

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



Thiago Corrêa de Almeida

**Metagenômica de um Ecossistema Estromatolitogênico**  
**(Lagoa Salgada, São João da Barra, RJ, Brasil)**

Rio de Janeiro

2022

Thiago Corrêa de Almeida

**Metagenômica de um Ecossistema Estromatolitogênico  
(Lagoa Salgada, São João da Barra, RJ, Brasil)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Sotero Martins.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca.

Rio de Janeiro

2022

Título do trabalho em inglês: Metagenomics of a Stromatolithogenic Ecosystem (Salgada Lagoon, São João da Barra, RJ, Brazil).

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

A447m Almeida, Thiago Corrêa de.  
Metagenômica de um Ecossistema Estromatolitogênico (Lagoa Salgada, São João da Barra, RJ, Brasil) / Thiago Corrêa de Almeida. -- 2022.  
122 f. : il. color.

Orientadora: Adriana Sotero Martins.  
Coorientador: Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca.  
Tese (Doutorado em Saúde Pública e Meio Ambiente ), Rio de Janeiro, 2022.  
Bibliografia: f. 104-119.

1. Metagenômica. 2. Laguna Costeira. 3. Classificação. 4. Origem da Vida.  
5. Cianobactérias. I. Título.

CDD 579.3

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348  
Biblioteca de Saúde Pública

Thiago Corrêa de Almeida

**Metagenômica de um Ecossistema Estromatolítico  
(Lagoa Salgada, São João da Barra, RJ, Brasil)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 04 de agosto de 2022.

Banca de Examinadora

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elvira Carvajal

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Prof. Dr. Maulori Curié Cabral

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.<sup>a</sup> Dra. Natasha Berendonk Handam

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Nelson Peixoto Kotowski

Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca (Coorientador)

Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Sotero Martins (Orientadora)

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2022

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, em especial minha mãe Maria Stella, meu pai Ronaldo e meu irmão Bernardo por estarem sempre ao meu lado, dando suporte nos momentos de necessidade. Sem essa ajuda, a caminhada até aqui teria sido infinitamente mais difícil.

A todos os amigos e amigas pelas palavras de incentivo, apoio e momentos de alegria, tão importantes durante esse período de estudo e pandemia. Citar o nome de todos vocês não caberia nesse espaço.

A minha orientadora Profa. Dra. Adriana Sotero Martins e coorientador Dr. Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca pelos ensinamentos, atenção e auxílio permanente durante todo o período do doutorado e desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de turma e equipe de pesquisa, em especial Priscila Gonçalves e Natasha Handam pela inestimável ajuda durante as etapas laboratoriais, e George Ventura. Todos foram de grande importância durante os momentos de dificuldade deste trabalho.

A todos os membros que compõem a banca examinadora, pelas sugestões e críticas que visaram a melhoria e aperfeiçoamento do estudo.

Por fim, a todos os professores e funcionários da Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP, em especial do Programa de Saúde Pública e Meio Ambiente, pela forma com que realizam seus trabalhos.

## RESUMO

A Lagoa Salgada é um corpo aquático hipersalino costeiro localizado no norte do Estado do Rio de Janeiro e reconhecida pela presença de estromatólitos. O ambiente lagunar está localizado em uma região de franca expansão urbana, onde as atividades antrópicas apresentam potencial para promover alterações físicas, químicas e microbiológicas no ecossistema. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade microbiana presente na Lagoa Salgada através da abordagem metagenômica. O material genético obtido da amostra coletada sequenciado pelo método *shotgun*. Os dados metagenômicos foram analisados utilizando o *pipeline* MetaWrap versão 1.3 para caracterização da diversidade microbiana e anotações funcionais dos genes. Análises colimétricas e físico-químicas também foram realizadas para avaliar a qualidade sanitária da água. Proteobacteria e Cyanobacteria foram os filos que apresentaram maior quantidade de sequências, constituindo-se assim os grupos dominantes na amostra. Grande parte dos genes da amostra apresentaram funções relacionadas a processos metabólicos, biossintéticos, processos de ligação, atividades enzimáticas de liase e ligase e formação de estruturas celulares. As vias metabólicas de biossíntese de metabólitos secundários, aminoácidos, metabolismo microbiano e do carbono se destacaram. Anotações associadas ao estresse ambiental (resposta ao estresse oxidativo, osmótico e térmico) e aos processos de fotossíntese, fixação de carbono, metabolização do nitrogênio e ao ciclo do enxofre também estiveram presentes. Dentre as espécies de actinobactérias analisadas, foram identificados um total de 72 produtos naturais com 16 apresentando percentual de similaridade acima de 50%. *Rhodococcus opacus* e *Streptomyces pluripotens* apresentaram o número de regiões gênicas com capacidade de sintetização de metabólitos secundários. No grupo de cianobactérias foram identificados 42 produtos naturais, sendo que 20 deles apresentavam percentual de similaridade acima de 50%. O gênero *Nostoc* englobou as espécies com o maior número de representações genicas. Os resultados obtidos por este estudo evidenciam a diversidade microbiana existente no ambiente aquático da Lagoa Salgada, assim como indicam a existência de um interessante potencial biotecnológico passível de ser explorado em trabalhos futuros. Todos os fatos destacados reforçam ainda mais a necessidade de preservação e proteção integral do ecossistema da lagoa com o intuito salvaguardar as riquezas existentes neste ambiente singular, e exploração sustentável como área de recreação.

Palavras-chaves: metagenômica; microrganismos; ambiente hipersalino; estromatólitos.

## ABSTRACT

Lagoa Salgada is a coastal hypersaline water body located in the north of Rio de Janeiro State and recognized by the presence of stromatolites. The lagoon environment is located in a region of rapid urban expansion, where human activities have the potential to promote physical, chemical and microbiological changes in the ecosystem. The objective of this work was to characterize the microbial diversity present in Lagoa Salgada through the metagenomic approach. The genetic material obtained from the collected sample was sequenced by the shotgun method. Metagenomic data were analyzed using the MetaWrap pipeline version 1.3 (modular software that automates the main tasks in metagenomic analysis) for characterization of microbial diversity and functional annotations of genes. Colimetric and physicochemical analyzes were also carried out to evaluate the sanitary quality of the waters of Lagoa Salgada, for use as a recreation area. Proteobacteria and Cyanobacteria were the phyla that presented the highest numbers of sequences, being the dominant groups in the sample. Several genera belonging to other phyla were also identified. Most of the genes in the sample showed functions related to metabolic and biosynthetic processes, binding processes, lyase and ligase enzymatic activities and formation of cellular structures. The metabolic pathways of biosynthesis of secondary metabolites, amino acids, microbial and carbon metabolism stood out. Annotations associated with environmental stress (response to oxidative, osmotic and thermal stress) and the processes of photosynthesis, carbon fixation, nitrogen metabolism and the sulfur cycle were also present. Among the species of actinobacteria analyzed, a total of 72 natural products were identified, with 16 presenting a similarity percentage above 50%. *Rhodococcus opacus* and *Streptomyces pluripotens* presented the number of gene regions capable of synthesizing secondary metabolites. In the cyanobacterial group, 42 natural products were identified, 20 of which had a similarity percentage above 50%. The genus *Nostoc* encompassed the species with the highest number of genetic representations. The results obtained by this study show the microbial diversity existing in the aquatic environment of Lagoa Salgada, as well as indicate the existence of an interesting biotechnological potential that can be explored in future works. All the facts highlighted further reinforce the need for preservation and integral protection of the lagoon's ecosystem in order to safeguard the riches existing in this unique environment, and sustainable exploitation as a recreation area.

Keywords: metagenomics; microorganisms; hypersaline environment; stromatolites.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Lagoas e laguna da região norte fluminense.....	16
Figura 2 -	Localização da Lagoa Salgada.....	17
Quadro 1 -	Classe e tipos de uso destinados às águas doces definidas pela Resolução Conama nº 357/2005.....	22
Quadro 2 -	Classes e tipos de uso destinados às águas salinas definidas pela Resolução Conama nº 357/2005.....	23
Quadro 3 -	Classes e tipos de uso destinado às águas salobras definidas pela Resolução Conama nº 357/2005.....	24
Figura 3 -	Unidades de Conservação (UC) previstas para a área de Influência do empreendimento. Em vermelho os limites propostos para a APA de Grussaí.....	26
Figura 4 -	Limite territorial do Parque Estadual Lagoa do Açú (PELAG).....	27
Figura 5 -	Exemplo de fluxograma das etapas da análise metagenômica e interação com a bioinformática.....	30
Figura 6 -	Organização de domínio das diferentes PKSS.....	32
Figura 7 -	Características estruturais das enzimas NRPS.....	34
Figura 8 -	Fluxograma etapas de processamento da amostra e análise metagenômica...	37
Figura 9 -	Fluxograma geral do pipeline Metawrap.....	41
Gráfico 1 -	Número de sequências dos filios pertencentes ao domínio Bacteria.....	46
Figura 10 -	Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Proteobacteria.....	48
Figura 11 -	Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Cyanobacteria.....	50
Figura 12 -	Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Actinobacteria.....	54
Figura 13 -	Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Bacteroidetes.....	58
Figura 14 -	Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Firmicutes.....	61
Figura 15 -	Representação da diversidade viral encontrada na amostra.....	63
Figura 16 -	Modelo de calcificação da bainha extracelular em cianobactérias.....	76



Gráfico 2 -	Tipo e número de metabólitos secundários sintetizados pelas espécies de actinobactérias.....	90
Gráfico 3 -	Tipo e número de metabólitos secundários sintetizados pelas espécies de cianobactérias.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores das concentrações de cada diluição no método de filtração para coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	39
Tabela 2 -	Resultado dos parâmetros físico-químicos da amostra de água e valores máximos permitidos (VMP) pela Resolução CONAMA 357/2005 .....	43
Tabela 3 -	Resultados dos parâmetros colimétricos da amostra para coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	45
Tabela 4 -	Principais classes, gêneros e espécies identificadas no filo Proteobacteria.....	49
Tabela 5 -	Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Cyanobacteria.....	51
Tabela 6 -	Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Actinobacteria.....	55
Tabela 7 -	Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Bacteroidetes.....	59
Tabela 8 -	Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Firmicutes....	62
Tabela 9 -	Principais espécies e famílias identificadas pertencentes ao grupo dos vírus .....	65
Tabela 10 -	Principais anotações funcionais relacionadas a categoria funções moleculares (p<0,05).....	68
Tabela 11 -	Principais anotações funcionais relacionadas a categoria processos biológicos (p<0,05).....	69
Tabela 12 -	Principais anotações funcionais relacionadas a categoria componentes celulares (p<0,05) .....	71
Tabela 13 -	Principais vias metabólicas identificadas na amostra (p<0,05).....	71
Tabela 14 -	Anotações funcionais relacionadas ao estresse ambiental (p<0,05).....	72
Tabela 15 -	Anotações relacionadas aos processos de fotossíntese e fixação do carbono (p<0,05).....	74
Tabela 16 -	Anotações relacionadas ao ciclo do enxofre (p<0,05).....	79
Tabela 17 -	Anotações relacionadas ao ciclo do nitrogênio (p<0,05).....	81
Tabela 18 -	Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para <i>Streptomyces</i> sp.....	84
Tabela 19 -	Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para	

	<i>Mycobicibacterium</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., e <i>Rhodococcus</i> sp.....	87
Tabela 20 -	Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para <i>Synechococcus</i> sp.....	94
Tabela 21 -	Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para <i>Calothrix</i> sp.....	96
Tabela 22 -	Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para <i>Nostoc</i> sp., <i>Microcystis</i> sp. e <i>Gloeotheca citriformis</i> .....	97

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	LAGOAS COSTEIRAS.....	14
2.2	LAGOAS DO NORTE FLUMINENSE.....	14
2.3	CARACTERIZAÇÃO DA LAGOA SALGADA.....	17
2.4	IMPACTOS ANTRÓPICOS NA LAGOA SALGADA.....	18
2.5	LEGISLAÇÃO DOS SISTEMAS LAGUNARES.....	19
2.6	USO RECREATIVO DAS LAGOAS.....	20
2.7	PRESERVAÇÃO DA LAGOA SALGADA.....	24
2.8	METAGENÔMICA.....	28
2.9	BIOINFORMÁTICA.....	29
2.10	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	31
<b>2.10.1</b>	<b>Policetídeos (PKs) e Peptídeos não ribossômicos (NRPs).....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	GERAL.....	36
4.2	ESPECÍFICOS.....	36
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	38
5.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	38
5.3	ANÁLISES COLIMÉTRICAS.....	38
5.4	FILTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	39
5.5	SEQUENCIAMENTO DO DNA EXTRAÍDO.....	40
5.6	ANÁLISE DOS DADOS METAGENÔMICOS.....	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMOSTRA DE ÁGUA.....	42
6.2	CARACTERIZAÇÃO COLIMÉTRICA DA AMOSTRA DE ÁGUA..	44
6.3	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	46
<b>6.3.1</b>	<b>Filo Proteobacteria.....</b>	<b>47</b>
<b>6.3.2</b>	<b>Filo Cyanobacteria.....</b>	<b>50</b>

<b>6.3.3</b>	<b>Filo Actinobacteria.....</b>	<b>54</b>
<b>6.3.4</b>	<b>Filo Bacteroidetes.....</b>	<b>57</b>
<b>6.3.5</b>	<b>Filo Firmicutes.....</b>	<b>60</b>
<b>6.3.6</b>	<b>Vírus.....</b>	<b>63</b>
<b>6.4</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES.....</b>	<b>68</b>
<b>6.5</b>	<b>POTENCIAL DOS MICRORGANISMOS QUANTO A CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PKS E NRPS.....</b>	<b>83</b>
<b>6.5.1</b>	<b>Actinobactérias.....</b>	<b>84</b>
<b>6.5.2</b>	<b>Cianobactérias.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>AÇÕES FUTURAS.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICE A - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA - KIT DNEASY POWER WATER (QUIAGEN).....</b>	<b>120</b>
	<b>APÊNDICE B - GRÁFICO DA PONTUAÇÃO DE QUALIDADE DE TODAS AS PARES DE BASE (BP) DO SEQUENCIAMENTO</b>	<b>122</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As lagoas costeiras são corpos de águas rasas separados do oceano por uma barreira física ou conectados a ele, pelo menos temporariamente, por uma ou mais entradas restritas, sendo geralmente orientados paralelamente à costa (BIRD, 1994). São importantes devido às suas características biológicas, geológicas, físicas e químicas, além de serem exploradas pelo homem para o desenvolvimento de diversas atividades como: transporte, suprimento de alimentos, mineração e recreação (CATAUDELLA, 2015).

No Brasil, é possível evidenciar três grandes grupos de sistemas lacustres; os lagos Amazônicos, agrupados em lagos de várzea e de terra firme, os lagos do Pantanal Mato-grossense (Mato Grosso, MS), onde encontram-se os corpos de água salobra, e os lagos e lagunas costeiras, que estão distribuídos por todo o litoral brasileiro (APRILE et al, 2001). Dentro desse contexto, a Lagoa Salgada está inserida no último grupo. Localizada na região norte do Estado do Rio de Janeiro, a lagoa é um corpo aquático hipersalino de restinga, com extensão superficial de aproximadamente de 16 Km<sup>2</sup>, que pode ser considerada patrimônio geopaleontológico da humanidade devido a presença de estruturas estromatolíticas em seu ecossistema. Os estromatólitos, estruturas biogênicas formadas pela união e aprisionamento de sedimentos, através da precipitação do carbonato de cálcio, por ação das cianobactérias presente no respectivo microbioma ambiental (VISSCHER e STOLZ, 2005; FOSTER e GREEN, 2011; SILVA et al, 2013), são utilizados como marcadores evolutivos, sendo referências para estudos sobre origem da vida primitiva e variações das condições ambientais pretéritas (COIMBRA et al, 2000; SILVA et al, 2008; CASTRO et al., 2016). Possuem importância geológica e paleontológica devido a ocorrência em poucas regiões do mundo - Hamelin Pool, SharkBay, Austrália; Highborne Cay e Storr's Lake, Bahamas; Kiritimati Atoll, Pacífico Central; Lake Socompa, Argentina; lagoas costeiras da África do Sul (PROEMSE et. al, 2017).

A Lagoa Salgada está localizada em uma região que apresenta atividade agropecuária e significativa expansão urbana. Tais atividades vêm promovendo alterações no ambiente físico (remoção de estruturas estromatolíticas e processo de assoreamento) e hidroquímico da lagoa (uso de agrotóxicos nas lavouras da região e aumento da poluição) (SRIVASTAVA, 1999). Destaca-se, também, a presença de grandes empreendimentos industriais na região desse ecossistema, como o Complexo Portuário do Açú.

Diante desse cenário, a aplicação da metagenômica, abordagem que permite acessar genomas de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis presentes em uma amostra ambiental,

possibilitando a descoberta de novos genes, e posteriormente, a inferência de suas funções, (TUFFIN et al, 2009), se apresenta como uma valiosa oportunidade para a exploração, identificação e caracterização das sequências de DNA de diversos grupos de microrganismos presentes no ecossistema da Lagoa Salgada, que possam ser prospectados biotecnologicamente, e uma oportunidade de conhecer mais sobre a biodiversidade de um ecossistema específico de importância planetária existente em solo brasileiro.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. LAGOAS COSTEIRAS**

As lagoas costeiras podem ser definidas como áreas de água relativamente rasas que foram parciais ou totalmente isoladas do mar pela formação de barreiras deposicionais, geralmente composta de areia, acumulada acima do nível da maré alta por ação das ondas (BIRD, 1994). Sua presença se estende por diversas regiões litorâneas do planeta com variadas configurações climáticas e ambientais.

Segundo Bird (1994), as formações geomorfológicas das lagoas costeiras derivaram geralmente da submersão de vales ou planícies pela ação do mar durante os estágios finais da transgressão marinha no final do Quaternário, onde, nas costas litorâneas tectonicamente estáveis, elevou o mar a aproximadamente seu nível atual, cerca de 6000 anos atrás.

Em relação aos gradientes sedimentológicos, hidrológicos e biológicos, as lagoas costeiras apresentam mosaicos complexos de diferentes habitats, onde se observa uma heterogeneidade ambiental significativa, não apenas de uma lagoa para outra, mas também dentro da mesma lagoa (por exemplo, conectividade de redes alimentares, interfaces com a bacia hidrográfica da lagoa e mar adjacente etc.) (CATAUDELLA, 2015). A quantidade e a qualidade da água são influenciadas pela taxa em que a lagoa perde ou ganha água por evaporação, precipitação, entrada de água subterrânea, escoamento superficial e troca com o oceano (ALLEN et al. 1981).

A estrutura composta e as funções desses ecossistemas altamente resilientes e produtivos, juntamente com sua eficiente transferência trófica, oferecem oportunidades únicas para o desenvolvimento de diversas atividades humanas. No entanto, devido a ineficácia das medidas de preservação adotadas, as lagoas costeiras passaram a apresentar um significativo processo de degradação: reivindicações de terras, poluição e falta de manejo, entre outros fatores, modificaram fortemente a estrutura e o funcionamento desses ecossistemas costeiros sensíveis em diversos litorais do mundo (CATAUDELLA, 2015).

### **2.2. LAGOAS DO NORTE FLUMINENSE**

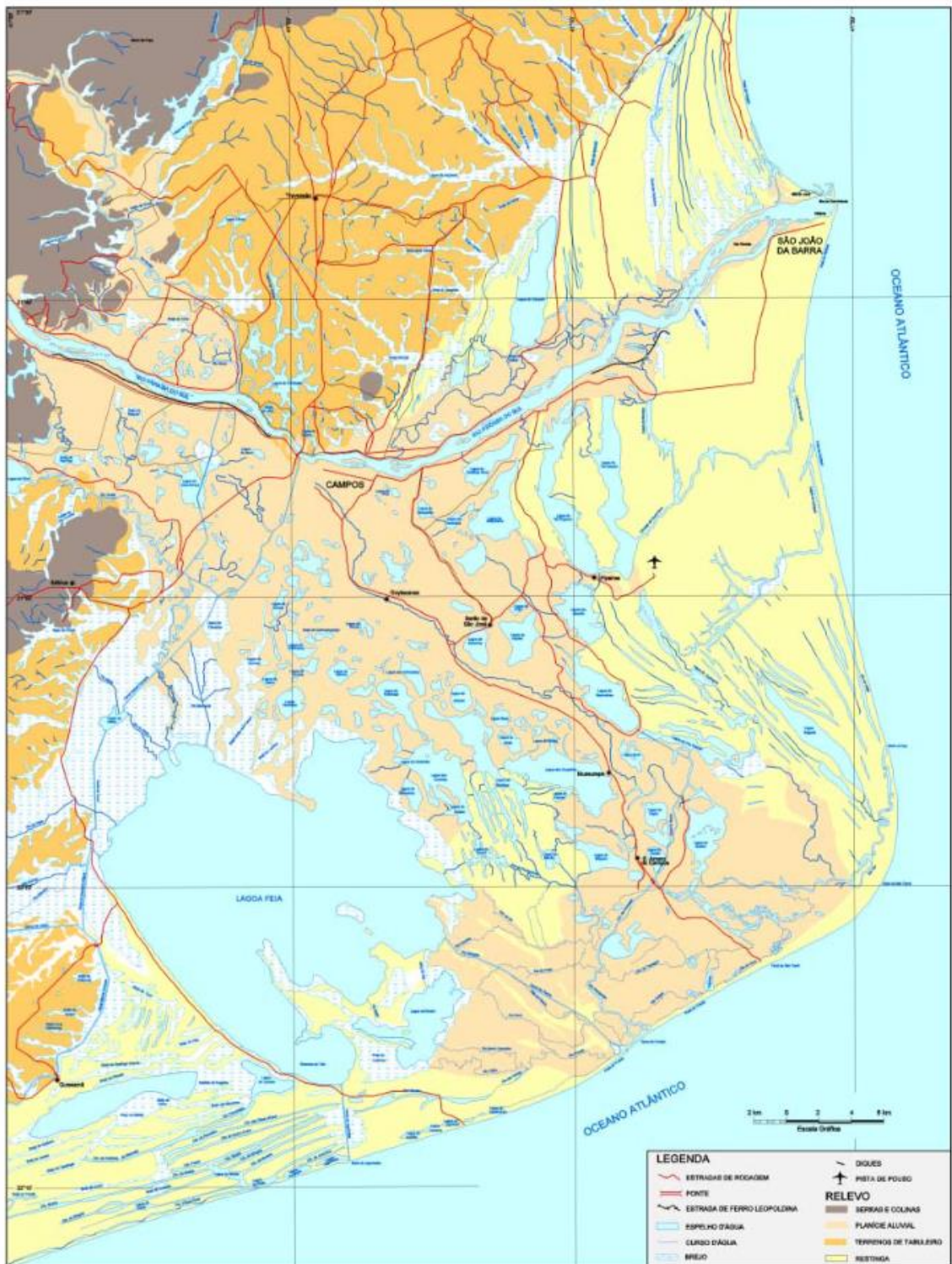
O Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro é conhecido por ser uma região que apresenta uma riqueza de sistemas lagunares naturais. Sua formação geológica, caracterizada



serras, colinas, tabuleiros, planície aluvial e restinga produziram, ao longo dos anos, uma grande diversidade de lagoas e lagunas, que diferem entre si quanto a localização, tamanho e composição da água - doce ou com características salobras ou marinhas (TUDESCO, 2011).

As bacias hidrográficas mais proeminentes da região norte do estado são a da Lagoa Feia, as dos rios Paraíba do Sul e a do Itabapoana. Da bacia da Lagoa Feia afluem os rios Ururaí e Macabu. Da Lagoa Feia, no passado, defluíam cinco canais naturais centralizados pelo conhecido rio Iguaçu, hoje, a Lagoa do Açú (BIDEGAIN, 2002). Destacam-se também as pequenas bacias que descendem dos relevos tabulares e que foram barradas por praias e restingas, mantendo ou não comunicação periódica com o mar. Surgiram, assim, lagoas alongadas, entre as quais se destacam os rios/lagoas Funda, d'Anta, do Siri, Lagoinha, das Pitas, do Mangue, Caculucagem, da Tiririca, da Boa Vista, do Morobá, Salgada, Doce, Guriri, do Largo, de Buena, de Macabu-Sesmaria, de Imburi, da Saudade, de Santa Maria, do Brejo Grande, Preta, Paulista, de Carapebus, Comprida e Cabiúnas (Figura 1) (BIDEGAIN, 2002).

Figura 1. Lagoas e lagunas (em azul) da região norte fluminense.



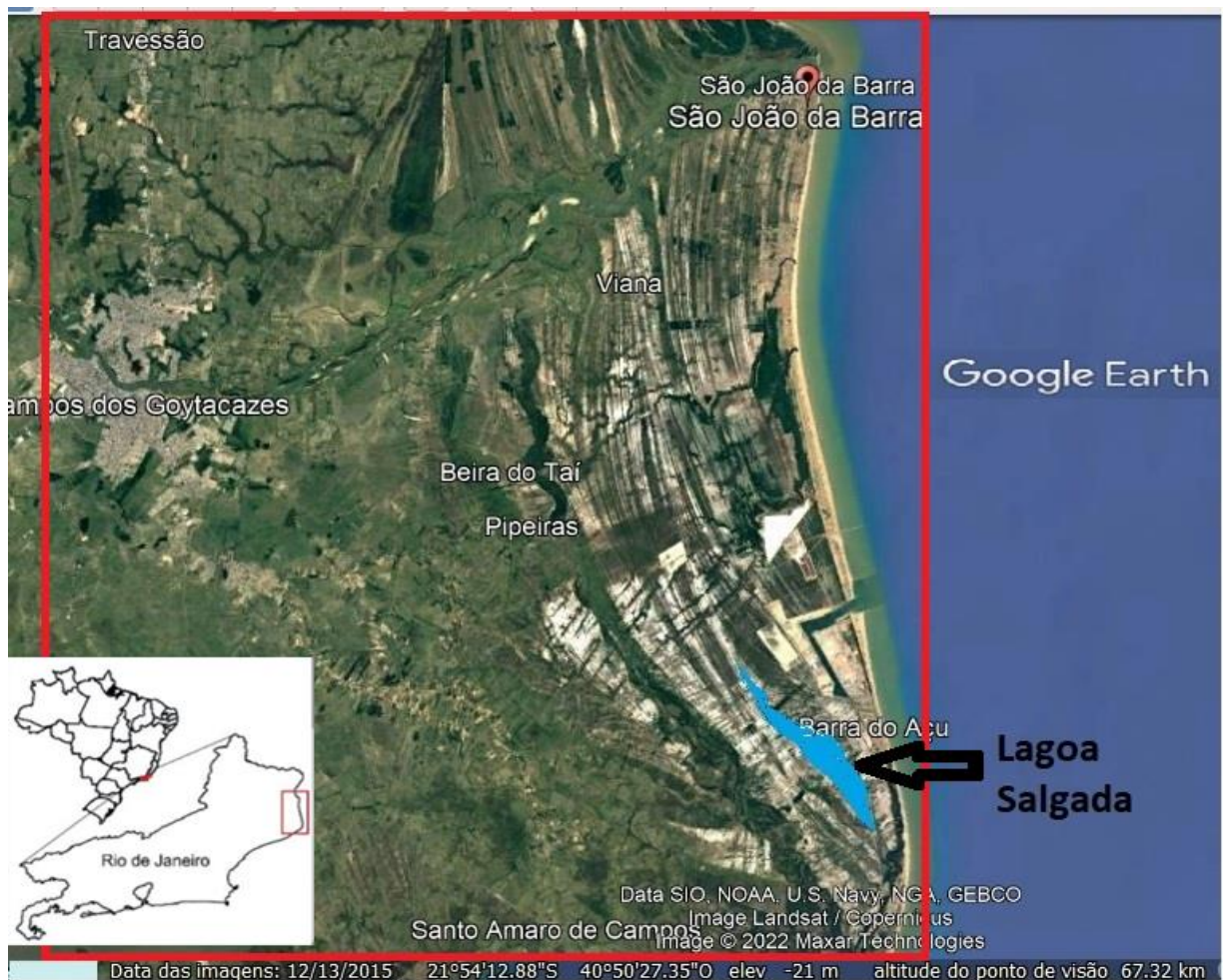
Fonte: Retirado de BIDEGAIN, 2002.

Apesar da relativa diversidade de corpos hídricos na região, inúmeros rios e lagoas sofreram sucessivas alterações em sua configuração inicial (devido à expansão agropecuária e urbana), sendo parcial ou totalmente drenadas e aterradas (TUDESCO, 2011; BIDEGAIN, 2002).

### 2.3. CARACTERIZAÇÃO DA LAGOA SALGADA

A Lagoa Salgada é um corpo aquático hipersalino, localizada no litoral norte do estado do Rio de Janeiro ( $41^{\circ}00'30''\text{W}$  e  $21^{\circ}54'10''\text{S}$ ), sudeste do Brasil, próximo ao Cabo de São Tomé, entre os municípios de Campos dos Goytacazes e São João da Barra (SRIVASTAVA, 2002) (Figura 2). Sua extensão superficial é de aproximadamente  $16 \text{ Km}^2$ , com 1,9 Km de largura e 8,6 Km de comprimento, possuindo uma conexão com o mar através do rio Açú (SILVA, 2002).

Figura 2. Localização da Lagoa Salgada.



Fonte: Google Earth – Imagem Landsat, elevação 21 metros, obtida do Google Earth. Imagem de 12/12/2015, obtida em 05/02/2022.

A lagoa está situada em uma região caracterizada por um clima tropical, com predominância de fortes ventos nordeste. Entre os meses de fevereiro a abril predomina a baixa pluviosidade, com rebaixamento da lâmina da água. Entretanto, entre os meses de agosto e setembro, devido à alta pluviosidade, a lagoa apresenta-se cheia. Quando cheia, a Lagoa Salgada apresenta lâmina d'água em torno de 1 m (SRIVASTAVA, 2002). A temperatura da água varia de 27°C até 32°C entre março e abril e o pH oscila de 8,0 até 9,1 em direção à porção central da lagoa (DA SILVA E SILVA et al., 2013; TUDESCO, 2011).

A Lagoa Salgada possui significativa importância geopaleontológica devido a presença de estruturas estromatolíticas em seu ecossistema (SRIVASTAVA, 2002; MANSUR et al, 2012). Proemse et al (2017) define os estromatólitos como sendo uma rocha formada por precipitação mineral de estruturas microbianas em camadas repetitivas e laminadas. Neste contexto, Foster e Green (2011) destacam a necessidade de delinear a composição da comunidade das esteiras microbianas associadas a essas estruturas, uma vez que tais esteiras são comunidades multicamadas que conduzem o ciclo biogeoquímico de elementos-chave dentro do ecossistema estromatolítico. Os estromatólitos neoformados são produtos da atividade metabólica do tapete microbiano e do ciclo geoquímico, resultando na acreção e precipitação de estruturas carbonáticas (REID et al, 2000; FOSTER e GREEN, 2011). Os principais constituintes microbianos das estruturas estromatolíticas atuais pertencem aos grupos *Cyanobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* (KÜHL, FENCHEL e KAZMIERCZAK, 2003; FOSTER e GREEN, 2011).

Através do estudo dos estromatólitos abre-se a possibilidade de reconstrução paleoambiental a partir de registros fossilíferos, permitindo apontar quais as condições ambientais que prevaleciam há milhões de anos atrás (SILVA E SILVA et al., 2004).

#### 2.4. IMPACTOS ANTRÓPICOS NA LAGOA SALGADA

A Lagoa Salgada vem sofrendo significativa pressão antrópica ao longo das décadas. Srivastava (1999) lista uma série de atividades humanas com potencial de contaminação do ambiente lagunar, tais como: sítios agropecuários que utilizam agrotóxicos e outros produtos nocivos nas plantações, criando situações altamente perigosas para alterações do ambiente hidro químico da lagoa; utilização do calcário estromatolítico na construção civil (alicerces das casas, pavimentação e fabricação de "cal virgem"); remoção dos estromatólitos para a implementação de pequenas atividades agrícolas (plantação de tomate, pimentão, batata-doce,



milho, etc.). O referido autor reforça que as atividades citadas vêm sendo empregadas há vários anos, e tem causado uma degradação direta nos afloramentos estromatolíticos.

Outro fator que merece destaque é a presença do Complexo Logístico Industrial Portuário do Açú (CLIPA) na região. Com construção iniciada em outubro de 2007 e área total de 90 Km<sup>2</sup>, o Porto do Açú é um complexo portuário privativo de uso misto localizado no município de São João da Barra (LAMMLE, 2017). Segundo Crespo et al (2010), com a implantação do CLIPA existe a possibilidade de ocorrência de novas ondas de migração, crescimento populacional e expansão urbana na região. Todos esses fatores podem gerar graves problemas estruturais e de ordenamento territorial, com impacto ambiental significativo devido a ocupação de várzeas ou áreas de risco, caso não exista um planejamento urbanístico eficaz, respeitado e de crescimento sustentável.

## 2.5. LEGISLAÇÃO DOS SISTEMAS LAGUNARES

As Áreas de Preservação Permanente (APP) são estabelecidas legalmente na publicação da Lei Federal nº 12.651 de 25 de maio de 2012. Segundo a referida lei, APP é uma área protegida, coberta ou não por vegetação nativa, com a função ambiental de preservar os recursos hídricos, a paisagem, a estabilidade geológica e a biodiversidade, facilitar o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar das populações humanas (BRASIL, 2012).

Em relação aos sistemas lagunares, a Lei nº 12.651 dispõe:

*Art. 4º Considera-se Área de Preservação Permanente, em zonas rurais ou urbanas:*

*[...]*

*II - as áreas no entorno dos lagos e lagoas naturais, em faixa com largura mínima de:*

*a) 100 (cem) metros, em zonas rurais, exceto para o corpo d'água com até 20 (vinte) hectares de superfície, cuja faixa marginal será de 50 (cinquenta) metros;*

*b) 30 (trinta) metros, em zonas urbanas;*

Semelhantes aos parâmetros que definem as APPs de cursos d'água (rios), as APPs relativas às lagoas e lagunas também são definidas pela faixa marginal existente ao redor dos seus respectivos corpos d'água. Segundo Tudesco (2011), algumas funções ambientais das lagoas são bem similares às funções exercidas pelos rios, sobretudo no que concerne aos aspectos ligados às suas margens, como habitat de espécies, remoção de nutrientes e controle de sedimentos e enchentes.

## 2.6. USO RECREATIVO DAS LAGOAS

Considerados bens naturais vulneráveis, lagos e lagoas são ambientes característicos da paisagem que contribuem, significativamente, para aumentar a qualidade de vida no meio urbano, proporcionando espaço para atividades recreativas, educativas e, até mesmo, contribuindo para a amenização do clima (MARTÍNEZ-ARROYO e JÁUREGUI, 2000).

No Brasil, atividades recreativas voltadas aos atrativos paisagísticos naturais são fortemente relacionadas a ambientes aquáticos. Nas últimas décadas, lagos e lagoas têm sido bastante utilizadas como refúgio e descanso das pressões da vida moderna (BIELLA e VALENCIO, 2003). Estes ambientes são utilizados e explorados de diversas formas pela população, seja ela local ou não. Vallejo (2013) descreve os diferentes usos do ambiente, inclusive aqueles passíveis de serem desenvolvidos em áreas pertencentes a unidades de conservação (UC). São eles:

- Recreativo - Quando os visitantes praticam a recreação (esportes, diversão e cultura) durante o tempo livre (lazer);
- Comercial - Exploração realizada através de empresas e guias de turismo e ecoturismo, meios de hospedagem, alimentação e venda de produtos;
- Científico - Pesquisadores em trabalhos de investigação científica em diversos campos do conhecimento (ciências da natureza, geociências, ciências sociais);
- Educacional - Programas e atividades de educação e interpretação ambiental, viagens acadêmicas, treinamentos (sobrevivência, montanhismo etc);
- Desenvolvimento pessoal - Programas que utilizam a natureza e a aventura no desenvolvimento de valores de autoconfiança, trabalho em grupo, comunicação e liderança. Incluem-se nesta classe as atividades de desenvolvimento espiritual e religioso.

Dentro deste contexto, é de suma importância o conhecimento sobre a qualidade das águas de um dado corpo hídrico para adequá-lo aos seus mais variados usos, sejam estes consuntivos ou não (MEDEIROS et al, 2016).

O uso da água para fins recreativos pode ser classificado de acordo com o tipo de contato entre o usuário e o meio aquático. O contato primário ocorre quando há um contato íntimo e prolongado do corpo humano com a água, havendo risco de ingestão da mesma (ex. natação, mergulho, esqui aquático, surfe etc). O contato secundário ocorre quando o contato com a água é acidental, ou seja, não é necessário (ex.: pesca, remo, navegação esportiva etc) (SANTOS, et al, 2021).

Visando proteger a saúde humana quanto ao uso recreativo de ambientes aquáticos, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) publicou, em janeiro de 2001, a Resolução CONAMA nº 274/2000, que define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. A referida resolução considera que: a saúde e o bem-estar humano podem ser afetados pelas condições de balneabilidade; a classificação das águas doces, salobras e salinas é essencial à defesa dos níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar as condições de balneabilidade; a necessidade de serem criados instrumentos para avaliar a evolução da qualidade das águas, em relação aos níveis para a balneabilidade, de forma a assegurar as condições necessárias à recreação de contato primário.

A CONAMA nº 274/2000 classifica as águas recreacionais em quatro classes em função da concentração de coliformes fecais (termotolerantes) e *Escherichia coli*. As categorias e valores estão descritos abaixo:

- Excelente: quando em 80% ou mais do conjunto de amostras, obtidas em cinco semanas, no mesmo local, houver, no máximo, 250 coliformes termotolerantes ou 200 *E. coli* por 100 mililitros;
- Muito Boa: quando em 80% ou mais do conjunto de amostras, obtidas em cinco semanas, no mesmo local, houver, no máximo, 500 coliformes termotolerantes ou 400 *E. coli* por 100 mililitros;
- Satisfatória: quando em 80% ou mais do conjunto de amostras, obtidas em cinco semanas, no mesmo local, houver, no máximo, 1000 coliformes termotolerantes ou 800 *E. coli* por 100 mililitros;

- Imprópria: não atendimento aos critérios estabelecidos para as águas próprias e outros fatores que contraindiquem capazes de oferecer riscos à saúde humana ou tornar desagradável à recreação.

Já Resolução CONAMA nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2005), define, em seu Art. 3º, que as águas doces, salobras e salinas do território nacional sejam classificadas segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em classes de qualidade. Os parâmetros de qualidade determinados pela resolução supracitada estabelecem limites individuais para cada substância em cada classe (Art, 7). Abaixo (Quadro 1, Quadro 2 e Quadro 3) estão apresentadas as classes e tipos de uso das águas doces, salinas e salobras (BRASIL, 2005).

Quadro 1. Classe e tipos de uso destinados às águas doces definidas pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

Classe	Tipo de uso
Classe Especial	a) abastecimento para consumo humano, com desinfecção; b) preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; c) a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.
Classe 1	a) abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; b) proteção das comunidades aquáticas; c) recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274/2000; d) irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e) proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas
Classe 2	a) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;



	<ul style="list-style-type: none"> <li>b) proteção das comunidades aquáticas;</li> <li>c) recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 274/2000;</li> <li>d) irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto;</li> <li>e) aquicultura e atividade de pesca.</li> </ul>
Classe 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; b) irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;</li> <li>c) pesca amadora;</li> <li>d) recreação de contato secundário;</li> <li>e) dessedentação de animais.</li> </ul>
Classe 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) navegação;</li> <li>b) harmonia paisagística.</li> </ul>

Fonte: BRASIL, 2005.

Quadro 2. Classes e tipos de uso destinados às águas salinas definidas pela Resolução CONAMA n<sup>o</sup> 357/2005.

Classe	Tipo de uso
Classe Especial	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral;</li> <li>b) preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas</li> </ul>
Classe 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA no 274/2000; b) proteção das comunidades aquáticas;</li> <li>c) aquicultura e atividade de pesca.</li> </ul>
Classe 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) pesca amadora;</li> <li>b) recreação de contato secundário.</li> </ul>
Classe 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) navegação;</li> <li>b) harmonia paisagística.</li> </ul>

Fonte: BRASIL, 2005.

Quadro 3. Classes e tipos de uso destinado às águas salobras definidas pela Resolução CONAMA n° 357/2005.

Classe	Tipo de uso
Classe Especial	a) a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; b) preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas
Classe 1	a) recreação de contato primário, conforme Resolução CONAMA n° 274/2000; b) proteção das comunidades aquáticas; c) aquicultura e atividade de pesca; d) abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; e) irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto.
Classe 2	a) pesca amadora; b) recreação de contato secundário.
Classe 3	a) navegação; b) harmonia paisagística.

Fonte: BRASIL, 2005.

As resoluções CONAMA n° 274/2000 e CONAMA n° 357/2005 são as principais ferramentas utilizadas na classificação de corpos hídricos, servindo como referência para a definição da qualidade da água, assim como seu uso e destinação.

## 2.7. PRESERVAÇÃO DA LAGOA SALGADA

A proteção do ecossistema da Lagoa Salgada e de sua respectiva zona de amortecimento é essencial para a preservação do seu inestimável valor ambiental. Entretanto, ao longo das últimas décadas, raras ações foram efetivamente implantadas com o objetivo de manutenção integral desse ecossistema. Somente nos últimos anos os órgãos responsáveis, visando impedir a degradação da lagoa devido à expansão urbana, implantação de grandes empreendimentos industriais e crescimento da atividade agropecuária na região, passaram a implementar políticas e leis que pudessem assegurar sua proteção. As políticas adotadas foram:

Em 2008, o Plano Diretor do município de Campos dos Goytacazes (Lei nº 7.972/08), insere em seu Art. 56, inciso IV, a criação e implementação de diversas Unidades de Conservação dentro do seu território, visando a proteção de diversos ecossistemas, dentre os quais estão inseridos os lagos e lagoas da região:

*Art.56. Para a criação, proteção e recuperação de áreas verdes deverão ser executadas as seguintes ações e medidas de planejamento:*

*[...]*

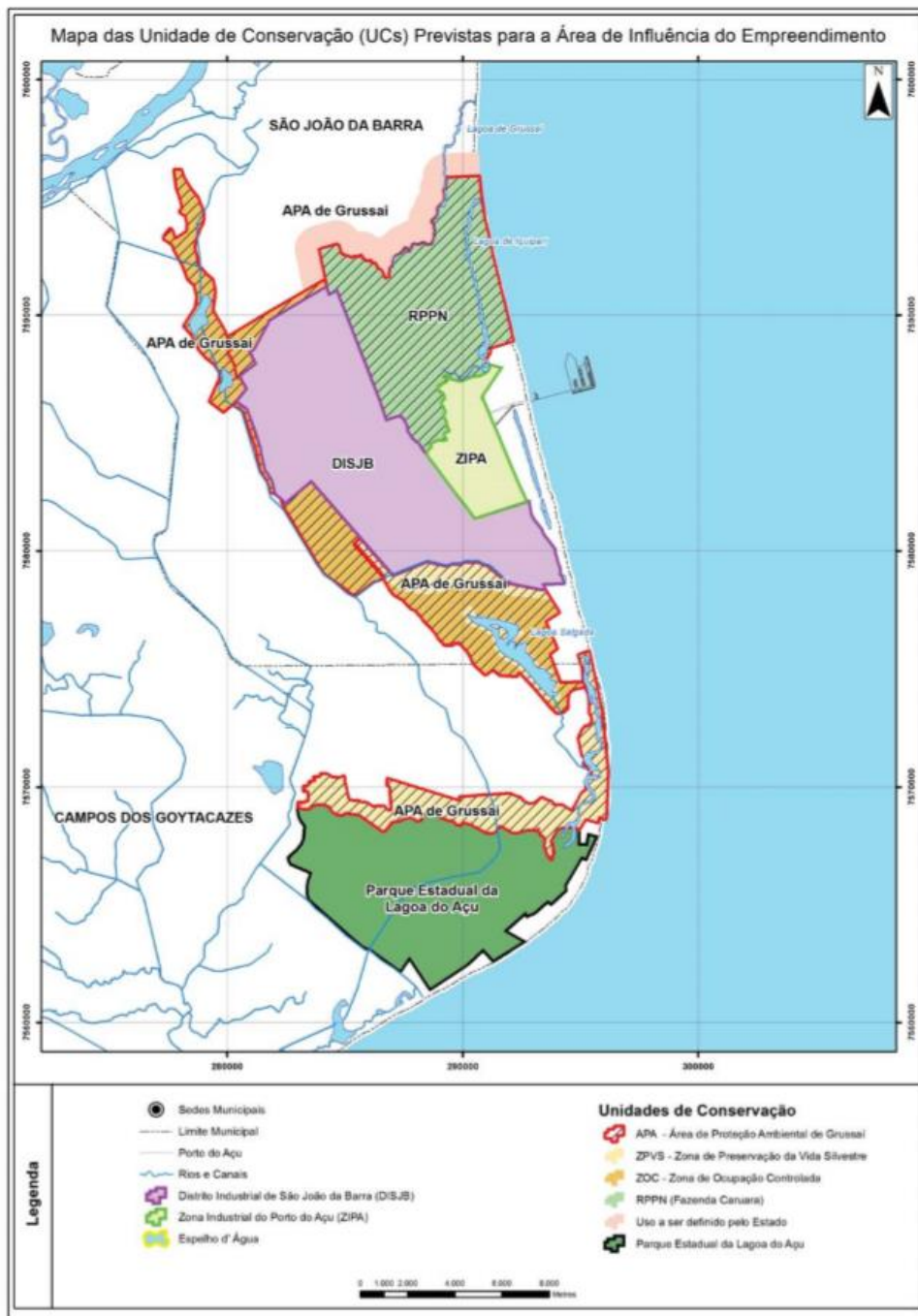
*IV - Elaborar estudos para a criação e implantação, ao menos, das Unidades de Conservação abaixo, com seus respectivos planos de manejos:*

*[...]*

*n) APA's das lagoas dos Prazeres, Feia e do Salgado.*

No mesmo período, com a instalação do Complexo Portuário do Açú, foi proposta a criação de três Unidades de Conservação (UC) na região do empreendimento - o Parque Estadual da Lagoa do Açú, a Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN) Fazenda Caruara; e a Área de Proteção Ambiental (APA) de Grussaí (COSTA & OLIVEIRA, 2017), com a finalidade de proteção dos ecossistemas locais. No projeto inicial, a APA de Grussaí possuía limites que incluíam as lagoas de Grussaí, Iquipari, Salgada, do Açú, localizados ao norte, e o banhado de Boa Vista, ao sul, todas localizadas em áreas de restinga próximo ao empreendimento portuário (Figura 3). No entanto, a criação da APA não chegou a ser realizada. Segundo Costa & Oliveira (2017), com a implantação do porto e mudanças no projeto, os limites iniciais do Parque de Grussaí foram reduzidos, de modo que a sua zona de amortecimento não afetasse o empreendimento. Somente em 2012 os limites da APA foram englobados parcialmente com a criação da UC Parque Estadual Lagoa Do Açú.

Figura 3. Unidades de Conservação (UC) previstas para a área de Influência do empreendimento. Em vermelho os limites propostos para a APA de Grussai.



Fonte: Retirado do Relatório de Impacto Ambiental (RIMA) Ecologus Engenharia Consultiva, 2011.

Em 2010, com a parceria de entidades acadêmicas nacionais, governamentais (nos três níveis), privadas e ONGs foi proposta a criação do Geoparque Costões e Lagunas, no Estado do Rio de Janeiro. Abrangendo 16 municípios e uma área de, aproximadamente, 10.900 km<sup>2</sup>, o

geoparque visa a preservação e divulgação das riquezas biológicas e geológicas do litoral fluminense (MANSUR et al., 2012). Foram selecionados diversos geosítios de relevância ambiental, histórica, cultural e científica, no qual está inserido o ecossistema da Lagoa Salgada.

No ano de 2012, o Parque Estadual Lagoa do Açú (PELAG) foi criado através do Decreto nº 43.522/12. Com uma área total de 8.251,45 hectares, o parque é classificado como uma Unidade de Proteção Integral, cujo objetivo é assegurar a preservação de remanescentes de vegetação nativa de Mata Atlântica como restinga, mangue e áreas alagadas da região (INEA, 2019). Segundo Costa & Oliveira (2017), o PELAG acabou englobando, parcialmente, as áreas propostas para a APA de Grussaí, apresentando assim uma configuração final que abrange, em seus limites, o Banhado da Boa Vista, a Lagoa do Açú e somente uma parte da Lagoa Salgada (Figura 4).

Figura 4. Limite territorial do Parque Estadual Lagoa do Açú (PELAG).



Fonte: Instituto Estadual do Ambiente (INEA, 2012)

## 2.8. METAGENÔMICA

Konstantinidis, Rosselló-Móra e Amann (2017) afirmaram que a grande maioria dos microrganismos em quase todos os ambientes da Terra ainda não tinham sido cultivados e devidamente estudados. Entretanto, esse cenário começou a ser alterado no final da mesma década com o desenvolvimento da metagenômica.

A metagenômica, definida como a análise funcional e genômica de todos os microrganismos de um nicho ambiental específico sem a necessidade de cultivo (HANDELSMAN et al. 1998), surgiu como um esforço para descobrir mais sobre a diversidade microbiana existentes em ambientes naturais como solo, água, ar, efluentes, e até tratos gastrointestinais de vertebrados e invertebrados (LÓPEZ-GARCÍA e MOREIRA 2008).

A metodologia aplicada na metagenômica consiste, em termos simplificados, no isolamento direto de DNA de uma amostra definida, seguido pela clonagem dos genomas completos de toda a população microbiana existente na amostra (LANGER et al, 2006). Ao final, a biblioteca de DNA resultante é analisada em busca de sequências de interesse.

As abordagens ômicas proporcionaram significativa mudança sobre a perspectiva microbiana envolvendo estrutura, função e ecologia. Através das tecnologias de sequenciamento de nova geração - *Next Generation Sequencing* (NGS) - aliadas a ferramentas de bioinformática e estatística para análise das sequências de DNA, é possível obter caracterizações de populações microbianas diretamente de qualquer amostra ambiental (Meneghine, 2016). Estudos realizados em solo sob diferentes cultivos e manejos (MENDES et al., 2014) e ambientes água doce (STEFFEN et al, 2012) e marinhas (VENTER et al, 2004) são exemplos de tais aplicações.

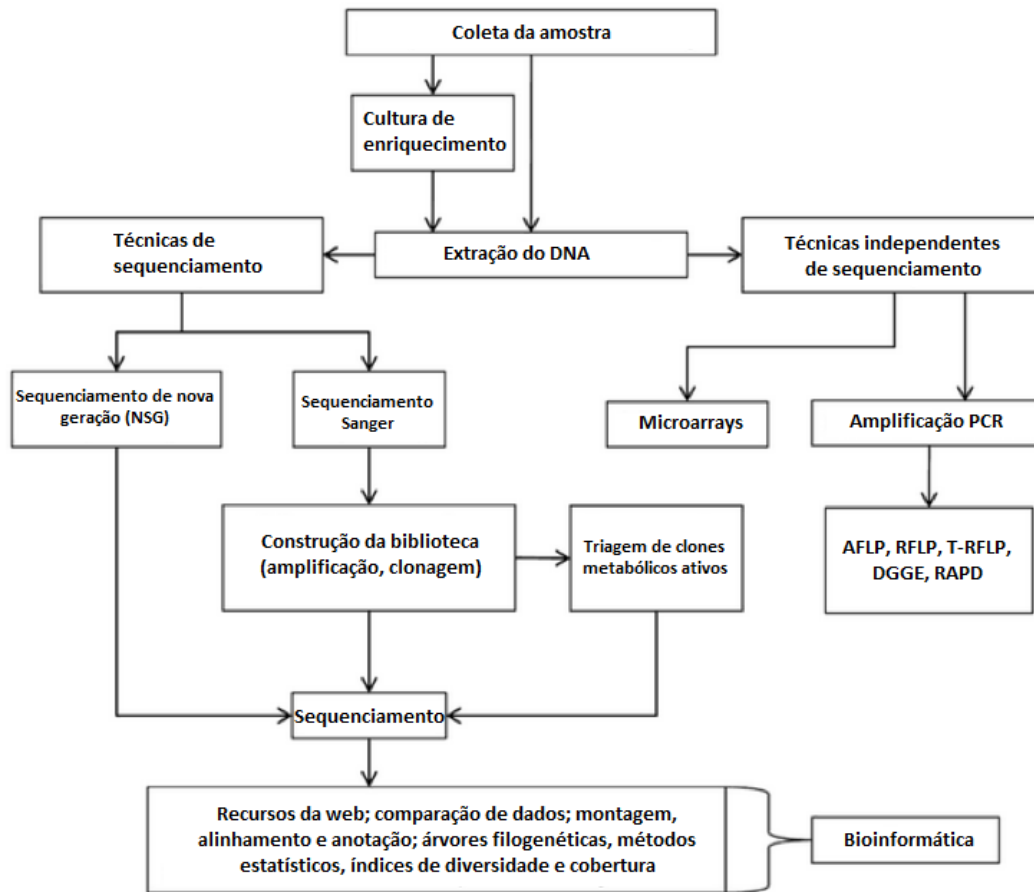
Atualmente, a metagenômica vêm sendo aplicada em vários campos da ciência, desde pesquisas sobre a ecologia microbiana (SOTERO-MARTINS et al, 2021) até trabalhos que visam a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como novas enzimas de interesse industrial, antibióticos, entre outros (SALLÔTO, 2012). Este campo de pesquisa merece destaque em função de ser uma área recente, multidisciplinar e com grande potencial de aplicação. Segundo Garcia (2010) e Sallôto (2012) a utilização da abordagem metagenômica é considerada o primeiro passo para o estudo de um mundo até então praticamente desconhecido, e possibilita uma nova perspectiva para a ciência, pois permite a identificação e o monitoramento de uma vasta quantidade de microrganismos presentes em ambientes naturais ou antropizados.

## 2.9. BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é um campo multidisciplinar que permite a obtenção, processamento, análise e apresentação de informações biológicas utilizando ferramentas de informática especializadas (ARAÚJO et al., 2008). Algumas destas ferramentas nos permitem realizar a interpretação de sequências biológicas de modo a identificar elementos funcionais do genoma e seus respectivos produtos e implicações (ESPINDOLA et al., 2010) (Figura 5).

Sob esse aspecto, os dados gerados no campo da bioinformática podem ser considerados como a forma mais específica de informações sobre os seres vivos, uma vez que proporciona uma análise detalhada de seu código genético (ARAÚJO et al., 2008). Assim, uma aplicação direta da bioinformática nos estudos metagenômicos permite uma otimização e identificação de possíveis sequências gênicas que podem favorecer o desenvolvimento de novas ferramentas que promovam a melhoria de diagnósticos tanto no campo da saúde pública quanto na área ambiental.

Figura 5. Exemplo de fluxograma das etapas da análise metagenômica e interação com a bioinformática.



Fonte: Adaptado de CARDOSO et al, 2012.

Com o avanço da tecnologia computacional ao longo das últimas décadas, diversas ferramentas foram desenvolvidas com a finalidade de analisar a grande quantidade de dados gerados pela técnica de metagenômica. Servidores da Web, como *GenBank* - banco de dados de sequências genéticas do *NCBI - National Center for Biotechnology Information*, *MG-RAST - Metagenomics analysis server* (bases de dados metagenômico), *Ribosomal - RDP Classifier II - Ribosomal database project* (banco de dados ribossomal) são alguns exemplos de bancos de dados que permitem que os pesquisadores realizem análises integradas e visualizem os resultados com menos complexidade ou forte conhecimento computacional. Além disso, nessas plataformas, os dados gerados pelo sequenciamento ficam disponibilizados publicamente para diversas análises adicionais (MOURA, 2020).

Atualmente, diversos projetos metagenômicos de larga escala estão gerando coleções de sequências microbianas abrangentes para diferentes ambientes, seja ele natural ou



antropizado. Como as comunidades microbianas mudam à medida que interagem com outros organismos e à medida que o ambiente muda, análises de séries temporais também se tornaram comuns (HIRAOKA et al, 2016).

## 2.10. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

### 2.10.1. Policetídeos (PKs) e Peptídeos não ribossômicos (NRPs)

A estrutura da comunidade microbiana terrestre é altamente complexa e diversa, o que representa um desafio para a ciência. A microbiota natural desempenha papel fundamental na manutenção dos processos bioquímicos e representa um vasto reservatório biológico e genético que pode ser explorado para a recuperação de novos genes, vias metabólicas e seus produtos (SCUCH, 2007).

Nas últimas décadas, produtos provenientes do metabolismo secundário microbiano têm sido cada vez mais utilizados para fins médicos, industriais e agrícolas, na qual se destacam os antibióticos, drogas cancerígenas, compostos antifúngicos, agentes imunossupressivos, inibidores enzimáticos, agentes antiparasíticos entre outros (RASTEGARI et al, 2019). Grande parte desses compostos são produtos naturais obtidos de microrganismos que habitam variados ecossistemas.

Dentre os metabólitos secundários conhecidos destacam-se os policetídeos, que representam uma família de substâncias que possuem via biossintética comum e compõem a estrutura química básica de diversos antibióticos (tetraciclina e eritromicina), parasticidas (avemectinas), agentes tumorais (antraciclina), agentes antifúngicos (candidina e anfotericina) (VINNING, 1980).

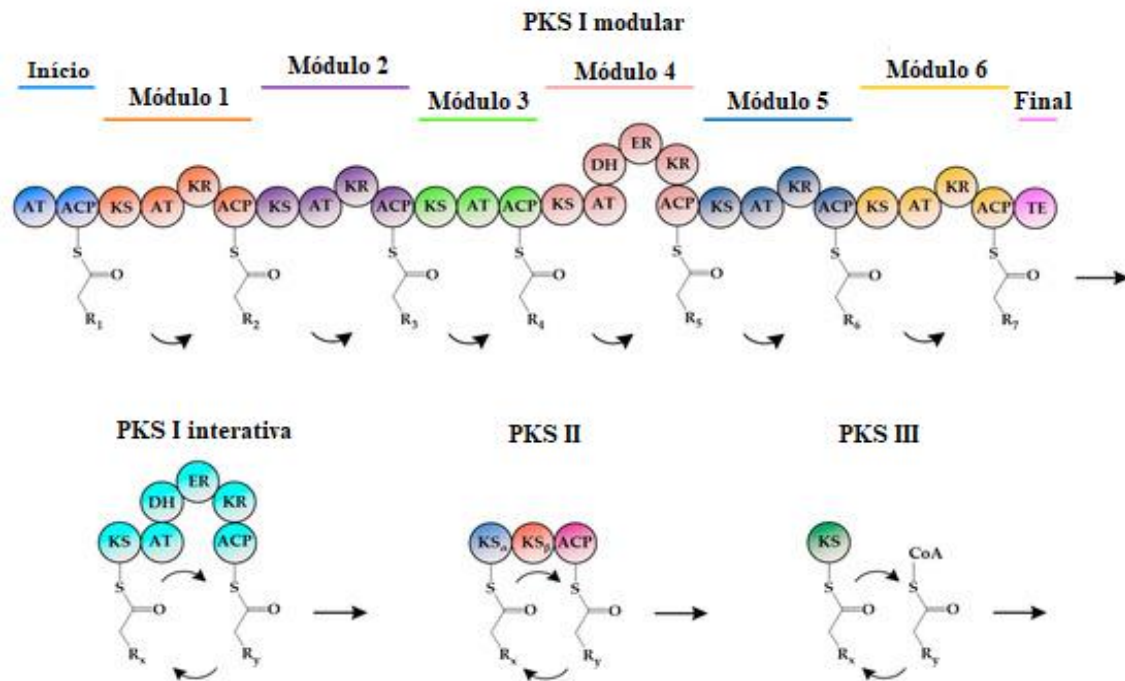
Os policetídeos (PKs) são sintetizados por enzimas multifuncionais chamadas policetídeo sintases (PKSs), que atuam na montagem da estrutura carbônica dos policetídeos a partir de ésteres graxos de coenzima A, proveniente de ácidos graxos como acetato, propionato e butirato (HOPWOOD, 2004).

As PKSs são formadas por três domínios básicos: a ceto-sintase (KS) que atua como módulo de partida; aciltransferases (AT) como módulos de alongamento; e a proteína carreadora de acil (ACP) como módulo de terminação. (SOLTANI, 2016).

Pode-se classificar as PKSs em três tipos (MODENA, 2019) (Figura 6):

- PKS do tipo I (PKS I) são enzimas multifuncionais arranjadas de forma linear e organizadas em módulos de atividades de ação não interativa responsáveis pela catálise de um ciclo de alongamento da cadeia de policetídeos. As PKS I podem ser classificadas em duas categorias: modulares e interativas. As modulares são encontradas exclusivamente em bactérias, enquanto as interativas estão presentes majoritariamente em fungos;
- PKS do tipo II (PKS II) são complexos catalíticos multienzimáticos que transportam um único conjunto de atividades que atua de forma interativa. Encontradas exclusivamente em bactérias;
- PKS do tipo III (PKS III) são enzimas homodiméricas multifuncionais de condensação e ação interativa que utilizam o malonil-CoA como substrato. Encontradas em plantas, fungos e bactérias.

Figura 6. Organização de domínio das diferentes PKSs. Domínios putativos são representados por círculos. Em PKSs modulares do tipo I, os domínios funcionais são organizados em vários módulos, sendo cada módulo responsável por uma única etapa de condensação descarboxilativa na formação de policetídeos. Para PKSs tipo I interativa, os domínios funcionais são agrupados em um único módulo e cada domínio é usado repetidamente durante a síntese de policetídeos. PKSs do tipo II são complexos multienzimáticos dissociáveis, com cada proteína contendo um domínio catalítico único e independente que é usado iterativamente durante a formação de policetídeos. As reações por PKSs do tipo III também são iterativas, mas não requerem um ACP para a fixação da cadeia de policetídeos em crescimento. AT: Aciltransferase; ACP: proteína transportadora de acilo; KS: Cetossintase; KR: Cetoreductase; DH: Desidratase; RE: Enoil redutase; TE: Tioesterase; CoA: Coenzima A

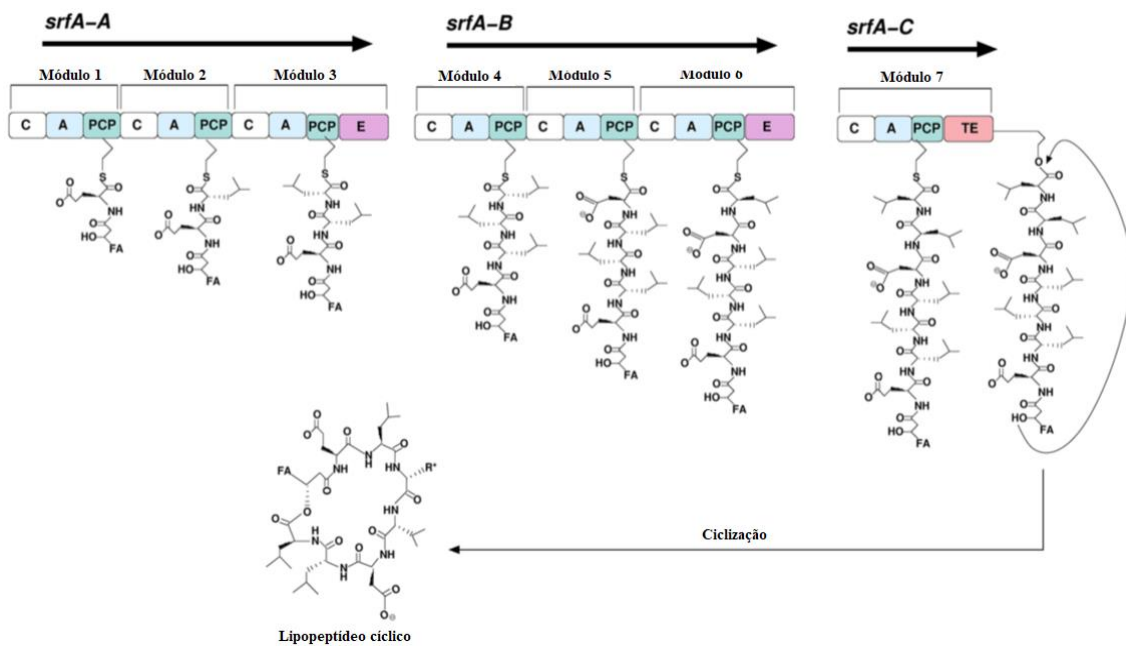


Fonte: Traduzido de Lim, Go e Yew (2016).

Os peptídeos não ribossômicos (NRPs) são metabólitos secundários sintetizados pela ação das sintases de peptídeos não ribossomais (NRPSs), que utilizam diversos substratos de monômeros de acila, entre os quais se destacam aminoácidos, ácidos graxos e ácidos carboxílicos (BLOUDDOFF e SCHMEING, 2017). São comumente encontrados em bactérias, fungos e organismos endossimbiontes de eucariontes superiores (MODENA, 2019).

As NRPSs são complexos multienzimáticos organizados modularmente que servem como molde e maquinaria biossintética, através de um mecanismo modelo dos ribossomos. Cada módulo é definido como uma seção da enzima NRPS que incorpora de maneira específica um aminoácido na estrutura peptídica. Desta forma, os módulos podem ser divididos em domínios, que catalisam as etapas individuais da síntese peptídica não ribossomal. Cada módulo consiste em três domínios, domínio de adenilação (A), proteína transportadora de peptidil (PCP) ou domínio de tioração (T) e domínio de condensação (C) (Figura 7). A ordem dos módulos é geralmente co-linear às sequências peptídicas do produto. A síntese de peptídeos não ribossomais prossegue na direção N para terminal C, produzindo peptídeos que geralmente têm cerca de 3-15 aminoácidos de comprimento. Os peptídeos liberados podem ser lineares, cíclicos ou cíclicos ramificados (MARTÍNEZ-NUÑEZ e LOPEZ, 2016; MOOTZ et al, 2002).

Figura 7. Características estruturais das enzimas peptídicas sintetases não ribossomais. As NRPSs podem ser subdivididas em módulos, cada um incorporando um aminoácido. Cada módulo consiste em três domínios: domínio de adenilação (A), domínio da proteína transportadora de peptidil (PCP) e domínio de condensação (C), que realizam a síntese de NRPs; o domínio de epimerização (E) e o domínio de tioesterase (TE) também são representados. Nesta figura, a biossíntese de surfactina (genes *srfA* de *Bacillus* spp.) foi exemplificada.



Fonte: Traduzido de Martínez-Nuñez e Lopez (2016).

A relevância desses complexos enzimáticos para a pesquisa de metabólitos secundários pode ser ilustrada pelo lançamento de diversas bases de dados curadas, tais como antiSMASH, DoBISCUIT e ClusterMine360, que buscam organizar o grande número de informações em catálogos de domínios, módulos, clusters gênicos e produtos de síntese (MEDEMA et al, 2011).

### 3. JUSTIFICATIVA

Apesar do seu grande valor para o campo da ciência, a comunidade microbiana existente no ecossistema da Lagoa Salgada ainda não foi totalmente explorada.

Tudesco (2012) afirma que parte da área de amortização da Lagoa Salgada já se encontra ocupada pela população local. Além disso, o desenvolvimento de atividades agropecuárias, expansão urbana, e a presença de grandes empreendimentos (Complexo Portuário do Açú) na região apresentam-se como possíveis fatores de degradação do ecossistema. Ademais, registra-se que somente a porção sul da lagoa está inserida na unidade de conservação do Parque Estadual Lagoa do Açú.

Outro ponto de destaque está relacionado às demandas das secretarias municipais de São João da Barra relativo à carência de informações que possibilitem a utilização sustentável da região da lagoa como área recreativa.

Desta forma, ao empregar as ferramentas da metagenômica, será possível acessar todo o DNA contido nas amostras de água, possibilitando conhecer a diversidade microbiana e o potencial biotecnológico presente no metabolismo secundário desse ecossistema único. Permitirá também contribuir com a indicação de quais atividades turísticas e recreativas poderiam ser empregadas na região da lagoa, visando o uso sustentável do ambiente e a proteção da saúde da população. Por fim, esse estudo auxiliará na fundamentação da necessidade de proteção integral do ambiente lagunar, contribuindo para a preservação das riquezas biológicas existentes.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. GERAL**

Caracterizar a diversidade microbiana presente na Lagoa Salgada através da abordagem metagenômica.

### **4.2. ESPECÍFICOS**

Analisar os parâmetros físico-químicos e colimétricos da amostra de água coletada;

Caracterizar taxonomicamente a microbiota existente no ambiente aquático;

Caracterizar funcionalmente os genes da comunidade microbiana identificada;

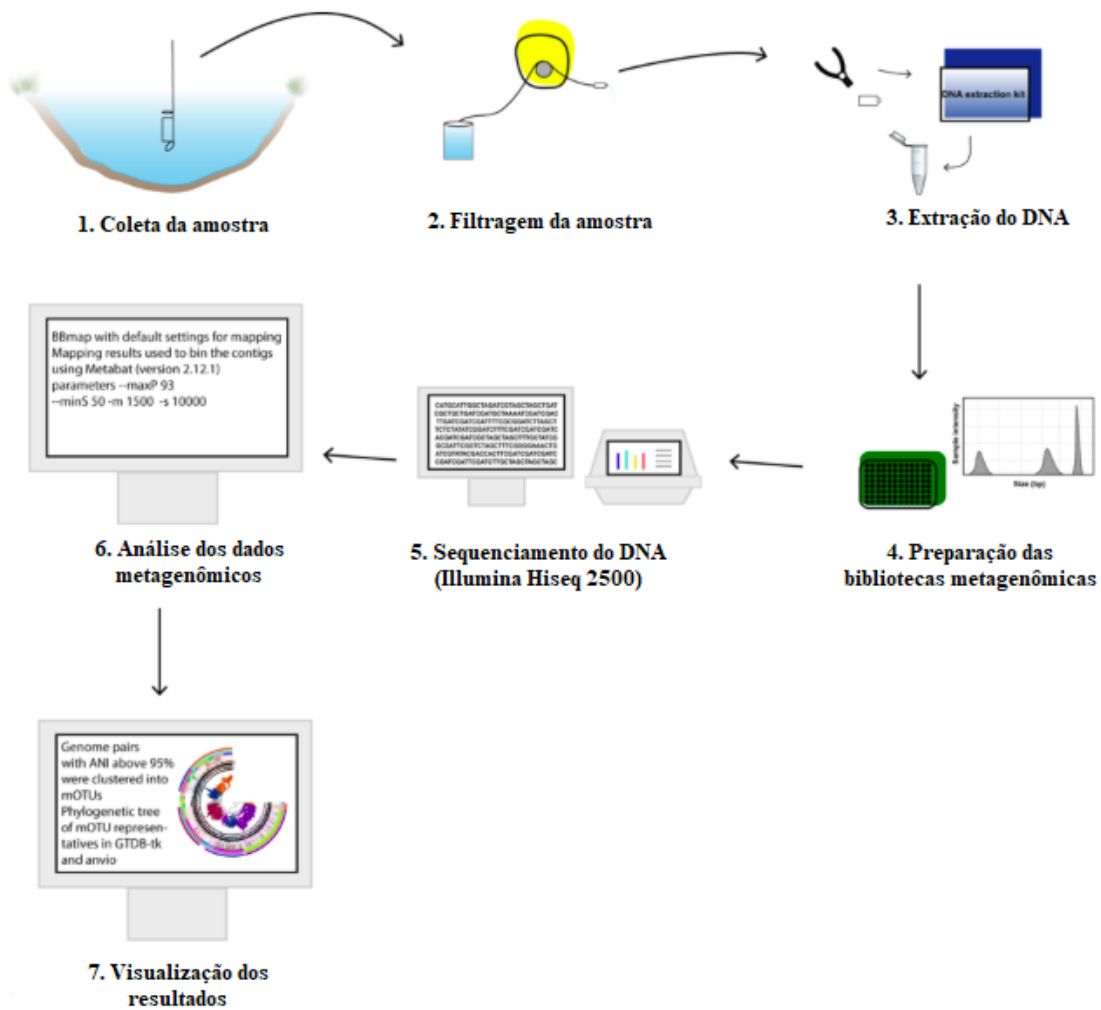
Avaliar o potencial dos principais grupos de microrganismos quanto a capacidade de produção de metabólitos secundários bioativos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

O referido estudo possui caráter descritivo, com análise exploratória de dados obtidos em laboratório e de análise por bioinformática.

A figura 8 representa as etapas metodológicas desenvolvidas durante o estudo para obtenção dos resultados.

Figura 8. Fluxograma das etapas de processamento da amostra e análise metagenômica.



Fonte: Modificado de Buck et al (2021).

### 5.1. COLETA DAS AMOSTRAS

A amostra de água foi obtida na área da Lagoa Salgada (21°54'04.5"S 41°01'35.0"W), localizada entre os municípios de São João da Barra e Campos dos Goytacazes, região norte do Estado do Rio de Janeiro, no mês de julho de 2019. Foi coletado o volume de 20 litros de água através de galões devidamente esterilizados e tratados para receber a água que seria submetida ao processo de extração de DNA. Além disto, foram coletados, em frascos estéreis, um volume de 500 mL de água para análises físico-químicas e, em frascos estéreis, um volume de 100 mL para análises colimétricas.

### 5.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA) da ENSP/Fiocruz, por meio dos métodos descritos no Manual Prático de Análise de Água da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2009, baseada no *Standard Methods for the Examination of the Water and Wasterwater* (EATON et al., 2005). Foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: alcalinidade, pH; condutividade elétrica, cloro livre e total; carbono total, carbono inorgânico total, carbono orgânico total, nitrogênio total; nitrogênio nitrito; nitrogênio nitrato; cloreto; fluoreto; fosfato; sulfato; e turbidez.

As metodologias correspondentes a cada parâmetro físico-químico foram: Titulometria com indicadores para alcalinidade total; Metodologia instrumental para pH; Comparação visual – DPD para cloro total e residual livre; Diazotação para nitrogênio nitrito; Titulometria de Mohr para cloretos; Metodologia instrumental para condutividade; Espectrofotometria para sulfato, nitrato e fluoreto; e Nefelometria para turbidez (APHA, 2017).

### 5.3. ANÁLISES COLIMÉTRICAS

Os níveis de coliformes totais (CT) e de *Escherichia coli* (EC) foram analisados pelo método da membrana filtrante como descrito em Sotero-Martins et al. (2017), após diferentes diluições e contagem das colônias em Unidade Formadora de Colônias por mililitro (UFC/mL). A amostra de água foi analisada em triplicata, onde cada triplicata foi diluída duas vezes com



o objetivo de averiguar as concentrações de CT e EC em diferentes cenários. Os valores das concentrações e diluições estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores das concentrações de cada diluição no método de filtração para coliformes totais e *Escherichia coli*.

Amostra de água (triplicata)	Diluição 1 (D1)	Diluição 2 (D2)
A	20 mL da amostra em 40 mL de água = 2,5x*	10 mL da D1 em 40 mL de água = 12,5x
B	5 mL da amostra em 45 mL de água = 10x	10 mL da D1 em 40 mL de água = 50x
C	1 mL da amostra em 49 mL de água = 50x	10 mL da D1 em 40 mL de água = 250x

x = vezes diluída. Fonte: Próprio autor, 2022.

Para o isolamento dos microrganismos foi utilizada a metodologia descrita no Manual da Merck (2000), em meio de cultura cromogênico indicador, Chromocult® Coliform Agar. As colônias foram diferenciadas por processo colorimétrico, em que coliformes totais se apresentam como colônias na cor salmon/vermelhas e *Escherichia coli* como colônias na cor azul escuro para violeta. Cada diluição foi feita em triplicata.

Os dados da contagem das colônias presumíveis de serem coliformes totais (CT) ou *E. coli* (EC) foram utilizados na avaliação da qualidade sanitária da amostra baseado nos parâmetros da Resolução CONAMA nº 274/2000, que estabelece os critérios de balneabilidade em águas brasileiras.

#### 5.4. FILTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Na etapa de extração de DNA os 20 litros de água foram submetidos ao processo de filtração por bomba à vácuo, utilizando membranas Millipore de diferentes porosidades: 0,8 µm a fim de reter o material particulado em suspensão, 0,45 µm a fim de reter eucariotos, 0,22

um a fim de reter procariotos. As membranas contendo o material filtrado foram submetidas à extração de DNA através do kit DNeasy Power Water (Quiagen). O DNA total de cada membrana foi extraído seguindo o protocolo e instruções do fabricante (APÊNDICE A). A etapa descrita foi realizada no Laboratório de Biotecnologia em Saúde Humana e Ambiental – BIOTECSA, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ. O DNA total foi quantificado e avaliado quanto a pureza da amostra, após a leitura em NanoDrop e por Qubit.

### 5.5. SEQUENCIAMENTO DO DNA EXTRAÍDO

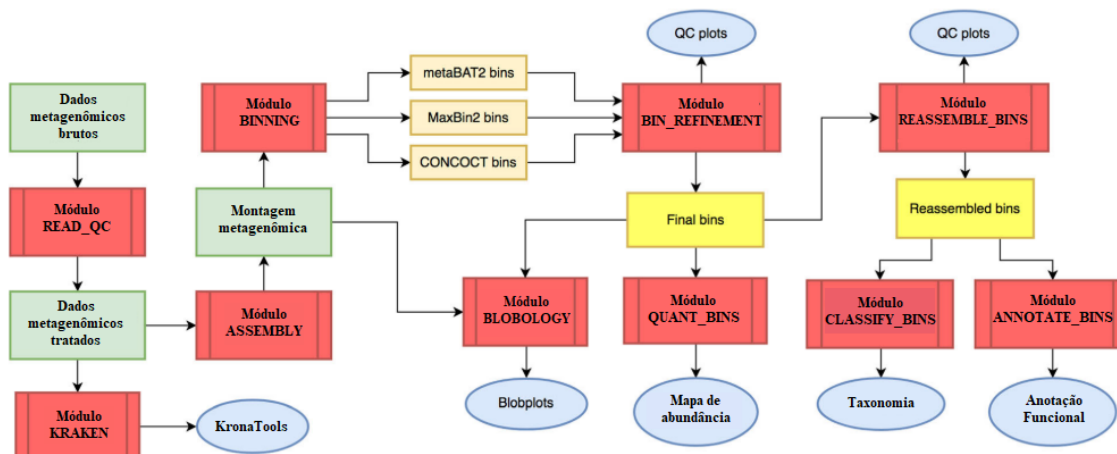
As bibliotecas metagenômicas foram preparadas com os Kits Nextera XT DNA e Nextera XT index da Illumina, seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas utilizando o método *shotgun* no sequenciador Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), realizado na Plataforma de Sequenciamento do Centro de Tecnologia da Indústria Química e Têxtil - SENAI CETIQT.

### 5.6. ANÁLISE DOS DADOS METAGENÔMICOS

Para a análise dos dados metagenômicos foi utilizada a metodologia do *pipeline* MetaWrap versão 1.3 (URITSKIY; DIRUGGIERO; TAYLOR, 2018), um software de linha de comando que utiliza uma coleção de módulos, cada um sendo um programa autônomo que aborda um aspecto do processamento ou análise de dados.

Primeiramente, no módulo metaWRAP-Read\_qc, as sequências brutas advindas do sequenciamento foram avaliadas quanto à qualidade do sequenciamento (Figura 9), utilizando como parâmetro de corte o índice Phred acima de 20. Para analisar a qualidade dos dados gerados pelo sequenciamento, utilizou-se a ferramenta FastQC versão 0.11.8 com os parâmetros padrão. Em seguida as sequências passaram pelo módulo de montagem, com parâmetros “*k-mer length*” de 21. As sequências brutas e as montadas (*contigs*) foram taxonomicamente perfiladas no módulo Kraken versão 2, sendo, os resultados, gerados pelo módulo do Krona, apresentando representações taxonômicas interativas da comunidade microbiana. Com a montagem realizada, as sequências foram encaminhadas para o módulo de *binning*, sendo consolidadas em um único conjunto completo. O módulo Reassemble\_bins foi utilizado para remontar as leituras, aprimorando a qualidade do conjunto gerado, e permitindo aferir funcionalidade aos genes da amostra.

Figura 9. Fluxograma geral do pipeline metaWRAP. Caixas vermelhas representam módulos de montagem e análise; verdes: dados metagenômicos; laranja: conjuntos intermediários; amarelo: conjuntos finais; azuis: relatórios finais e figuras representativas dos resultados.



Fonte: Traduzido de Uritskiy, Diruggiero e Taylor (2018).

Os resultados das análises foram visualizados no programa KronaTools versão 2.7 e REVIGO Gene Ontology treemap. A proporção de abundância foi realizada através de estatística descritiva (porcentagem).

Para a análise dos metabólitos secundários foi utilizada a plataforma antiSMASH versão 5.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>), uma ferramenta de identificação, anotação e análise de grupos de genes do metabolismo secundário (BLIN et al, 2021), que compara a sequência de consulta com o banco de dados MIBiG — Informações mínimas sobre o banco de dados Biosynthetic Gene Cluster (MEDEMA et a, 2015). Após a análise, os resultados obtidos foram curados manualmente por comparação com a literatura relacionada para a predição dos metabólitos secundários.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA AMOSTRA DE ÁGUA

Os resultados das análises de alcalinidade, turbidez, salinidade, pH, cloro (Cl), carbono (C), nitrogênio (N) e sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) da amostra de água encontram-se na Tabela 2.

Com concentração de cloreto a 6.900 mg/L e salinidade de 3,71%, a amostra analisada possui características que permitem classificá-la como sendo água salgada a hipersalina, pois apresenta valores de sais acima dos parâmetros estabelecidos pelo art. 2, inciso III da Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais entre outros enquadramentos. Segundo Rich e Maier (2015), podem ser considerados ambientes hipersalinos aqueles cuja concentração de sais se apresenta em níveis mais elevados do que a água do mar (aproximadamente 3,5%), podendo até atingir o ponto de saturação total. Esses resultados divergem do que foi discutido por Iespa, Iespa e Borhi (2012), que definiram o ambiente aquático da Lagoa Salgada como um meio ambiente com característica salobra a salgada devido às condições da baixa circulação de água, índice de chuvas e ação antrópica do canal do Açú.

Analisando as propriedades físico-químicas da amostra foi observado o pH com valor de 8,5 e alcalinidade total de 280 mg/L. A concentração de carbono total (CT) foi de 152,90 mg/L, dos quais 116,03 mg/L corresponderam à concentração de carbono orgânico total (COT). O valor para nitrogênio total (NT) foi de 7,7 mg/L. Por fim, devido à alta concentração de cloreto, não foi possível quantificar os íons de fluoreto e fosfato, assim como a série nitrogenada - nitrato e nitrito.

Tabela 2. Resultado dos parâmetros físico-químicos da amostra de água e valores máximos permitidos (VMP) pela Resolução CONAMA 357/2005.

Parâmetros	Valores	VMP*
Alcalinidade Total (mg/L)	280	-
Salinidade (%)	3,71	>3,0
pH (25 °C)	8,5	6,5 a 8,5
Condutividade (µS/cm)	142,1	-
Cloro Total (mg/L)	0,10	0,01
Cloro Livre (mg/L)	0,05	-
Carbono Total (mg/L)	152,90	-
Carbono Inorgânico Total (mg/L)	36,87	-
Carbono Orgânico Total (mg/L)	116,03	3
Nitrogênio Total (mg/L)	7,7	0,87
Cloreto (mg/L)	6900	-
Sulfato (mg/L)	14,7	-
Turbidez (UNT)	21	-

\*Valores máximos permitidos para o enquadramento sobre águas salinas de classe I (art.18, inciso I). Fonte: Próprio autor, 2022.

Comparando os resultados físico-químicos com os valores definidos pela CONAMA nº 357/05, no enquadramento sobre águas salinas de classe I (destinadas a recreação de contato primário; proteção e conservação das comunidades aquáticas; e/ou atividade de pesca), foi observado que o valor do pH se manteve dentro da faixa permitida. Entretanto, os valores obtidos para cloro total, carbono orgânico total e nitrogênio total se mostraram muito acima dos padrões recomendados. Segundo von SPERLING (2000), o carbono orgânico total (COT), principalmente na forma dissolvida, desempenha função preponderante no desenvolvimento da comunidade microbiana em ecossistemas aquáticos, pois além de se inserir na cadeia trófica de bactérias e algas - como agente precipitador de nutrientes na camada bentônica para produção primária -, o COT atua também no processo de fotossíntese, por intermédio da interferência na penetração das radiações solares no corpo d'água. Já os compostos de nitrogênio são nutrientes para processos biológicos. Quando em altas concentrações em águas naturais conjuntamente

com outros compostos provocam o enriquecimento do meio e possibilitam o crescimento em maior extensão de organismos que os utilizam (CETESB, 2007). Na dieta humana a ingestão de alimentos com altos níveis de nitrato, uma das formas oxidadas do nitrogênio, pode estar associada com a ocorrência de câncer de estômago (INCA, 2012).

Desta forma, resultados obtidos caracterizam a amostra como imprópria quanto aos níveis de cloro total, COT, e nitrogênio total, segundo os parâmetros definidos pela CONAMA nº 357/2005. Assim, as atividades humanas descritas na resolução não são recomendadas. A alta concentração de determinados nutrientes no ambiente - como COT, nitrogênio e fósforo - pode promover o processo de eutrofização, ocasionando mudanças na composição e sucessão de espécies fitoplanctônicas (ZHU et al, 2020). Tais alterações podem permitir que compostos orgânicos excretados por determinados microrganismos conferiram, em altas concentrações, toxicidade ao meio aquático. Substâncias pertencentes às classes das hepatotoxinas, neurotoxinas, endotoxinas e toxinas irritantes da pele podem ser produzidas por diferentes tipos de algas e possuem ação deletéria à saúde humana (von SPERLING, 2000).

Por fim, os altos valores de COT e nitrogênio total podem ser considerados um dos fatores responsáveis pela abundância do filo Cyanobacteria na amostra, em especial o gênero *Synechococcus*, que correspondeu a 15% do número de sequências identificadas.

## 6.2. CARACTERIZAÇÃO COLIMÉTRICA DA AMOSTRA DE ÁGUA

As análises bacteriológicas demonstraram que a amostra de água analisada apresentou valores máximos de 2 UFC/mL para coliformes totais (CT) e 1 UFC/mL para *Escherichia coli* (EC) (Tabela 3), estando dentro dos padrões de balneabilidade estipulados pela Resolução CONAMA nº 274/2000, que estabelece sistemáticas de avaliação da qualidade ambiental das águas doces, salobras e salinas.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros colimétricos da amostra para coliformes totais e *Escherichia coli*.

	A		B		C		CONAMA n° 274 (UFC/mL) <sup>a</sup>
	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	(UFC/mL)	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	
Coliformes totais	0	0	2	2	1	1	4,61
<i>Escherichia coli</i>	0	0	1	0	0	0	3,9

<sup>a</sup> Considerados os valores correspondentes para a categoria satisfatória do art. 2, §1 da Resolução CONAMA n° 274/2000. Valores convertidos para UFC/mL (Gronewold e Wolpert, 2008). Fonte: Próprio autor, 2022.

Analisando os microrganismos que compõem o grupo coliformes totais foi observado que: *Salmonella* representou somente 0,04% do número total sequências da amostra; *Shigella* 0,003%; *Citrobacter* 0,04%; *Klebsiella* 0,6%; *Enterobacter* 0,09%; *Proteus* 0,02%; e *Serratia* 0,1%. Os gêneros destacados pertencem à família Enterobacteriaceae, e são os principais indicadores dentro dos coliformes totais (MOURA, 2019). *Escherichia coli* representou 0,004% do número de sequências.

Os valores encontrados nos parâmetros colimétricos corroboram a diversidade microbiana identificada. A abundância dos microrganismos pertencentes ao grupo coliformes se mostrou baixa durante a etapa de análise taxonômica da amostra, que será discutida na próxima seção.

Apesar de atender os parâmetros estabelecidos pela CONAMA n° 274, deve-se reforçar que parte do ambiente da Lagoa Salgada está sob significativa pressão antrópica, onde atividades como agricultura e pecuária; zoneamento urbano inadequado (TUDESCO, 2011); utilização dos estromatólitos para construção civil (pavimentação e afins); e presença de grandes empreendimentos industriais podem contribuir para que os valores dos indicadores de contaminação fecal sejam rapidamente alterados. Um cenário de aumento destes indicadores, associado à expansão urbana desordenada, irá promover a degradação do ecossistema. Dentro deste contexto, destaca-se também a necessidade de análises da qualidade da água quanto a

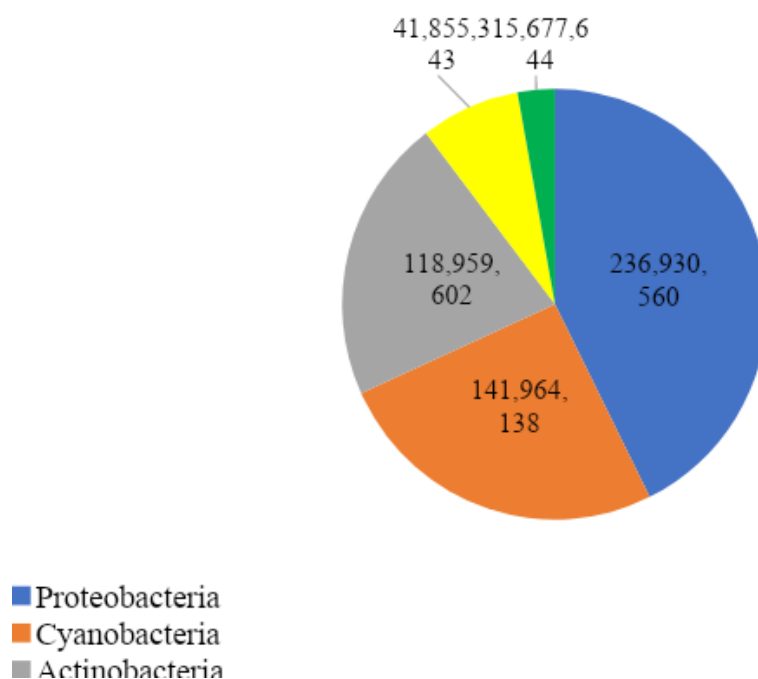
presença de compostos tóxicos inorgânicos, estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357/2005, que versa, dentre diversos pontos, sobre a necessidade de se manter a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico aquático, sem que os mesmos sejam afetados pela deterioração da qualidade da água (BRASIL, 2005). Tais análises se tornam relevantes devido a reconhecida utilização de produtos agrotóxicos em lavouras familiares localizadas a poucos metros da margem da lagoa.

### 6.3. CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA

O domínio Bacteria apresentou a maior abundância de microrganismos, representando 93% do número de sequências identificadas em comparação aos domínios Eukaryota (4%) e Archaea (0,1%). Os vírus representaram 2% do total de sequências.

Analisando os dados do domínio Bacteria a nível taxonômico de filo, foi observado que as proteobactérias (36%) apresentaram o maior número de sequências identificadas, seguido pelas cianobactérias (22%), actinobactérias (18%), bacteroidetes (6%) e firmicutes (2%) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Número de sequências dos filos pertencentes ao domínio Bacteria.



Fonte: Próprio autor, 2022.



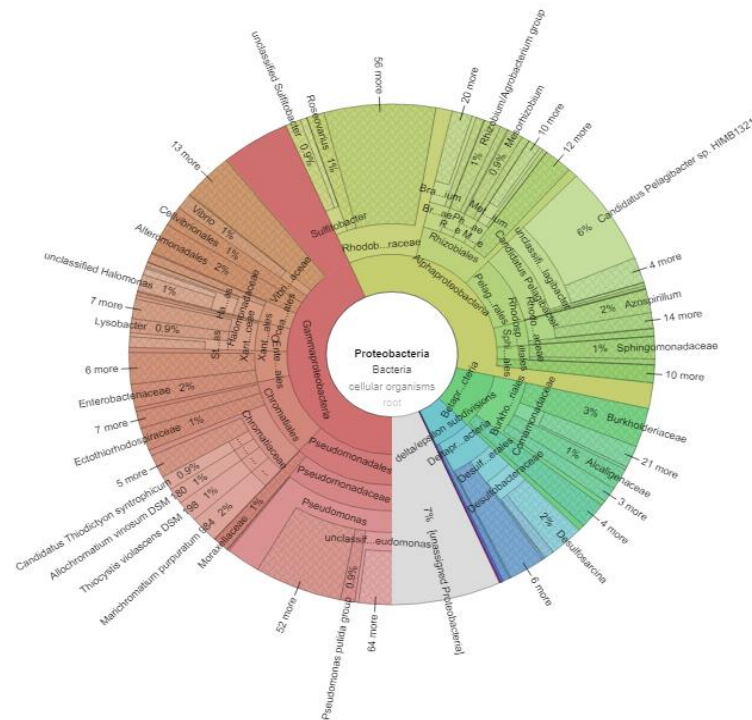
Cenários semelhantes foram observados em diferentes ecossistemas hipersalinos pelo mundo como em Laguna Tebinquiche - Atacama, Chile (DEMERGASSO et al, 2008), Lago Aran-Bidgol, Irã (MAKHDOUMI et al, 2012), em lagos de salinas solares - Sfax, Tunísia (BAATI et al, 2008) e esteiras microbianas de Shark Bay, Austrália (RUVINDY et al, 2016). Em todos os ambientes citados as proteobactérias apresentaram-se como o grupo filogenético dominante, evidenciando a capacidade de adaptação e colonização de seus microrganismos.

Resultados obtidos por Foster e Green (2011) demonstraram que ecossistemas de estromatólitos marinhos e hipersalinos apresentaram diversidade bacteriana significativamente maior quando comparado com um ecossistema estromatolítico artificial ou o de água doce.

### **6.3.1. Filo Proteobacteria**

Explorando o filo Proteobacteria, foi observada uma expressiva pluralidade de microrganismos. Os mesmos foram identificados em diferentes grupos taxonômicos, sendo a classe Gammaproteobacteria a de maior abundância, representando 43% do referido filo. A classe Alphaproteobacteria veio em seguida, correspondendo a 35% do número de sequências. As classes Betaproteobacteria (9%) e Deltaproteobacteria (6%) também apresentaram microrganismos identificados (Figura 10). O número de sequências não identificadas foi de 7%.

Figura 10. Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Proteobacteria.



Fonte: Próprio autor, 2021.

O gênero *Pseudomonas* foi aquele que apresentou o maior número de sequências identificadas, correspondendo a 11% das Proteobacterias. O gênero *Candidatus Pelagibacter* veio em seguida, representando 8% do filo. Outros gêneros que se destacaram foram: *Desulfosarcina* (2%), *Marichromatium* (2%), *Halomonas* (2%), *Azospirillum* (2%), *Bradyrhizobium* (2%), *Sulfitobacter* (1%), *Thiocystis* (1%), *Roseovarius* (1%), *Allochromatium* (1%) e *Burkholderia* (1%).

A nível de espécie, *Candidatus Pelagibacter* sp. HIMB1321 (6%), *Marichromatium purpuratum* 984 (2%), *Thiocystis violascens* DSM 198 (1%), *Allochromatium vinosum* DSM 180 (1%) foram aquelas que obtiveram as maiores porcentagens (Tabela 4).

Tabela 4. Principais classes, gêneros e espécies identificadas no filo Proteobacteria.

Classe	Gênero	Espécie
Gammaprobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	<i>Marichromatium</i>	<i>Marichromatium purpuratum</i> 984
	<i>Halomas</i>	<i>Halomonas sp. JS92-SW72</i>
	<i>Thiocystis</i>	<i>Thiocystis violascens DSM 198</i>
	<i>Allochromatium</i>	<i>Allochromatium vinosum DSM</i> 180
Alphaproteobacteria	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus Pelagibacter sp.</i>
	<i>Pelagibacter</i>	<i>HIMB1321</i>
	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum lipoferum 4B</i>
	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> S58
	<i>Sulfitobacter</i>	<i>Sulfitobacter pseudonitzschiae</i>
Betaproteobacteria	<i>Roseovarius</i>	<i>Roseovarius faecimaris</i>
	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia lata</i>
Deltaproteobacteria	<i>Desulfosarcina</i>	<i>Desulfosarcina widdelii</i>

Fonte: Próprio autor, 2022.

O filo Proteobacteria compreende uma das maiores divisões dentro dos procariontes, sendo responsável pela grande maioria das bactérias Gram-negativas validamente identificadas. O grupo abrange um complexo conjunto de atributos fenotípicos e fisiológicos de grande importância biológica, uma vez que englobam a maioria das bactérias Gram-negativas de interesse médico, industrial e agrícola (MADIGAN e MARTINKO, 2006). Dentro deste contexto, espécies de *Pseudomonas*, gênero de maior abundância dentro do filo, possuem capacidade de degradar hidrocarbonetos e compostos halogenados em ambientes hipersalinos (OYEWUSI et al, 2020). Com base nessa característica e abundância encontrada por este estudo, a utilização de *Pseudomonas sp.* como agente potencialmente biorremediador para



Analisando o filo a nível de gênero, evidenciou-se que *Synechococcus* foi aquele que apresentou maior abundância, representando 64% das cianobactérias identificadas na amostra. O gênero *Synechocystis* apareceu em seguida, com 23%. Os demais gêneros identificados foram: *Geminocystis* (2%), *Calothrix* (1%), *Nostoc* (0,9%), *Microcystis* (0,5%), *Candidatus Atelocyanobacterium* (0,3%), *Gloeothece* (0,2%), *Halothece* (0,2%), *Rippkaea* (0,2%), *Arthrospira* (0,2%), *Planktothrix* (0,2%), *Oxynema* (0,2%), *Moorea* (0,1%), *Oscillatoria* (0,1%), *Crocospaera* (0,1%), *Crocospaera* (0,1%), *Cyanothece* (0,1%), *Fischerella* (0,1%), *Geitlerinema* (0,09%), *Microcoleus* (0,09%), *Geitlerinema* (0,09%), *Scytonema* (0,08%), *Chondrocystis* (0,07%), *Raphidiopsis* (0,07%), *Gloeocapsa* (0,06%), *Nodularia* (0,05%), *Sphaerospermopsis* (0,04%), *Anabaena* (0,04%).

Analisando o filo a nível de espécie, foi observado que *Synechococcus* sp. RS9909 (46%) apresentou o maior número de sequências, seguido por *Synechocystis* sp. PCC 6714 (16%), *Synechococcus* sp. WH 8101 (9%), *Synechocystis* sp. CACIAM 05 (4%), *Synechococcus* sp. BMK-MC-1 (1%), *Geminocystis* sp. NIES-3708 (0,9%) e *Calothrix* sp. PCC 6303 (0,8%). Os valores referentes ao número de sequências das espécies destacadas estão na Tabela 5.

Tabela 5. Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Cyanobacteria.

Ordem	Gênero	Principais espécies
Synechococcales	<i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus</i> sp. RS9909
		<i>Synechococcus</i> sp. WH 8101
		<i>Synechococcus</i> sp. BMK-MC-1
	<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714
<i>Synechocystis</i> sp. CACIAM 05		
Chroococcales	<i>Geminocystis</i>	<i>Geminocystis</i> sp. NIES-3708
Nostocales	<i>Calothrix</i>	<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303

Fonte: Próprio autor, 2022.

Cianobactérias, microrganismos pertencentes a um antigo grupo de procariontes fotossintéticos, apresentam uma ampla diversidade de estratégias celulares, capacidades fisiológicas e adaptações que permitem sua distribuição em ambientes como oceanos tropicais,

ecossistemas marinhos costeiros e de água doce, esteiras microbianas e águas polares ricas em nutrientes (SOHM et al, 2016).

As cianobactérias são os principais produtores primários em lagos hipersalinos interiores e costeiros, em nascentes e lagoas de evaporação salina e outros ambientes com concentrações de sal maior do que a água do mar que, normalmente é de 3,5% (OREN, 2015).

As habilidades de sobrevivência e dispersão existente no filo foram observadas por Callieri (2017) e Cabello-Yeves et al (2017) para o gênero *Synechococcus*. Os autores destacaram que os microrganismos pertencentes ao gênero possuem uma parede celular espessa de peptidoglicano e uma camada externa de glicoproteínas que aumenta a tolerância ambiental. Também foi destacada a existência de pigmentos fotossintéticos (ficocianina e ficoeritrina) que permitem a adaptação a diferentes intensidades de luminosidade (comprimentos de onda de 400 a 650 nm).

Por fim, *Synechococcus* sp. possuem capacidade de sobreviver em uma ampla faixa de temperatura. Mastala et al (1996) demonstrou que os microrganismos do gênero apresentaram uma elevação na taxa de crescimento a 28-30°C, com células capazes de sobreviver a uma variação de até 40°C. A faixa ideal, entre 28 e 30°C, corresponde às condições de temperatura encontrada em países tropicais, o que torna propícia a sobrevivência do grupo em tais localidades (RASCONI et al, 2015). Os fatores descritos permitem explicar a abundância de *Synechococcus* sp. na amostra estudada, uma vez que o gênero possui ferramentas para adaptação e crescimento perante as variações físico-químicas que ocorrem na Lagoa Salgada durante as estações do ano.

Corroborando com outros trabalhos, foram observados valores semelhantes para o gênero *Synechococcus* em Clementino et al (2008). Em estudo sobre diversidade procariótica de áreas marinhas hipersalinas da Lagoa de Araruama (Rio de Janeiro), os autores detectaram amostras dominadas por filótipos de *Synechococcus*. Silva e Silva et al (2013) evidenciou a família Synechococcaceae como sendo aquela que apresentou a maior frequência quanto à composição microbiana relacionada a todas as etapas de formação e desenvolvimento dos estromatólitos na Lagoa Salgada. Walsby et al (1983) identificou significativas concentrações de *Synechococcus* nas esteiras bentônicas do lago hipersalino de Solar Lake (costa do Golfo de Aqaba, Mar Vermelho), ecossistema com características semelhantes à Lagoa Salgada. Foster e Green (2011) identificaram que as esteiras estromatólíticas de Highborne Cay (Bahamas) continham uma comunidade cianobacteriana altamente distinta, que incluía representantes unicelulares de *Synechococcus* spp. Burns et al (2004) observaram cianobactérias do gênero

*Synechococcus* compoem a diversidade microbiana dos estromatólitos existentes no ambiente marinho hipersalino da baía de Shark Bay, Austrália. Jardillier et al (2010) estimaram que o referido gênero seja responsável por 21% da fixação total de dióxido de carbono da região tropical e subtropical nordeste do Oceano Atlântico, destacando que sua participação na fixação oceânica de CO<sub>2</sub> não pode ser negligenciada.

Espécies pertencentes ao gênero *Synechocystis* foram identificadas por Fourçans et al (2004) em um lago hipersalino raso na salina de Salins-de-Giraud, (localizado próximo a barreira de areia e a costa marítima de Camargue, França). O referido gênero, juntamente com outros tipos unicelulares de cianobactérias, representou 27% da contagem total de microrganismos identificados, valores próximos ao encontrado por esse estudo. O gênero *Synechocystis* é definido morfológicamente como organismos esféricos cocóides, com tilacóides parietais, que apresentam capacidade de habitar variados ambientes (Korelusová, et al., 2009). Oren (2015), evidenciou que espécies de *Synechocystis* podem apresentar capacidade halotolerantes, podendo ser isoladas tanto em ambientes de água doce, quanto apresentar elevado crescimento em ambientes com concentrações de sal até 3 vezes mais altas que a água do mar. São utilizados em estudos ecofisiológicos e bioquímicos relacionados à regulação metabólica das cianobactérias. (Korelusová et al., 2009; Oren, 2015). Nesse contexto, Liu et al (2015), identificou a presença dos gêneros *Synechococcus* e *Synechocystis* nos sete lagos de salinidade distintas analisados (localizados na Bacia Qaidam do Planalto Qinghai-Tibetano, China). Os autores destacam que, apesar de apresentarem abundância distintas em cada área de estudo, a capacidade de tolerar uma ampla faixa de salinidade pode explicar a onipresença dos gêneros nos lagos da bacia.

O gênero *Geminocystis* foi proposto e descrito por Korelusova et al. (2009), em seu estudo de revisão do gênero *Synechocystis*. Os autores classificaram *Geminocystis* como sendo um táxon irmão do gênero *Cyanobacterium* devido às diferenças morfológicas, filogenéticas e tipo de divisão celular. Ramos et al. (2017) identificou a presença de *Geminocystis* sp. em três lagoas hipersalinas do complexo lagunar de Araruama (Araruama, Pitanguinha e Pernambuco), ecossistemas que apresentam características semelhantes à Lagoa Salgada quanto a sua formação geológica e posição geográfica (localizadas na costa nordeste do Estado do Rio de Janeiro). Andreote et al. (2014), identificaram espécies pertencentes ao gênero *Geminocystis* em lagoas salino-alcálicas localizadas em Nhecolândia, uma sub-região do Complexo do Pantanal.

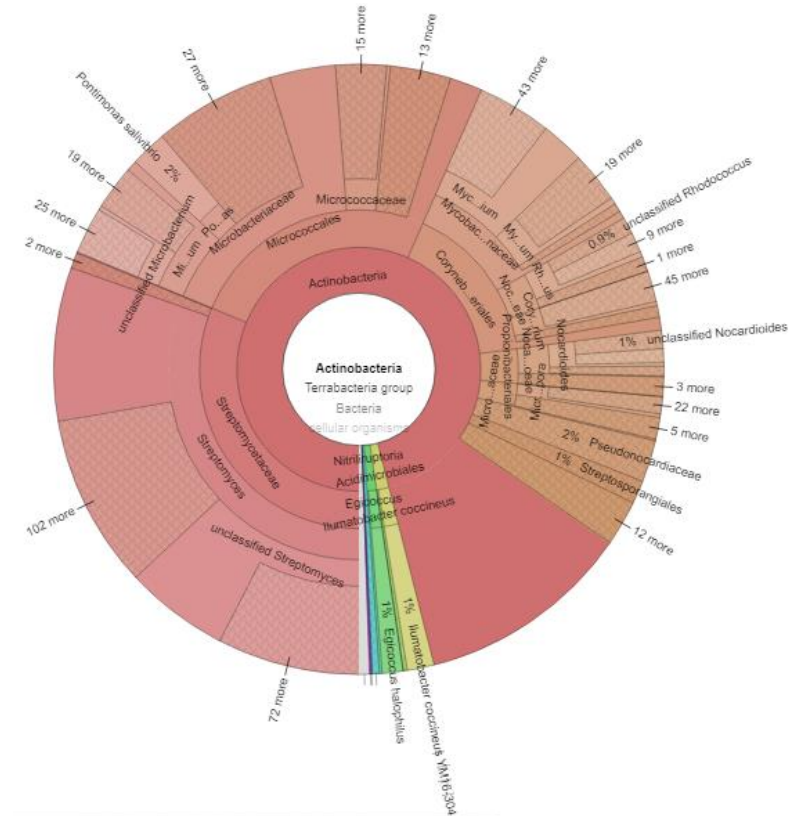
O gênero *Calothrix* é composto por cianobactérias filamentosas, bentônicas, com alto nível de diversidade genética. Apresenta uma ampla distribuição global, sendo encontrado em habitats marinhos, de água doce e terrestres, tais como: esteiras cianobacterianas, recifes tropicais, ambientes endolíticos e fontes termais (Sihvonen et al., 2007). Silva e Silva et al. (2013) identificou espécies de *Calothrix* na água e em esteiras microbianas da Lagoa Salgada. Paerl, Pinckney & Steppe et al. (2000), em estudo de revisão acerca da sobrevivência e crescimento microbiano em ambientes extremos, classificou o gênero *Calothrix* como sendo um dos grupos dominantes com a capacidade de fixação de nitrogênio em esteiras bentônicas intertidais e lagoas hipersalinas sob condições físico-químicas de estresse (extremos de temperaturas, radiação excessiva, dessecação, depleção de nutrientes, extremos de pH e hipersalinidade).

### **6.3.3. Filo Actinobacteria**

O filo Actinobacteria apresentou significativa diversidade de microrganismos entre os grupos taxonômicos. Ao analisar os dados foi identificada diversas ordens dentro do grupo, sendo Streptomycetales (31%) aquela com maior abundância. A ordem Micrococcales representou 25% das sequências, seguida por Corynebacteriales (16%), Propionibacteriales (4%), Micromonosporales (2%), Pseudonocardiales (2%) e Acidimicrobiales (2%) (Figura 12).



Figura 12. Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Actinobacteria.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Os gêneros que se destacaram foram: *Streptomyces* (30%), *Microbacterium* (6%), *Mycolicibacterium* (6%), *Mycobacterium* (3%), *Rhodococcus* (2%), *Corynebacterium* (2%), *Nocardioides* (2%), *Micromonospora* (1%), *Ilumatobacter* (1%).

Dentre a diversidade observada, duas espécies se destacaram, são elas: *Pontimonas salivibrio* (2%) e *Ilumatobacter coccineus* YM16-304 (1%) (Tabela 6).

Tabela 6. Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Actinobacteria.

Ordem	Gênero	Espécie
Streptomycetales	Streptomyces	<i>Streptomyces</i> sp. C8S0
Micrococcales	Microbacterium	<i>Microbacterium</i> sp. LKL04

	Pontimonas	<i>Pontimonas salivibrio</i>
Corynebacterales	Mycolicibacterium	<i>Mycolicibacterium confluentis</i>
	Mycobacterium	<i>Mycobacterium sp. MS1601</i>
	Rhodococcus	<i>Rhodococcus coprophilus</i>
	Corynebacterium	<i>Corynebacterium camporealensis</i>
Propionibacterales	Nocardioides	<i>Nocardioides sp. HDW12A</i>
Micromonosporales	Micromonospora	<i>Micromonospora sp. WMMC415</i>
Pseudonocardiales	Pseudonocardia	<i>Pseudonocardia sp. HH130629-09</i>
Acidimicrobiales	Ilumatobacter	<i>Ilumatobacter coccineus YM16-304</i>

Fonte: Próprio autor, 2022.

As actinobactérias compõem um grupo de bactérias Gram-positivas com alto teor de guanina e citosina em seu DNA, podendo habitar ambientes terrestres ou aquáticos. São organismos unicelulares, sem parede celular distinta, que produzem um micélio não septado e mais delgado (ANANDAN, DHARUMADURAI e MANOGARAN, 2016). O filo desempenha importante função na decomposição de materiais orgânicos, como celulose e quitina, possuindo papel vital na renovação da matéria orgânica, no ciclo do carbono, e na reposição de nutrientes no ambiente em que estão inseridas (ARAÚJO et al, 2020). Além disso, são conhecidos pela capacidade de produzirem uma variedade de metabólitos secundários com alto interesse farmacológico e comercial (SALWAN & SHARMA, 2020; BETANCUR et al, 2017; BERGEIJK, TERLOUW, MEDENA e WEZEL, 2020).

A diversidade do grupo, em ambientes marinhos, ainda é considerada sub-explorada, o que eleva seu potencial econômico e biotecnológico para a descoberta de novos produtos naturais (BLUNT et al, 2016). Actinobactérias marinhas, por habitarem em ambientes com características físico-químicas variadas, produzem diferentes tipos de compostos bioativos em comparação com as espécies terrestres (HASSAN et al, 2017). Esse fato está relacionado a necessidade de adaptação a condições anaeróbicas, e variações de temperatura e pressão nesses habitats.

*Streptomyces* sp., gênero com maior abundância no filo, apresenta, como propriedade intrínseca, capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos como antivirais, antifúngicos, antitumorais, anti-hipertensivos, e principalmente, antibióticos e

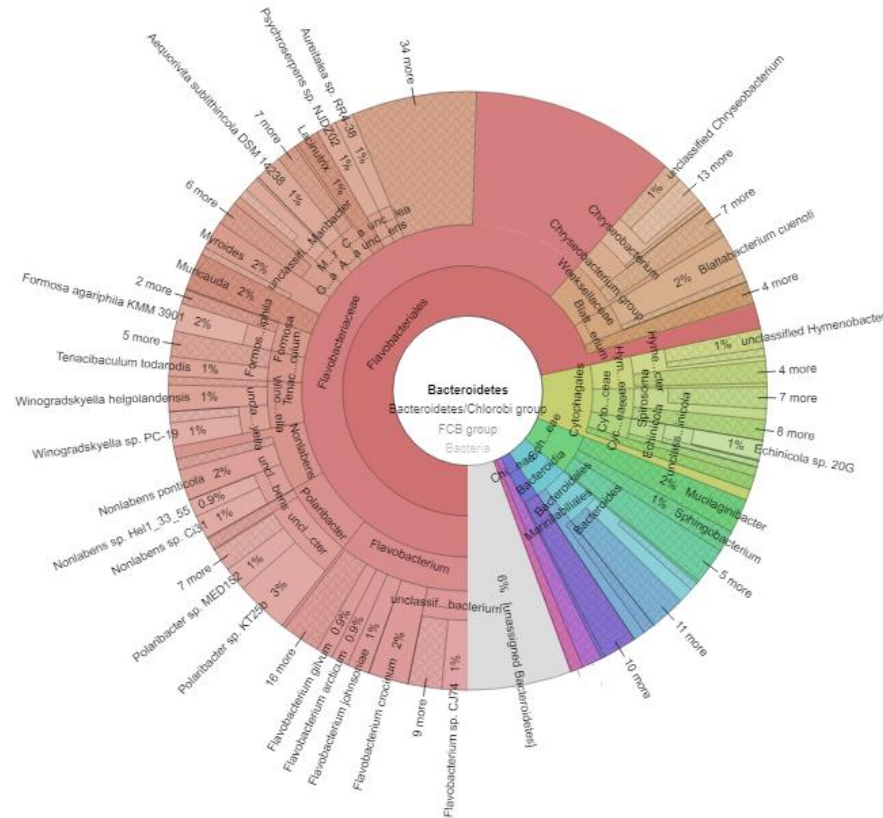
imunossupressores, sendo o principal grupo estudado pela indústria farmacêutica e biotecnológica (TANGERINA et al, 2020; LI et al, 2021). A produção da maioria desses compostos varia de acordo com a espécie e, geralmente, tem como função permitir a competição por recursos com outros microrganismos do ambiente, sendo de gêneros diferentes ou não (WESTHOFF et al, 2021). Zhao et al (2016) demonstraram que fatores ambientais como a salinidade, podem promover a evolução mais rápida de alguns genes de *Streptomyces* spp. como forma de adaptação às características do ambiente, resultando em maior expressão de determinados aglomerados gênicos e produção de diferentes compostos.

Desta forma, os valores encontrados neste estudo para *Streptomyces*, assim como para os gêneros *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardioides* - grupos também reconhecidos pela produção de compostos bioativos (QUAN et al, 2017; CENICEROS et al, 2017; SYED et al, 2019) -, sugerem que o ambiente aquático da Lagoa Salgada apresenta significativo potencial para a exploração de metabólitos secundários. O ambiente singular e ainda pouco explorado, somado aos fatores físico-químicos característicos da lagoa, constitui um cenário promissor para a identificação de novos compostos ou até mesmo de novas espécies e/ou cepas de actinobactérias.

#### **6.3.4. Filo Bacteroidetes**

O filo Bacteroidetes apresentou grupos taxonômicos bem definidos, possuindo cinco ordens de destaque. Dentre elas, a ordem Flavobacteriales representou 72% do número de sequências, configurando-se a ordem dominante. A ordem Cytophagales correspondeu a 9% do filo, sendo seguida por Sphingobacteriales (5%), Bacteroidales (3%), Marinilabiliales (1%) (Figura 13).

Figura13. Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Bacteroidetes.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Analisando o filo ao nível de gênero, observou-se que *Flavobacterium* (11%) representou o maior número de sequências, seguido pelos gêneros *Polaribacter* (6%), *Nonlabens* (5%), *Winogradskyella* (4%), todos pertencentes à mesma ordem. Outros gêneros que se destacaram foram: *Blattabacterium* (3%), *Chryseobacterium* (3%), *Tenacibaculum* (2%), *Hymenobacter* (2%), *Mucilaginibacter* (2%), *Spirosoma* (2%), *Formosa* (2%), *Muricauda* (2%), *Myroides* (2%), *Gramella* (2%), *Maribacter* (1%), *Aequorivita* (1%), *Lacinutrix* (1%), *Echinicola* (1%), *Bacteroides* (1%), *Sphingobacterium* (1%). As espécies *Polaribacter* sp. KT25b (3%), *Blattabacterium cuenoti* (2%), *Formosa agariphila* KMM 3901 (2%), *Nonlabens ponticola* (2%), *Flavobacterium crocinum* (2%), *Nonlabens* sp. Ci31 (1%), *Flavobacterium johnsoniae* (1%), *Tenacibaculum todarodis* (1%), *Winogradskyella helgolandensis* (1%) foram aquelas que se destacaram dentro do filo (Tabela 7). A porcentagem de microrganismos não classificados foi de 6%.

Tabela 7. Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Bacteroidetes.

Ordem	Gênero	Espécie
Flavobacteriales	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium crocinum</i>
		<i>Flavobacterium johnsoniae</i>
	<i>Polaribacter</i>	<i>Polaribacter sp. KT25b</i>
	<i>Nonlabens</i>	<i>Nonlabens ponticola</i>
		<i>Nonlabens sp. Ci31</i>
	<i>Winogradskyella</i>	<i>Winogradskyella helgolandensis</i>
	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium sp. G0162</i>
	<i>Blattabacterium</i>	<i>Blattabacterium cuenoti</i>
	<i>Tenacibaculum</i>	<i>Tenacibaculum todarodis</i>
	<i>Formosa</i>	<i>Formosa agariphila KMM 3901</i>
	<i>Muricauda</i>	<i>Muricauda sp. 501str8</i>
	<i>Myroides</i>	<i>Myroides odoratus</i>
	<i>Gramella</i>	<i>Gramella sp. MAR_2010_147</i>
	<i>Maribacter</i>	<i>Maribacter sp. MJ134</i>
<i>Aequorivita</i>	<i>Aequorivita sublithicola DSM 14238</i>	
<i>Lacinutrix</i>	<i>Lacinutrix sp. 5H-3-7-4</i>	
Cytophagales	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hymenobacter swuensis DY53</i>
	<i>Spirosoma</i>	<i>Spirosoma aerolatum</i>
	<i>Echinicola</i>	<i>Echinicola sp. 20G</i>
Sphingobacteriales	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Mucilaginibacter xinganensis</i>
	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium hotanense</i>
Bacteroidales	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides sp. M10</i>
Marinilabiliales	<i>Draconibacterium</i>	<i>Draconibacterium orientale</i>

Fonte: Próprio autor, 2022.

O filo Bacteroidetes abriga bactérias Gram-negativas, quimio-organotróficas, não formadoras de esporos, em forma de bastonetes. Microrganismos pertencentes ao grupo colonizaram diversos tipos de habitats, incluindo solo, oceanos, ambientes de água doce e trato gastrointestinal de animais (THOMAS et al, 2011). No ambiente, as classes Flavobacteriia,

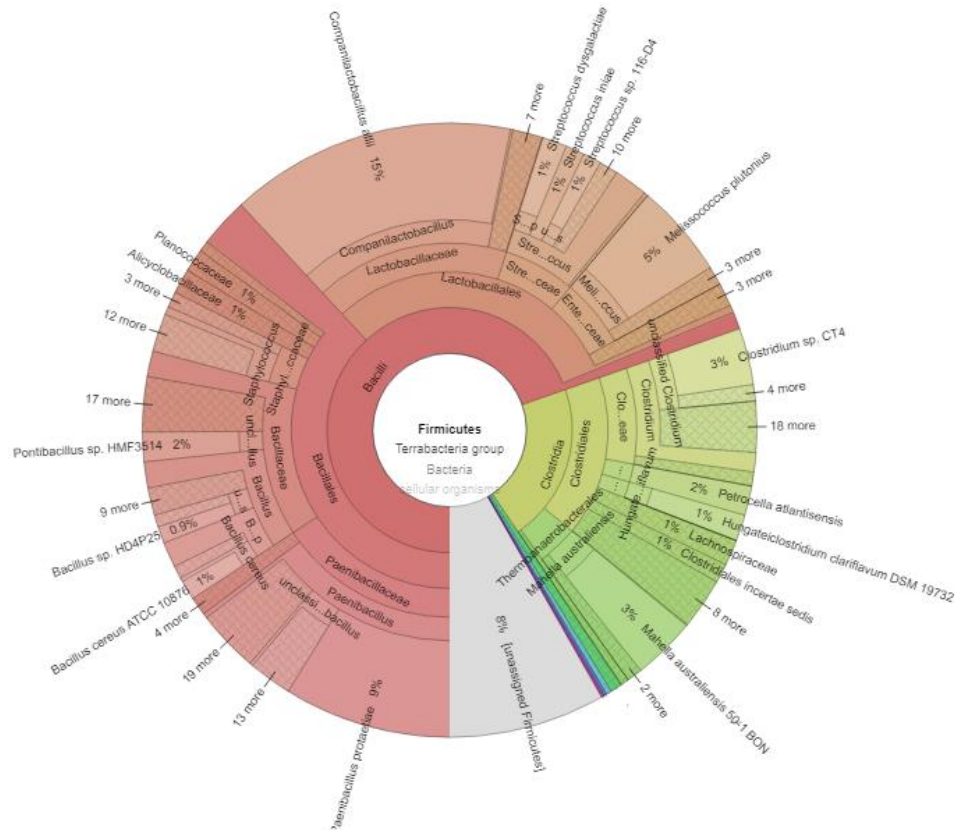
Cytophagia, Chitinophagia, Saprospira e Sphingobacteriia abrigam grande parte das espécies identificadas (HAHNKE et al, 2016). A afirmativa citada foi observada nos resultados encontrados, na qual as ordens Cytophagales, Sphingobacteriales e, principalmente, Flavobacteriales apresentaram o maior número de sequências dentro do filo.

Naghoni et al (2017), em estudo sobre a diversidade microbiana do lago hipersalino Meyghan (Irã), observou, dentro do filo Bacteroidetes, a dominância das classes Flavobacteria (pertencente a ordem Flavobacteriales) e Cytophaga (pertencente a ordem Cytophagales) em amostra de baixa salinidade (~50 g/L) enquanto Sphingobacteria (pertencente a ordem Sphingobacteriales) dominou as amostras de maior salinidade (~180 g/L e ~300 g/L). O achado descrito evidencia a salinidade atuando como elemento controle dentro do filo Bacteroidetes e corrobora os resultados deste estudo, definindo que o protagonismo das ordens Flavobacteriales e Cytophagales sobre Sphingobacteriales e as demais está diretamente relacionado a salinidade do meio aquático da Lagoa Salgada, que está mais próxima dos valores da primeira amostra do estudo citado.

### **6.3.5. Filo Firmicutes**

Analisando o filo Firmicutes observou-se que a ordem Bacillales (38%) foi aquela que apresentou o maior número de sequências. A ordem Lactobacillales (31%) apresentou valores relativamente próximos, sendo sucedida pelas ordens Clostridiales (16%) e Thermoanaerobacterales (4%) respectivamente (Figura 14). A porcentagem de microrganismos não classificados no filo foi de 8%.

Figura 14. Representação da diversidade microbiana encontrada no filo Firmicutes.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Os gêneros *Companilactobacillus* e *Paenibacillus* se destacaram dentro do referido grupo, onde cada um representou 15% do filo. Os gêneros *Bacillus* (8%), *Clostridium* (8%), *Streptococcus* (6%), *Melissococcus* (5%), *Staphylococcus* (2%), *Planococcus* (2%), *Pontibacillus* (2%), *Petrocella* (2%), *Hungateiclostridium* (1%) também se destacaram, porém com porcentagens significativamente menores em relação aos primeiros supracitados.

A espécie *Companilactobacillus allii* (15%) foi aquela que representou o maior número de sequências dentro do referido nível taxonômico. Outras espécies que obtiveram porcentagens relevantes foram: *Paenibacillus protaetiae* (9%), *Melissococcus plutonius* (5%), *Clostridium* sp. CT4 (3%), *Pontibacillus* sp. HMF3514 (2%), *Petrocella atlantisensis* (2%), *Hungateiclostridium clariflavum* DSM 19732 (1%) e *Streptococcus dysgalactiae* (1%) (Tabela 8).

Tabela 8. Principais ordens, gêneros e espécies identificadas no filo Firmicutes.

Ordem	Gênero	Espécie
Bacillales	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus protaetiae</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
	<i>Planococcus</i>	<i>Planococcus dechangensis</i>
	<i>Pontibacillus</i>	<i>Pontibacillus sp. HMF3514</i>
Lactobacillales	<i>Companilactobacillus</i>	<i>Companilactobacillus allii</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	<i>Melissococcus</i>	<i>Melissococcus plutonius</i>
Clostridiales	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium sp. CT4</i>
	<i>Petrocella</i>	<i>Petrocella atlantisensis</i>
	<i>Hungateiclostridium</i>	<i>Hungateiclostridium clariflavum</i> DSM 19732
Thermoanaerobacterales	<i>Mahella</i>	<i>Mahella australiensis</i>

Fonte: Próprio autor, 2022.

O filo Firmicutes compreende microrganismos Gram-positivos, com paredes celulares rígidas ou semi-rígidas contendo peptidoglicano (GARCIA et al, 2021). Por apresentarem muitas bactérias com diferentes características filogenéticas e fenotípicas, o grupo possui uma hierarquia taxonômica bastante fluida, sendo necessário sólidos estudos para estabelecer uma filotaxonomia mais forte (YUTIN E GALPERIN, 2013).

As células dos microrganismos que compõem o grupo possuem formato de bastonetes ou esferoidais e se reproduzem principalmente por fissão binária. Alguns formam endósporos e são móveis por meio de flagelos (BEPPU E UEDA, 2015; Filippidou et al, 2016).

Membros do filo são abundantes no solo e ambientes aquáticos onde estão envolvidos na decomposição e reciclagem de matéria orgânica (LIU et al, 2019). No entanto, diversos gêneros colonizam a flora intestinal de mamíferos - participando do processo digestório - ou possuem ação patogênica a humanos, animais e plantas (BAMOLA et al, 2017; WANG et al,



2019). Alguns membros do filo Firmicutes também são industrialmente valiosos para a produção de antibióticos, enzimas e produtos lácteos (Liu et al., 2012; Kwak et al., 2013).

Em ambientes aquáticos hipersalinos, Abdallah et al (2016) observou que as classes Bacilli e Clostridia apresentaram dominância dentro do filo Firmicutes nas amostras de água da lagoa Chott El Jerid (Tunísia), resultado também constatado por este estudo. No entanto, ao analisar a abundância por filos identificados, se tem um cenário diferente. No trabalho citado, assim como em Jacob et al (2017), Edwarson e Hollibaugh (2018) e Han et al (2017), Firmicutes se apresentou como grupo dominante juntamente com as proteobactérias, diferentemente do cenário encontrado na Lagoa Salgada. A diferença de diversidade para ambientes com características semelhantes pode estar relacionada a fatores físico-químicos. Em todos os estudos citados os autores encontraram valores de salinidade significativamente mais altos (~90 a 346 g. L<sup>-1</sup>) quando comparado com os da Lagoa Salgada. Por outro lado, os valores para pH ficaram abaixo (5,9 a 6,9) em relação ao da lagoa, sugerindo que tais fatores associados podem atuar diretamente na capacidade de colonização do filo.

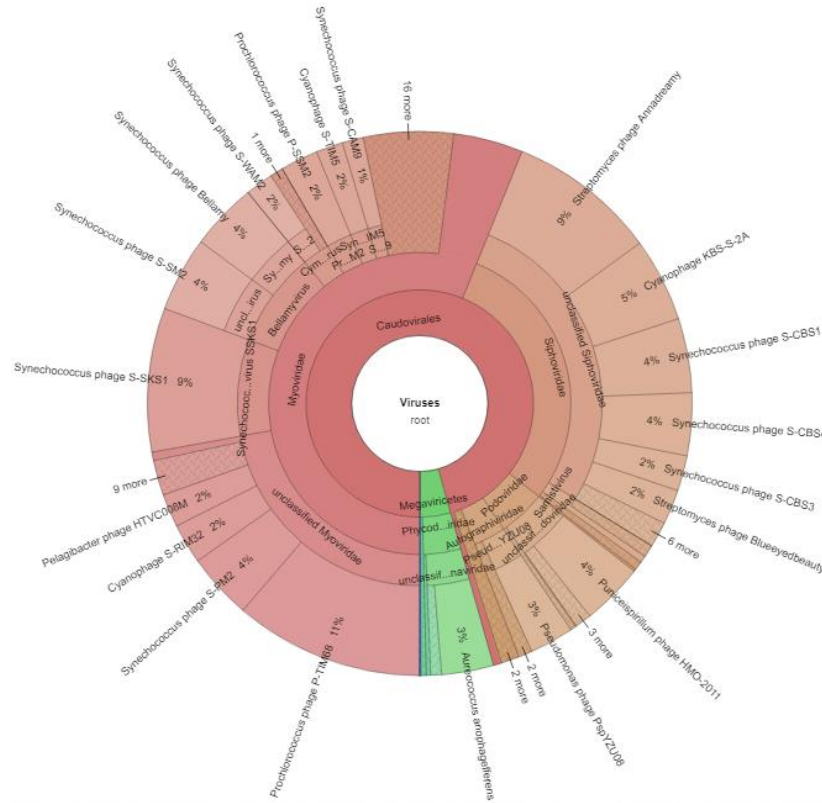
Segundo Cupit, Lomstein e Kjeldsen (2019), a baixa taxa de lise dos endósporos durante os procedimentos de extração de ácido nucleico também pode contribuir para a baixa abundância relativa de Firmicutes em determinadas bibliotecas de sequências.

### 6.3.6. Vírus

Analisando a diversidade viral da amostra, foi observado que a mesma é composta majoritariamente por microrganismos pertencentes ao reino Duplodnaviria (96%). O reino Varidnaviria representou as demais sequências (4%).

Explorando a diversidade dos vírus a nível taxonômico de família, observou-se que 56% das sequências identificadas pertenciam ao grupo Myoviridae, sendo aquele de maior abundância dentro da análise. A família Siphoviridae também se destacou, representando 29% das sequências (Figura 15). As demais famílias identificadas foram: Podoviridae (5%), Phycodnaviridae (4%), Autographiviridae (3%) e Demereciviridae (1%).

Figura 15. Representação da diversidade viral encontrada na amostra.



Fonte: Próprio autor, 2021.

Ao analisar o grupo dos vírus à nível taxonômico de espécie, foi observado que *Prochlorococcus phage P-TIM68* (11%) apresentou o maior número de sequências identificadas, seguida pelas espécies *Streptomyces phage Annadreamy* (9%) e *Synechococcus phage S-SKS1* (9%) respectivamente. Outras espécies que apresentaram porcentagens relevantes foram: *Cyanophage KBS-S-2A* (5%), *Synechococcus phage S-PM2* (4%), *Synechococcus phage S-SM2* (4%), *Synechococcus phage S-CBS1* (4%), *Synechococcus phage Bellamy* (4%), *Synechococcus phage S-CBS4* (4%), *Puniceispirillum phage HMO-2011* (4%), *Pseudomonas phage PspYZU08* (3%), *Aureococcus anophagefferens vírus* (3%), *Cyanophage S-RIM32* (2%), *Pelagibacter phage HTVC008M* (2%), *Synechococcus phage S-WAM2* (2%), *Prochlorococcus phage P-SSM2* (2%), *Cyanophage S-TIM5* (2%), *Synechococcus phage S-CBS3* (2%), *Streptomyces phage Blueyedbeauty* (2%) (Tabela 9).

Tabela 9. Principais espécies e famílias identificadas pertencentes ao grupo dos vírus.

Família	Espécies
Myoviridae	<i>Prochlorococcus phage</i> P-TIM68
	<i>Synechococcus phage</i> S-SM2
	<i>Synechococcus phage</i> Bellamy
	<i>Cyanophage</i> S-RIM32
	<i>Prochlorococcus phage</i> P-SSM2
	<i>Pelagibacter phage</i> HTVC008M
	<i>Synechococcus phage</i> S-WAM2
Siphoviridae	<i>Cyanophage</i> S-TIM5
	<i>Streptomyces phage</i> Annadreamy
	<i>Cyanophage</i> KBS-S-2 <sup>a</sup>
	<i>Synechococcus phage</i> S-CBS1
	<i>Synechococcus phage</i> S-CBS4
Podoviridae	<i>Synechococcus phage</i> S-CBS3
	<i>Streptomyces phage</i> Blueeyedbeauty
Podoviridae	<i>Puniceispirillum phage</i> HMO-2011
Phycodnaviridae	<i>Aureococcus anophagefferens virus</i>
Autographiviridae	<i>Pseudomonas phage</i> PspYZU08

Fonte: Próprio autor, 2022.

Vírus, agentes biológicos constituídos por DNA ou RNA de fita simples ou dupla, envolvido por uma proteína e/ou revestimento lipídico, são abundantes em toda a biosfera do planeta e desempenham importantes funções na ciclagem bioquímica de nutrientes, assim como na evolução de seus organismos hospedeiros (SIME-NGANDO, 2014; DANOVARO et al, 2011; SUTTLE, 2007).

Segundo Baxter et al (2011) e Plominsky et al (2018), os ambientes hipersalinos abrigam as maiores densidades virais conhecidas em sistemas aquáticos, apresentando concentrações entre de até 10<sup>9</sup> partículas semelhantes a vírus por mililitro. Essa riqueza está diretamente relacionada com a abundância bacteriana presente no ambiente, uma vez que a

maioria dos vírus são bacteriófagos de eubactérias e archaea, (BETTAREL et al., 2010; PENNAFIRME et al, 2019). Normand et al (2014) afirmam que os vírus são os principais fatores bióticos que controlam a estrutura das comunidades microbianas hipersalinas devido, principalmente, à falta de outros grandes predadores.

Em relação a formação das esteiras microbianas, Paction et al (2014) revelaram que os vírus podem desempenhar funções na organomineralização das mesmas em ecossistemas hipersalinos. Os autores, em estudo sobre as alterações na abundância e morfologia dos vírus e seus hospedeiros, concluíram que a precipitação mineral ocorre diretamente em vírus livres. Os vírus são inicialmente permineralizados por silicatos de magnésio amorfos, que então se alteram para nanoesferas de carbonato de magnésio - com aproximadamente 80-200 nm de diâmetro - durante a diagênese. Em seguida, a precipitação mineral ocorre a partir de detritos celulares decorrentes da lise celular após a infecção viral.

Os resultados encontrados mostraram que a maioria dos vírus identificados na amostra pertencem ao grupo dos bacteriófagos (fagos), principalmente relacionados à cianobactérias - *Synechococcus phage S-SKS1*, *Cyanophage KBS-S-2A*, *Synechococcus phage S-PM2*, *Synechococcus phage S-SM2*, *Synechococcus phage S-CBS1*, *CBS3*, *CBS4*, *Synechococcus phage Bellamy*, *Cyanophage S-RIM32*, *Synechococcus phage S-WAM2*, *Cyanophage S-TIM5*. A abundância de cianófagos está diretamente associada à abundância de cianobactérias identificadas na amostra. Esse resultado levanta a questão sobre a influência que tais agentes possuem dentro da diversidade microbiológica do filo, assim como do ambiente da lagoa.

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias, e apresentam potencial de transferir material genético entre hospedeiros por meio de transdução (BALCÁZAR, 2017). Segundo Sime-Ngando (2014), os fagos ambientais podem forçar os mecanismos de diversificação microbiana em direção à evolução da célula hospedeira através de diversos processos biológicos, nos quais se destacam: o controle de vírus líticos competitivos; a alteração das propriedades metabólicas das células hospedeiras que podem adquirir imunidade a infecções fenotípicas e características genotípicas, como a produção de toxinas; a transferência de genes virais e de hospedeiros entre espécies (transdução), influenciando assim a especiação; os efeitos dos mecanismos fisiológicos envolvidos na resistência do hospedeiro contra vírus (produção de metabólitos secundários através de mutações cromossômicas).

Por possuírem uma alta abundância e grande distribuição por diversos ecossistemas, os vírus ambientais se apresentam como potenciais veículos responsáveis pela variabilidade

genética dos microrganismos, especialmente em ambientes aquáticos, atuando diretamente nos processos ecológicos e evolutivos.

Em ambientes hipersalinos, a abundância das famílias Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae também foi relatada no Grande Lago Salgado, Estados Unidos (MOTLAGH et al, 2017; BHATTARAI et al, 2021), nos lagos salinos no planalto Qinghai-Tibet (GU et al, 2021), lago Elmenteita, Quênia (AKHWALE et al, 2019) entre outros ambientes. Dávila-Ramos et al (2019) destaca que as famílias supracitadas possuem capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros bacterianos pertencentes a mais de 140 gêneros procarióticos. Pennafirme et al (2019), em estudo sobre a caracterização das esteiras microbianas e partículas virais da Lagoa Vermelha (Massambaba, RJ), identificaram a predominância das famílias Myoviridae (42%), Podoviridae (33%) e Siphoviridae (25%) nas amostras analisadas. Os resultados descritos são semelhantes ao deste estudo, indicando que tais grupos virais podem ser predominantes em ambientes aquáticos hipersalinos localizados na região costeira do Estado do Rio de Janeiro.

#### 6.4. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES

A análise das funções gênicas dos microrganismos produziu uma gama de anotações funcionais (ontologia gênica - termo GO).

Foi identificada a ocorrência de 629 anotações funcionais, sendo 387 (61,52%) correspondentes a categoria funções moleculares, 205 (32,59%) a categoria processos biológicos e 37 (5,89%) relacionado a componentes celulares. As funções gênicas de cada categoria foram organizadas em grupos para melhor análise.

Na categoria funções moleculares observou-se que grande parte dos genes estavam relacionados a processos de ligação e atividades enzimáticas de liase e ligase (Tabela 10).

Tabela 10. Principais anotações funcionais relacionadas a categoria funções moleculares ( $p < 0,05$ ).

Termo GO	p-valor	FDR
Atividade catalítica	3.4e-21	2.53e-18
Ligação de íons	1.09e-10	4.05e-08
Ligação de compostos cíclicos orgânicos	3.12e-07	2.11e-05
Ligação de compostos heterocíclicos	3.12e-07	2.11e-05
Atividade de transferase	4.22e-10	1.05e-07
Ligação de nucleotídeos	5.63e-08	5.99e-06
Ligação de íons metálicos	1.16e-05	0.00043
Ligação de derivados de carboidratos	3.01e-06	0.00016
Ligação de ribonucleotídeos	2.93e-06	0.00016
Ligação de nucleotídeos de purina	5.04e-06	0.00023
Ligação de trifosfato de ribonucleosídeo de purina	5.68e-06	0.00025
Ligação de ribonucleotídeos de purina	7.66e-06	0.00032
Ligação de ATP	4.77e-05	0.0017
Atividade de ligase	1.18e-07	9.81e-06
Atividade de transferase, transferindo grupos contendo fósforo	0.001	0.0237
Atividade de liase	2.53e-07	1.89e-05
Atividade da ligase, formando ligações carbono-nitrogênio	7.02e-07	4.02e-05

Atividade catalítica, atuando no RNA	0.00093	0.0237
Atividade de transferase, transferindo grupos de um carbono	0.00093	0.0237
Atividade de liase de carbono-oxigênio	8.41e-05	0.0025
Atividade catalítica, atuando em um tRNA	0.00032	0.0091
Atividade isomerase	0.00062	0.0164
Atividade de transferase, transferindo grupos alquil ou aril (exceto metil)	4.96e-05	0.0017
Atividade da hidrolase	0.00053	0.0147
Atividade de liase de carbono-carbono	0.00092	0.0237
Hidroximetil-, formil- e atividade relacionada a transferase	0.0012	0.0276

Fonte: Próprio autor, 2022.

Na categoria processos biológicos, as anotações identificadas foram associadas a genes responsáveis por processos metabólicos e biossintéticos (Tabela 11).

Tabela 11. Principais anotações funcionais relacionadas a categoria processos biológicos ( $p < 0,05$ ).

Termo GO	p-valor	FDR
Processo metabólico celular	3.25e-28	4.67e-25
Processo metabólico de substância orgânica	6.41e-25	1.53e-22
Processo metabólico primário	1.51e-22	1.81e-20
Processo metabólico composto de nitrogênio	2.68e-27	1.93e-24
Processo biossintético celular	2.03e-24	3.24e-22
Processo metabólico do composto de nitrogênio celular	2.86e-15	2.57e-13
Processo metabólico de compostos cíclicos orgânicos	8.76e-17	9.68e-15
Processo metabólico de ácidos orgânicos	6.84e-15	5.17e-13
Processo metabólico do ácido carboxílico	3.18e-14	1.98e-12
Processo metabólico do fósforo	3.63e-09	1.21e-07
Processo biossintético heterocíclico	9.9e-14	5.92e-12
Processo biossintético de compostos aromáticos	1.51e-14	9.85e-13

Processo metabólico derivado de carboidratos	1.09e-12	6.03e-11
Processo metabólico de aminoácidos celulares	1.04e-09	3.64e-08
Processo biossintético do ácido carboxílico	7.01e-11	2.96e-09
Processo biossintético de organofosforados	3.92e-09	1.28e-07
Processo metabólico de nucleotídeos	5.28e-11	2.37e-09
Processo de biossíntese de macromoléculas celulares	0.0011	0.0185
Processo metabólico do ácido nucleico	0.0027	0.0395
Processo biossintético de nucleotídeos	1.1e-10	4.38e-09
Processo celular de biossíntese de aminoácidos	8.4e-08	2.23e-06
Processo metabólico do ribonucleotídeo de purina	2.11e-09	7.21e-08
Fosforilação	0.0023	0.0353
Nucleoside monophosphate biosynthetic process	6.93e-08	1.91e-06
Processo biossintético de nucleosídeo monofosfato	8,00E-08	2.17e-06
Processo biossintético de vitaminas solúveis em água	0.00032	0.0064
Processo biossintético do ácido dicarboxílico	2.4e-06	5.84e-05
Reparo de DNA	0.0024	0.0362
Processo metabólico de aminoácidos da família aspartato	0.0022	0.0346
Processo metabólico de aminoácidos da família da glutamina	0.0014	0.0227
Processo metabólico do ribonucleosídeo bifosfato	1.58e-05	0.00034
Processo biossintético de composto contendo pirimidina	0.00071	0.0136
Processo metabólico da glutamina	0.00092	0.0167
Ciclo do ácido tricarboxílico	0.0019	0.0301
Processo biossintético da coenzima A	0.0035	0.0447

Fonte: Próprio autor, 2022.



As anotações que se destacaram dentro da categoria componentes celulares estavam relacionados a genes da estrutura celular, citoplasma e citosol (Tabela 12).

Tabela 12. Principais anotações funcionais relacionadas a categoria componentes celulares ( $p < 0,05$ ).

Termo GO	p-valor	FDR
Entidade anatômica celular	7.17e-13	6.41e-11
Estrutura anatômica intracelular	3.98e-13	6.41e-11
Citoplasma	1.4e-12	7.49e-11
Citosol	8.82e-06	0.00036

Fonte: Próprio autor, 2022.

Foi observada a presença de diversas vias metabólicas na amostra, sendo aquelas relacionadas a biossíntese de metabólitos secundários, aminoácidos, metabolismo microbiano e do carbono a apresentar o maior número de genes. As principais vias identificadas estão listadas na Tabela 13.

Tabela 13. Principais vias metabólicas identificadas na amostra ( $p < 0,05$ ).

Vias metabólicas	p-valor	FDR
Biossíntese de metabólitos secundários	7.6e-20	4.03e-18
Biossíntese de aminoácidos	2.68e-10	9.48e-09
Metabolismo microbiano em diversos ambientes	5.01e-07	1.33e-05
Metabolismo do carbono	7.97e-06	0.00017
Biossíntese de Pantotenato e coenzima A	2.37e-05	0.00042
Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato	0.00023	0.0034
Metabolismo das purinas	0.00038	0.005
Metabolismo do piruvato	0.00038	0.005
Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	0.00082	0.0087
Metabolismo da riboflavina	0.0012	0.0118
Glicólise / Gliconeogênese	0.002	0.0162
Biossíntese de lisina	0.0021	0.0162
Biossíntese de aminoacil-tRNA	0.0023	0.0162
Metabolismo do ácido 2-oxocarboxílico	0.0018	0.0162

Ciclo citrato (ciclo ácido tricarboxílico (TCA))	0.0032	0.0212
Biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano	0.0045	0.0279
Biossíntese de açúcar de nucleotídeo de antígeno O	0.0047	0.0279
Reservatório de um carbono por folato	0.0047	0.0279
Exportação de proteínas	0.0045	0.0279
Metabolismo da pirimidina	0.0059	0.0298
Metabolismo do açúcar-amino e do açúcar-nucleotídeo	0.0059	0.0298
Metabolismo da glicina, serina e treonina	0.0069	0.0315
Biossíntese de monobactam	0.0068	0.0315
Metabolismo da cisteína e da metionina	0.0071	0.0315
Biossíntese da unidade de açúcar policetídeo	0.0068	0.0315
Biossíntese de folato	0.0079	0.0315
Metabolismo de glioxilato e dicarboxilato	0.0099	0.0374

Fonte: Próprio autor, 2022.

Os resultados revelaram a multiplicidade de processos biológicos e reações enzimáticas que ocorrem no ambiente da lagoa. As anotações supracitadas indicam a presença de genes que atuam no transporte e metabolismo de carboidratos, lipídios, nucleotídeos e aminoácidos; processamento de informações genéticas, ambientais e sinalização celular; mecanismos de defesa; produção e conversão de energia; e processos de replicação, recombinação e reparo.

Paralelamente foi possível observar uma gama de anotações relacionadas a resposta ao estresse ambiental, na qual se destacaram aquelas associadas a resposta ao estresse oxidativo, estresse osmótico e térmico. Dentro deste contexto, genes com funções de defesa também foram identificados (Tabela 14).

Tabela 14. Anotações funcionais relacionadas ao estresse ambiental ( $p < 0,05$ ).

Termo GO	p-valor	FDR
Estresse oxidativo		
resposta ao estresse oxidativo	2.03e-21	3.4e-49
processo biossintético de glutathione	2.76e-08	1.6e-25
NADPH: quinona oxidoreductase	8.76e-14	3.2e-19
atividade da glutathione hidrolase	6.44e-10	4.8e-16

atividade da glutathione sintase	3.28e-13	1.6e-25
processo biossintético da glicina	3.73e-07	1.2e-17
atividade da glicina		1.3E-15
hidroximetiltransferase	0.0032	
superóxido dismutase	0.0045	1.6e-23
Estresse térmico		
resposta celular ao calor	0.0053	1.9e-28
ligação proteica de choque térmico	0.0049	7.8e-12
resposta de defesa ao vírus	0.0028	6.1e-21
processo biossintético de antibiótico	0.0098	2.5e-13

Fonte: Próprio autor, 2022.

A categoria estresse oxidativo englobou a maioria das sequências gênicas identificadas para resposta ao estresse, com as anotações regulação do processo oxidativo, processo biossintético da glutathione, e enzimas NADPH: quinona oxidoreductase, superóxido dismutase, glutathione hidrolase e sintase se destacando. Também foram detectados genes responsáveis pelo processo de biossíntese da glicina e da enzima glicina hidroximetiltransferase. A glicina é um osmólito orgânico que atua contra diferentes estresses ambientais como salinidade, alta temperatura, radiação UV e metais pesados (ALONSO, SANCHÉZ e MARTINEZ, 2001). Já a glutathione além de desempenhar um significativo papel de defesa contra o estresse oxidativo (CASCELLA et al, 2014), promove a proteção contra xenobióticos tóxicos, abrangendo os poluentes ambientais (GARCÍA-GIMENEZ e PALLARDÓ, 2014). Por fim, superóxido dismutase, é um antioxidante que possui função fundamental na remoção de espécies reativas ao oxigênio, que são produzidas durante o estresse por irradiância visível e ultravioleta em microalgas e plantas (JANKNEGT et al, 2007).

A presença de genes relacionados aos processos de resposta ao estresse indica como os microrganismos respondem, tanto a nível de comunidade quanto de organismo, às características ambientais da lagoa, permitindo assim que haja o crescimento e desenvolvimento desses microrganismos.

As análises permitiram identificar genes relacionados aos ciclos do carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre na amostra, três principais ciclos biogeoquímicos presentes em ecossistemas de lagoas hipersalinas (LLORENS-MARÈS et al, 2015).

Os resultados demonstraram que o microbioma da lagoa possui uma gama de anotações associadas ao processo de fotossíntese, com destaque para a fixação de carbono. Genes responsáveis pelo processo metabólico da clorofila, biossintético de carboidratos e complexo do fotossistema II também foram identificados. As demais anotações associadas estão na tabela 15.

Em relação ao processo de fixação de carbono, foram identificadas enzimas pertencentes ao ciclo Calvin-Benson, ciclo redutivo do ácido tricarboxílico (TCA) e via redutiva da glicina, indicando assim os múltiplos caminhos metabólicos de assimilação do carbono no ambiente lagunar (Tabela 15).

Tabela 15. Anotações relacionadas aos processos de fotossíntese e fixação do carbono ( $p < 0,05$ ).

Termo GO	p-valor	FDR
Fotossíntese	3.2e-14	2.8e-6
Processo metabólico da clorofila	1.19e-13	7.4e-13
Complexo do fotossistema II	2.82e-07	2.8e-6
Biossintético de carboidratos	2.42e-08	1.0e-12
Glicerol-3-fosfato desidrogenase	4.22e-16	1.4e-29
Uroporfirinogênio descarboxilase	5.63e-03	1.1e-12
Hidroximetilbilano sintase	2.73e-05	7.5e-7
Fixação de carbono	1.18e-05	1.1e-23
Ciclo Calvin-Benson-Bassham		
Frutose-bifosfato aldolase	3.18e-12	1.4e-16
Frutose 1,6-bifosfato 1-fosfatase	3.63e-04	1.5e-5
Ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) I		
Isocitrato desidrogenase (NADP+)	3.56e-17	1.6e-21
Malato desidrogenase (descarboxilante) (NAD+)	3.07e-12	1.5e-11

Adenilosuccinato sintase	3.84e-09	2.7e-15
Via redutiva da glicina de fixação autotrófica de CO <sub>2</sub>		
Formato desidrogenase	5.18e-02	1.1e-27
Formato-tetrahidrofolato ligase	4.61e-09	3.5e-7
Sistema de clivagem de glicina	0.00035	1.6e-4
Acetato-coa ligase	0.0028	1.2e-29

Fonte: Próprio autor, 2022.

Resumidamente, pode-se definir fotossíntese como o processo biológico de conversão da energia solar em energia química utilizável. Este processo chave ocorre tanto em ambientes terrestres quanto em aquáticos, sendo todas as plantas verdes, algas e bactérias fotossintéticas os organismos responsáveis pela sua realização. (Pan et al, 2012).

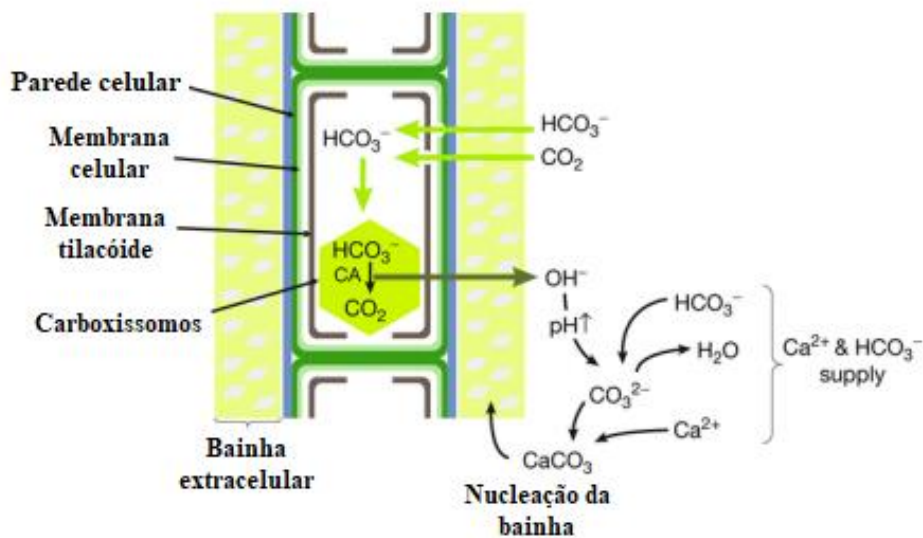
Durante as etapas fotossintéticas, dois eventos-chave ocorrem obrigatoriamente; reações com presença de luz, na qual a energia luminosa é convertida em ATP e NADPH e o oxigênio é liberado, e reações escuras, onde o CO<sub>2</sub> é fixado em carboidratos utilizando os produtos das reações de luz, ATP e NADPH. (CROCE e AMERONGEN, 2020).

Conforme destacado, as cianobactérias são os principais produtores primários em lagoas costeiras hipersalinas, apresentando significativa atividade fotossintética. Produtores primários dominantes em esteiras microbianas de águas rasas são geralmente fototróficos oxigenados (Paerl et al, 2000). Tais fatos, associados às anotações e abundância identificadas, permitem considerar o gênero *Synechococcus* sp., seguido de *Synechocystis* sp., como os principais grupos responsáveis pelo processo de fotossíntese oxigenada da Lagoa Salgada.

Ademais, pode-se sugerir também que grande parte da fixação do CO<sub>2</sub> do ambiente está diretamente relacionada ao processo de oxi-fotossíntese supracitado, pois, conforme dito, a comunidade de cianobactérias se mostrou abundante na amostra. Yates e Robbins (1998) destacaram o papel de *Synechococcus* spp. na precipitação de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), durante o processo de fixação de CO<sub>2</sub>, em ambientes aquáticos que apresentam condições de pH elevado. Brito et al (2022) demonstraram que o crescimento de *Synechococcus* spp. em meio alcalino (pH 10,5) pode promover o aumento da produção de substâncias exopoliméricas (SEP), como consequência da proliferação de cianobactérias (floração) - geralmente caracterizadas por altas densidades celulares e taxas de fotossínteses. A SEP pode estar associada à parede celular de alguns tipos bacterianos ou em suspensão na fase aquosa como

SEP solúvel. Neste contexto, os autores destacam que as cianobactérias, que geralmente possuem uma bainha de SEP mucóide espessa ao redor de sua parede celular (Figura 16), também excretam carboidratos, possivelmente incluindo SEP solúvel, como um mecanismo fotossintético de “transbordamento de carbono” em condições onde há limitação de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo.

Figura 16. Modelo de calcificação da bainha extracelular em cianobactérias. As cianobactérias podem importar ativamente bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) para suas células através de mecanismos de concentração de  $\text{CO}_2$  e convertê-lo em  $\text{CO}_2$  para a fotossíntese. Essa captação ativa de bicarbonato aumenta o pH próximo às células e no SEP. Se a saturação do mineral  $\text{CaCO}_3$  for alta o suficiente, os cristais podem nuclear sobre ou no SEP.



Fonte: Adaptado de LEE, 2021.

Segundo Scalan (2003) *Synechococcus* sp. possui alta relação superfície/volume (0,8–1,2  $\mu\text{m}$ ), proporcionando aos membros do grupo uma melhor eficiência de absorção de luz por pigmento. O gênero também é caracterizado por possuir diferentes pigmentos-proteínas para captar energia luminosa e simultaneamente proteger o fotossistema II (PSII) - complexo de múltiplas subunidades de membranas integrais (tilacóides) que inicia o fluxo de elétrons na fotossíntese oxigenada (NICKELSEN e RENGSTL, 2013) - de fotodanos.

*Synechococcus* sp. possui um complexo de antena extra-membrana (ficobilissoma) composto de bastonetes de ficocianina que irradiam proteínas centrais de aloficocianina. As

proteínas ligantes da membrana central ligam o ficobilissoma à membrana tilacóide e transferem a energia da luz colhida para a *clorofila a* e carotenóides no complexo PSII (GORBUNOV et al, 2011; KIRILOVSKY, 2015). Murphy et al (2017) demonstraram que *Synechococcus* apresentou um retorno metabólico positivo após ativação de mecanismos de reparo do PSII em todas as faixas de luz testadas.

O estresse ambiental causado pelos fatores anteriormente destacados pode causar significativa redução nos teores de pigmentos fotossintéticos, comprometendo, em especial, o processo metabólico da clorofila. Essa redução pode ocorrer devido a degradação das vias biossintéticas ou do próprio pigmento, gerando uma perda na eficiência de absorção de luz nos fotossistemas I, e principalmente II. Entretanto, o dano e a magnitude causado pelo estresse ambiental depende da duração da exposição e tolerância ao estresse de cada organismo. *Synechococcus* sp. apresenta características morfológicas (SRIVASTAVA e NEILAN, 2013) e genéticas (LOU et al, 2018)) que possibilitam sua sobrevivência e desenvolvimento em ambientes considerados extremos. Tais fatos contribuem para justificar a abundância do gênero no ambiente, assim como, evidenciar o seu papel dentro do processo fotossintético e formação das esteiras microbianas da lagoa.

Ecossistemas dependem de produtores primários, organismos autotróficos que fixam CO<sub>2</sub> e fornecem carbono orgânico para organismos heterotróficos. Organismos capazes de utilizar o CO<sub>2</sub> como única fonte de carbono inclui seres fototróficos e quimioautotróficos (bactérias sulfurosas incolores, nitrificantes, metanógenos e algumas bactérias redutoras de sulfato) (SÁNCHEZ-ANDREA et al, 2020). Em esteiras microbianas este processo é realizado por eucariotas (diatomáceas) e cianobactérias.

A fixação de CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Calvin-Bensson-Bassham (denominada fase escura da fotossíntese) depende das reações que ocorrem na presença de luz para o fornecimento de energia (ATP e NADPH). A etapa inicial do ciclo de Calvin promove a ligação do CO<sub>2</sub> à ribulose bifosfato por ação da enzima RuBisCO (ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase), produzindo dois compostos, cada um com 3 moléculas de carbono (ácido fosfoglicérico). O conjunto de reações posteriores reduzem o CO<sub>2</sub> e reciclam a molécula aceptora. Seis execuções deste ciclo utilizam 6 moléculas de CO<sub>2</sub> para produzir uma molécula de frutose-6-fosfato (LIU et al, 2021).

Dentro do ciclo descrito acima, a enzima frutose-bifosfato aldolase (GO:0004332) catalisa a condensação aldólica reversível de diidroxiacetonafosfato (DHAP) e gliceraldeído 3-fosfato (GAP) (MetaCyc, 2022). Já a enzima frutose 1,6-bifosfato (GO:0042132) participa de

reações que ocorrem no estroma do cloroplasto durante o ciclo. Até o momento, não foi previsto que a mesma tenha um papel direto na formação de sacarose citosólica (MetaCyc, 2022).

O ciclo redutivo do ácido tricarboxílico (ATC) é uma via de fixação de dióxido de carbono encontrada em eubactérias autotróficas e Archaea. É considerada uma via primordial para a produção de moléculas orgânicas iniciais para a biossíntese de açúcares, lipídios, aminoácidos, pirimidinas e pirróis (Metacy, 2022).

O ciclo redutor é em grande parte um o ciclo oxidativo e catabólico do ATC ao contrário, onde a maioria das enzimas funcionam de forma reversível, podendo catalisar ambas as direções. Acredita-se que apenas três pares de enzimas contrárias determinem a direção oxidativa ou redutiva do ciclo, são elas: ATP citrato sintase; oxoglutarato sintase; e succinato desidrogenase (SIEBERS et al, 2004). As enzimas listadas são responsáveis por catalisar a direção redutiva. Por fim, a presença dessas atividades enzimáticas em bactérias e archaea cultivadas autotroficamente é considerada indicativa da presença do ciclo redutivo do ATC (Metacy, 2022).

Dentre as enzimas identificadas, o isocitrato desidrogenase (NADP<sup>+</sup>) (GO:0004450) catalisa a descarboxilação oxidativa de D-treisocitrato a 2-oxoglutarato e CO<sub>2</sub>, juntamente com a redução de NADP<sup>+</sup>. Em organismos que possuem o ciclo redutivo do ATC, a enzima NADP-dependente pode operar na direção reversa, catalisando a carboxilação redutiva do 2-oxoglutarato. É uma enzima chave, sendo também importante para controlar o fluxo metabólico entre o ciclo ATC e o ciclo do glioxilato (METACY, 2022); malato desidrogenase (GO:0004471) atua na redução do oxaloacetato produzido com NADH transformando-o em (S) malato (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) (HÜGLER et al, 2005); a adenilosuccinato sintase (GO:0004019) utiliza o aspartato para gerar fumarato no processo de conversão de monofosfato de inosina em monofosfato de adenosina (KE et al, 2015)

Inicialmente proposta por Bar-Even et al (2012), a via redutiva da glicina é considerada a sétima via de fixação de CO<sub>2</sub> identificada (SÁNCHEZ-ANDREA et al 2020; SONG et al, 2020). Sánchez-Andrea et al (2020), descreveram o crescimento quimiolitototrófico da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* (Deltaproteobacteria; 0,02% da amostra) utilizando hidrogênio e sulfato como substratos energéticos. No estudo, os autores revelaram que *D. desulfuricans* possui capacidade de assimilar CO<sub>2</sub> pela via redutiva da glicina. Nesta via, o CO<sub>2</sub> é primeiramente reduzido a formato (CHO<sub>2</sub>), que por sua vez é reduzido e condensado com um segundo CO<sub>2</sub> para gerar glicina. A seguir, a glicina é reduzida por *D. desulfuricans* pela glicina redutase a acetil-P e depois a acetil-CoA, que posteriormente é



condensada com outro CO<sub>2</sub> para formar piruvato. A amônia está envolvida na operação da via, o que se reflete na dependência da taxa de crescimento autotrófico da concentração de amônia. O experimento demonstra um crescimento autotrófico microbiano totalmente suportado pela referida via de fixação de CO<sub>2</sub>, que é altamente eficiente em ATP (SÁNCHEZ-ANDREA et al 2020).

As enzimas identificadas atuam via das seguintes formas: formato desidrogenase catalisa a oxidação reversível de dois elétrons do formato em dióxido de carbono; formato-tetraidrofolato ligase catalisa a ativação dependente de ATP do CHO<sub>2</sub> através de sua adição à posição N10 do tetraidrofolato. Consiste num passo inicial nas vias para a redução de CO<sub>2</sub> e outros precursores de um carbono; sistema de clivagem de glicina é um complexo multienzimático que catalisa a oxidação reversível da glicina, produzindo dióxido de carbono, amônia, 5,10-metilenotetrahidrofolato e um nucleotídeo de piridina reduzido; acetato-CoA ligase ativa o acetato na acetil-CoA dependente de ATP.

A identificação de enzimas atuantes na via redutiva da glicina expõe a ação das bactérias redutoras de sulfato e oxidadoras de sulfeto presentes no ambiente da lagoa, que mesmo não apresentando uma abundância significativa, estão presentes nas zonas litificadas das esteiras microbianas (BAUMGARTNER et al, 2006). Enzimas identificadas para o ciclo do enxofre (S) serão detalhadas nos próximos parágrafos.

Foram identificados uma gama de anotações funcionais relacionadas ao ciclo do enxofre. Entre os processos biológicos foram observados genes responsáveis pela metabolização do enxofre, redução, transporte, transulfuração e assimilação de sulfato. Na categoria de funções moleculares foram identificadas as enzimas adenililsulfato quinase e sulfato adenililtransferase - relacionadas à redução e assimilação do sulfato; cisteína dessulfurase, dissulfeto oxidorreductase, sulfotransferase, enxofre dioxigenase, éster sulfúrico hidrolase, proteína-dissulfeto redutase, transportador transmembranar de sulfato (Tabela 16). Não foram encontrados genes da sulfato redutase e nem relacionados à redução de sulfito.

Tabela 16. Anotações relacionadas ao ciclo do enxofre (p<0,05).

Termo GO	p-valor	FDR
Processo metabólico composto de enxofre	3.05e-08	2.3e-22
Tiorredoxina-dissulfeto redutase	2.43e-05	1.9e-12
Assimilação de sulfato	4.04e-03	1.3e-7

Sulfotransferase	5.38e-05	5.3e-9
Dioxigenase de enxofre	4.646e-06	1.2e-8
Atividade de hidrolase de éster sulfúrico	4.97e-02	7.8e-5
Transporte de sulfato	1.19e-09	3.2e-6
Processo metabólico composto de enxofre	0.00043	2.3e-8
Assimilação de sulfato	0.00081	1.3e-7
Dissulfeto de oxidoredutase	0.0025	8.4e-7
Atividade de sulfato de adenililtransferase (ATP)	3.29e-07	1.6e-13

Fonte: Próprio autor, 2022.

Embora as vias metabólicas de ciclagem do enxofre não tenham sido completamente identificadas, a presença de enzimas intermediárias diretamente associadas à redução e assimilação de sulfato indicam a atividade de grupos microbianos no processo de dissimilação do composto no ambiente lagunar.

O ciclo do enxofre é uma rede complexa de reações químicas que podem ocorrer espontaneamente no ambiente, dependendo da temperatura e do pH, ou podem ser controladas por sistemas enzimáticos microbianos. Em ambientes hipersalinos, a metabolização de compostos sulfurados é um processo tipicamente catalisado por microrganismos.

Foi observado uma significativa abundância de microrganismos que atuam nos processos metabólicos do enxofre. Associadas a oxidação de sulfeto foram identificadas bactérias referentes aos gêneros *Bradyrhizobium* (0,6% da amostra; Alphaproteobacteria), *Thioalkalivibrio* (0,3%; Gammaproteobacteria), *Burkholderia* (0,3%; Gammaproteobacteria), *Paracoccus* (0,3%; Alphaproteobacteria), *Hydrogenophaga* (0,07%; Betaproteobacteria), *Thiomicrothabdis* (0,01%; Gammaproteobacteria). Entre as bactérias redutoras de sulfato destacaram-se microrganismos pertencentes as ordens Desulfobacterales (1%; Deltaproteobacteria), Desulfovibrionales (0,4%, Deltaproteobacteria), Syntrophobacterales (0,04, Deltaproteobacteria); a classe Clostridia (0,5%, Firmicutes); e gêneros *Thermodesulfobacterium* (0,01%, Thermodesulfobacteria), *Sulfurovum* (0,002%, Epsilonproteobacteria), *Sulfurimonas* (0,006%, Epsilonproteobacteria), *Desulfuromona* (0,007% Deltaproteobacteria), *Sulfurospirillum* (0,02%, Epsilonproteobacteria).

A diversidade microbiana descrita acima é semelhante aos resultados encontrados por Lay et al (2013), Vavourakis et al (2019) e Li et al (2022) durante as etapas metabólicas do enxofre em diferentes ambientes hipersalinos.

Outro fato que merece destaque é a relação existente entre microrganismos dos grupos Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria, que possuem funções importantes no ciclo de enxofre e na formação de microbialitos em ambientes aquáticos hipersalinos (DUPRAZ et al, 2009). Segundo Visscher & Stolz (2005), Deltaproteobacterias redutoras de enxofre realizam respiração anoxigênica utilizando sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) como um acceptor de elétrons terminal, reduzindo-o a sulfeto. Durante este processo, a concentração de carbonato é aumentada, assim como a alcalinidade. Como consequência, se a concentração local de cálcio for suficientemente alta, a precipitação de carbonato de cálcio é promovida. Monteiro et al (2019) destaca a capacidade das classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria utilizarem o rendimento de sulfeto da redução de sulfato como doador de elétrons. Neste processo, em condições aeróbicas, o sulfeto é oxidado promovendo a dissolução do carbonato de cálcio. Entretanto, em comunidades de esteiras microbianas, a concentração de oxigênio disponível pode ser limitada devido ao seu consumo por outras bactérias, resultando um cenário onde a oxidação do sulfeto é incompleta. Desta forma, ânions hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) são produzidos, o que induz o sistema a precipitar o carbonato de cálcio e restabelecer o equilíbrio do pH (MONTEIRO et al, 2019; BAUMGARTNER et al. 2006).

A associação das classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria ao ciclo do enxofre e formação de microbialitos podem indicar que tais microrganismos possuem funções nos processos metabólicos de formação das estruturas estromatolíticas da Lagoa Salgada, uma vez que há uma maior abundância dos mesmos em esteiras microbianas (SPRING et al, 2019; GOMEZ et al, 2018) em relação à coluna d'água.

Para o ciclo do nitrogênio foram identificados genes responsáveis pelo processo metabólico de nitrogênio, regulação da utilização de nitrogênio (GO:0006808), processo metabólico de ureia, e sintetização da enzima glutamato sintase (Tabela 17).

Tabela 17. Anotações relacionadas ao ciclo do nitrogênio ( $p < 0,05$ ).

Termo GO	p-valor	FDR
Processo metabólico composto de nitrogênio	1.3e-19	1.9e-24
Regulação da utilização de nitrogênio	8.7e-10	4.3e-25
Atividade da glutamato sintase	2.17e-08	5.7e-15
Processo metabólico da ureia	0.0021	1.5e-6

Fonte: Próprio autor, 2022.

O nitrogênio utilizado pelos produtores primários em ambientes marinhos pode derivar da cadeia alimentar planctônica que reciclam o nitrogênio a partir da biomassa produzindo amônio e ureia (COLLIER, BRAHAMSHA e PALENIK, 1999).

O amônio, fonte preferida de nitrogênio inorgânico em cianobactérias, pode ser obtido através meio ambiente por difusão passiva ou absorção ativa, sendo assimilado pela atividade da glutamato sintase (LINDEL e POST, 2001). Já a ureia, componente dominante dentro do grupo compostos orgânicos nitrogenados, é degradada pela urease (ureia amidohidrolase), uma metaloenzima que catalisa a hidrólise da ureia, liberando duas moléculas de amônia e uma de ácido carbônico (COLLIER, BRAHAMSHA e PALENIK, 1999).

Segundo Collier e Palenik (1999) a inativação de genes da subunidade da urease (ureC) inibiram o crescimento de *Synechococcus* sp. em ambiente com altos níveis de ureia, confirmando a hipótese de que tais genes são essenciais para que o referido gênero possa utilizar a ureia como fonte de nitrogênio.

Não foram detectados genes relacionados aos processos de oxidação da amônia (nitrificação e nitratação). Esse fato pode ser explicado pela baixa diversidade de microrganismos nitrificantes presentes na amostra, como por exemplo, *Nitrosospira*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrobacter*, gêneros notadamente reconhecidos pela capacidade de oxidação da amônia e nitrito (CHOI et al, 2010). A soma do número de sequências dos gêneros citados correspondeu somente a 0,022% do total de sequências identificadas.

A nitrificação, processo envolvendo a oxidação sequencial de amônia em nitrito e nitrato, realizado principalmente por bactérias autotróficas nitrificantes, é essencial para a remoção biológica e ciclagem global de nitrogênio. Choi et al (2010), em estudo para determinar o impacto do crescimento fototrófico na atividade nitrificante autotrófica, demonstrou que o crescimento (floração) de cianobactérias e algas inibiu significativamente a taxa máxima de nitrificação no ambiente. Zehr e McCreynolds (1989) afirmam que, apesar da nitrogenase - enzima catalizadora do dinitrogênio em amônia - ser rapidamente inativada na presença de oxigênio, algumas espécies de cianobactérias possuem a capacidade de fixar nitrogênio na mesma célula em que o oxigênio evoluiu. Neste contexto, os autores destacam que *Synechococcus* spp. apresentam capacidade de fixação de nitrogênio em tempos específicos durante o ciclo de crescimento, em ambientes com pouca disponibilização de oxigênio.

Outras hipóteses estão relacionadas a: competição por  $\text{NH}_4^+$  entre bactérias oxidantes de amônia, cianobactérias e diatomáceas, principais componentes estruturais dos tapetes

microbianos fotossintéticos; e inibição da atividade das bactérias oxidantes de amônia pela alta salinidade do ambiente (COBAN et al, 2021).

Desta forma, os fatores supracitados podem explicar a identificação de genes relacionados aos processos metabólicos e de regulação do nitrogênio, e a ausência de genes relacionados especificamente às etapas de nitrificação e desnitrificação.

#### 6.5. POTENCIAL DOS MICRORGANISMOS QUANTO A CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PKS E NRPS

Microorganismos patogênicos possuem sofisticados mecanismos para inativação de fármacos, tornando imprescindível a descoberta de novos compostos que tenham a capacidade de atuar diretamente na multirresistência emergente adquirida (BUTLER et al, 2013). Ambientes extremos são caracterizados por condições físicas ou químicas que diferem significativamente daquelas encontradas em habitats que suportam formas de vida mais abundantes e variadas (ZHAO et al, 2011). Dentro deste contexto, ambientes aquáticos hipersalinos possuem as características que se encaixam nesse cenário, uma vez que a alta salinidade e baixas concentrações de oxigênio são fatores ambientais que podem limitar sua biodiversidade (VENTOSA, 2006).

Metabólitos secundários vêm sendo encontrados em diversos grupos de organismos (bactérias, fungos, plantas, dinoflagelados, moluscos e esponjas). No grupo bacteriano, o filo Actinobacteria tem sido a fonte mais significativa de produtos naturais bioativos, com um longo histórico de produção de novos compostos comercialmente importantes para a área da saúde. (KATSUYAMA, 2019). O filo Cyanobacteria também vem despertando interesse quanto a sua capacidade produtora de compostos naturais. As cianobactérias, por habitarem uma ampla gama de ecossistemas e possuírem habilidade de prosperar sob condições extremas, vem sendo exploradas em estudos farmacológicos, biotecnológicos e até estéticos (PATHAK et al, 2020; GUERREIRO et al, 2020; NOWRUZI, SARVARI e BLANCO, 2020). Metabólitos secundários são frequentemente produzidos por cianobactérias em resposta ao estresse biótico e abiótico no ambiente circundante, fornecendo proteção e auxiliando na sobrevivência, e dando vantagem sobre outras espécies (VIJAYAKUMAR & RAJA, 2018). Tais características tornam o grupo uma potencial fonte de metabólitos.

Diante deste cenário apresentado e da identificação de anotações funcionais relacionadas a genes codificadores para processo biossintético de antibióticos, foram analisadas as espécies que apresentaram o maior número de sequências pertencentes aos filos Actinobacteria e Cyanobacteria. A análise visou avaliar o potencial de sintetização de metabólitos secundários NPRS e PKS pelas principais espécies pertencentes aos grupos citados.

### 6.5.1. Actinobactérias

Os resultados demonstraram que as espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* (6% da amostra total; 174 espécies), foram aquelas com a maior diversidade de metabólitos secundários por região gênica. Também foi observado uma grande diversidade de compostos identificados, totalizando 22 substâncias.

A espécie *Streptomyces pluripotens* apresentou o maior número de regiões codificadoras de interesse (10) de um total de 30 regiões identificadas (10/30), sendo PKS tipo I (PKS I) o metabólito mais sintetizado pelos aglomerados. Os compostos identificados apresentaram significativa diversidade (Tabela 18). As substâncias de destaque, e respectivas similaridades foram: Antimicina (100%), E-837 (100%) - metabólito associado a produção de Tetronomicina (GONTANG et al, 2010) -, e Pigmento de esporos (83%) - composto associado à biossíntese de melanina a partir da malonil-CoA por PKS tipo II, e armazenados em esporos (OMURA et al, 2001).

Analisando os resultados referentes a espécie *Streptomyces* sp. C8S0 foram observadas 23 regiões gênicas com capacidade para codificação de metabólitos secundários, sendo 8 relacionadas às classes NRPS (4), PKS I (1) e PKS III (3). Foi constatado novamente uma significativa variedade de compostos identificados. Todos os aglomerados gênicos produziram compostos biológicos diferentes, com destaque para a Anisomicina (84%), que obteve a maior porcentagem de similaridade, sucedido pela Feglimicina (42%) e Tiolutina (36%).

Já a espécie *Streptomyces venezuelae* apresentou a menor quantidade de regiões codificadoras para PKS e NRPS (6/31). No entanto, a mesma expressou as maiores porcentagens de similaridade para os compostos identificados, com destaque para a Venemicina (100%) e Alquilresorcinol (100%).

Tabela 18. Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para *Streptomyces* sp.

Espécies	Região gênica	Intervalo do contig	Enzima (Classe)	Composto identificado	Similaridade
<i>Streptomyces pluripotens</i>	10/30				
	4	771.476 - 812.540	PKS III	Herboxidieno	6%
	5	823.634 - 867.660	PKS I	Neocarzinostatina	34%
	6	872.260 - 935.178	NRPS	Esporalida A e B	19%
	7	953.402 - 1.003.799	PKS I	Cinnamicina	14%
	8	1.006.137 - 1.060.635	NRPS	Enduracidina	8%
	10	2.013.395 - 2.085.904	PKS II	Pigmento de esporos	83%
	15	4.881.867 - 4.962.501	NRPS	Glicinocina	16%
	18	5.974.148 - 6.040.769	PKS I	4_Z-animicina	77%
	26	6.870.824 - 6.959.482	PKS I	E-837	100%
28	7.376.877 - 7.239.861	PKS I; NRPS	Antimicina	100%	
<i>Streptomyces</i> sp. C8S0	8/23				
	2	200.636 - 248.615	NRPS	Herboxidieno	3%
	6	645.295 - 710.332	PKS I; NRPS	Diisonitrila	11%
	9	980.480 - 1.023.530	PKS I	Lactonamicina	15%
	10	1.093.109 - 1.134.763	NRPS	Tiolutina	36%
	14	2.837.726 - 2.882.392	NRPS	Istamicina	10%
	15	3.363.806 - 3.416.645	PKS III	Feglimicina	42%
	17	3.763.051 - 3.806.938	NRPS	Indigoidina	20%
	22	6.792.084 - 6.862.000	PKS III	Anisomicina	84%
	3	502.898 - 602.505	PKS I; NRPS	Venemicina	100%
	16	5.784.219 - 5.822.599	PKS III	Flaviolina	50%
	20	6.473.487 - 6.554.282	PKS II	Auricina	55%
	26	7.403.744 - 7.476.256	PKS II	Pigmento de esporos	83%
	28	7.704.299 - 7.757.163	NRPS	Salinichelinas	61%

<i>Streptomyces venezuelae</i>	30	7.943.079 - 7.984.236	PKS III	Alquilresorcinol	100%
	6/31				
	3	502.898 - 602.505	PKS	Venemicina	100%
	16	5.784.219 - 5.822.599	PKS III	Flaviolina	50%
	20	6.473.487 - 6545.282	PKS II	Auricina	55%
	26	7.403.744 - 7.476.256	PKS II	Pigmento de esporos	83%
	28	7.704.299 - 7.757.163	NPRS	Salinichelinas	61%
	30	7.943.079 - 7.984.236	PKS III	Alquilresorcinol	100%

Fonte: Próprio autor, 2022.

O gênero *Mycolicibacterium*, segundo maior grupo presente no filo Actinobacteria com 45 espécies identificadas, e correspondendo a 1% do total da amostra, apresentou aglomerados gênicos sintetizando majoritariamente metabólitos PKS I. Dentre os microrganismos analisados, a espécie *Mycolicibacterium sediminis* destacou-se na produção do respectivo metabólito com 4 regiões gênicas. O composto Micobactina foi identificado em todas as espécies do gênero, obtendo a maior similaridade (80%) nos organismos *Mycolicibacterium confluentes* e *Mycolicibacterium sediminis*. (Tabela 20).

O gênero *Microbacterium* (6.683.789 sequências) não apresentou diversidade de regiões gênicas capacitadas para a produção de metabólitos secundários. As três espécies de destaque do grupo, *Microbacterium sp. LKL04*, *Microbacterium sp. HY82* e *Microbacterium sp. Y-01*, expressaram apenas uma região com potencial para produção do metabólito PKS 3 cada, com baixos valores de similaridade, sendo o composto Microansamicina (7%) o de maior destaque (Tabela 19).

As espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* (3.650.931 sequências) apresentaram significativa diversidade quanto ao tipo de metabólito sintetizado. Alquilresorcinol e Micobactina foram as substâncias com as maiores porcentagens de similaridade - valores máximos de 100% e 80% respectivamente. Destaca-se também a identificação de outros compostos como: Coelichelin (36%), FD-891 (25%) - antibiótico citotóxico especialmente ativo contra leucemia humana (KUDO et al, 2010) -, e Nifimicinas (22%) (Tabela 20).



O gênero *Rhodococcus* (2.670.701 sequências) apresentou espécies com aglomerados de genes produzindo majoritariamente metabólitos da classe NRPS. Dentro deste contexto, *Rhodococcus opacus* foi o microrganismo com maior número de regiões (16), sendo 14 com capacidade de sintetizar a classe supracitada (Tabela 20). Em relação aos compostos houve uma significativa diversidade. Foram identificadas 17 substâncias diferentes, na qual Rodoquelina (100%), Heterobatina A (54%) e Coechelin (54%) apresentaram as maiores porcentagens de similaridade.

Tabela 19. Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para *Mycolicibacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Mycobacterium* sp., e *Rhodococcus* sp.

Espécies	Região gênica	Intervalo do contig	Enzima (Classe)	Composto identificado	Similaridade
<i>Microbacterium</i> sp. LKL04	1/3				
	3	2.213.775 - 2.254.896	PKS III	-	-
<i>Microbacterium</i> sp. Y-01	1/3				
	1	3.289.820 - 3.319.293	PKS III	Microansamicina	7%
<i>Microbacterium</i> sp. HY82	1/5				
	2	525.345 - 564.795	PKS III	SF2575	4%
<i>Mycolicibacterium confluentis</i>	4/13				
	4	438.015 - 522.679	PKS III	Alkytresorcinol	100%
	5	1.538.717 - 1.602.867	PKS I	Micobactina	80%
	6	1.966.193 - 2.007.299	PKS III	Lagunapirona A	22%
<i>Mycolicibacterium sediminis</i>	4/15				
	12	5.229.593 - 5.274.506	PKS I	Fusamina	5%
	7	1.394.563 - 1.445.595	PKS I	Simociclina	4%
	11	3.155.311 - 3.200.574	PKS I	Fusamina	5%
<i>Mycolicibacterium helvum</i>	4/18				
	14	3.951.254 - 3.996.622	PKS I	Estreptobactina	11%
	15	4.968.739 - 5.034.001	NPRS; PKS I	Micobactina	80%
	5	1.893.246 - 1.951.103	NPRS	Micobactina	40%
<i>Mycobacterium</i> sp. MS1601	5/16				
	7	2.201.024 - 2.251.125	PKS I; NPRS	Micobactina	20%
	12	3.474.734 - 3.515.846	PKS III	Alkytresorcinol	100%
	17	5.191.318 - 5.237.599	PKS I	Estreptobactina	11%
<i>Mycobacterium</i> sp. MS1601	5/16				
	3	1.406.040 - 1.444.774	PKS III	Alkylresorcinol	100%
	10	4.365.795 - 4.429.709	PKS I; NPRS	Micobactina	80%
	11	4.848.678 - 4.889.784	PKS III	Alkytresorcinol	66%

	13	5.741.494 - 5.803.678	NPRS	Coelichelin	36%
	14	5.882.882 - 5.929.187	PKS I	Estreptobactina	11%
<i>Mycobacterium</i> sp. EPa45	4/17				
	2	481.137 - 534.737	NRPS	Micobactina	70%
	6	2.854.842 - 2900.725	PKS I	Estreptobactina	11%
	11	5.030.987 - 5.072.054	PKS III	Alkytresorcinol	100%
	15	6.078.215 - 6.127.158	PKS I	Borreliquina	5%
<i>Mycobacterium</i> <i>marseillense</i>	7/18				
	3	1.076.502 - 1.119.058	PKS III	Alkytresorcinol	100%
	7	1.790.112 - 1.849.358	NRPS	Micobactina	80%
	8	2.236.338 - 2.301.896	NRPS; PKS I	Eucumicina	10%
	9	2.340.973 - 2.392.386	PKS I	FD-891	25%
	11	2.780.109 - 2.850.779	NRPS	Zorbamicina	4%
	12	2.875.790 - 2.934.084	PKS III; PKS I	Nihimicinas	22%
	16	4.015.877 - 4.076.456	NRPS	Borreliquina	5%
<i>Rhodococcus</i> <i>coprophilus</i>	4/11				
	2	408.150 - 468.955	NRPS	Cloranfenicol	11%
	5	2.145.770 - 2.201.843	NRPS	Heterobactina A	54%
	7	2.645.162 - 2.690.150	PKS I	antibiótico HKI 10311129	6%
	10	3.491.909 - 3.547.335	NRPS	-	-
<i>Rhodococcus</i> <i>opacus</i>	16/27				
	1	153.827 - 252.272	NRPS	Oxamolicina	12%
	3	829.270 - 894.568	NRPS	Quartomicina	5%
	6	2.546.243 - 2.609.976	NRPS	Atratumycin	7%
	7	2.672.529 - 2.718.259	NRPS	Rodoquelina	100%
	8	2.760.923 - 2.815.063	NRPS	Saquayamicina	5
	11	2.889.647 - 2.933.312	NRPS	-	-
	13	4.495.012 - 4.538.262	PKS I	-	-
	14	4.656.392 - 4.706.975	PKS I	Tetrocarcina A	11%
	17	5.208.629 - 5.708.843	NRPS	Coehelin	54%
	18	5.615.974 - 5.708.843	NRPS	Atratumycin	5%
	19	5.960.785 - 6.008.538	NRPS	-	-
	20	6.042.937 - 6.124.843	NRPS	-	-
	22	6.775.952 - 7.413.707	NRPS	Chloromyxamide	10%
	23	7.366.756 - 7.413.707	NRPS	Fluvirucin B2	5%
	24	7.598.553 - 7.663.402	NRPS	WS9326	10%
	25	7.671.586 - 7.716.010	NRPS	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp. PBTS 1	4/13				
	4	1.531.385 - 1.573.625	NRPS	Fluvirucin B2	5%

6	1.886.343 - 1.938.518	NRPS	Caliqueamicina	2%
7	2.328.905 - 2.379.076	NRPS	Meilingmycin	2%
10	3.223.412 - 3.279.611	NRPS	Amychelin	18%
12	3.852.098 - 4.162.072	PKS I	Selvamicin	11%

Fonte: Próprio autor, 2022.

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que possuem um alto teor de guanina e citosina (G+C) em seu genoma. São considerados microrganismos cosmopolitas de vida livre com capacidade de adaptação a uma ampla gama de ecossistemas ambientes terrestres e aquáticos (DHAKAL et al, 217), podendo apresentar diferentes estilos de vida - desde organismos patogênicos, habitantes do solo, plantas simbiotes a comensais gastrointestinais (BARKA et al, 2016).

Seu crescimento ocorre por através do processo de ramificação das hifas, que por sua vez produzem micélio radial, permitindo assim a colonização de substratos distantes do centro de origem. Algumas espécies produzem esporos como estratégia de dispersão e sobrevivência (MEIJ et al, 2017).

As actinobactérias desempenham um papel relevante nos ecossistemas em que estão inseridas, pois atuam na degradação de matéria orgânica através da produção e liberação de enzimas hidrolíticas,

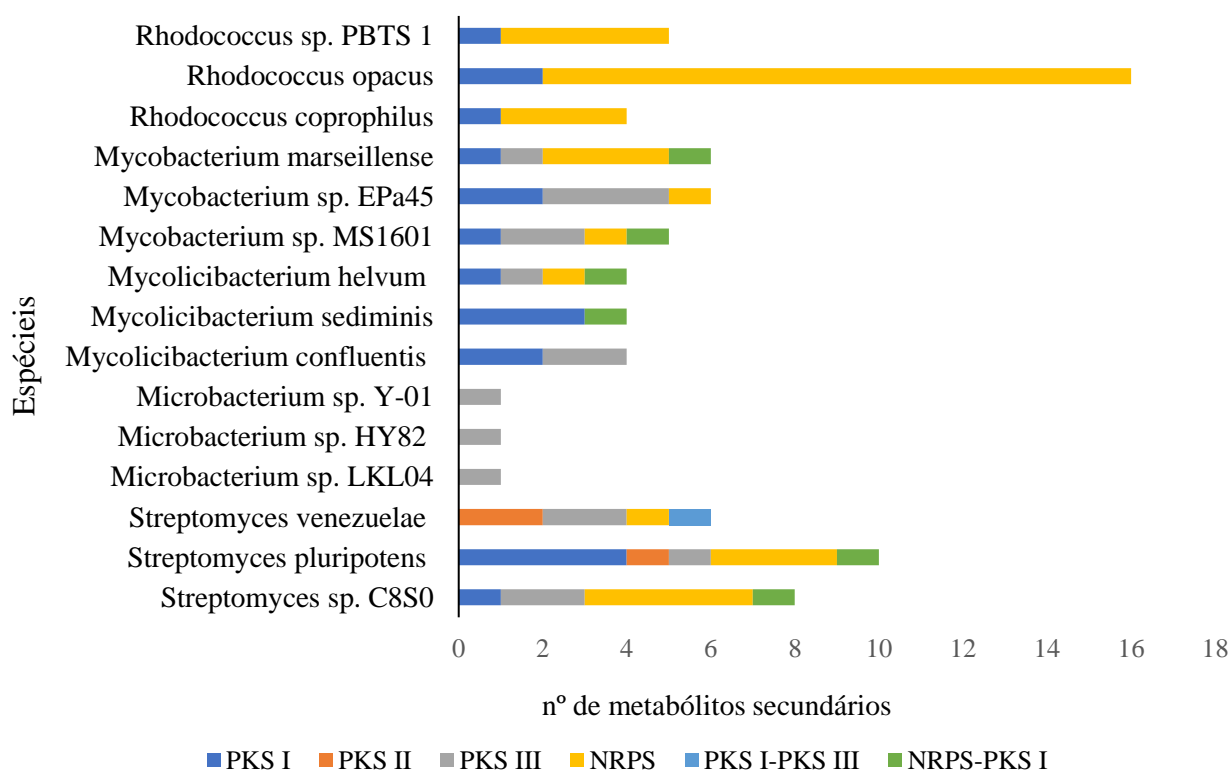
A diversidade ecológica presente no filo está diretamente relacionada ao seu potencial metabólico. Actinobactérias são produtoras versáteis de produtos naturais bioativos, sendo responsáveis por aproximadamente dois terços de todos os antibióticos conhecidos e utilizados atualmente (BARKA et al, 2016; HEUL et al, 2018). O grupo também se destaca pela capacidade de sintetizar compostos anticancerígenos, imunossuppressores, anti-helmínticos, herbicidas e compostos antivirais, além de enzimas extracelulares (BERDY, 2005). A diversidade do filo Actinobacteria também foi observada por este estudo. Arasu et al (2015) afirmam que ambientes hipersalinos se apresentam como uma significativa fonte de actinomicetos não cultiváveis com potencial para sintetizar produtos naturais. Os autores ainda destacam alguns gêneros identificados em regiões hipersalinas, tais como: *Prauserella*, *Pseudonocardia*, *Salinispora*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Salinobacterium*, *Rhodococcus*, *Verrucosipora*, *Gordonia*, *Marinophilus*, *Actinomadura*. Das espécies citadas, somente duas (*Salinobacterium* e *Marinophilus*) não foram encontradas no ambiente da Lagoa Salgada.

Quanto ao potencial do filo para produção de produtos naturais foi observado que as espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentaram maior diversidade de aglomerados

gênicos quando comparado às demais espécies analisadas. Essa característica inata do gênero o torna grupo primário para a exploração de novos compostos naturais. Tangerina et al (2020) destacam a notável capacidade de sintetização de metabólitos secundários ativos - antibióticos, antitumorais, antimaláricos e agentes imunossupressores - pelas mais de 900 espécies de *Streptomyces* já identificadas.

O potencial destacado acima foi observado nas espécies *Streptomyces* sp. C8S0, *Streptomyces pluripotens*, *Streptomyces venezuelae*, *Mycolicibacterium helvum*, *Mycobacterium* sp. MS160, *Mycobacterium* sp. EPa45 e *Mycobacterium marseillense*. Todas apresentaram diversidade de agrupamentos gênicos, sendo esses capazes de codificar metabólitos NRPS e pelo menos dois tipos distintos de PKS (Gráfico 2).

Gráfico 2. Tipo e número de metabólitos secundários sintetizados pelas espécies de actinobactérias.



Fonte: Próprio autor, 2022.

A diversidade de regiões gênicas observada no gênero *Streptomyces* é corroborada por Komaki et al (2019) onde o autor destaca que a análise genômica de *Streptomyces* sp. evidenciou que cada espécie do grupo possui agrupamentos de genes para metabólitos

secundários, e que obrigatoriamente parte de tais agrupamentos correspondem a enzimas da classe PKS e NRPS.

No gênero *Mycolicibacterium*, Ong & Tan (2019) identificaram, em uma cepa extraída de amostras marinhas, um total de 16 agrupamentos gênicos, sendo eles: três agrupamentos que codificavam a via biosintética para PKS I; dois agrupamentos de para PKS I-NRPS; dois agrupamentos para PKS III; e dois para NRPS; resultados próximos ao encontrado por este estudo.

O gênero *Mycobacterium* é conhecido por possuir microrganismos patogênicos a humanos e animais, sendo espécies como *Mycobacterium tuberculosis*, responsáveis por milhões de óbitos em todo o mundo (QUAN et al, 2017). Entretanto, alguns organismos do grupo apresentam características saprófitas com potenciais aplicações biotecnológicas. Cabezón & Garcia (2016) demonstraram que certas espécies micobacterianas podem ser utilizadas como excelentes ferramentas para realizar a biotransformação de esteróis (e seus derivados) em valiosos compostos farmacêuticos como forma de competir com os tradicionais procedimentos de síntese química. Syed et al (2019) constatou que apesar de alguns metabólitos secundários auxiliarem certas espécies micobacterianas a sobreviverem em seus hospedeiros causando o enfraquecimento do sistema imunológico, outros possuem propriedades antibacterianas (incluindo antimicobacterianas), antifúngicas e antivirais passíveis de serem exploradas.

Todas as espécies pertencentes ao gênero *Rhodococcus* apresentaram agrupamentos gênicos codificando majoritariamente NRPS com destaque para *Rhodococcus opacus*. Esse cenário também foi observado por McLeod et al (2006), cujo estudo analisou o genoma da espécie *Rhodococcus* sp. RHA1, obtendo ao final 24 aglomerados sintetizando NRPS e 7 PKS, valores proporcionais semelhantes encontrados neste estudo. Os autores ainda destacam que o gênero *Rhodococcus* é um grupo metabolicamente versátil, porém ainda pouco explorado em termos de produtos naturais, possuindo até a data do referido estudo um total de 110 genomas, 1981 agrupamentos gênicos e 717 NRPS identificados em bancos de dados. Enfatizando o potencial biossintético do gênero. Ceniceros et al (2017) evidenciou que a maioria dos agrupamentos gênicos de determinadas cepas de *Rhodococcus* sp. são específicas de clado, e não possuem qualquer homologia com agrupamentos que codificam produtos naturais conhecidos. Os autores sinalizam que essas regiões parecem codificar a biossíntese de lipopeptídeos, podendo ser uma interessante via para a descoberta de novos biossurfactantes e antimicrobianos.

Por fim, dentre as actinobactérias analisadas, foram identificados um total de 72 produtos naturais, sendo 16 apresentando percentual de similaridade acima de 50%. Este resultado, somado ao fato de que pelo menos um aglomerado biossintetizante de NRPS ou PKS foi identificado em todas as espécies, demonstra o potencial do filo para sintetização de produtos naturais no ambiente da lagoa, indicando a existência de um cenário promissor passível de ser explorado, visando a bioprospecção de novos compostos.

### **6.5.2. Cianobactérias**

Cianobactérias se apresentam como um dos microrganismos mais antigos e competentes do planeta, com capacidade de colonizar diversos tipos de ambientes como solo, ambientes marinhos e de água doce, rochas (endolíticas), plantas ou animais (como endossimbiontes) (JONES et al, 2021).

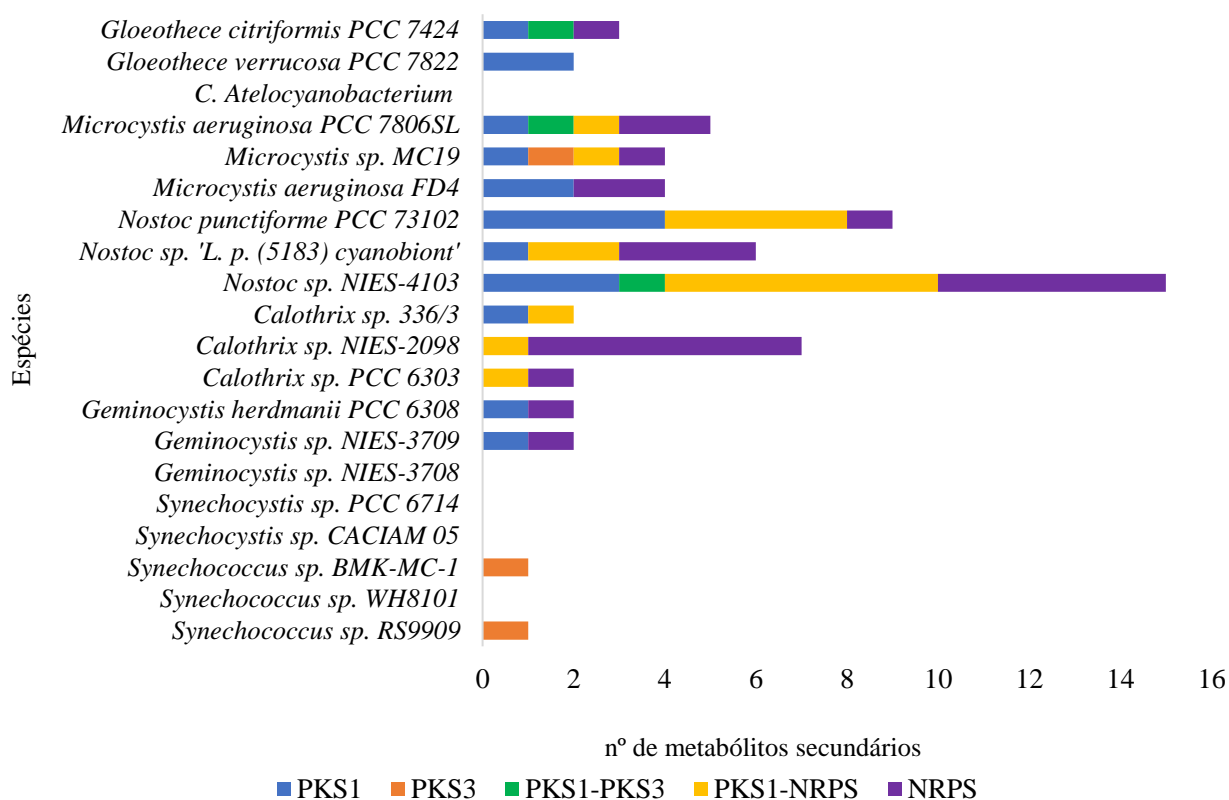
Habitar esta vasta multiplicidade de ecossistemas exige adaptações bem-sucedidas a condições ambientais muito diferentes. Desta forma, microrganismos pertencentes ao grupo das cianobactérias evoluíram e desenvolveram uma grande variedade de metabólitos secundários (HARTMANN, 2008). Tais produtos naturais podem apresentar funções de defesa contra outros organismos (antibióticos, herbicidas, fungicidas etc.); de agentes transportadores de metais; de facilitadores da simbiose, como fotoprotetores, antioxidantes entre outros (PEREIRA e GIANI, 2014).

As cianobactérias também se destacam pela capacidade de sintetizar uma grande variedade de metabólitos tóxicos, cujos efeitos podem ser deletérios para a saúde humana. Os principais grupos funcionais relacionados aos metabólitos citados são as hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas, além das toxinas irritantes (lipopolissacarídeos) (WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005).

Diante do cenário apresentado, foi realizada a análise dos aglomerados gênicos das cianobactérias que apresentaram o maior número de sequências entre os principais gêneros identificados com o objetivo de avaliar o potencial biossintetizante para os metabólitos secundários das classes PKS e NRPS.

As análises mostraram que as espécies pertencentes ao gênero *Synechococcus* não possuíram a mesma diversidade de regiões gênicas quando comparadas aos demais grupos de cianobactérias (Gráfico 3).

Gráfico 3. Tipo e número de metabólitos secundários sintetizados pelas espécies de cianobactérias.



Fonte: Próprio autor, 2022.

*Synechococcus* sp. RS9909, espécie com maior número de sequências dentro do filo, apresentou somente 3 aglomerados de genes relacionados à síntese de metabólitos secundários, sendo 1 aglomerado biossintetizante para o PKS III (1/3). A Hierridina B foi o composto identificado para o aglomerado em questão (43%) (Tabela 20). O mesmo cenário foi encontrado para *Synechococcus* sp. BMK-MC-1 (1/3). A espécie *Synechococcus* sp. WH8101 não apresentou regiões produtoras de metabólitos secundários.

Tabela 20. Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para *Synechococcus* sp.

Espécies	Região gênica	Intervalo do contig	Enzima (Classe)	Composto	Similaridade
<i>Synechococcus</i> sp. RS9909	1/3				
	2	1.032.519 - 1.073.655	PKS III	Hierridina B	42%
<i>Synechococcus</i> sp. WH8101	-	-	-	-	-
<i>Synechococcus</i> sp. BMK-MC-1	1/3				
	1	983.280 - 1.024.374	PKS III	Hierridina B/C	42%
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	-	-	-	-	-
<i>Synechocystis</i> sp. CACIAM 05	-	-	-	-	-
<i>Geminocystis</i> sp. NIES-3708	-	-	-	-	-
<i>Geminocystis</i> sp. NIES-3709	2/4				
	6	3.993.737 - 3.262.153	NRPS	Kijaniicina	4%
<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308	7	3.993.737 - 4.042.229	PKS I	1-Heptadeceno	100%
	2/5				
	2	1.589.072 - 1.637.531	PKS I	1-Heptadeceno	100%
	4	2.669.419 - 2.738.814	NRPS	Kijaniicina	4%

Fonte: Próprio autor, 2022.

Resultado semelhante foi encontrado por Brito et al (2015) em estudo sobre bioprospecção de cianobactérias para metabólitos secundários bioativos. No referido trabalho, os autores isolaram 61 gêneros de cianobactérias da costa atlântica portuguesa, constatando, ao final, que o gênero *Synechococcus* foi o único a não apresentar sequências de domínio KS e/ou A (genes codificadores de PKS e NRPS) na amostra. Shih et al (2013) evidenciou a ausência de agrupamento de genes NRPS e presença somente de metabólitos PKS tipo III nas espécies de *Synechococcus* estudadas, corroborando os resultados deste estudo.

Outros estudos demonstraram uma maior frequência de genes codificadores de PKS e NRPS em cianobactérias que possuem linhagens filamentosas (CALTEAU et al, 2014; BRITO et al, 2015). Esta característica estrutural, associada a fatores metabólicos, pode explicar a diferença de potencial biossintetizante encontrado nas espécies de *Synechococcus* em relação às demais cianobactérias analisadas, uma vez que gênero em questão é morfologicamente diferente, sendo microrganismos cocóides. No entanto, o potencial para sintetizar os compostos hierridina B (*Synechococcus* sp. RS9909; *Synechococcus* sp. BMK-MC-1) e hierridina C (*Synechococcus* sp. BMK-MC-1) identificados nos microrganismos analisados destaca o potencial metabólico existente no ecossistema da Lagoa Salgada. A hierridina é um composto sintetizado unicamente pela PKS tipo III que apresenta significativa atividade antitumoral,



atuando como inibidor do crescimento da linhagem celular HT-29 de adenocarcinoma de cólon (FREITAS et al, 2016). Costa et al (2019) descreve o processo de síntese do produto no qual o policetídeo é modificado por uma metiltransferase e uma oxidorreductase para produzir herridina B. Larsen, Pearson e Neilan (2021) afirmam que agrupamentos gênicos com capacidade de sintetizar o composto em questão estão presentes principalmente em algumas espécies do gênero *Prochlorococcus* e *Synechococcus*, sugerindo assim que a produção de hierridinas e compostos relacionados é comum em algumas cianobactérias marinhas.

Apesar da austeridade de aglomerados gênicos nas espécies de *Synechococcus* analisadas, o gênero possui relevância na produção de metabólitos secundários. A identificação de microrganismos com potencial para sintetizar hierridina é um indicativo promissor para a exploração genômica de outros grupos dentro do filo, além de demonstrar o potencial do ambiente como fonte para a descoberta de novos produtos naturais bioativos.

As espécies pertencentes aos gêneros *Synechocystis* não possuíram regiões gênicas biossintetizantes para os metabólitos de interesse.

No entanto, os microrganismos pertencentes ao gênero *Geminocystis*, especialmente *Geminocystis* sp. NIES-3709 (2/5) e *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 (2/5), apresentaram aglomerados com 100% de similaridade para a síntese de 1-Heptadeceno, composto derivado de reações de ácidos graxos de cadeia longa relacionado a biossíntese de alcanos (ZHU et al, 2018) (Tabela 21). Kawahara e Hihara (2021), em estudo sobre o aprimoramento de desempenho de enzimas biossintéticas de alcano, comparou várias espécies de cianobactérias visando avaliar a quantidade de hidrocarbonetos de interesse biotecnológico produzidos por enzimas solúveis disponíveis nas mesmas.

As espécies pertencentes ao gênero *Calothrix* apresentaram regiões gênicas com capacidade de sintetizar metabólitos majoritariamente da classe NRPS (Tabela 21). A síntese do metabólito PKS I também foi observada durante a análise. Em relação a produção de compostos bioativos, foi identificado que os microrganismos analisados apresentaram significativo percentual de similaridade para as substâncias: anabaenopeptina NZ875 (100%), nostamida A (100%), nostopeptokide A (50%) e glicolipídeos de heterocistos (85%). Demay et al (2020), em estudo sobre a capacidade de produção de compostos bioativos com ações anti-inflamatórias por cianobactérias, identificaram que espécies de *Calothrix* estavam entre aquelas que apresentaram os maiores números de aglomerados e produtos naturais produzidos, sendo NRPS a principal classe. Os resultados citados são semelhantes aos achados por este trabalho. Chen, Smith e Waring (2003) demonstraram a ação e eficácia da calotrixina A, composto

bioativo produzido por cianobactérias do gênero *Calothrix*, contra células cancerígenas HeLa humanas. As anabaenopeptinas são hexapeptídeos compostos por seis módulos em quatro genes individuais, na qual variações na composição dos aminoácidos geram diferentes membros desta família, sendo a anabaenopeptina e a nostamida A os principais produtos. Tais compostos exibem uma forte atividade inibidora de proteases, sendo de alto interesse para as pesquisas biomédicas (GREUNK et al, 2018).

Tabela 21. Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para *Calothrix* sp.

Espécies	Região gênica	Intervalo do contig	Enzima (Classe)	Composto	Similaridade
<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303	2/13	2.067.516 - 2.110.921	NRPS	Anabaenopeptina NZ875; Nostamida A	100%
	3				
<i>Calothrix</i> sp. NIES-2098	8	3.045.911 - 3.131.378	NRPS-PKS I	Nostopeptokide A	50%
	7/24	1.374.870 - 1.421.759	-	-	-
	4				
	6	1.728.182 - 1.771.470	NRPS	Anabaenopeptina NZ875; Nostamida A	100%
	9	2719.125 - 2.766.698	NRPS	Tiacumicina B	6%
	13	3.996.130 - 4.065.102	NRPS	Anabaenopeptina NZ875; Nostamida A	100%
	15	4.535.066 - 4.590.875	NRPS	Puwainaficina A/B/C/D	40%
	19	6.407.425 - 6.461.507	NRPS-PKS I	Nostoficina	27%
24	8.623.981 - 8.656.060	NRPS	Anabaenopeptina	42%	
<i>Calothrix</i> sp. 336/3	2/8	2.420.213 - 2.288.249	NRPS-PKS I	Hapalosina	40%
	4				
	7	4.545.743 - 4.599.047	PKS I	Glicolipídios heterocistos	85%

Fonte: Próprio autor, 2022.

As espécies pertencentes ao gênero *Nostoc* foram aquelas que apresentaram o maior número de regiões gênicas, com destaque para *Nostoc* sp. NIES-4103 (16/32). Os metabólitos NRPS e PKS I obtiveram a maior frequência nos aglomerados identificados (Tabela 22). Piccardi et al (2000) analisaram 50 espécies de *Nostoc* de diferentes ambientes (solo, campos de arroz, águas doces e marinhas) quanto às respectivas atividades antifúngicas, antibacterianas e citotóxicas. Ao final, foram identificados 24 tipos microbianos com potencial de ação metabólica contra, pelo menos, um dos organismos alvo. Os resultados encontrados por este estudo corroboram com os achados dos autores, pois evidenciam a capacidade do grupo em

produzir uma ampla gama de metabólitos com atividade antibiótica ou citotóxica, além de identificar o potencial biossintetizante existente no gênero para ambientes hipersalinos. Os compostos anabaenopeptina, nostamida A, hapalosina, micropeptina K139, microcierodermina e glicolipídeos de heterocistos obtiveram similaridade acima de 50% nas espécies do grupo. A hapalosina é um ciclodepsipeptídeo com habilidade de reverter a resistência adquirida a múltiplas drogas em linhas de células tumorais (JIN, MILLER e LINDSEY, 2021). Segundo Bolatkan et al (2017), a micropeptina, um depsipeptídeo cíclico, quando extraída de cianobactérias pertencentes a família Nostocaceae, apresenta significativa ação antitumoral e antifúngica contra o organismo alvo. A microesclerodermina, um hexapeptídeo cíclico, se destaca por ser um potente agente antifúngico, e também possuir atividade antiproliferativa contra células de câncer de pulmão, leucemia e pâncreas (ZHANG, XIA e ZHANG, 2021). Tal composto possui significativo potencial biotecnológico na área farmacológica.

Tabela 22. Potencial de sintetização de metabólitos PKS e NRPS para *Nostoc* sp., *Microcystis* sp. e *Gloeotheca citriformis*.

Espécies	Região gênica	Intervalo do contig	Enzima (Classe)	Composto	Similaridade
<i>Nostoc</i> sp. NIES-4103	16/32				
	1	104.814 - 145.432	NRPS	Anabaenopeptina NZ875	100%
	3	857.102 - 909.466	NRPS	Nostamida A Hapalosina	40%
	4	1.108.780 - 1.156.246	PKS I	Minutisamida A/C/D	38%
	5	1.487.719 - 1.538.277	PKS I- PKS III	Merociclofano C/D	55%
	7	1.912.254 - 1.951.372	NRPS	Teonelamida	20%
	8	2.174.157 - 2.231.590	NRPS- PKS I	Nocuolin	42%
	12	2.920.008 - 3.007.369	PKS I	Glicolipídeos de heterocistos	85%
	13	3.065.101 - 3.118.683	NRPS	Anabaenopeptina NZ875	100%
	14	3.259.669 - 3.312.766	PKS I	Nostamida A Minutisamida A/C/D	46%
	16	3.597.104 - 3.638.811	NRPS	Vioprolide A	16%
	17	3.692.414 - 3.792.351	NRPS- PKS I	Hapalosina	80%
	19	4.058.533 - 4.115.327	NRPS- PKS I	Nostopeptólido A2	50%
	22	5.249.232 - 5.307.780	PKS I	Minutisamida A/C/D	38%
	23	5.668.006 - 5.741.602	NRPS- PKS I	Minutisamida A/C/D	15%
	28	7.698.160 - 7.767.737	NRPS- PKS I	Malingamida I	29%
31	8.258.232 - 8.350.117	NRPS- PKS I	Nostoficina	27%	

<i>Nostoc</i> sp. 'Lobaria pulmonaria (5183) cyanobiont'	6/12				
	1	302.236 - 394.968	NRPS- PKS I	Nostoficina	27%
	2	616.349 - 666.548	NRPS- PKS I	Hapalosina	40%
	4	1.020.290 - 1.72.677	PKS I	Glicolípidos de heterocistos	100%
	6	2.906.361 - 2.971.210	NRPS	Micropeptina K139	75%
	8	3.719.503 - 3.763.667	NRPS	-	
	10	5.154.163 - 5.200.114	NRPS	-	
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	9/20				
	1	42.449 - 94.118	PKS I	Glicolípidos de heterocistos	100%
	2	1.541.129 - 1.591.247	PKS I	Glicolípidos de heterocistos	57%
	3	2.504.882 - 2.564.790	PKS I	Aranazol A/B/C/D	25%
	4	2.637.229 - 2.723.092	NRPS- PKS I	Nostopeptólido A2	100%
	5	3.036.926 - 3.096.852	NRPS	Micropeptina K139	62%
	10	3.072.419 - 3.799.405	NRPS- PKS I	Nostoficina	27%
	11	3.881.815 - 3.974.643	NRPS- PKS I	Crocacina	23%
	14	4.167.587 - 4.349.893	PKS I	Microesclerodermina	57%
	20	8.130.738 - 8.187.006	NRPS- PKS I	Nostopeptólido A2	50%
<i>Microcystis aeruginosa</i> FD4	4/11				
	3	2.093.804 - 2.133.221	PKS I	Bartoloside 2/3/4	27%
	4	2.333.391 - 2.381.106	PKS I	Ambiguina isonitrila	6%
	8	4.001.480 - 4.067.467	NRPS	Micropeptina K139	75%
	9	4.885.273 - 4.949.555	NRPS	Aeruginosina 98-A/B/C	85%
<i>Microcystis</i> sp. MC19	4/8				
	4	2.204.252 - 2.245.439	PKS III	-	-
	5	2.246.110 - 2.325.436	NRPS- PKS I	Myxalamid	27%
	7	2.749.030 - 2.794.990	PKS I	Calcheamicin	5%
	8	4.697.549 - 4.756.319	NRPS	Microcystin	23%
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806SL	5/11				
	2	1.386.506 - 1.442.136	PKS I- PKS III	Merociclofano C/D	55%
	3	1.475.183 - 1.538.079	NRPS	Aeruginosina 98-A/B/C	85%
	4	1.650.347 - 1.687.552	PKS I	Bartoloside 2/3/4	27%
	6	3.009.072 - 3.098.514	NRPS- PKS I	Microcystina-LR	94%
	9	4.353.268 - 4.527.985	NRPS	Micropeptina K139	100%
<i>Candidatus Atelocyanobacterium thalassa</i> isolate ALOHA	-	-	-	-	
<i>Gloeotheca verrucosa</i> PCC 7822	2/10				
	3	318.599 - 363.943	PKS I	Caliqueamicina	6%
	7	2.009.235 - 2.057.562	PKS I	1-Heptadeceno	100%
<i>Gloeotheca citrififormis</i> PCC 7424	4/7				

2	894.213 - 936.388	NRPS	-	-
4	2.073.766 - 2.132.680	PKS I	1-Heptadeceno	100%
5	2.997.342 - 3.728.786	PKS I- PK III	Carbamidociclofa no	46%
7	5.517.902 - 5.561.912	NRPS	Hexose-palythine- serine/ Hexose- shinorine	57%

Fonte: Próprio autor, 2022.

Os resultados encontrados para o gênero *Microcystis* demonstraram predominância de aglomerados biossintetizantes para NRPS e PKS I, com as espécies apresentando quantidades semelhantes de regiões gênicas para estas classes (Tabela 23). O destaque do grupo está relacionado à diversidade de compostos identificados. Foram encontradas 9 substâncias nos respectivos aglomerados, sendo micropeptina K139 (100%) - também identificada no gênero *Nostoc* - aquela com maior percentual de similaridade. Microcistina-LR (94%), aeruginosina 98-A, B, C (85%) e merociclofano (55%) foram outros compostos que se destacaram. A pluralidade de compostos detectados nas espécies de *Microcystis* também foi encontrada por Manach et al (2019) que, ao analisar a produção de metabólitos entre espécies de *Microcystis* de localidades distintas, encontrou um amplo conjunto de produtos naturais quimicamente díspares, incluindo microcistinas, muitas aeruginosinas, microgininas, cianopeptolinas e anabaenopeptinas, juntamente com um grande conjunto de moléculas desconhecidas. As aeruginosinas são oligopeptídeos bioativos produzidos em alta diversidade estrutural por espécies dos gêneros *Microcystis* e *Planktothrix*, cuja principal atividade biológica está associada à ação inibitória *in vitro* de serinoproteases (ISHIDA et al, 2009). Entre as cianotoxinas, a microcistina-LR é a isoforma de microcistinas mais comum e a que apresenta maior toxicidade (PUDDICK et al, 2014). O composto pode atuar diretamente em animais aquáticos, afetando a sobrevivência, imunidade e/ou desenvolvimento do organismo. Através do processo de bioacumulação, a microcistina-LR pode ser transmitida aos humanos via cadeia alimentar, sendo o intestino o órgão alvo de toxicidade (MASSEY et al, 2018). Merociclofano C e D, pertencentes ao grupo dos paraciclofanos, possui significativa atividade antiproliferativa contra células cancerígenas humanas, em especial melanomas (MAY et al, 2017).

A espécie *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* isolate ALOHA não apresentou regiões gênicas biossintetizantes para os metabólitos de interesse.

Nas espécies do gênero *Gloeothece* a classe PKS I foi encontrada na maioria dos aglomerados detectados (Tabela 23). A diversidade de regiões gênicas observadas nos grupos *Nostoc* e *Microcystis* não foi refletida no gênero em questão. Os compostos 1-Heptadeceno -

também identificado no gênero *Geminocystis* -, Hexose-palythine-serina e Hexose-shinorina apresentaram valores de similaridade acima de 50%. Uma maior diversidade de aglomerados foi encontrada por Popin et al (2021) para a espécie *Gloeothece verrucosa* PCC 7822. Analisando genes plasmídicos, os autores identificaram cinco regiões biossintetizantes de metabólitos, sendo duas NRPS e uma NRPS-PKS I. D'Agostino et al (2016) afirma que embora as funções da hexose-shinorina e hexose-palythine-serina não sejam totalmente conhecidas, é provável que as mesmas estejam associadas à matriz extracelular e envolvidas na proteção contra raios UV, dessecação e/ou estresse oxidativo.

Dentre as espécies de cianobactérias analisadas, foram identificados um total de 42 produtos naturais, com 20 apresentando percentual de similaridade acima de 50%. A identificação de compostos com ações antibacterianas, antitumorais e antifúngicas, mesmo em espécies que possuíam poucas regiões biossintetizantes, exemplifica o potencial existente nos microrganismos pertencentes ao filo. Além disso, conforme descrito na seção 6.2 dos resultados, 3% das sequências relacionadas ao filo Cyanobacteria não foram identificadas. Apesar de ser considerado um baixo percentual, tal dado é um fator adicional que corrobora a diversidade existente no grupo passível de ser investigada.

Os resultados obtidos também indicam que a comunidade de cianobactérias presente na Lagoa Salgada, além de estar atuando diretamente na formação dos estromatólitos, também possui um promissor potencial biotecnológico e farmacológico. Conforme referenciado anteriormente, ambientes hipersalinos costeiros ainda não são totalmente explorados, principalmente quanto à capacidade de síntese de produtos naturais pela microbiota presente.

Por fim, destaca-se que os resultados obtidos para o filo Cyanobacteria advém da análise da coluna d'água. O potencial do grupo pode ser ainda maior com a utilização de substratos provenientes das esteiras microbianas como material amostral, comumente formada por uma alta diversidade de cianobactérias.

## 7. CONCLUSÃO

As análises físico-químicas apresentaram valores elevados para cloro total, carbono orgânico total e nitrogênio total, estando em desacordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005. No entanto, a análise colimétrica evidenciou que os valores dos indicadores de contaminação fecal estão dentro das faixas de balneabilidade, segundo a Resolução CONAM nº 274/2000. Desta forma, visando preservar a saúde humana e a conservação do ambiente, recomenda-se que as atividades recreativas desenvolvidas na área da lagoa possuam caráter sustentável e educacional, valorizando o patrimônio natural e cultural do ambiente, sem que haja um contato primário prolongado.

As bactérias foram os tipos microbianos de maior abundância no ambiente lagunar da Lagoa Salgada. Os domínios Eukaryota e Archaea estiveram presentes, porém em menores porcentagens. Grande parte da diversidade viral estava relacionada à classe dos fagos, principalmente de cianobactérias.

Proteobacteria foi o filo com maior número de sequências identificadas, seguido pelas cianobactérias e actinobactérias. A nível de gênero, *Synechococcus* apresentou a maior abundância dentre os demais, sendo o grupo dominante da amostra. A alta representatividade no ambiente, indica que o gênero pode possuir significativa participação nos processos biológicos associados a fotossíntese e de formação das estruturas estromatolíticas.

A diversidade de anotações funcionais demonstrou a riqueza microbiana do ambiente assim como sua complexidade. Grande parte dos genes identificados possuíam funções relacionadas a transporte, processos metabólicos, mecanismos de defesa, produção de energia e processos de replicação, recombinação e reparo. A salinidade e temperatura podem ser considerados os fatores de maior influência sobre a comunidade microbiana da lagoa, definindo a representatividade de cada grupo.

A análise dos filios Actinobacteria e Cyanobacteria quanto ao potencial de biossíntese de metabólitos secundários revelou que a maioria das espécies pertencentes aos respectivos grupos apresentam capacidade para a produção de produtos naturais bioativos. Gêneros como *Streptomyces*, *Rhodococcus* e *Nostoc*, possuíam múltiplos aglomerados gênicos sintetizando os diversos tipos de complexos enzimáticos PKS, assim como para NRPS. Os resultados obtidos podem ser considerados indicativos promissores quanto a existência de uma comunidade microbiana com relevante potencial biotecnológico passível de ser explorado.

Este estudo contribuiu para definir a diversidade microbiana existente na Lagoa Salgada, assim como suas características funcionais. O ambiente lagunar nunca havia sido explorado de forma tão detalhada quanto aos aspectos taxonômicos e funcionais.

A abordagem metagenômica, pioneira no ambiente, se mostrou eficaz para cumprir os objetivos estabelecidos. O elevado volume de dados gerados possibilitou análises precisas, assim como permitiu visualizar novas possibilidades de trabalho e linhas de pesquisa.

Por fim, o estudo serve como mais um argumento sobre a necessidade de preservação e proteção integral do ecossistema lagunar. A diversidade microbiana, o potencial biotecnológico, a presença singular e contínua da atividade estromatolitogênica pelas cianobactérias são riquezas ambientais de valor inestimáveis, que necessitam ser, firmemente, protegidas pelos órgãos competentes tanto para estudos futuros quanto como herança para as próximas gerações. Ainda há muito a ser descoberto no ambiente da Lagoa Salgada.



## 8 AÇÕES FUTURAS

Devido a pandemia por coronavírus, SARS-CoV-2 (doença Covid-19), que impossibilitou a realização de algumas etapas programadas, destaco algumas possibilidades de análises que podem ser desenvolvidas futuramente:

- Analisar a diversidade microbiana comparativamente a partir de novos pontos de coleta e em diferentes estações do ano.
- Analisar exclusivamente, por meio da metagenômica, o potencial para produção de metabólitos secundários existente em microrganismos presentes nas esteiras microbianas.
- Avaliar a qualidade da água lagunar quanto à presença de agentes inorgânicos tóxicos.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M. B., KARRAY, F., MHIRI, N. Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. **Extremophiles** 20, 125–138. 2016.
- AKHWALE, J. K., ROHDE, M., ROHDE, C., BUNK, B., SPRÖER, C. Isolation, characterization and analysis of bacteriophages from the haloalkaline lake Elmenteita, Kenya. **PLOS ONE** 14(4). 2019.
- ALONSO, A., SÁNCHEZ, P., MARTÍNEZ, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**. v.3 (1). 2002.
- ANANDAN R., DHARUMADURAI D., MANOGARAN, G. **An Introduction to Actinobacteria**. in Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. London, United Kingdom: IntechOpen, 2016. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/49873> .Acesso em: 19 maio 2022.
- APRILE, F. M. et al. TIPOLOGIA DOS ECOSSISTEMAS LACUSTRES COSTEIROS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL. **Bioikos**, v. 15, n. I, p. 17–21, 2001.
- ARAÚJO, N. D. DE et al. A Era Da Bioinformática: Seu Potencial E Suas Implicações Para As Ciências Da Saúde. **Estudos de Biologia**, v. 30, n. 70/72, 2008.
- ARAUJO, R., GUPTA, V. S. R., FRANK, R., BISSETT, A., MELE, P., CHRISTOPHER M. M., FRANCO, C. M. M. Biogeography and emerging significance of Actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 146. 2020.
- BAATI, H., GUERMAZI, S., AMDOUNI, R. Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. **Extremophiles** 12, 505–518, 2008.
- BALCÁZAR, J. L. How do bacteriophages promote antibiotic resistance in the environment? **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24 (5), p. 447-449. 2018.
- BAMOLA, V. D., GHOSH, A., KAPARDAR, R.K., LAL, B., CHEEMA S., SARMA, P., CHAUDHRY, R. Gut microbial diversity in health and disease: experience of healthy Indian subjects, and colon carcinoma and inflammatory bowel disease patients. **Microb Ecol Health Dis.**; 28:1322447. 2017.
- BAR-EVEN, A., NOOR, E., MILO, R. A survey of carbon fixation pathways through a quantitative lens, **Journal of Experimental Botany**. v.63, (6). 2012.
- BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., MEIER-KOLTHOFF, J. P., KLENK, H. P., CLÉMENT, C., OUHDOUCH, Y., & VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, 80(1), 1–43. 2015.
- BAUMGARTNER, L. K., REID, R. P., DUPRAZ, C., DECHO, A.W., BUCKLEY, D. H., SPEAR, J. R., PRZEKOP, K. M., VISSCHER, P. T. Sulfate reducing bacteria in microbial

mats: Changing paradigms, new discoveries. **Sedimentary Geology**. v. 185 (3-4), p. 131-145. 2006.

BEPPU, U., SHIRATORI, O., PARK, K.S., HIRATA, N., YAMASHITA, K. **Symbiobacterium**. Bergey's Manual of Systematics and Archea and Bacteria. Disponível em <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00731>. Acesso em: 18 maio 2022.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **J Antibiot**. v. 58, (1–26). 2005.

BERGEIJK, D. A., TERLOUW, B. R., MEDEMA, M. H. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nat Rev Microbiol** 18, 546–558. 2020.

BETANCUR, L. A., NARANJO-GAYBOR, S., J., VINCHIRA-VILLARRAGA, D., M, MORENO-SARMIENTO, N.C., MALDONADO, L. A. Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling / bioactivity and taxonomical approach. **PLOS ONE** 12(2). 2017.

BHATTARAI, B., BHATTACHARJEE, A. S., COUTINHO, F. H., GOEL, R. K. Viruses and Their Interactions with Bacteria and Archaea of Hypersaline Great Salt Lake. **Frontiers in Microbiology**. v.12. 2021.

BIDEGAIN, P.; BIZERRIL, C. R.; SOFFIATI, A. **Lagoas do Norte Fluminense - Perfil Ambiental**. Projeto Planágua Semads / GTZ de. Rio de Janeiro: Cooperação Técnica Brasil - Alemanha, Projeto Planágua Semads, 2002.

BIELLA, C.R.F., VALENCIO, N.F.L.S. **Impactos de empreendimentos turísticos em pequenas comunidades: uma visão sociológica como subsídio às políticas para o setor**. In: MARTINS, R.C. VALENCIO, N.F.L.S (Orgs). Uso e gestão dos recursos hídricos no Brasil. vol.II. Editora Rima. 307p. 2003.

BIRD, E. C. F. Physical Setting and Geomorphology of Costal Lagoons. In: Kjerfve, B. Coastal Lagoon Processes. 60. 1-8. **Elsevier oceanography series**. Amsterdam: 1994. cap. 2, p. 9-39.

BLIN, K., SHAW, S., KLOOSTERMAN, A. M., CHARLOP-POWERS Z., WEZEL, G., MEDEMA, M. H., WEBER, T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities, **Nucleic Acids Research**, Volume 49, Issue W1, 2. 2021.

BLUNT, J., W., COPP, B., R., KEYZERS, R., A., MUNRO, M., H., G., PRINSEP, M., R. **Marine natural products**. Issue 3, 2016.

BOLATKHAN, K., AKMUKHANOVA, N.R., ZAYADAN, B. K., SADVAKASOVA, A. K., SINETOVA, M. A., LOS, D. A. Isolation and Characterization of Toxic Cyanobacteria from Different Natural Sources. **Appl Biochem Microbiol** v. 53, 754–760. 2017.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução n°. 274/2000. Diário Oficial de Brasília, 2001. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama>. Acesso em: 2 fev. 2022.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br> . Acesso em: 05 de fev 2022.

BRASIL. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Diário Oficial de Brasília, 2012. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2011-2014/2012/lei/112651.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2011-2014/2012/lei/112651.htm) . Acesso em: 5 abr. 2022.

BRITO, A., GAIFEM, J., RAMOS, V., GLUKHOV, E., DORRESTEIN, P. C., GERWICK, W. H., VASCONCELOS, V. M., MENDES, M. V. Bioprospecting Portuguese Atlantic coast cyanobacteria for bioactive secondary metabolites reveals untapped chemodiversity. **Algal Research**. v. 9, pages 218-226. 2015.

BRITO, M., BUNDELEVA, I., MARIN, F., VENNIN, E., WILMOTTE, A., PLASSERAUD, L., VISSCHER, P.T. Effect of Culture pH on Properties of Exopolymeric Substances from *Synechococcus* PCC7942: Implications for Carbonate Precipitation. **Geosciences**. v.12, 210. 2022.

BRYANSKAYA, A.V., SHIPOVA, A.A., ROZANOV, A. S., KOLPAKOVA, O. A., LAZAREVA, E.V., UVAROVA, Y. E., EFIMOV, V. M., ZHMODIK, S. M., TARAN, O. P., GORYACHKOVSKAYA, T. N., PELTEK, S. E. Diversity and Metabolism of Microbial Communities in a Hypersaline Lake along a Geochemical Gradient. **Biology**. v. 11 (605). 2022.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature methods**, v. 12, n. 1, p. 59–60, jan. 2015.

BUCK, M., GARCIA, S.L., FERNANDEZ, L. Comprehensive dataset of shotgun metagenomes from oxygen stratified freshwater lakes and ponds. **Sci Data** **8**, 131. 2021.

CABELLO-YEVES, P. J., HARO-MORENO, J. M., MARTIN-CUADRADO, A., GHAI ROHIT, P. A., CAMACHO, A., RODRIGUEZ-VALERA, F. Novel *Synechococcus* Genomes Reconstructed from Freshwater Reservoirs. **Frontiers in Microbiology**. v. 8. 2017.

CALLIERI C. *Synechococcus* plasticity under environmental changes, **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, Issue 23. 2017.

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

CARDOSO, A. M. et al. Metagenomics in Polluted aquatic environments. In: PROF. NURAY BALKIS (ED.) **Water Pollution**. [s.l.] InTech, 2012. p. 202.

CARDOSO, A., HERNANDES, C., SALLOTO, G., PARANHOS, R., MARTINS, O. **Metagenomics** in Polluted Aquatic Environments, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/figure/Flowchart-summarizing-the-several-steps-of-metagenomic-analysis-and-bioinformatics>. Acessado em: 10 março 2022.

- CASCELLA, R., EVANGELISTI, E., ZAMPAGNI, M., BECATTI, M., D'ADAMIO, G., GOTI, A., LIGURI, G., FIORILLO, C., CECCHI, C. S-linolenoyl glutathione intake extends life-span and stress resistance via Sir-2.1 upregulation in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**. v.73, pg.127-135. 2014.
- CASTRO, B. V. M. et al. Cianobactérias: dos Primórdios da Via à Formação de um Substrato Atual, o Minério de Ferro. **Revista de Geologia**, v. 29, n. 1, p. 113–132, 2016.
- CATAUDELLA S., CROSETTI D., MASSA F. (eds). **Mediterranean coastal lagoons: sustainable management and interactions among aquaculture, capture fisheries and the environment** *Studies and Reviews*. General Fisheries Commission for the Mediterranean. No 95. Rome, FAO. 2015. 278 pp.
- CHEN, X., SMITH, G.D. & WARING, P. Human cancer cell (Jurkat) killing by the cyanobacterial metabolite calothrixin A. **Journal of Applied Phycology**. v.15, pages 269–277. 2003.
- CHOI, O., DAS, A., YU, C., HU, Z. Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and Cyanobacteria. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 107(6). 2010.
- COBAN, O., RASIGRAF, O., DE JONG, A. E. E., SPOTT, O., BEBOUT, B. M. Quantifying Potential N Turnover Rates in Hypersaline Microbial Mats by Using <sup>15</sup>N Tracer Techniques. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 87(8). 2021.
- COLLIER, J. L., BRAHAMSHA, B., PALENIK, B. 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 Society**. v.145 (2). 1999.
- COSTA, M. B.; OLIVEIRA, V. D. P. S. Análise do uso do solo no Parque Estadual da Lagoa do Açú, Campos dos Goytacazes/RJ. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, v. 11, n. 2, p. 31, 2017a.
- COSTA, M. B.; OLIVEIRA, V. D. P. S. Caracterização Legal, Física e Biótica do Parque Estadual da Lagoa do Açú. **Boletim do Observatório Ambiental Alberto Ribeiro Lamego**, v. 11, n. 1, p. 43, 2017b.
- COSTA, M., SAMPAIO-DIAS, I., CASTELO-BRANCO, R., SCHARFENSTEIN, H., CASTRO, R. R., SILVA, A., SCHNEIDER, M. P. C., ARAÚJO, J., VASCONCELOS, V. M. LEÃO, P. N. Structure of Hierridin C, Synthesis of Hierridins B and C, and Evidence for Prevalent Alkylresorcinol Biosynthesis in Picocyanobacteria. **J. Nat. Prod.** v. 82 (2), pages 393–402. 2019.
- CRESPO, M.P.; ANDRÉ, R.E.G.R.A.; NASCIMENTO, G.S.N.; SILVA, J.A.F; QUINTO JUNIOR, L.P. Contribuições para o planejamento urbano-ambiental na região Norte Fluminense. **Boletim do Observatório Ambiental Aberto Ribeiro Lamego**, Campos dos Goytacazes/RJ, v.4 n. 1, p. 113-126, 2010.

CROCE, R., VAN AMERONGEN, H. Light harvesting in oxygenic photosynthesis: Structural biology meets spectroscopy. **Science**. v. 369 (6506), 2020.

CUPIT, C., LOMSTEIN, B. A., KJELDSEN, K. U. Contrasting community composition of endospores and vegetative Firmicutes in a marine sediment suggests both endogenous and exogenous sources of endospore accumulation. **Environmental Microbiology reports**. v. 11 (3). 2018.

D'AGOSTINO, P. M., JAVALKOTE, V. S., MAZMOUZ, R., PICKFORD, R., PURANIK, P., NEILAN, B. A., Comparative Profiling and Discovery of Novel Glycosylated Mycosporine-Like Amino Acids in Two Strains of the Cyanobacterium *Scytonema cf. crispum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82 (19). 2016.

DA SILVA E SILVA, L. H. et al. Composição cianobacteriana e química dos estromatólitos da lagoa Salgada, Neógeno do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Geologia USP - Serie Científica**, v. 13, n. 1, p. 95–106, mar. 2013.

DANIEL A. PEREIRA, D. A., ALESSANDRA GIANI, A. Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 88 (1), pages 175–183. 2014.

DANOVARO, R., CORINALDESI, C., DELL'ANNO, A., FUHRMAN, J. A., MIDDELBURG, J. J., NOBLE, R. T., SUTTLE, C. A. Marine viruses and global climate change, **FEMS Microbiology Reviews**. v.3 (6), pages 993–1034, 2011.

DÁVILA-RAMOS, S., CASTELÁN-SÁNCHEZ, H. G., MARTÍNEZ-ÁVILA, L., SÁNCHEZ-CARBENTE, M. R., PERALTA, R., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., DOBSON, A. D. W., GONZALEZ, R. A., PASTOR, N., BATISTA-GARCÍA, R. A. A Review on Viral Metagenomics in Extreme Environments. **Frontiers in Microbiology**. v.10. 2019.

DEHM, D., KRUMBHOLZ, J., BAUNACH, M., WEIBACH, V., HINRICH, K., GULJAMOV, A., TABUCHI, T., JENKE-KODAMA, H., SUSSMUTH, R. D., DITTMANN, E. Unlocking the Spatial Control of Secondary Metabolism Uncovers Hidden Natural Product Diversity in *Nostoc punctiforme*. **Chem. Biol**. v. 14 (6) pages 1271–1279. 2019.

DEMAY, J., HALARY, S., KNITTEL-OBRECHT, A., VILLA, P., DUVAL, C., HAMLAOUI, S., ROUSSEL, T., YÉPRÉMIAN, C., REINHARDT, A., BERNARD, C., MARIE, B. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Wound-Healing Properties of Cyanobacteria from Thermal Mud of Balaruc-Les-Bains, France: A Multi-Approach Study. **Biomolecules**. v.11 (28). 2021.

DEMERGASSO, C., ESCUDERO, L., CASAMAYOR, E.O. Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). **Extremophiles** 12, 491–504. 2008.

DHAKAL, D., POKHREL, A. A., SHRESTHA, B., SOHNG, J. K. Marine Rare Actinobacteria: Isolation, Characterization, and Strategies for Harnessing Bioactive Compounds. **Frontiers in Microbiology**. v. 8 (1106). 2017.

- DINSDALE, E. A., EDWARDS, R. A., HALL, D., ANGLY, F., BREITBART, M., BRULC, J. M., FURLAN, M., DESNUES, C. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**. 452, 629–632, 2008.
- DUPRAZ, C., REID, P., BRAISSANT, O., DECHO, O. A., NORMAN, S., VISSCHER, P. T. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. **Earth-Science Reviews**. v. 96 (3), pages 141-162. 2009.
- EDWARDSON, C. F., HOLLIBAUGH, J. T. Composition and Activity of Microbial Communities along the Redox Gradient of an Alkaline, Hypersaline, Lake. **Frontiers in Microbiology**. v.9.2018.
- ESPINDOLA, F. S. Recursos de Bioinformática Aplicados às Ciências Ômicas como Genômica, Transcriptômica, Proteômica, Interatômica e Metabolômica. **Uberlândia**, v. 26, n. 3, p. 463-477, 2010.
- FERNÁNDEZ-CABEZÓN, L., GALÁN, B., GARCÍA, J. L. Engineering *Mycobacterium smegmatis* for testosterone production. **Microbial Biotechnology**. v. 10 (1). 2016.
- FILIPPIDOU S., WUNDERLIN T., JUNIER T., JEANNERET N., DORADOR C., MOLINA V., JOHNSON, D. R., JUNIER P. A Combination of Extreme Environmental Conditions Favor the Prevalence of Endospore-Forming Firmicutes. **Frontiers in Microbiology**. v. 7. 2016.
- FOSTER, J. S., GREEN, S. J. **Microbial Diversity in Modern Stromatolites**. In: Tewari, V., Seckbach, J. (eds) **STROMATOLITES: Interaction of Microbes with Sediments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, vol 18. Springer, Dordrecht. 2011.
- FRANÇOIS, T., JAN-HENDRIK, H., ETIENNE, R., MIRJAM, C., GURVAN. M. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. **Frontiers in Microbiology**. v. 2. 2011.
- FREITAS, S., MARTINS, R., COSTA, M., LEÃO, P.N., VITORINO, R., VASCONCELOS, V., URBATZKA, R. Hierridin B Isolated from a Marine Cyanobacterium Alters VDAC1, Mitochondrial Activity, and Cell Cycle Genes on HT-29 Colon Adenocarcinoma Cells. **Marine Drugs**. v. 14, 158. 2016.
- GABOR, E. et al. Updating the metagenomics toolbox. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 2, p. 201–206, 2007.
- GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L., PALLARDÓ, F. V. Maintenance of glutathione levels and its importance in epigenetic regulation. **Frontiers in Pharmacology**. v.5. 2014.
- GARCIA, P. S., DUCHEMIN, W., FLANDROIS, J., GRIBALDO, S., GRANGEASSE, C., BROCHIER-ARMANET, C. A Comprehensive Evolutionary Scenario of Cell Division and Associated Processes in the Firmicutes. **Molecular Biology and Evolution**. v. 38 (6), p 2396–2412. 2021.

- GOMEZ, F. J., MLEWSKI, C., BOIDI, F. J., FARÍAS, M. E., GÉRARD, E. Calcium Carbonate Precipitation in Diatom-rich Microbial Mats: The Laguna Negra Hypersaline Lake, Catamarca, Argentina. **Journal of Sedimentary Research**. v. 88 (6): 727–742. 2018.
- GORBUNOV, M. Y., KUZMINOV, F. I., FADEEV, V. V., KIM, J. D., FALKOWSKI, P. G. A kinetic model of non-photochemical quenching in cyanobacteria, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1807, (12), 2011.
- GREUKE, C., DUELL, E., D'AGOSTINO, P. M., GLOCKLE, A., LAMM, K., GUILDER, T. A. M. Direct Pathway Cloning (DiPaC) to unlock natural product biosynthetic potential. **Metabolic Engineering**. v. 47, pages 334-345. 2018.
- GRONEWOLD, A. D; WOLPERT, R. L. Modeling the relationship between most probable number (MNP) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. **Water Research**, v. 42, p. 3327-3334, 2008.
- GU, C., LIANG, Y., LI, J., MCMINN, A., TIAN, J. WANG, M. GUO, C., WANG, H. Saline lakes on the Qinghai-Tibet Plateau harbor unique viral assemblages mediating microbial environmental adaption. **iScience**. v.24 (12). 2021.
- GUERREIRO, A., ANDRADE, M. A., MENEZES, C., VILARINHO, F., DIAS, E. Antioxidant and Cytoprotective Properties of Cyanobacteria: Potential for Biotechnological Applications. **Toxins**. v. 12, 548. 2020.
- HAHNKE, R. L., RICHARD L., MEIER-KOLTHOFF, P., GARCÍA-LÓPEZ, M., MUKHERJEE, S. H., MARCEL, I. N. N., WOYKE T., KYRPIDES, N. C., KLENK, H., GÖKER, M. Genome-Based Taxonomic Classification of Bacteroidetes. **Frontiers in Microbiology**. v. 7. 2016.
- HAN, R., ZHANG, X., LIU, J., LONG, Q., CHEN, L., LIU, D. Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke Salt Lake environments. **Can. J. Microbiol.** 63, 895–908. 2017.
- HANDELSMAN J. Molecularbiological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem Biol S**. 1998;5(10):R245–9.
- HASSAN, S. S., ANJUM, K., ABBAS, A. Q., AKHTER, N., SHAGUFTA, I., SHAH, S. S.A., TASNEEM, U. Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 49, pages 34-47. 2017.
- HEUL, H. U., BILYK, B. L., MCDOWALL, K. J., SEIPKE, R. F., WEZEL, G. P. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. **Natural Product Reports**. v. 6. 2018.
- HIRAOKA, S.; YANG, C. C.; IWASAKI, W. Metagenomics and bioinformatics in microbial ecology: Current status and beyond. **Microbes and Environments**, v. 31, n. 3, p. 204–212, 2016.
- HOPWOOD D.A. Cracking the Polyketide Code. **PLOS Biology** 2(2): e35. 2004.



HUGLER, M., WIRSEN, C.O., FUCHS, G., TAYLOR, C. D., SIEVERT, S. M. Evidence for Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation via the Reductive Tricarboxylic Acid Cycle by Members of the  $\epsilon$  Subdivision of Proteobacteria. **Journal of Bacteriology**. v. 187 (9). 2005.

IESPA, A. A. C., IESPA, C., M., D., BORGHI, L. Evolução paleoambiental da Lagoa Salgada utilizando microbialitos, com ênfase em microfácies carbonáticas. **Geosciences**. v. 31, nº 3. 2012.

ISHIDA, K. I., CHRISTANSEN G., CADEL-SIX, S., BOUCHIER, C., DITTMAN, E., HERTWECK, C., MARSAC, N. T. Plasticity and Evolution of Aeruginosin Biosynthesis in Cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75 (7). pages 2017-2026. 2009.

ISLA, F. I. **Coastal zones and estuaries**. Ed. Eolss Publishers. Oxford, United Kingdom, 2009.

JACOB, J. H., HUSSEIN, E. I., SHAKHATREH, M. A. K., CORNELISON, C. T. Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. **MicrobiologyOpen**. v.6(5). 2017.

JANKNEGT, P. J., RIJSTENBIL J. W., VAN DE POLL W. H., GECHEV T.S., BUMA, A. G. A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. **J Photochem Photobiol B**. v. 26;87(3):218-26. 2007.

JIN, X., MILLER, E. S., LINDSEY, J. S. Natural Product Gene Clusters in the Filamentous Nostocales Cyanobacterium HT-58-2. **Life**. v. 11 (356). 2021.

JONES M. R., PINTO E., TORRES, M.A., DORR, F., MARZEC, M., SZUBERT, K., TARTAGLIONE, L. CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. **Water Res**. 196:1–12. 2021.

KATSUYAMA, Y. Mining novel biosynthetic machineries of secondary metabolites from actinobacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 83 (9) page1606–1615. 2019.

KAWAHARA, A., HIHARA, Y. **Biosynthesis of Fatty Acid Derivatives by Cyanobacteria: From Basics to Biofuel Production**. In Cyanobacteria Biotechnology (eds J. Nielsen, S. Lee, G. Stephanopoulos and P. Hudson). 2021.

KE, H., LEWIS, I. A., MORRISEY, J. M., LORENA, M., LILNÁS, M., VAIDYA, A. B. Genetic Investigation of Tricarboxylic Acid Metabolism during the *Plasmodium falciparum* Life Cycle. v. 11 (1). 2015.

KIRILOVSKY, D. Modulating energy arriving at photochemical reaction centers: orange carotenoid protein-related photoprotection and state transitions. **Photosynth Res** 126, 3–17. 2015.

KOMAKI, H., Sakurai, K., Hosoyama, A. Diversity of PKS and NRPS gene clusters between *Streptomyces abyssomicinicus* sp. nov. and its taxonomic neighbor. **J Antibiot** 73, 141–151. 2020.

KONSTANTINIDIS, K., ROSSELLÓ-MÓRA, R., AMAN, R. Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. **ISME J.** vol 11, 2399–2406, 2017.

KUDO, F., MOTEGI, A., MIZOUE, K., EGUCHI, T. Cloning and Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster of 16-Membered Macrolide Antibiotic FD-891: Involvement of a Dual Functional Cytochrome P450 Monooxygenase Catalyzing Epoxidation and Hydroxylation. **ChemBioChem.** v. 11 (11), 2010.

LANGER, M., GABOR, E. M., LIEBETON, K., MEURER, G., NIEHAUS, F., SCHULZE, R., ECK, J., LORENZ, P. Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. **Biotechnol J.** 1, 815–821, 2006.

LARSEN, J. S., PEARSON, L. A., NEILAN, B. A. Genome Mining and Evolutionary Analysis Reveal Diverse Type III Polyketide Synthase Pathways in Cyanobacteria. **Genome Biology and Evolution.** V. 3 (4). 2021.

LAY, C., MYKYTCZUK, N. C. S., GAGNON, G., GREER, C. W., WHYTE, L. G. Defining the Functional Potential and Active Community Members of a Sediment Microbial Community in a High-Arctic Hypersaline Subzero Spring. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 79 (12). 2013.

LEE, J. H. **Stromatolites.** Ed(s): David Alderton, Scott A. Elias. Encyclopedia of Geology (Second Edition), Academic Press, pages 375-388. 2021.

LI, S., Li, Z., Pang, S., Xiang, W., Wang, W. Coordinating precursor supply for pharmaceutical polyketide production in *Streptomyces*. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 69, pages 26-34. 2021.

LI, X., YANG, M., MU, T. Composition and key-influencing factors of bacterial communities active in sulfur cycling of soda lake sediments. **Arch Microbiol.** v. 204, 317. 2022.

LIM Y. P., GO, M.K., YEW, W. S. Exploiting the Biosynthetic Potential of Type III Polyketide Synthases. **Molecules.** 21(6):806. 2016.

LINDELL, D., POST, A. F. Ecological Aspects of *ntcA* Gene Expression and Its Use as an Indicator of the Nitrogen Status of Marine *Synechococcus* spp. **Applied and Environmental Microbiology.** v.76 (8). 2001.

LIU, S., XI, B., QIU, Z., HE, X. S., ZHANG, H., DANG, Q. L., ZHAO, X., DAN LI, D. Succession and diversity of microbial communities in landfills with depths and ages and its association with dissolved organic matter and heavy metals, **Science of The Total Environment.** v. 651, pages 909-916. 2019.

LIU, X., HUANG, L., RENSING, C., YE, J., NEALSON, K. Syntrophic interspecies electron transfer drives carbon fixation and growth by *Rhodospseudomonas palustris* under dark, anoxic conditions. **Science Advances.** v.7,(27). 2021.

LLORENS-MARÈS, T., YOOSEPH, S., GOLL, J. Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. **ISME Journal** 9, 1648–1661. 2015.

LÓPEZ-GARCÍA, P. & Moreira, D. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. **Res Microbiol.** 159, 67–73, 2008.

LOU, W., TAN, X., SONG, K., ZHANG, S., LUAN, G., LI, C., LU, X. A Specific Single Nucleotide Polymorphism in the ATP Synthase Gene Significantly Improves Environmental Stress Tolerance of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. **Applied and Environmental Microbiology.** 18, v.84. 2018.

MADIGAN, M., T., MARTINKO, J. M. Brock **Biology of Microorganisms.** International Edition, 11th Edition. Pearson, 2006.

MAGNUSON, E., MYKYTCZUK, N. C. S., PELLEGRIN, A., GORDIAL, J. TWINE, S. M., WING, B., FOOTE, S. J., FULTON, K., WHYTE, L. G. Thiomicrorhabdus streamers and sulfur cycling in perennial hypersaline cold springs in the Canadian high Arctic. **Environ. Microbiol.** 23, 3384–3400. 2020.

MAKHDOUMI-KAKHKI A., Amoozegar, M. A., Kazemi B., PaiC, L., Ventosa, A. Prokaryotic Diversity in Aran-Bidgol Salt Lake, the Largest Hypersaline Playa in Iran, **Microbes and Environments**, v. 27, Issue 1, Pages 87-93. 2012.

MANACH, S., DUVAL, C., MARIE, A., DJEBIAT, C., CATHERIE, A., EDERY, M., BERNARD, C., MARIE, B. Global Metabolomic Characterizations of *Microcystis* spp. Highlights Clonal Diversity in Natural Bloom-Forming Populations and Expands Metabolite Structural Diversity. **Frontiers in Microbiology.** v.10 (791). 2019.

MANSUR, K. L. et al. **Geoparque costões e lagunas do Estado do Rio de Janeiro. Geoparques do Brasil:** propostas - volume 1, p. 687–745, 2012.

MARTÍNEZ-NÚÑEZ, M.A., LÓPEZ, V.E.L.Y. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. **Sustain Chem Process** 4, 13. 2016.

MARTINHO DE BRITO, M., BUNDELEVA, I., MARIN, F., VENNIN, E., WILMOTTE, A., PLASSERAUD, L., VISSCHER, P.T. Effect of Culture pH on Properties of Exopolymeric Substances from *Synechococcus* PCC7942: Implications for Carbonate Precipitation. **Geosciences.** 12, 210. 2022.

MASSEY, I. Y., YANG, F., DING, Z., YANG, S., GUO, J., TEZI, C., AL-OSMAN, M., KAMEGNI, R. B., ZENG, W. Exposure routes and health effects of microcystins on animals and humans: A mini-review. **Toxicon.** v. 151, pages 156-162. 2018.

MASTALA, Z., HERODEK, S., BALOGH, K.V., BORBÉLY, G., SHAFIK, H. M., VÖRÖS, L. Nutrient requirement and growth of a *Synechococcus* species isolated from Lake Balaton. **Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.** 81, 503–512. 1996.

MAY, D. S., CHEN, W-L., LANTVIT, D. D., ZHANG, X., KRUNIC, A., BURDETTE, J. E., ESTAQUIO, A., ORJALA, J. Merocyclophanes C and D from the Cultured Freshwater Cyanobacterium *Nostoc* sp. (UIC 10110). **Journal of Natural Products**. v. 80, 2017.

MCLEOD, M. P., WARREN, R. L., HSIAO, W. W., ARAKI, N., MYHRE, M., FERNANDES, C., MIYAZAWA, D., WONG, W., LILLQUIST, A. L., WANG, D., DOSANJH, M., HARA, H., PETRESCU, A., MORIN, R. D., YANG, G., STOTT, J. M., SCHEIN, J. E., SHIN, H., SMAILUS, D., SIDDIQUI, A. S., ELTIS, L. D. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.103(42), 15582–15587. 2006.

MEDEMA, M., KOTTMANN, R., YILMAZ, P. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. **Nat Chem Biol** **11**, 625–631. 2015.

MEIJ, A., WORSLEY, S. F., HUTCHINGS, M. I., WEZEL, G. P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS Microbiology Reviews**. V. 41 (3). 2017.

MENDES, L. W., KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. A., VAN VEEN, J. A., TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME journal**, p. 1577–1587, 2014.

MENEGHINE, A. K. **Análise metagenômica e perfil biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica**. Jaboticabal, 2016 iv, 89 p.: il. ; 29 cm Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016.

METACYC20. R.Caspi, R.Billington, I.M. Keseler, A.Kothari, M.Krummenacker, P.E.Midford, W.K. Ong, S.Paley, P.Subhraveti, P.D. Karp. **The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update** Disponível em: [metacy.org](http://metacy.org). Acesso em: 23 abr. 2022.

MODENA, N. A. **Análise genômica de *Penicillium echinulatum* para predição de agrupamentos de genes envolvidos no metabolismo secundário**. 68 f.: il.; 30 cm Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

MONTEIRO, J. M., VOGWILL, R., BISCHOFF, K., GLEESON, D. B. Comparative metagenomics of microbial mats from hypersaline lakes at Rottnest Island (WA, Australia), advancing our understanding of the effect of mat community and functional genes on microbialite accretion. **Limnology and Oceanography**. v. 65 (S1). 2019.

MOOTZ, H. D., SCHWARZER D., MARAHIEL M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases.” **ChemBiochem : a European journal of chemical biology** vol. 3,6. 2002:

MOTLAGH, A. M., BHATTACHARJEE, A. S., COUTINHO, F. H., DUTILH, B. E., CASJENS, S. R., GOEL, R. K. Insights of Phage-Host Interaction in Hypersaline Ecosystem through Metagenomics Analyses. **Frontiers in Microbiology**. v.8. 2017.

- MOURA, P. G. **Metagenômica de água de reúso, esgoto e água potável**. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, 2020. 137f
- MURPHY, C. D., ROODVOETS, M.S., AUSTEN, E.J., DOLAN, A., BARNETT, A. Photoinactivation of Photosystem II in *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. **PLOS ONE** 12(1). 2017.
- NAGHONI, A., EMTIAZI, G., AMOOZEGAR, M. A. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. **Sci Rep** 7, 11522. 2017.
- NICKELSEN, J., RENGSTL, B. Photosystem II Assembly: From Cyanobacteria to Plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 64:609-635. 2013.
- NORMAND, P., DURAN, R., LE ROUX, X., MORRIS, C., POGGIALE, J. C. **Biodiversity and Microbial Ecosystems Functioning**. In: Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., Sime-Ngando, T. (eds) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer, Dordrecht. 2015.
- NOWRUZI, B., FAHIMI, H., ORDODARI, V., ASSAREH, R. Genetic analysis of polyketide synthase and peptide synthase genes of cyanobacteria as a mining tool for new pharmaceutical compounds. **Journal of Pharmaceutical & Health Sciences**. v.5 (2), pages 139-150. 2017.
- NOWRUZI, B., SARVARI, G., BLANCO, S. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. **Algal Research**. v. 29, 2020.
- ONG, J. F. M., TAN, L. T. Draft Genome Sequence of *Mycolicibacterium* sp. Strain 018/SC-01/001, Isolated from the Marine Sponge *Iotrochota* sp. **Microbiol Resour Announc**. v. 8 (42). 2019.
- OREN, A. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. **Biodivers Conserv** 24, 781–798. 2015.
- OYEWUSI, H. A., WAHAB, R. A., KAYA, Y., EDIBEIB, M. F., HUYOP, F. Alternative Bioremediation Agents against Haloacids, Haloacetates and Chlorpyrifos Using Novel Halogen-Degrading Bacterial Isolates from the Hypersaline Lake Tuz. **Catalysts**, 10, 651. 2020.
- PACTON, M., WACEY, D., CORINALDESI, C. Viruses as new agents of organomineralization in the geological record. **Nat Commun** 5, 4298. 2014.
- PAN, J., LIN, S., WOODBURY, N. W. Bacteriochlorophyll Excited-State Quenching Pathways in Bacterial Reaction Centers with the Primary Donor Oxidized. **J. Phys. Chem. B**. 116 (6), 2012.

- PATHAK, J., PANDEY, A., MAURYA, P.K. Cyanobacterial Secondary Metabolite Scytonemin: A Potential Photoprotective and Pharmaceutical Compound. **Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.** 90, 467–481. 2020.
- PENNAFIRME, S., PEREIRA, D. C., PEDROSA, L. G. M., MACHADO, A. S., SILVA, G. O. A., C.N. KEIM, C. N., LIMA, I., LOPES, R. T., PAIXÃO, I. C. N. P., CRAPEZ, M. A. C. Characterization of microbial mats and halophilic virus-like particles in a eutrophic hypersaline lagoon (Vermelha Lagoon, RJ, Brazil). **Regional Studies in Marine Science.** v.31. 2019.
- PICCARDI, R., FROSINI, A., TREDICI, M.R. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. **Journal of Applied Phycology** 12, 543–547. 2000.
- PLOMINSKY, A. M., HENRÍQUEZ-CASTILLO, C., DELHERBE, N., PODELL, S., RAMIREZ-FLANDES, S., UGALDE, J. A., SANTIBAÑEZ, J. F., VAN DEN ENGH, G., HANSELMANN, K., ULLOA, O., DE LA IGLESIA, R., ALLEN, E. E., TREFAULT, N. Distinctive Archaeal Composition of an Artisanal Crystallizer Pond and Functional Insights Into Salt-Saturated Hypersaline Environment Adaptation. **Frontiers in Microbiology.** v.9. 2018.
- PUDDICK, J., PRINSEP, M. R., WOOD, S. A., KAUFONONGA, S. A. F., CARY, S. C., HAMILTON, D. P. High Levels of Structural Diversity Observed in Microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and Characterization of Six New Microcystin Congeners. **Marine Drugs.** v. 12, 5372-5395. 2014.
- RASCONI S., GALL A., WINTER K., KAINZ M. J. Increasing Water Temperature Triggers Dominance of Small Freshwater Plankton. **PLOS ONE** 10(10). 2015.
- RASTEGARI A. A., YADAV A. N., YADAV N. **Genetic Manipulation of Secondary Metabolites Producers**, Editor(s): Vijai Kumar Gupta, Anita Pandey, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Chapter 2. Elsevier, 2019, Pages 13-29.
- RICH V. I., MAIER, R. M. **Aquatic Environments**. Editor(s): Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, Terry J. Gentry, Chapter 6, Environmental Microbiology (Third Edition), Academic Press, 2015.
- RUVINDY, R., WHITE, R. A., NEILAN, B. A., & BURNS, B. P. Unravelling core microbial metabolisms in the hypersaline microbial mats of Shark Bay using high-throughput metagenomics. **ISME Journal**, 10(1), 183–196. 2016.
- SALLÔTO, G. R. B. **Avaliação metagenômica da microbiota do complexo lagunar de Jacarepaguá e seus impactos na saúde pública.** [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
- SALWAN, R., SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. **Microbiological Research.** v. 231. 2020.
- SÁNCHEZ-ANDREA, I., GUEDES, I.A., HORNUNG, B. The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. **Nat Commun** 11, 5090. 2020.

SANTOS, C. A. A. S., OLIVEIRA, L., BARBOSA, M. A., HORSTER, T. R. Z., NASCIMENTO, B. L. M., SERRA, M. A. A. O., COSTA, I. A., ORLANDA, J. F. F. Analysis of the quality of the recreational water in spas in the City of Açailândia, Maranhão, Brazil. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13. 2021.

SAWYER, C. N.; McCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. **Chemistry for environmental engineering**. 4th ed. United States of America: McGraw-Hill, Inc. 1994. 658p.

SCANLAN, D. J. Physiological diversity and niche adaptation in marine *Synechococcus*. **Advances in Microbial Physiology**. v.47, page 1-64. 2003.

SENATE, L. M., TJATJI, M. P., PILLAY, K. Similarities, variations, and evolution of cytochrome P450s in *Streptomyces* versus *Mycobacterium*. **Sci Rep** 9, 3962. 2019.

SILVA E SILVA, L. H. **Contribuição ao conhecimento da composição microbiana e química das estruturas estromatolíticas da lagoa Salgada, Quaternário do Rio de Janeiro, Brasil**. Tese (Doutorado) - Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2002

SIME-NGANDO, T. Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*. v.5. 2014.

SLEATOR, R. D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, n. 5, p. 361–366, nov. 2008.

SOLTANI J. **Secondary Metabolite Diversity of the Genus *Aspergillus*: Recent Advances**. Editor(s): Vijai Kumar Gupta, *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Chapter 22, Elsevier, 2016, Pages 275-292.

SOTERO-MARTINS, A. et al. Methods for Sanitary Inspection of Microbiological and Parasitary Quality of Water and Sand of Recreation Areas. **American Journal of Engineering Research (AJER)**, v. 6, n. 2, p. 56-62, 2017.

SOTERO-MARTINS, A et al. Quality of raw water in the Guandu Basin of Rio de Janeiro state during water crisis of 2020. *Revista Ambiente & Água*. 16 (4), 2021.

SRIVASTAVA, A. K., RAI, A. N., NEILAN, B. A. (Eds.). **Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses** (1st ed.). 2013. Disponível em <https://doi.org/10.1201/b13853> . Acessado em 30 de maio de 2022.

SRIVASTAVA, N. K. Lagoa Salgada, RJ - **Estromatólitos recentes**. In: Schobbenhaus, C.; Campos, D.A.; Queiroz, E.T.; Winge, M.; Berbert-Born, M.L.C. (Edits.) *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. 1. ed. Brasília: DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), 2002. v. 01: 203-209.

STEFAN, S., DIMITRY Y. S., SUSANNE, V., MANFRED, R., TANJA, W., NIKOS, K. C. Sulfate-Reducing Bacteria That Produce Exopolymers Thrive in the Calcifying Zone of a Hypersaline Cyanobacterial Mat. **Frontiers in Microbiology**. v.10. 2019.

STEFFEN M. M., LI Z, EFFLER, T. C, HAUSER, L.J., BOYER G.L, Comparative Metagenomics of Toxic Freshwater Cyanobacteria Bloom Communities on Two Continents. **PLOS ONE** 7(8): e44002. 2012.

SUBRAMANI, R., AALBERSBERG, W. Culturable rare *Actinomycetes*: diversity, isolation and marine natural product discovery. **Appl Microbiol Biotechnol** 97, 9291–9321. 2013.

SUTTLE, C. Marine viruses — major players in the global ecosystem. **Nat Rev Microbiol** 5, 801–812. 2007.

SYED, P.R., CHEN, W., NELSON, D.R., KAPPO, A.P., YU, J.-H., KARPOORMATH, R., SYED, K. Cytochrome P450 Monooxygenase CYP139 Family Involved in the Synthesis of Secondary Metabolites in 824 Mycobacterial Species. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, 2690. 2019.

TANGERINA, M. M.P., FURTADO, L. C., LEITE, V.M.B., BAUERMEISTER, A., VELASCO-ALZATE, K. Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. **PLOS ONE** 15(12). 2020.

TUDESCO, C. C. **A Lagoa Salgada e a ação antrópica em sua faixa marginal de proteção, região norte do Estado do Rio de Janeiro.** [s.l.] Instituto Federal Fluminense, Ciência e Tecnologia Fluminense, 2011.

VALAN, A. M., ESMAIL, G. A., AL-DHABI, N. A. Hypersaline Actinomycetes and Their Biological Applications. In **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications.** InTech. 2016.

VALLEJO, L. R. Uso público em áreas protegidas: atores, impactos, diretrizes de planejamento e gestão. **Revista Eletrônica Uso Público em Unidades de Conservação.** v. 1, nº 1. 2013.

VAVOURAKIS, C. D., MEHRSHAD, M., BALKEMA, C. Metagenomes and metatranscriptomes shed new light on the microbial-mediated sulfur cycle in a Siberian soda lake. **BMC Biol** 17, 69. 2019.

VENTER, J. C. et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 66 LP – 74, 2, 2004.

VIJAYAKUMAR, R. & RAJA, S. (eds.). **Secondary Metabolites - Sources and Applications.** IntechOpen, London. 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/6670> Acesso em: 15 maio 2022.

VISSCHER, P. T., STOLZ, J. F. Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.** v. 219 (1). 2005.

VON SPEARLING, E., LIBÂNIO, M., LIBÁVIO, P. A. C., COSTA, B. M. P. Avaliação da relevância do carbono orgânico total como parâmetro de caracterização de águas de abastecimento. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos.** v. 5 (4), 2000.

WAGNER, G. et al. STINGRAY: System for integrated genomic resources and analysis. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.



WANG, Y., LI, A., ZHANG, L., WAQAS, M., MEHMOOD, K., IQBAL, M., MUYOU, C., LI, Z., LIAN, Y., SIZHU, S., LI, J. Probiotic potential of *Lactobacillus* on the intestinal microflora against *Escherichia coli* induced mice model through high-throughput sequencing. **Microb. Pathog.** 137, 103760. 2019.

WESTHOFF, S., KLOOSTERMAN, A. M., HOESEL, S. F. A., WEZEL, G.P., ROZEN, D. E. Competition sensing changes antibiotic production in *Streptomyces*. **ASM Journals mBio**, v. 21(1). 2021.

WIEGAND, C., PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 203 (5). 2005.

YUTIN, N., GALPERIN, M. Y. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. **Environmental Microbiology**. v. 15(10), p. 2631-2641. 2013.

ZEHR, J. P., MCREYNOLDS, L. A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55 (10). 1989.

ZHANG, J.-N., XIA, Y.-X., ZHANG, H.-J. Natural Cyclopeptides as Anticancer Agents in the Last 20 Years. **Int. J. Mol. Sci.** v. 22, 3973. 2021.

ZHAO, F., QIN, Y. H., ZHENG, X. Biogeography and Adaptive evolution of *Streptomyces* Strains from saline environments. **Sci Rep** 6, 32718. 2016.

ZHU, T., SHI, W., DAM, B. V., YU, L. K. J., QIN, B. Algal Accumulation Decreases Sediment Nitrogen Removal by Uncoupling Nitrification-Denitrification in Shallow Eutrophic Lakes. **Environ. Sci. Technol.** v. 54, 10, pages 6194–6201. 2020.

ZHU, T., SCALVENZI, T., SASSOON, N., LU, X., GUGGER, M. Terminal Olefin Profiles and Phylogenetic Analyses of Olefin Synthases of Diverse Cyanobacterial Species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 8 (13). 2018.

## APÊNDICE A - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA - KIT DNEASY POWER WATER (QUIAGEN)

Notas prévias:

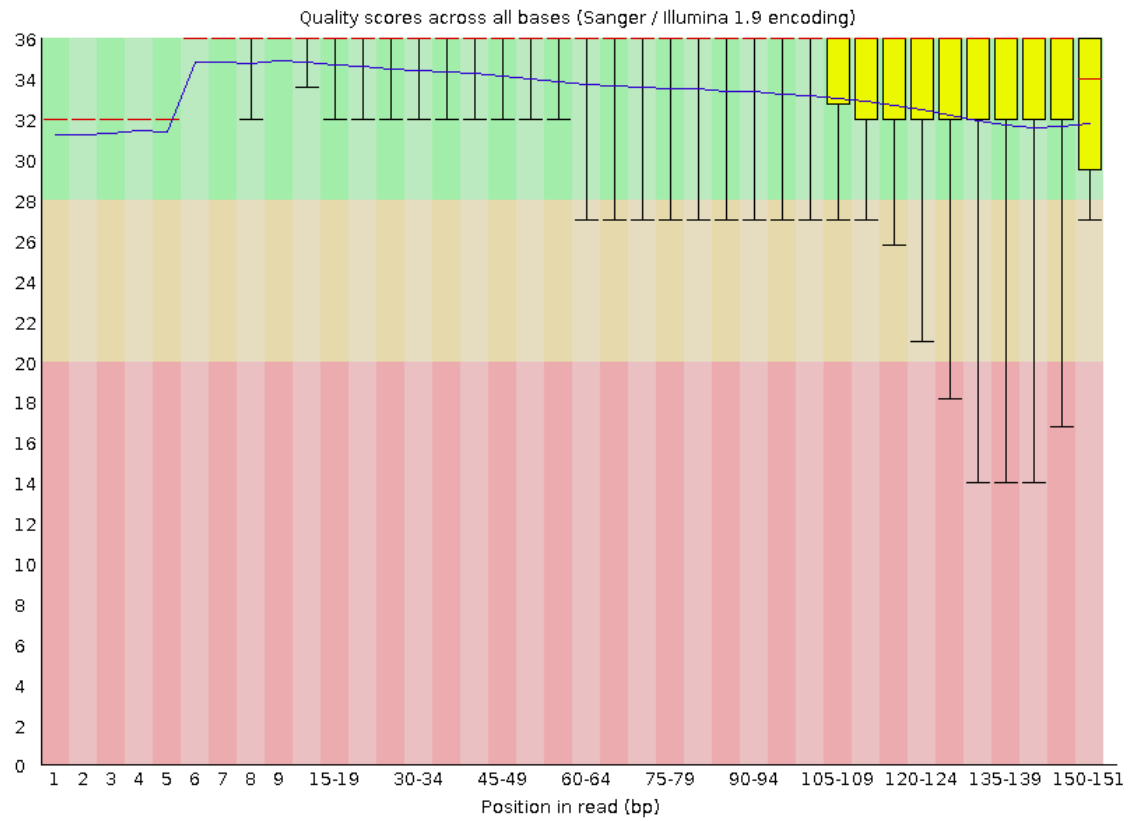
- Aquecer a solução PW1 a 55°C por 5-10 minutos para dissolver eventuais precipitados. A solução deve ser usada enquanto estiver aquecida.
- Aquecer a solução PW3 a 55°C por 5-10 minutos para dissolver eventuais precipitados.
- Agitar a solução PW4 para misturar antes do uso.

### Etapas:

1. Filtrar as amostras de água usando um filtro acoplado a uma bomba a vácuo.
0. Remover a porção superior do funil do filtro.
0. Utilizando um fórceps (pinça) esterilizado, pegar a membrana filtrante lateralmente.
0. Inserir a membrana em 5 ml do tubo Power Water DNA Bead Tube.
0. Adicionar 1 ml da solução **PW1** no tubo Power Water DNA Bead Tube.
0. Prender o tubo horizontalmente a um adaptador de vórtice.
0. Vortex na velocidade máxima por 5 minutos (etapa opcional, caso tenha centrífuga para tubo de 15 ml).
0. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2ml;  
Coletar o sobrenadante usando um tip de 1ml, inserindo o mesmo dentro do Bead.  
**Nota:** É necessário inserir o tip dentro do bead para melhor obtenção do sobrenadante. Pipetar até remover todo o sobrenadante. Espera-se recolher 600-650 uL de sobrenadante.
0. Centrifugar a 13.000 RPM por 1 minuto.
0. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante um novo tubo de 2 ml.
0. Adicionar 200 uL da solução **IRS**, e vórtex rapidamente para misturar.
0. Centrifugar os tubos a 13.000 RPM por 1 minuto.
0. Evitando o pellet, transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2 ml.

0. Adicionar 650 uL da solução **PW3** e vórtex rapidamente para misturar.
0. Carregar 650 uL do sobrenadante para dentro da coluna (MB Spin Column); Centrifugar a 13.000 RPM por 1 minuto.
0. Descartar o sobrenadante. Repetir até que todo o sobrenadante tenha sido processado.
0. Acoplar a coluna em um novo tubo de 2 ml.
0. Adicionar 60 uL da solução **PW4** (agitar antes de usar), e centrifugar a 13.000 RPM por 1 minuto.
0. Descartar o fluxo, adicionar 650 uL de etanol, e centrifugar a 13.000 RPM por 1 minuto.
0. Descartar novamente o fluxo, e centrifugar mais uma vez a 13.000 RPM por 2 minutos.
0. Acoplar a coluna em um novo tubo de 2 ml.
0. Adicionar 100 uL da solução **EB** no centro do filtro da coluna.
0. Centrifugar a 13.000 RPM por 1 minuto.
0. Descarte a coluna.
0. Fechar o tubo e guardar a amostra no freezer.

## APÊNDICE B - GRÁFICO DA PONTUAÇÃO DE QUALIDADE DE TODAS AS PARES DE BASE (BP) DO SEQUENCIAMENTO



Fonte: Próprio autor, 2022