transcriptional attenuator common domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i>	9,22
CHAD domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN O53 1648 PE 4 SV 1	9,98
Circadian clock protein KaiB OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN <i>kaiB</i> PE 3 SV 1	9,15
Cobyric acid synthase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN <i>cobQ</i> PE 3 SV 1	9,22
CpcA Fragment OS <i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB 909 PE 3 SV 1	9,71
CpcG protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN <i>cpcG</i> PE 4 SV 1	9,85
C-phycocyanin-2 alpha chain OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701 GN <i>cpcA</i> PE 3 SV 1	9,44
CRISPR-associated regulatory protein DevR family OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701 GN MICAK 2840008 PE 4 SV 1	11,23
Cyclophilin type peptidyl prolyl cis trans isomerase CLD family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN	9,22
Cyp120 protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN <i>cyp120</i> PE 3 SV 1	11,23
<i>Cytochrome b6 f complex subunit PetP</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN <i>petP</i> PE 4 SV 1	9,71
Cytochrome P450 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN MAE 48830 PE 3 SV 1	9,25
D-fructose 1 6 biphosphatase class 2 sedoheptulose 1 7 biphosphatase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAES	9,22
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MA	9,29
<i>DNA gyrase subunit B</i> OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN <i>gyrB</i> PE 3 SV 1	10,54

Descrição	Score
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN rpoB PE 3 SV 1	9,29
E3 binding domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN pdhC PE 3 SV 1	9,29
<i>Elongation factor G OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN fusA PE 3 SV 1</i>	11,93
Elongation factor Ts OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN tsf PE 3 SV 1	11,93
<i>Elongation factor Tu OS Microcystis aeruginosa PCC 9443 GN tufB PE 3 SV 1</i>	11,93
Endoglucanase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02900 PE 4 SV 1	9,22
Endonuclease MutS2 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN mutS PE 3 SV 1	9,98
Extracellular ligand binding receptor OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 809 PE 4 SV 1	9,24
<i>Ferredoxin--NADP reductase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 04681 PE 3 SV 1</i>	9,22
<i>Ferredoxin--nitrite reductase OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN C789 5331 PE 4 SV 1</i>	9,22
<i>Gas vesicle structural protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN gvpJ PE 3 SV 1</i>	11,93
<i>General stress protein 16U OS Microcystis aeruginosa PCC 9808 GN yceD PE 4 SV 1</i>	10,83
Genome sequencing data contig C300 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN IPF 2992 PE 4 SV 1	9,81
GlnB protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN glnB PE 3 SV 1	9,55
Glutaredoxin family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN gst PE 4 SV 1	9,29
Glutathione S transferase OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN MICAI 2990012 PE 4 SV 1	9,29
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN gap PE 3 SV 1	10,23
Glycosyl hydrolase BNR repeat containing protein OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN MICAI 2580019 PE 4 SV 1	11,23
Gst1 protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9808 GN gst PE 4 SV 1	9,29
HAD-superfamily hydrolase subfamily IA variant 3 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9717 GN MICAB 5800002 PE 4 SV 1	10,3
HEAT domain protein repeat containing protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9807 GN MICAF 960004 PE 4 SV	11,23
Heat shock protein DnaJ like OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9809 GN MICAH 600009 PE 4 SV 1	11,93
Helicase conserved C terminal domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 3891 PE 4 SV 1	10,85
HsdR protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN hsdR PE 4 SV 1	10,84
Hsp20/alpha crystallin family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN hspA PE 3 SV 1	9,36
Hybrid peroxiredoxin hyPrx5 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9806 GN MICAE 1020002 PE 4 SV 1	9,36
Iron uptake protein A1 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 00714 PE 4 SV 1	9,29

Descrição	Score
Lipase family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 2989 PE 4 SV 1	11,93
Lysozyme g Modular protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443 GN MICAC 1320009 PE 4 SV 1	11,23
Macrolide-specific efflux protein macA OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02499 PE 4 SV 1	10,32
Major carboxysome shell protein 1A Carbon dioxide concentrating mechanism protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i>	9,22
MaoC domain protein dehydratase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9807 GN MICAF 3190008 PE 4 SV 1	11,93
Membrane-associated protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02398 PE 4 SV 1	10,13
Metallo-beta-lactamase superfamily protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN psoR PE 4 SV 1	10,54
Modification methylase VspI OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02049 PE 4 SV 1	10,83
Modulator of DNA gyrase family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN tldD PE 4 SV 1	9,22
Molybdopterin biosynthesis protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN moeB PE 4 SV 1	9,26
Multifunctional cyclase dehydratase 3 O methyl transferase tcmN OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02242 PE	10,13
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN ndhK PE 3 SV 1	9,22
NADP-dependent alcohol dehydrogenase C 2 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04580 PE 3 SV 1	9,23
NADPH-dependent 7 cyano 7 deazaguanine reductase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9808 GN queF PE 3 SV 1	11,23
NirA protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN nirA PE 4 SV 1	9,22
Nitrogen regulatory protein P II OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN glnB PE 3 SV 1	9,26
O-methyltransferase family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN O53 2206 PE 4 SV 1	10,13
<i>Orange carotenoid binding protein OS Microcystis aeruginosa PCC 9809 GN MICAH 4340001 PE 4 SV 1</i>	9,53
<i>Peptidyl-prolyl cis trans isomerase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 04096 PE 4 SV 1</i>	9,22
<i>Phage tail sheath protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 02776 PE 4 SV 1</i>	11,93
Phosphatase YqaB OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04085 PE 4 SV 1	10,3
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 00236 PE 4 SV 1	10,31
Phosphoglucosyltransferase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 03331 PE 3 SV 1	9,29
Phosphorylase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701 GN glgP PE 3 SV 1	10,32
<i>Photosystem I reaction center subunit III OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN psaF PE 4 SV 1</i>	11,92
<i>Phycobilisome 32 1 kDa linker polypeptide phycocyanin associated rod 1 OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESP</i>	9,85
<i>Phycocyanin beta subunit Fragment OS Microcystis aeruginosa EAWAG175 GN pcB PE 3 SV 1</i>	9,77

Descrição	Score
PII signal transducing protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 03880 PE 3 SV 1	9,26
PilT protein like protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701 GN MICAK 3550001 PE 4 SV 1	9,6
PIN domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN O53 2961 PE 4 SV 1	9,6
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9806 GN pnp PE 3 SV 1	9,36
<i>Porin type major outer membrane protein OS Microcystis aeruginosa PCC 9717 GN MICAB 5440006 PE 4 SV 1</i>	9,6
<i>Predicted secreted metalloprotease OS Microcystis aeruginosa PCC 9809 GN MICAH 1530007 PE 4 SV 1</i>	10,54
Probable Chi protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN MAE 52240 PE 4 SV 1	11,93
Probable ribonuclease VapC OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN vapC PE 3 SV 1	9,6
Protein translocase subunit SecD OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN secD PE 3 SV 1	11,25
Proton extrusion protein PcxA OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN pcxA PE 3 SV 1	10,83
PsaD protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN psaD PE 4 SV 1	9,22
PsaF protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN psaF PE 4 SV 1	9,22
<i>PsbC protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN psbC PE 4 SV 1</i>	9,91
<i>PsbO protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN psbO PE 4 SV 1</i>	9,22
Putative modulator of DNA gyrase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN MAE 33710 PE 4 SV 1	11,93
Pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase component OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 971	9,29
RbpF/A2 protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN rbpF A2 PE 4 SV 1	9,3
Receptor ligand binding region family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> TAIHU98 GN O53 945 PE 4 SV 1	9,21
Ribonuclease OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04839 PE 4 SV 1	10,54
<i>Ribulose biphosphate carboxylase small chain OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 01248 PE 4 SV 1</i>	9,17
RNA binding protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9809 GN MICAH 3660023 PE 4 SV 1	9,29
RNA recognition motif family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 4241 PE 4 SV 1	9,22
SagB-type dehydrogenase domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 00955 PE 4 SV 1	9,62
Secretion protein HlyD family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9807 GN MICAF 5100004 PE 4 SV 1	11,23
Similar to tr P74426 P74426 SYNY3 Sll0359 protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN IPF 5963 PE 4 SV 1	11,93
Similar to tr Q8YVN1 Q8YVN1 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701 GN MICAK 2440010 PE 4 SV 1	11,92
Similarity OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN IPF 2686 PE 4 SV 1	11,16

Descrição	Score
S-layer domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN porB PE 4 SV 1	9,24
Splicing factor CC1 like family OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 03959 PE 4 SV 1	9,22
Spore protein SP21 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 01131 PE 3 SV 1	9,36
Stringent starvation protein A OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02111 PE 4 SV 1	9,29
Sulfur acquisition oxidoreductase SfnB family OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04762 PE 4 SV 1	10,06
Tetratricopeptide repeat family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 2682 PE 4 SV 1	11,23
ThiF family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN thiF PE 4 SV 1	9,26
Thioredoxin OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN trxA PE 3 SV 1	9,97
Toxin YoeB OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04172 PE 4 SV 1	11,23
<i>Transaldolase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN tal PE 3 SV 1</i>	9,29
Transcriptional regulator AbrB family OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04495 PE 4 SV 1	9,29
<i>Transketolase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 04838 PE 4 SV 1</i>	10,83
Transposase domain protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 260 PE 4 SV 1	11,93
Trifunctional nucleotide phosphoesterase protein YfkN OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 01989 PE 3 SV 1	9,56
tRNA(FMet)-specific endonuclease VapC OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 03721 PE 4 SV 1	9,6
Type III effector pipB2 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04199 PE 4 SV 1	10,14
UPF0296 protein C789 1732 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN C789 1732 PE 3 SV 1	9,22
Xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 01763 PE 4 SV 1	9,97
Ycf48-like protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04165 PE 3 SV 1	9,34

Tabela - 19 Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (**tóxica**), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguido de análise pelo programa ProteinLynx e busca em banco de dados de *Microcystis*. Comparação entre as diferentes fases de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na fase exponencial tardia (marcador 115). Vermelho. proteínas mais expressas na fase exponencial (marcador 114).

entry	Description	115:114 ratio	function
S3J9L5	Phage tail sheath protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02776 PE 4 SV 1	0,43	Other
A8YAD8	Transcriptional regulator AbrB family OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04495 PE 4 SV 1	0,44	Regulatory functions
I4I147	General stress protein 16U OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9808 GN yceD PE 4 SV 1	0,46	response to stress
B0JPC0	Porin type major outer membrane protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN MAE 06090 PE 4 SV 1	0,69	transport
S3ITT4	ATP synthase subunit alpha OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN atpA PE 3 SV 1	0,70	Photosynthesis and respiration
L8NZV7	Carbon dioxide concentrating mechanism protein CcmK 2 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN ccmK2 PE 4 SV	0,76	Photosynthesis and respiration
B0JFY1	Phycobilisome core component OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN apcF PE 3 SV 1	1,28	Photosynthesis and respiration
I4GAE3	Elongation factor Tu OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9443 GN tufB PE 3 SV 1	1,42	Translation
Q6Q0T9	CpcA Fragment OS <i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB 909 PE 3 SV 1	1,53	Photosynthesis
S3IQV3	D-fructose 1 6 biphosphatase class 2 sedoheptulose 1 7 biphosphatase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAES	1,81	Carbohydrate biosynthesis
L8NTF7	60 kDa chaperonin OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN groL PE 3 SV 1	1,82	cellular process, protein folding
S3JIG5	Iron uptake protein A1 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 00714 PE 4 SV 1 futA1	1,85	transport and binding proteins
A8YJF4	Genome sequencing data contig C320 OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN IPF 5728 PE 4 SV 1	1,89	
L8NS07	Phycocyanin, beta subunit OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN cpcB PE 3 SV 1	2,09	Photosynthesis
I4IA06	Bacterioferritin comigratory protein OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN MICAI 1720013 PE 4 SV 1	2,03	oxidation-reduction process
L8P0D5	Cyclophilin type peptidyl prolyl cis trans isomerase CLD family protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN	2,20	protein peptidyl-prolyl isomerization
A8YFF3	CpcG protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN cpcG PE 4 SV 1	2,34	Photosynthesis
I4IAX6	Thioredoxin OS <i>Microcystis</i> sp T1 4 GN trxA PE 3 SV 1	3,35	Other

Tabela - 20 Proteínas diferencialmente expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3106 (**não tóxica**), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguido de análise pelo programa ProteinLynx e busca em banco de dados de Microcystis. Comparação entre as diferentes fases de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na fase exponencial tardia (marcador 117). Vermelho. proteínas mais expressas na fase exponencial (marcador 116).

entry	Description	117:116 Ratio	function
S3JFK 3	Nitrate transport protein NrtA OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 00942 PE 4 SV 1	116 only	transport and binding proteins
A8YC E5	PsbO protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN psbO PE 4 SV 1	0,26	Photosynthesis and respiration: Photosystem II
S3JH1 9	PII signal transducing protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 03880 PE 3 SV 1	0,52	Amino acid biosynthesis: Glutamate family / Nitrogen assimilation
A8YG 08	Similar to tr P74426 P74426 SYNY3 Sll0359 protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN IPF 5963 PE 4 SV 1	1,69	Regulatory functions
S3JAI 4	Elongation factor G OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN fusA PE 3 SV 1	1,78	Protein modification and translation factors
S3K45 9	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln amidotransferase subunit B OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 03480 PE 3 SV 1	2,03	translation
S3JBR 7	Transketolase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 02135 PE 4 SV 1	2,33	Energy metabolism: Pentose phosphate pathway
I4IVZ 8	ABC transporter nitrate binding protein NrtA OS Microcystis aeruginosa PCC 9701 GN nrtA PE 4 SV 1	2,34	transport and binding proteins
S3JFE 5	Aliphatic amidase expression regulating protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 00546 PE 4 SV 1	2,62	transport and binding proteins
B0JPD 3	ABC-type urea transport system substrate binding protein OS Microcystis aeruginosa strain NIES 843 GN MAE 0	2,72	transport and binding proteins
S3JWJ 8	Ferredoxin--NADP reductase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 04680 PE 4 SV 1	2,75	Photosynthesis and respiration
L8NY M0	Extracellular ligand binding receptor OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN C789 809 PE 4 SV 1	2,77	transport and binding proteins
S3JUJ 0	Orange carotenoid binding protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 01237 PE 4 SV 1	3,18	absorption of light
S3IQV 3	D-fructose 1 6 biphosphatase class 2 sedoheptulose 1 7 biphosphatase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAES	3,23	Carbohydrate biosynthesis; Calvin cycle
B0JL5 9	Probable ribonuclease VapC OS Microcystis sp T1 4 GN vapC PE 3 SV 1	3,29	other Adaptations and atypical conditions

Tabela - 21 Proteínas expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguido de análise pelo programa ProteinLynx e busca em banco de dados de *Microcystis*. Comparação entre as diferentes linhagens na fase **exponencial** de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na linhagem não tóxica (marcador 116). Vermelho. proteínas mais expressas na linhagem tóxica (marcador 114).

Entry	Description	116:114Ratio	function
A8YAD8	Transcriptional regulator AbrB family OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 04495 PE 4 SV 1	0,23	Regulatory functions
S3K8G8	Endoglucanase OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02900 PE 4 SV 1	0,31	metabolic process
S3J9L5	Phage tail sheath protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 02776 PE 4 SV 1	0,32	other
S3ITT4	ATP synthase subunit alpha OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN atpA PE 3 SV 1	0,42	Photosynthesis and respiration
A8YG08	Similar to tr P74426 P74426 SYNY3 Sll0359 protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN IPF 5963 PE 4 SV 1	0,50	Regulatory functions
L8NQH5	10 kDa chaperonin OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN groS PE 3 SV 1	0,62	cellular processes
L8NS07	Phycocyanin, beta subunit OS <i>Microcystis aeruginosa</i> DIANCHI905 GN cpcB PE 3 SV 1	1,55	photosynthesis
Q6Q0T9	CpcA Fragment OS <i>Microcystis aeruginosa</i> FACHB 909 PE 3 SV 1	1,72	photosynthesis
A8YAN9	PsbC protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN psbC PE 4 SV 1	2,05	photosynthesis
S3JFK3	Nitrate transport protein NrtA OS <i>Microcystis aeruginosa</i> SPC777 GN MAESPC 00942 PE 4 SV 1	2,40	transport and binding proteins
B0JPC0	Porin type major outer membrane protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES 843 GN MAE 06090 PE 4 SV 1	2,61	transport
I4IVZ8	ABC transporter nitrate binding protein NrtA OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9701 GN nrtA PE 4 SV 1	2,78	transport and binding proteins
A8YFF3	CpcG protein OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806 GN cpcG PE 4 SV 1	3,44	photosynthesis
I4HIQ0	Predicted secreted metalloprotease OS <i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 9809 GN MICAH 1530007 PE 4 SV 1	5,18	proteolysis

Tabela - 22 Proteínas expressas identificadas a partir de preparações de proteínas de *M. aeruginosa* CCIBt3194 (tóxica) e CCIBt3106 (não tóxica), solubilizadas em tampão iTRAQ e analisadas por espectrometria de massas, seguido de análise pelo programa ProteinLynx e busca em banco de dados de Microcystis. Comparação entre as diferentes linhagens na fase **exponencial tardia** de crescimento. Verde. proteínas mais expressas na linhagem não tóxica (marcador 117). Vermelho proteínas mais expressas na linhagem tóxica (marcador 115).

entry	Description	117:115 Ratio	funcion
L8NQH5	10 kDa chaperonin OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN groS PE 3 SV 1	0,34	cellular processes, ptn folding
I4IA06	Bacterioferritin comigratory protein OS Microcystis sp T1 4 GN MICAI 1720013 PE 4 SV 1	0,47	oxidation-reduction process
L8NX74	Redoxin family protein OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN prx5 PE 4 SV 1	0,55	cell redox homeostasis
S3JAI4	Elongation factor G OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN fusA PE 3 SV 1	1,28	translation
I4IA32	Uncharacterized protein OS Microcystis sp T1 4 GN MICAI 1730025 PE 4 SV 1	1,30	oxidation-reduction process
A8YG08	Similar to tr P74426 P74426 SYNY3 Sll0359 protein OS Microcystis aeruginosa PCC 7806 GN IPF 5963 PE 4 SV 1	1,36	Regulatory functions
S3JBR7	Transketolase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 02135 PE 4 SV 1	1,59	Energy metabolism: Pentose phosphate pathway
S3J9L5	Phage tail sheath protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 02776 PE 4 SV 1	1,76	other
L7EDG1	Receptor ligand binding region family protein OS Microcystis aeruginosa TAIHU98 GN O53 945 PE 4 SV 1	2,26	transport and binding proteins
S3JUE2	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 01248 PE 4 SV 1	2,39	Photosynthesis and respiration
B0JPD3	ABC-type urea transport system substrate binding protein OS Microcystis aeruginosa strain NIES 843 GN MAE 0	2,42	transport and binding proteins
S3JFE5	Aliphatic amidase expression regulating protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 00546 PE 4 SV 1	2,43	transport and binding proteins
L8NYM0	Extracellular ligand binding receptor OS Microcystis aeruginosa DIANCHI905 GN C789 809 PE 4 SV 1	2,55	transport and binding proteins
S3JUJ0	Orange carotenoid binding protein OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 01237 PE 4 SV 1	3,24	absorption of light

entry	Description	117:115 Ratio	funcion
S3JWJ8	Ferredoxin--NADP reductase OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 04680 PE 4 SV 1	3,80	Photosynthesis and respiration
S3K459	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln amidotransferase subunit B OS Microcystis aeruginosa SPC777 GN MAESPC 03480 PE 3 SV 1	4,84	translation
I4IVZ8	ABC transporter nitrate binding protein NrtA OS Microcystis aeruginosa PCC 9701 GN nrtA PE 4 SV 1	9,53	transport and binding proteins