

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Natália Cristina Vieira de Carvalho

**DINÂMICA TEMPORAL DO FITOPLÂNCTON EM UM LAGO RASO E
MESOTRÓFICO (LAGOA SANTA, MINAS GERAIS, BRASIL) E A OCORRÊNCIA
DE GENÓTIPOS PRODUTORES DE TOXINAS.**

Belo Horizonte

2019

Natália Cristina Vieira de Carvalho

**DINÂMICA TEMPORAL DO FITOPLÂNCTON EM UM LAGO RASO E
MESOTRÓFICO (LAGOA SANTA, MINAS GERAIS, BRASIL) E A OCORRÊNCIA
DE GENÓTIPOS PRODUTORES DE TOXINAS.**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dr. Alessandra Giani

Belo Horizonte

2019

- 043 Carvalho, Natália Cristina Vieira de.
Dinâmica temporal do fitoplâncton em um lago raso e mesotrófico (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e a ocorrência de genótipos produtores de toxinas [manuscrito] / Natália Cristina Vieira de Carvalho. – 2019.
67 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Alessandra Giani.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.
1. Fenômenos Fisiológicos Vegetais. 2. Fitoplâncton. 3. Cianobactérias. 4. Cylindrospermopsis. 5. Lagos. I. Giani, Alessandra. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação “Dinâmica temporal do fitoplâncton em um lago raso e mesotrófico (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e a ocorrência de genótipos produtores de toxinas”

Dissertação defendida pela mestrandia Natália Cristina Vieira de Carvalho, aprovada 31 de julho de 2019, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Dra. Alessandra Giani

Dra. Célia Leite Sant’Anna

Dr. Marcos Callisto de Faria Pereira

Dr. Danilo Rafael Mesquita Neves

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Rafael Mesquita Neves, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 14/10/2021, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1021194** e o código CRC **C151437E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa. Alessandra Giani, pela dedicação, por ter sido sempre presente e por todo suporte durante o mestrado. Sou muito grata por todo conhecimento compartilhado.

À Profa. Célia Leite Sant'Anna e ao Prof. Marcos Callisto de Faria Pereira por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Ficologia. Agradeço a Bruna por toda o auxílio durante o mestrado, além do apoio, já que passamos por todo esse processo juntas. A Laisa por ter sempre me ajudado também quando precisei, em laboratório, com a taxonomia e nas aventuras em Lagoa Santa. A Valquíria e ao Leandro por toda contribuição nesse trabalho, principalmente com as análises moleculares. Agradeço também a Elenice, Estevão e Vinícius por todos os auxílios em laboratório e/ou em campo.

Aos amigos que fiz durante o mestrado. Em especial, Leilane, Felipe, Tiago, Alexandre, Leandro e Fernanda. Pelos cafés, corridas, conversas e trocas de experiências durante a pós-graduação.

Às minhas amigas da PUC, que são ainda tão presentes, Fani, Luiza, Sara e Izabella. Que sempre me incentivaram, apoiaram e que também contribuíram para esse trabalho.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas. Pelos exemplos de amor, união e integridade.

À minha irmã Vanessa e à minha prima-irmã Amanda, que tanto amo e que sempre estiveram ao meu lado.

À Profa. Cláudia C. Windmoller, do Departamento de Química da UFMG, pela disponibilidade e contribuição ao realizar as análises de metais.

À Polícia Militar de Meio Ambiente de Lagoa Santa, por gentilmente terem concedido o empréstimo do barco e pelo acompanhamento em todas as coletas. Esse apoio foi fundamental para a realização desse trabalho. Agradeço principalmente ao Sargento Robson.

Ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG por viabilizar o transporte para a realização das coletas em Lagoa Santa.

À FAPEMIG e à CAPES pela bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!

RESUMO

A comunidade fitoplanctônica é muito diversa e é composta por diferentes grupos taxonômicos, que incluem microalgas e cianobactérias. A estrutura dessa comunidade é governada por diferentes interações ambientais, sendo que a predominância de um grupo em detrimento de outro, em determinado sistema aquático é, em geral, relacionado com as características físicas e químicas do ecossistema.

Na lagoa central de Lagoa Santa (Minas Gerais, Brasil), a dominância permanente e estável de *Cylindrospermopsis raciborskii*, espécie de cianobactéria potencialmente produtora de toxinas, foi registrada em estudos anteriores. Esse sistema aquático é um lago natural, pequeno e de pouca profundidade, localizado em área urbana, que vem sofrendo degradação ambiental. Este lago está inserido em um sistema cárstico que apresenta importância histórica e científica.

No presente trabalho, o objetivo foi aprofundar o estudo desse ecossistema, a fim de verificar os fatores ambientais que governam a dinâmica da comunidade fitoplanctônica, assim como os padrões de dominância e a eventual formação de florações tóxicas. Ao mesmo tempo, buscou-se avaliar se a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, presente na lagoa, possuía potencial de produzir toxinas, que não haviam sido mensuradas em estudos anteriores. Paralelamente, avaliou-se a eventual ocorrência de outras cianobactérias produtoras de cianotoxinas.

Para atender esses objetivos, foram realizadas amostragens mensais na Lagoa Santa, entre os anos de 2017 e 2019. Foram avaliadas as características físicas e químicas da água assim como a comunidade fitoplanctônica, através da identificação e contagem dos organismos. Abordagens moleculares, através da PCR convencional, foram utilizadas para detectar a presença de genes envolvidos na potencial produção de cianotoxinas, como a saxitoxina e microcistina.

Como resultados, o presente estudo revelou variação da estrutura da comunidade fitoplanctônica, onde houve alternância de dominância entre cianobactérias e microalgas pertencentes ao filo Chlorophyta. Diferentemente de resultados encontrados em trabalhos realizados anteriormente nesse ambiente, a espécie de cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, dominou a comunidade apenas durante parte do estudo. Algum distúrbio ocorrido no lago, deve ter favorecido a dominância das clorófitas, *Monoraphidium contortum* e *Botryococcus braunii*, período marcado pela diminuição da diversidade da comunidade, como demonstrado pela diminuição dos valores do índice de diversidade de Shannon. Esta

dominância das clorófitas coincidiu com um período de mistura da coluna d'água, que pode ter sido uma das causas da mudança observada na estrutura da comunidade fitoplanctônica. Após esse período, no entanto, a espécie de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* passou a ser a mais abundante.

Os processos de estratificação e mistura da coluna d'água observados no presente estudo na Lagoa Santa, podem ter favorecido as mudanças ocorridas na composição das espécies e nos padrões de dominância. As abordagens baseadas em traços funcionais foram importantes para entender as estratégias adotadas por cada espécie nesse estudo. As variações ambientais, ocorridas sobre um gradiente temporal, podem ter sido responsáveis pela alternância entre as espécies r-estrategistas e K-estrategistas. Além disso, a exclusão competitiva, à qual as espécies fitoplanctônicas estão sujeitas, deve também ter contribuído nas mudanças observadas na comunidade.

Através das abordagens moleculares, identificamos a presença do gene *sxtA* nesse ambiente, o qual codifica uma enzima multifuncional que inicia a síntese de saxitoxina, durante todo o estudo. Os resultados de microscopia sugerem, pelas espécies presentes, ser *Cylindrospermopsis raciborskii* a principal espécie potencialmente produtora. Além disso identificamos, em alguns meses desse estudo, a presença do gene *mycD*, o qual participa da complexa biossíntese da microcistina, possivelmente ligado a ocorrência de espécies do gênero *Microcystis* na lagoa.

O presente estudo contribuiu para compreender a dinâmica da comunidade fitoplanctônica da Lagoa Santa, evidenciando a importância das características físicas e químicas do ambiente, bem como dos fatores ecológicos na estruturação dessa comunidade. Esse trabalho também enfatiza a importância do uso de abordagens moleculares para a detecção de cepas potencialmente tóxicas de cianobactérias na comunidade.

Palavras-chave: Cianobactérias, *Cylindrospermopsis raciborskii*, diversidade, comunidade fitoplanctônica, cianotoxinas, lagos rasos.

ABSTRACT

The phytoplankton community is very diverse and composed by different taxonomic groups, which include microalgae and cyanobacteria. The community structure is governed by several environmental and biological interactions, and the predominance of one group over another in a given aquatic system is related to certain ecosystem characteristics.

In the central lake of Lagoa Santa (Minas Gerais, Brazil), the permanent and stable dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii*, a potentially toxin-producing cyanobacteria species, was recorded in previous studies. This aquatic system is a natural shallow lake, located in an urban area, which has been suffering from environmental degradation. This lake is part of a karst system that has historical and scientific importance.

The goal of the present work was to deepen the study of this ecosystem, in order to assess the environmental factors that govern the dynamics of the phytoplankton community, as well as the dominance patterns and the eventual formation of toxic blooms. At the same time, we sought to assess whether the species *Cylindrospermopsis raciborskii*, present in the lake, had the potential to produce toxins, which had not been measured before, and to evaluate the possible occurrence of other cyanotoxin-producing cyanobacteria.

To attain these objectives, monthly sampling was carried out in Lagoa Santa, between 2017 and 2019. The physical and chemical characteristics of the water on the phytoplankton community were evaluated. Molecular approaches, through conventional PCR, were used to detect the presence of genes involved in the potential production of cyanotoxins, such as saxitoxin and microcystin.

As a result, the present study revealed changes in the structure of the phytoplankton community, where an alternation of dominance between cyanobacteria and microalgae belonging to the phylum Chlorophyta was found. Differently from previous observations, the cyanobacteria species *Cylindrospermopsis raciborskii* dominated the community only during part of the study. Some disturbance in the lake must have favored the dominance of chlorophyte species, like *Monoraphidium contortum* and *Botryococcus braunii*, defining a period marked by the decrease in community diversity, as demonstrated by the decrease in Shannon's diversity index values.

This dominance of chlorophytes occurred in a period of water column mixing, which may have been one of the causes of the observed change in the structure of the phytoplankton community. After this period, however, the cyanobacterial species *Microcystis aeruginosa* became the most abundant.

The stratification and mixing processes of the water column observed in Lagoa Santa may have favored changes in species composition and dominance patterns. A functional traits approach, used in the present study, was important to understand the strategies adopted by each species. Environmental modifications seem to have produced an alternation between r- and K-strategist species over the temporal gradient. Biological interactions, like competitive exclusion to which phytoplankton species are subject, must also have contributed to the changes observed in the community.

By molecular approach, we identified the presence of the *sxtA* gene in this environment, which encodes a multifunctional enzyme that initiates saxitoxin synthesis. The microscopy results suggest that *Cylindrospermopsis raciborskii* is the main potentially producing species. Furthermore, in a few months of this study, we identified the presence of the *mycD* gene, which participates in the complex biosynthesis of microcystin, possibly linked to the occurrence of species of the genus *Microcystis* in the lake.

The present study contributed to understand the dynamics of the phytoplankton community of Lagoa Santa, highlighting the importance of the physical and chemical characteristics of the environment, as well as the ecological factors structuring this community. This study also emphasizes the importance of using molecular approaches to detect potentially toxic strains of cyanobacteria in the community.

Keywords: Cyanobacteria, *Cylindrospermopsis raciborskii*, diversity, community, functional traits, cyanotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lagoa Santa, localizada na cidade de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.....	20
Figura 2. Ponto amostral na Lagoa Santa (lagoa central), em Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.	22
Figura 3. Médias mensais da temperatura do ar (°C) e precipitação acumulada mensal (mm) durante o período de estudo em Lagoa Santa. Os dados foram obtidos através do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA).	27
Figura 4. Perfil vertical da variação sazonal da (a) temperatura da água (°C) e (b) oxigênio dissolvido (mg/L) da Lagoa Santa ao longo do período estudado.	28
Figura 5. Medida da zona eufótica (Z_{eu}) da Lagoa Santa durante o período amostrado.	29
Figura 6. Variação da condutividade elétrica durante o período de estudo.....	30
Figura 7. Variação da pH durante o período de estudo.	30
Figura 8. Variação de sólidos suspensos totais, referentes à fração inorgânica (mg/L) e orgânica (m) na profundidade de 1,0 m (a) e 3,0 m (b) da coluna d'água, na Lagoa Santa durante o período amostrado.	31
Figura 9. Variação da concentração de Fósforo solúvel (PO_4) durante o período de estudo, referente à profundidade de 1,0 m e 3,0 m da coluna d'água.....	32
Figura 10. Variação da concentração de Fósforo total (PT) durante o período de estudo, referente à profundidade 1,0 m e 3,0 m da coluna d'água.....	32
Figura 11. Variação da concentração de Amônio (NH_4), Nitrato (NO_3) e Nitrito (NO_2) durante o período de estudo, referente à profundidade de 1,0 m (a) e 3,0 m (b) da coluna d'água.	34
Figura 12. Variação sazonal da concentração de clorofila-a ($\mu g/L$) e carotenoides ($\mu g/L$) na Lagoa Santa a partir de amostras coletadas a 1,0 m de profundidade da coluna d'água, durante o período de amostragem.....	36
Figura 13. Eixo I: Biovolume dos principais grupos fitoplanctônicos (mm^3/L) encontrados na Lagoa Santa ao longo do período de estudo. Eixo II: Concentração de Clorofila-a ($\mu g/L$) relativa ao mesmo local e período de estudo, linha tracejada.	37
Figura 14. Abundância relativa, baseada no biovolume, dos principais grupos fitoplanctônicos encontrados na Lagoa Santa, ao longo do período de estudo.....	38
Figura 15. Eixo I: Biovolume das espécies <i>Planktolyngbya brevicularis</i> , <i>Planktolyngbya limnetica</i> , <i>Limnothrix</i> sp. e <i>Pseudoanabaena galeata</i> (mm^3/L). Eixo 2: Biovolume de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (linha tracejada), na Lagoa Santa durante o período de estudo.	39
Figura 16. Biovolume das espécies de <i>Microcystis</i> sp. (mm^3/L) e de células de <i>Microcystis</i> sp. encontradas na Lagoa Santa.	40

Figura 17. Eixo I: Biovolume das espécies do filo Chlorophyta (mm³/L) (eixo Y principal) e biovolume de *Monoraphidium contortum* (mm³/L) (eixo Y secundário), encontrados na Lagoa Santa durante o período de estudo.....41

Figura 18. Índice de Shannon baseado no biovolume (bits/mm³) para a comunidade fitoplanctônica da Lagoa Santa.....42

Figura 19. Produtos da amplificação para o conjunto de iniciadores 356F e 1391R para a detecção do gene 16S-rRNA com a finalidade de verificar a presença de cianobactérias da Lagoa Santa, durante o período de estudo. No alto do gel, estão indicadas as datas de de cada amostra; C+ e C- indicam, respectivamente, o controle positivo e negativo. Ladder 100pb. Géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio.....43

Figura 20. Produtos da amplificação para os iniciadores c-mycDF e q-mycDR com a finalidade de detectar o gene mycD para verificar a presença de cepas potencialmente produtoras de microcistina, para todo o período de estudo na Lagoa Santa. No alto do gel, estão indicadas as datas de cada amostra; C+ e C- indicam, respectivamente, o controle positivo e negativo. Ladder 100pb. Géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio.....43

Figura 21. Produtos da amplificação para o iniciador sxtA4, com a finalidade de detectar o gene sxtA para verificar a presença de cepas potencialmente produtoras de saxitoxina, na Lagoa Santa, durante o período de estudo. No alto do gel, estão indicadas as datas de cada amostra; C+ e C- indicam, respectivamente, o controle positivo e negativo. Ladder 100pb. Géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio.....44

Figura 22. Triplot da análise de redundância da interação entre as variáveis bióticas (vetores vermelhos) e abióticas (vetores azuis) referente ao período de estudo que ocorreu na Lagoa Santa (novembro/2017 e fevereiro/2019). Os círculos são referentes a cada amostragem, sendo que os números indicam o mês e o ano. Os vetores indicam a direção de aumento das variáveis. Os ângulos entre as variáveis indicam a correlação existente (ângulos próximos a 0° indicam alta correlação, ângulos próximos à 90°C indicam que não há correlação, ângulos próximos a 180° indicam alta correlação negativa). Proporção de explicação: 32,66% para a RDA 1 e 25,64% para RDA 2, total 78%. Temp= Temperatura da água; Prec= precipitação; Zeu = Zona eufótica; DO= oxigênio dissolvido; pH= potencial hidrogeniônico; TP= fósforo total; PO4= fósforo solúvel; NH4= amônio; NO3= nitrato; chl-a: clorofila-a; carot= carotenoides; Cracii= *Cylindrospermopsis raciborskii*; Chrooc: células livres de *Microcystis aeruginosa*; Bbraunii= *Botryococcus braunii*; Maeru= *Microcystis aeruginosa*; Mrcont: *Monoraphidium contortum*; Pbrevi= *Planktolyngbya brevicelulares*; Plim= *Planktolyngbya limnetica*.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de metais ($\mu\text{g/ L}$) encontrados na Lagoa Santa durante o período de estudo.....	35
Tabela 2. Resultados da análise de redundância para o eixo-1 (RDA1) e eixo-2 (RDA2) para fatores ambientais e espécies do fitoplâncton na Lagoa Santa.	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Área de estudo.....	20
3.2 Amostras ambientais	21
3.3 Identificação, quantificação e biovolume da comunidade fitoplanctônica.....	22
3.4 Análise da diversidade da comunidade fitoplanctônica.....	23
3.5 Análise de clorofila- <i>a</i> e carotenoides.....	23
3.6 Análise de sólidos.....	23
3.7 Análise de nutrientes	24
3.8 Análise de metais	24
3.9 Análises moleculares	24
3.9.1 Extração de DNA.....	24
3.9.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) – Análise qualitativa	25
3.10 Análises estatísticas	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Fatores climáticos, físicos e químicos.....	27
4.2 Nutrientes	31
4.3 Metais.....	35
4.4 Variáveis biológicas	36
4.4.1 Clorofila <i>a</i> e carotenoides	36
4.4.2 Comunidade fitoplanctônica.....	37
4.4.3 Análise de diversidade da comunidade fitoplanctônica	41
4.4.3 Análises moleculares	42
4.5 Análises estatísticas	44
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos estão submetidos a mudanças temporais e espaciais que são importantes para a estrutura da comunidade fitoplanctônica. As condições de equilíbrio e não-equilíbrio do ecossistema podem interferir na ecologia das espécies. Teorias ecológicas buscam explicar os eventos de sucessão do fitoplâncton nos ambientes aquáticos. A teoria proposta por Hutchinson's (1957) "Paradoxo do plâncton" sugere a coexistência de espécies, mesmo sob limitação de recursos, em condições de não-equilíbrio, devido as flutuações ambientais. Contudo, o Princípio da Exclusão Competitiva propõe que espécies competidoras, que apresentam nichos similares, não podem coexistir em um ambiente constante. Dessa forma, as espécies consideradas como competidoras superiores tendem a dominar o ambiente, o que pode causar a diminuição da diversidade da comunidade (Gause, 1934; Tilman, 1977). Connell's (1978), através da Hipótese dos Distúrbios Intermediários, propõe que a diversidade é maior em ambientes que apresentam distúrbios em frequências moderadas. Uma vez que a composição da comunidade fitoplanctônica impacta o funcionamento do ecossistema aquático como um todo, é de grande importância entender os fatores que governam a sua dinâmica.

A comunidade fitoplanctônica é muito diversa e é composta por diferentes grupos taxonômicos, o que incluem microalgas e cianobactérias. As cianobactérias são os únicos organismos procariontes do fitoplâncton e pertencem ao filo monofilético Cyanobacteria. No entanto, as microalgas pertencem principalmente aos filos Chlorophyta, Euglenophyta, Bacillariophyta, Ochrophyta e Dinophyta. As espécies dessa comunidade possuem características ecológicas, fisiológicas e morfológicas distintas (Tilman, 1977; Lewis, 1978; Reynolds et al., 2002). São esses organismos fundamentais nos ecossistemas aquáticos, por serem importantes produtores primários. São, portanto, fotossintetizantes e apresentam diferentes pigmentos para captura de luz. A clorofila *a* é o principal pigmento fotossintetizante, mas também possuem pigmentos acessórios como os carotenoides e também as ficocianinas em cianobactérias (Bryant, 2009). O fitoplâncton pode também alterar a qualidade da água e impactar os ciclos biogeoquímicos bem como a dinâmica trófica dos sistemas aquáticos (Klausmeier et al., 2004; Balch & Byrne, 1994; Paerl, 1988; Paerl et al, 2001; Falkowski et al., 2004). A estrutura da comunidade fitoplanctônica é governada por diferentes interações ambientais, sendo que a predominância de um grupo em detrimento de outro, em determinado sistema aquático, é relacionada principalmente com as características físicas e químicas do ecossistema (Harris, 1980; Reynolds, 1980).

Os padrões de dominância encontrados nas comunidades fitoplanctônicas são difíceis de definir, uma vez que um conjunto de fatores bióticos e abióticos podem estar envolvidos. As cianobactérias e as clorófitas são, geralmente, importantes componentes do fitoplâncton. Apresentam adaptações a um amplo espectro de condições ambientais, sendo esses organismos encontrados em lagos com diferentes características e graus de trofia (Salmaso, 2000). Em geral, as cianobactérias tendem a dominar em lagos eutróficos e hipereutróficos, exibindo longos e estáveis períodos de dominância, que levam a formação de florações (Paerl, 1988; Paerl et al., 2001, Carey, 2011; Elliott et al., 2010). As cianobactérias podem apresentar diferentes estruturas e adaptações fisiológicas que favorecem a sua dominância nos sistemas aquáticos. A presença de aerótopos, por permitir a flutuação, pode favorecer o acesso a luz e evitar a sedimentação desses organismos (Walsby, 1994; Padisák, 1997). As cianobactérias podem possuir também outras estruturas especializadas como os acinetos e heterócitos, que favorecem seu estabelecimento mesmo quando ocorre alterações ambientais no ecossistema (Paerl, 1988). Alguns gêneros são também capazes de formar florações tóxicas. De fato, as cianobactérias conseguem ser boas competidoras nos ambientes aquáticos. No entanto, alguns estudos apontam a dominância de clorófitas em lagos rasos com alta disponibilidade de nutrientes, mesmo em condições que poderiam favorecer a dominância de cianobactérias (Jeppesen et al., 1990; Jensen et al., 1994).

Os principais fatores que regulam a distribuição de espécies e as variáveis abióticas em um lago são relacionados com as dinâmicas de circulação e estratificação, que são dirigidos pelos padrões sazonais e climáticos do ecossistema (Reynolds, 1976; Tilzer & Goldman, 1978; Reynolds, 1980; Reynolds, 1984; Sommer, 1993). A estratificação térmica é um fenômeno natural que ocorre nos ambientes aquáticos, causando mudanças na estrutura química e física na coluna d'água, provocando assim a formação de camadas com diferentes densidades (Jonas & Dake, 1969; Bohrer & Schultze, 2008). Os lagos estão submetidos tanto a estratificação como a processos de mistura da coluna d'água, onde a quebra da estratificação pode ser considerada com um fator de distúrbio, visto que causa instabilidade no ambiente (Reynolds, 1976; Reynolds, 1984). Em geral, lagos rasos são frequentemente submetidos a total mistura da coluna d'água, em contraste, lagos profundos estão normalmente submetidos a estratificações mais duradouras (Padisák & Reynolds, 2003). No entanto, lagos rasos também podem apresentar estratificação térmica (Fonseca & Bicudo, 2008; Rangel et al., 2009). A morfometria dos lagos bem como as dinâmicas de circulação implica na estabilidade dos lagos, consequentemente afetam a produtividade primária e composição da comunidade fitoplanctônica (Reynolds, 1976; Lopes, 2005; Winder & Hunter, 2008; Brighenti, et al., 2011).

Além da dinâmica de circulação da coluna d'água, outros fatores são importantes para o fitoplâncton, como a temperatura, a disponibilidade de luz e nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, a presença de substâncias tóxicas e as interações intraespecíficas e interespecíficas (Lewis, 1978; Harris, 1980; Litchman & Klausmeier, 2001). As espécies fitoplanctônicas respondem de maneira distinta às condições ambientais e aos distúrbios que os sistemas aquáticos estão sujeitos. Apresentam também diferentes habilidades em obter recursos, como luz e nutrientes, diferentes taxas de crescimento, sedimentação e maneiras de evitar a predação. Dessa forma, com o intuito de prever as respostas das espécies às condições ambientais e definir os grupos que usualmente coexistem em um sistema aquático, foi proposto o uso de grupos funcionais (Reynolds, 1984; Kruk et al., 2010). Reynolds e colaboradores (Reynolds, 1984; Reynolds et al., 2002) propuseram uma classificação baseada em traços morfológicos, fisiológicos e ecológicos. Contudo, Kruk e colaboradores (Kruk et al., 2010; Kruk & Segura, 2012) sugeriram uma classificação baseada em traços morfológicos, como tamanho de célula, formação de colônias, dentre outros, uma vez que estes refletem as propriedades funcionais do fitoplâncton.

Algumas espécies do fitoplâncton podem apresentar como traço funcional a produção de toxinas, que afetam a qualidade da água e podem impactar alguns organismos em níveis tróficos superiores (Paerl et al., 2001). Essa capacidade de produzir toxinas se difere entre os grupos da comunidade fitoplanctônica, sendo que, entre as espécies de água doce, as cianobactérias se destacam nesse aspecto. As cianobactérias podem causar florações tóxicas nos sistemas aquáticos como consequência do processo de eutrofização (Anderson et al., 2002; Carey, 2011; Elliott, 2011). A eutrofização causa aumento da produtividade em decorrência do aumento de nutrientes como fósforo e nitrogênio (Levich, 1996). Esse processo ocorre devido ao crescimento populacional humano desordenado, bem como ao lançamento de efluentes urbanos, industriais e agrícolas nos ambientes aquáticos. As florações de cianobactérias que ocorrem nesses ambientes podem, por sua vez, causar modificações na qualidade da água.

As cianotoxinas são produzidas via metabolismo secundário (Paerl & Millie, 1996). São usualmente classificadas em relação ao seu efeito tóxico, como, por exemplo, hepatotoxinas (microcistina, nodularina e cilindrospermopsina), dermatotoxinas (lyngbyatoxina e aplysiatoxina) e neurotoxinas (saxitoxina e anatoxina) (Kaebernick & Neilan, 2001). Como resultado da presença das toxinas, graves problemas ambientais, econômicos, de saúde humana e animal podem ocorrer em consequência dos eventos de florações tóxicas (Carmichael, 2001; Anderson, 2002; Apeldoorn et al., 2007; Chorus & Bartram, 1999).

A microcistina é a cianotoxina mais frequentemente encontrada em ambientes de água doce, sendo globalmente detectada em florações tóxicas (Chorus & Bartram, 1999). Essa cianotoxina pode ser produzida por diferentes gêneros de cianobactérias, o que inclui formas coloniais e filamentosas, como *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Planktothrix* (Chorus & Bartram, 1999; Carmichael, 2001). As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos, as quais englobam mais de 65 isoformas com diferentes toxicidades (Rinehart et al., 1994). A estrutura geral é D-alanine-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutamate-Mdha, onde X e Z são L-aminoácidos variáveis. A síntese da microcistina ocorre por meio de uma via não ribossomal a qual inclui diversas reações que são catalisadas por enzimas denominadas de sintase de policetônicos (PKS) e sintetase de peptídeos (NRPS) (Arment & Charmichael, 1996). Quanto ao efeito tóxico, a microcistina é considerada como hepatotoxina, oferecendo sérios riscos de intoxicação se consumida, sendo essa relacionada a graves problemas de saúde pública. (Carmichael, 1994, Chorus & Bartram, 1999).

A saxitoxina (STX) é considerada como uma das mais potentes cianotoxinas, sendo produzida por diversas espécies filamentosas como *Anabaena circinalis* (Al-Tebrineh et al., 2010), *Planktothrix* sp. (Pomati et al., 2000), *Lyngbya wollei* (Yin et al., 1997) e *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos et al., 1999). A saxitoxina é um alcaloide que possui uma rota complexa de biossíntese, que abrange diversas formas análogas naturais. Uma enzima multifuncional denominada PKS (policetídeo sintases) é responsável por iniciar a via de biossíntese dessa toxina (Schembri et al., 2001; Kellmann et al., 2008). Quanto ao seu potencial tóxico, a saxitoxina é capaz de impedir a propagação de impulsos nervosos devido ao bloqueio de canais de sódio, o que pode levar a paralisia neuromuscular (Wiese et al. 2010). Essa toxina é considerada como de alto risco toxicológico, podendo afetar todo um ecossistema, colocando em risco as saúdes humana e animal.

A dominância estável e permanente de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, espécie de cianobactéria potencialmente produtora de toxina, foi registrada em estudos anteriores na Lagoa Santa (Figueredo & Giani, 2009). A lagoa central de Lagoa Santa é um lago natural, pequeno e de pouca profundidade, localizado em área urbana. Foi classificado como um ambiente mesotrófico por Figueredo & Giani (2009). Este lago está inserido em um sistema cárstico que apresenta importância histórica e científica. Estudos paleontológicos, arqueológicos e espeleológicos de grande relevância foram realizados nessa região (Holten & Sterll, 2011; Neves et al., 2013; Da-Gloria et al., 2017). A Lagoa Santa também possui importância paisagística, além da área ser utilizada para lazer e prática de esportes náuticos. Entretanto, esse sistema aquático vem sofrendo degradação ambiental devido

aos processos de urbanização, como assoreamento, aporte de efluentes, introdução de espécies exóticas e eutrofização (Figueredo & Giani, 2009; Brighenti, 2009).

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska, 1912) é uma espécie de cianobactéria filamentosa pertencente à ordem Nostocales, apontada como invasora em diversos sistemas aquáticos (Padisák, 1997; Antunes et al., 2015). Essa espécie é considerada potencialmente produtora de saxitoxina (STX) e cilindrospermopsina (CYN), sendo que cada toxina é encontrada em cepas diferentes, dependendo da região em que se encontra (Hawkins et al., 1985; Lagos et al., 1999). Apresenta uma ampla distribuição geográfica, por ser capaz de se estabelecer e proliferar em diferentes condições ambientais devido a sua plasticidade fisiológica (Padisák, 1997). *C. raciborskii* possui uma grande habilidade competitiva, uma vez que consegue eficientemente dominar a comunidade fitoplanctônica (Padisák, 1997; Antunes et al., 2015). Nos sistemas aquáticos brasileiros, houve um aumento da frequência de florações causadas por *C. raciborskii* (Padisák, 1997; Bouvy, 1999; Tucci & Sant'Anna, 2003; Gemelgo et al., 2008; Figueredo & Giani, 2009; Antunes et al., 2015). O aparecimento desta espécie compromete a qualidade da água destinada ao abastecimento público e atividades de lazer, assim como pode diminuir a diversidade fitoplanctônica nestes ambientes.

Embora estudos prévios sobre a comunidade fitoplanctônica e a ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* na Lagoa Santa (Figueredo & Giani, 2009) já tenham sido realizados, não havia sido detectado nenhum fator ambiental que ajudasse a explicar a dominância dessa espécie e sua permanência na lagoa durante todo o ano. Dessa forma, no presente trabalho, o objetivo foi aprofundar o estudo desse ecossistema, a fim de verificar os fatores ambientais que governam a dinâmica da comunidade fitoplanctônica assim como os padrões de dominância e eventual formação de florações tóxicas. Ao mesmo tempo, avaliou-se se a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, que havia sido descrita como dominante na lagoa durante todo o ano, possuía potencial de produzir toxinas, o que não havia sido realizado em estudos anteriores.

Com esse intuito, abordagens morfológicas (microscopia) foram utilizadas com o objetivo de estudar a composição e diversidade do fitoplâncton e abordagens moleculares foram aplicadas para verificar a ocorrência de cepas potencialmente tóxicas na Lagoa Santa. A utilização de técnicas moleculares tem se tornado importante para detectar e monitorar espécies de cianobactérias em ecossistemas aquáticos (Pomati et al., 2000; Jungblut & Neilan, 2006; Kurmayer et al., 2009; Al-Tebrineh et al., 2010; Te et al., 2015). Por exemplo, o uso da PCR (Reação em cadeia da polimerase) convencional permite detectar a presença de cianobactérias em um sistema, assim como a presença de genes envolvidos na potencial

produção de cianotoxina. Uma vez que em estudos anteriores foi detectada na Lagoa Santa a presença de uma espécie de cianobactéria potencialmente tóxica, *Cylindrospermopsis raciborskii*, o uso da PCR permite avaliar a presença ou não de genótipos produtores de saxitoxina. A utilização dessa ferramenta torna-se, portanto, fundamental para estudar a dinâmica de populações tóxicas de *C. raciborskii* e eventualmente de outras espécies de cianobactérias nesse lago pois, como é sabido, a capacidade ou não de produzir uma toxina não é uma característica intrínseca de uma espécie, mas uma característica de cada indivíduo (Shirai et al., 1991; Kaebernick & Neilan, 2001, Pimentel & Giani, 2013). Portanto, isso quer dizer que a presença de uma espécie não implica, necessariamente, na presença de indivíduos produtores de toxinas e nem que estes indivíduos produtores estejam presentes durante todo o ano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral e hipótese

O objetivo geral desse trabalho foi realizar a caracterização limnológica, bem como investigar a dinâmica temporal do fitoplâncton em um lago raso e mesotrófico.

A hipótese principal é: a estrutura da comunidade fitoplanctônica irá mudar ao longo das estações do ano e poderá ser parcialmente explicada por fatores físico-químicos da água, influenciados pelas variações climáticas.

2.2 Objetivos específicos

1- Investigar os fatores ambientais responsáveis por mudanças na estrutura e composição da comunidade fitoplanctônica, ao longo de um gradiente temporal, na lagoa central de Lagoa Santa.

2- Avaliar espécies chaves, dentro da comunidade fitoplanctônica, pela sua dominância no período de estudo.

3- Avaliar o potencial de toxicidade das populações de cianobactérias presentes, em escala sazonal, por meio da detecção de genes ligados a produção de saxitoxina e microcistina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

A lagoa central da cidade de Lagoa Santa (19°38'S e 43°53'W), denominada como Lagoa Santa, é um sistema aquático natural localizado no estado de Minas Gerais, Brasil (Figura 1). Situado em área urbana, esse lago encontra-se na região metropolitana de Belo Horizonte, pertencendo à bacia do rio das Velhas. A região de Lagoa Santa apresenta grande importância por fazer parte de um sistema cárstico amplamente estudado e explorado no Brasil (Parizzi et al., 1998; Rosa, et al., 1995).

A Lagoa Santa apresenta área superficial correspondente a 1,7 km² e a área da bacia de drenagem é igual a 12,07m² (Brighenti, 2009). Apresenta baixa profundidade, em torno de 5 metros, na sua porção central. A região em estudo está localizada no bioma Cerrado e apresenta condições climatológicas com precipitação média anual de 1380 mm, sendo maior entre setembro e março, e temperatura média anual de 23°C (Brighenti, 2009, Figueredo, 2009). Esse sistema aquático tem apresentado processo de eutrofização decorrente da degradação ambiental (Figueredo & Giani, 2009).



Figura 1. Lagoa Santa, localizada na cidade de Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

3.2 Amostragens ambientais

As amostragens ambientais foram realizadas mensalmente, com início em novembro/2017 e término em fevereiro/2019. As coletas foram sempre realizadas na parte da manhã, entre 09:00 e 11:00. No mês de maio/2018 não foi feita a amostragem ambiental devido a problemas de logística. Para esse estudo, foi determinado um ponto amostral, na porção central da lagoa, para a coleta das amostras de água e dados físico-químicos (Figura 2).

No local de coleta, a transparência da coluna d'água foi aferida através de um disco de Secchi. A profundidade da zona eufótica (Z_{eu}) foi estimada multiplicando-se por 2,5 o valor obtido no disco de Secchi. Os perfis verticais de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica foram determinados com o uso de uma sonda multiparamétrica (Yellow Springs) a cada 0,5 metros. Para a análise de nutrientes (amônio, fósforo solúvel, nitrito, nitrato e fósforo total), foram coletadas amostras de água com uma garrafa de Van Dorn. Essas amostras foram coletadas nas profundidades de 1,0m e 3,0m do lago e armazenadas em recipientes de polietileno com volume igual a 3 litros. Em seguida, foram armazenadas em caixas térmicas com gelo, para serem transportadas para o Laboratório de Ficologia da UFMG. No laboratório, as amostras foram filtradas utilizando-se filtros de fibra de vidro (Macherey-Nagel, GF1, 0,7 μ m tamanho de poro). O volume filtrado foi anotado. Os filtros foram congelados para análises posteriores de clorofila, sólidos totais e DNA. As amostras filtradas também foram congeladas para análises de fósforo solúvel, amônio, nitrato e nitrito em freezer a -20°C. Para as análises de fósforo total, as amostras foram congeladas sem filtração prévia.

As amostras qualitativas do fitoplâncton foram obtidas através de arrastos verticais e horizontais, realizados no ponto amostral, com a utilização da rede de plâncton (20 μ m de abertura de poro). As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 50 ml. Para a análise quantitativa do fitoplâncton, as amostras de água foram coletadas por meio de uma garrafa coletora de Van Dorn, na profundidade do disco de Secchi. Essas foram armazenadas em frascos de vidro transparente de 100 ml. Em seguida, tanto as amostras quantitativas como qualitativas do fitoplâncton foram preservadas com a adição de solução de lugol acético. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Ficologia - UFMG e foram armazenadas em local escuro.

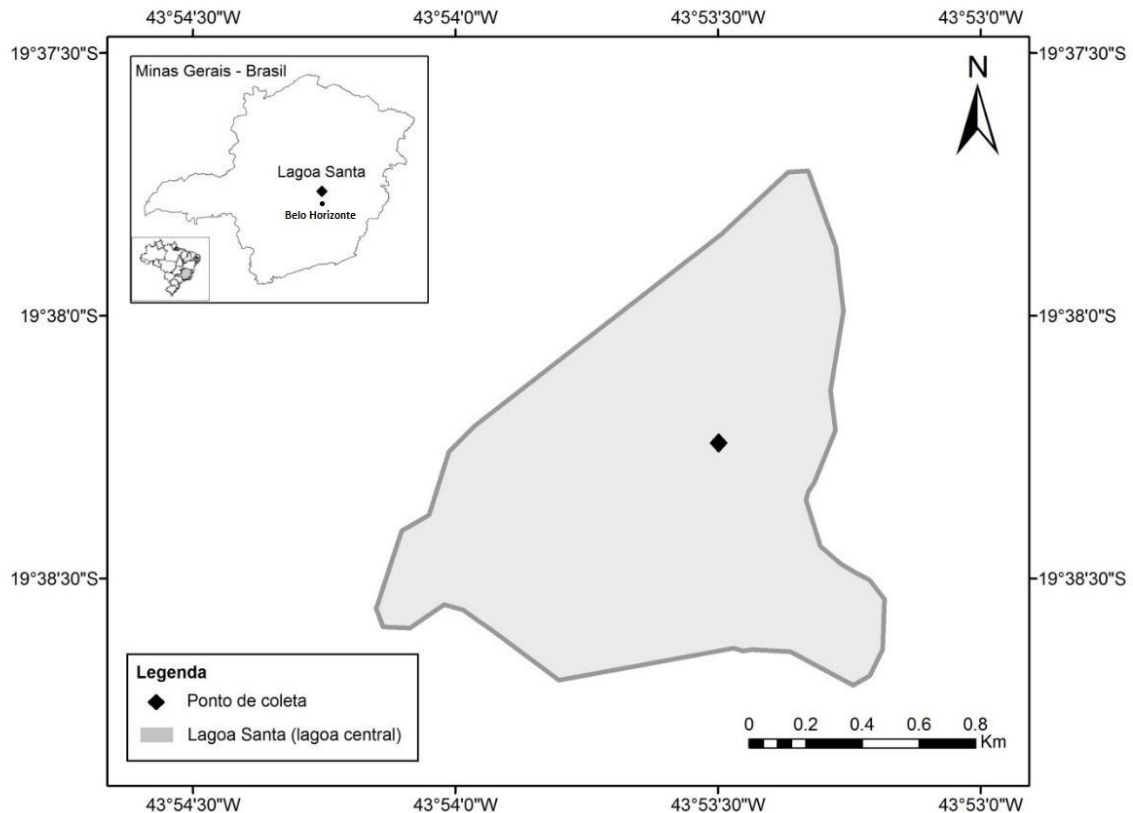


Figura 2. Ponto amostral na Lagoa Santa (lagoa central), em Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

3.3 Identificação, quantificação e biovolume da comunidade fitoplanctônica

A análise qualitativa do fitoplâncton foi realizada através da utilização de um microscópio óptico Olympus BX40. As amostras foram examinadas em lâminas, para identificação das espécies fitoplanctônicas (microalgas e cianobactérias). Foram realizadas medidas de diâmetro, comprimento e largura das células, de acordo com a espécie analisada, sendo no mínimo 20 indivíduos de cada espécie.

A análise quantitativa foi executada por meio da contagem do fitoplâncton em microscópio invertido Zeiss Axio Observer D1, no aumento de 400X, segundo o método de sedimentação de Utermöhl (1958). Nesse procedimento, as amostras foram homogeneizadas e colocadas para sedimentar por 24 horas em câmaras de sedimentação Utermöhl Hydro-Bios de 10 ml de volume. Quando necessário, em caso de muitas células que impediam a quantificação correta, as amostras foram diluídas utilizando água destilada. Durante o processo de contagem, em cada amostra, foi percorrido um transecto completo, contando assim todos os organismos presentes

em todo o diâmetro da câmara de contagem. As espécies foram contadas até alcançar o número de 100 indivíduos da espécie dominante.

O biovolume de cada espécie foi obtido usando as equações matemáticas do cálculo de formas geométricas aproximadas segundo Rott (1981) e Hillebrand et al. (1999).

3.4 Análise da diversidade da comunidade fitoplanctônica

Como objetivo de analisar a diversidade comunidade fitoplanctônica, optou-se por utilizar o índice de Shannon (Shannon & Weaver, 1949). Para o cálculo desse índice foi utilizado o biovolume do fitoplâncton. Sendo H' – índice de diversidade de Shannon, p_i – proporção entre o biovolume de cada espécie e o biovolume total do fitoplâncton encontrado na amostra e S – número total de espécies encontradas. Nesse estudo, foi utilizado logaritmo ($\log_2$). O índice de Shannon foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \log_b p_i)$$

3.5 Análise de clorofila-*a* e carotenoides

As quantificações de clorofila-*a* e carotenoides foram obtidas através de métodos colorimétricos de acordo com o método proposto por Nusch (1980). A clorofila-*a* e os carotenoides foram extraídos a partir dos filtros previamente congelados, correspondente a todo período amostral. As amostras foram provenientes da profundidade de 1,0 m da coluna d'água, com duplicatas. Em espectrofotômetro, os comprimentos de onda de 665 nm e 430 nm, foram utilizados para determinar a concentração de clorofila e carotenoides, respectivamente. Para que a turbidez fosse corrigida, leituras a 750 nm foram realizadas.

3.6 Análise de sólidos

Previamente à amostragem ambiental, os filtros foram pré-queimados em uma mufla à 350°C por 1 hora e 30 minutos. Ao esfriar, os filtros foram pesados. Após as coletas no local de estudo, as amostras foram homogeneizadas e filtradas, utilizando-se os filtros pré-queimados, através de uma bomba a vácuo, onde foram obtidas duas réplicas para cada profundidade amostrada (1,0 m e 3,0 m). Para a realização da análise de sólidos totais, os filtros

foram colocados em uma estufa à 105°C por 2 horas, e em seguida pesados. Posteriormente, foram colocados em mufla à 400°C, por 2 horas e 30 minutos, e novamente pesados.

3.7 Análise de nutrientes

As concentrações dos nutrientes foram obtidas através de métodos colorimétricos, de acordo com APHA (2005). As amostras filtradas foram utilizadas para as análises de amônio, nitrato, nitrito e fosforo solúvel, já as amostras não filtradas foram utilizadas para as análises de fósforo total. As análises de nutrientes foram feitas nas amostras provenientes das profundidades de 1,0m e 3,0m, com réplicas.

3.8 Análise de metais

As análises de metais foram realizadas com objetivo de entender os fatores responsáveis pelas mudanças abruptas observadas na estrutura da comunidade fitoplanctônica. As análises foram realizadas pelo Departamento de Química da UFMG, em um equipamento ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry), capaz de detectar metais em concentrações baixas de ppq (“part per quadrillion”). Os metais analisados foram: Manganês (Mn), Ferro (Fe), Cobre (Cu), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Zinco (Zn), Lítio (Li), Berílio (Be), Alumínio (Al), Vanádio (V), Cromo (Cr), Arsênio (As), Selênio (Se), Estrôncio (Sr), Prata (Ag), Cádmio (Cd), Antimônio (Sb), Bário (Ba), Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb) e Urânio (U). As análises de metais foram feitas em amostras provenientes da profundidade de 1,0 m da coluna d’água dos meses de fevereiro/2018, abril/2018, julho/2018, setembro /2018, novembro/2018 e janeiro/2019.

3.9 Análises moleculares

3.9.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo de Kurmayer et al. (2003), com algumas alterações. Foi extraído o DNA de todas as amostras ambientais, referentes à profundidade de 1,0 m da coluna d’água, do mês de novembro/2017 a fevereiro/2019. Neste procedimento para lise celular foi utilizado o TES (25% w/v sacarose, 50mM Tris-HCl, 100mM

EDTA), lisozima e proteinase K. Para a extração de DNA foi utilizado fenol-clorofórmio-álcool-isoamil. O DNA foi ressuspensão e limpo utilizando, respectivamente, etanol 100% e 70%. A quantificação do DNA genômico foi realizada através de um espectrofotômetro de microvolume (Thermo Fisher Nanodrop 1000). Através da razão dos comprimentos de onda 260nm e 280nm, utilizados para a quantificação de DNA e proteínas, é possível inferir a qualidade do genoma extraído. Além disso, para visualizar a qualidade do mesmo foi usada corrida em gel com 1% de agarose, corado com brometo de etídio.

3.9.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) – Análise qualitativa

Com o objetivo de detectar DNA de cianobactérias nas amostras ambientais foi utilizado o conjunto de iniciadores 356F (5' GTGGGGAATTTTCCGCAA 3'; De La Torre et al., 2003) e 1391R (GACGGGCGGTGWGTRCA; Turner et al., 1999) para a amplificação da região 16S-rRNA, DNA ribossomal, cujo o amplicon é de 890pb. Esse gene foi escolhido por ser uma região conservada e encontrado em todas as espécies de cianobactérias. Em sequência, foram realizadas as PCRs de todo o período de estudo, a partir do DNA extraído das amostras coletadas a 1,0 m de profundidade. As reações de PCR, foram preparadas a fim de obter um volume final de 20µL. Sendo assim, foram utilizadas as seguintes concentrações de cada reagente: 2 µL de Buffer I0 (Phoneutria), 1,2 µL de BSA (4mg/mL), 0,4 µL de dNTP (10mM), 0,1 µL de Taq polimerase 2,5U (Phoneutria), 0,5 do primer 356F (10pmol) e 0,5 do primer 1391R (10pmol) e 1 µL de DNA genômico diluído (10ng/ µL). Para a amplificação foi utilizado o termociclador My Cyciler (Biorad) em determinadas etapas: desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, em 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão).

Uma vez identificada a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* nas análises microscópicas, espécie essa considerada potencialmente produtora de saxitoxina na literatura, optou-se por verificar a presença dos genótipos produtores dessa toxina. Para isso, utilizou-se iniciadores para a detecção do gene *stxA*, ao qual codifica uma enzima multifuncional que inicia a síntese de saxitoxina (STX). Dessa forma, utilizou-se os primers específicos, sendo esses o sxtA4F (5'GATGACGGAGTATTTGAAGC 3'; Al-Tebrineh et al., 2010) e o sxtA4R (5' CTGCATCTTCTGGACGGTAA 3'; Al-Tebrineh et al., 2010), para a amplificação do gene *stxA*, cujo amplicon é de 285pb. Em cada reação de PCR foi utilizada um volume final de 20 (µL), contendo 1 µL Buffer IC (Phoneutria), 1,2 µL de BSA (4mg/mL), 1 µL de MgCl₂ (2mM), 0,4 µL de dNTP (10mM), 0,2 µL de Taq polimerase 2,5U (Phoneutria), 0,5 µL do primer

sxtA4F (10pmol), 0,5 µL do primer sxtA4R (10pmol), e DNA genômico diluído (10ng/µL). As etapas de amplificação no termociclador foram: desnaturação inicial à 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 2 minutos (extensão).

Espécies do gênero *Microcystis* também foram detectadas nas análises microscópicas, como é considerada potencialmente produtora de microcistina na literatura, também optou por verificar a presença dos genótipos produtores dessa toxina. Iniciadores foram utilizados para a detecção do gene *mycD*, ao qual está relacionado com a produção de microcistina. Dessa forma, utilizou-se primers específicos, sendo esses o c-mcyDF (5' GGAGAATGAAAAGCATGAGATAC 3', Pimentel & Giani, 2013) e o q-mcyDR (5' TATTCCCCAAGATTGCCATAATTT 3', Pimentel & Giani, 2013), para a amplificação do gene *mycD*, cujo o amplicon é de 370pb. Em cada reação de PCR foi utilizada um volume final de 20 (µL), contendo 2 µL de Buffer IC (Phoneutria), 1,2 µL de BSA (4mg/mL), 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL de Taq polimerase 2,5 U (Phoneutria), 0,5 µL do primer c-mcyDF (10pmol), 0,5 µL do primer q-mcyDR (10 pmol), e 1 µL DNA genômico diluído (10ng/µL). As etapas de amplificação no termociclador foram: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 61°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão).

Após a realização das PCRs, os tamanhos dos produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio, por meio da comparação com um marcador de massa molecular de 100pb (DNA Ladder).

3.10 Análises estatísticas

Com o objetivo de identificar a influência de variáveis ambientais sobre as variáveis bióticas, a fim de verificar a distribuição das espécies da comunidade fitoplanctônica num gradiente temporal, optou-se por utilizar análise de redundância (RDA). A normalidade dos dados bióticos e abióticos foram previamente avaliados com o Shapiro-wilk test. Ambos os dados foram transformados em logarítimo decimal ($\log_{10}$). Foi considerado, como base para as conclusões, o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A verificação da normalidade dos dados e a RDA foram realizados utilizando o programa R *software*, onde utilizou-se o pacote Vegan (R Development Core Team, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Fatores climáticos, físicos e químicos

A variação sazonal das médias de temperatura do ar bem como da precipitação mensal acumulada, referentes ao período de estudo, mostraram uma divisão clara entre estação chuvosa (novembro/2017 a março/2018; outubro/2018 a fevereiro/2019) e seca (abril/2018 a setembro/2018) (Figura 3). As condições foram esperadas para região, uma vez que essa apresenta verões quentes e chuvosos e invernos secos com temperaturas mais baixas. A temperatura média do ar apresentou o valor mínimo de 20,2°C (julho/2018) e máximo de 25,4°C (janeiro/2019). A precipitação mensal acumulada apresentou variação entre valores mínimos de 0 mm (junho e julho/2018) e máximos de 223 mm (fevereiro/2019).

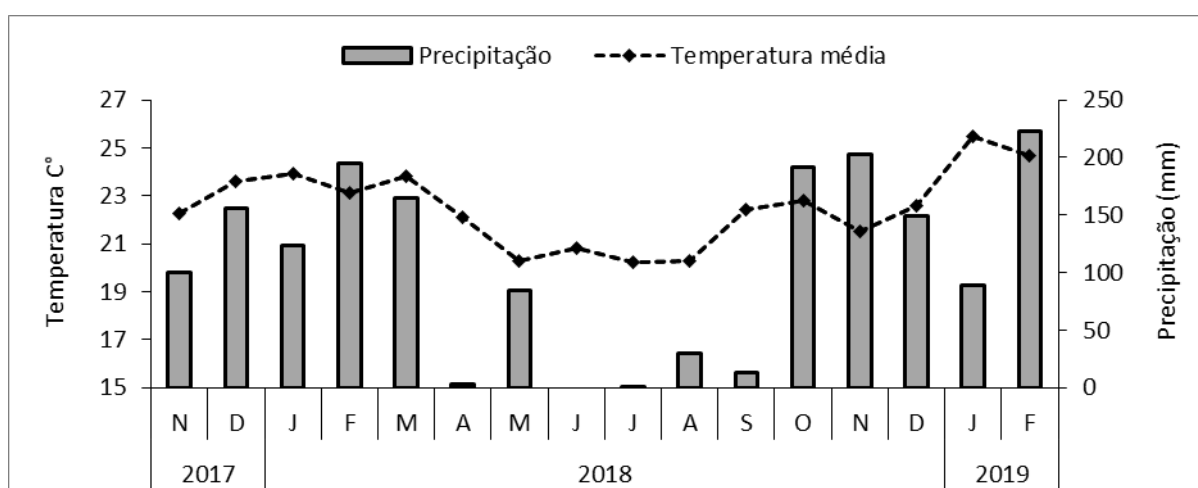


Figura 3. Médias mensais da temperatura do ar (°C) e precipitação acumulada mensal (mm) durante o período de estudo em Lagoa Santa. Os dados foram obtidos através do Instituto de Controle do Espaço Aéreo (ICEA).

Os perfis verticais da variação sazonal da temperatura da água e de oxigênio dissolvido, referentes ao período de estudo, estão apresentados na figura 4. O perfil vertical da temperatura da água (Figura 4a) mostrou períodos de estratificação entre novembro/2017 a março/2018 e novamente entre outubro/2018 a fevereiro/2019. Nesses períodos a temperatura da água variou verticalmente entre 29,5°C e 25,0°C. Observa-se que os períodos de estratificação ocorreram principalmente entre o início e o fim da estação chuvosa. No entanto, entre os meses de abril/2018 e setembro/2018 houve isoterмия, evidenciando um período de desestratificação e mistura da coluna d'água. Nesse período a temperatura da água apresentou valores mais baixos, com máximo de 23,0°C (abril/2018) e mínimo de 20,5°C (julho/2018).

O perfil vertical do oxigênio dissolvido (Figura 4b) mostrou uma tendência similar ao da temperatura da água, com estratificação durante a estação mais quente e chuvosa, e maior uniformidade na estação seca. Durante o período de desestratificação é possível observar oxigenação de toda a coluna d'água (entre 8,5 mg/L na superfície e 6,0mg/L no fundo). Entretanto, durante período de estratificação, há uma diminuição progressiva concentração do oxigênio, apresentando valores muito baixos no fundo, cuja profundidade máxima foi de 5,0m.

Portanto, é possível constatar que houve estratificação térmica e estratificação química referente ao oxigênio dissolvido, durante a estação chuvosa e mistura total da coluna d'água na estação seca.

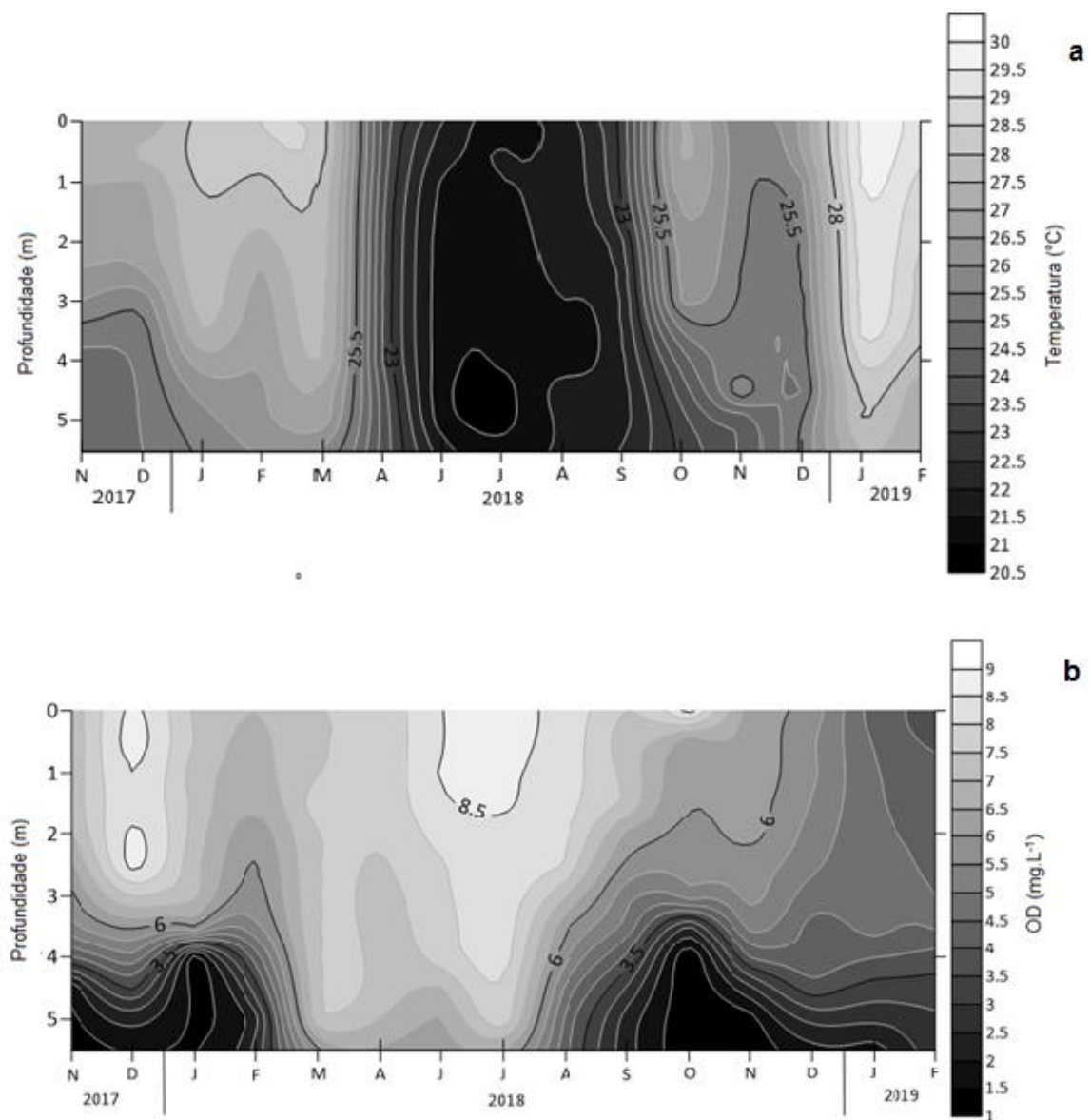


Figura 4. Perfil vertical da variação sazonal da (a) temperatura da água (°C) e (b) oxigênio dissolvido (mg/L) da Lagoa Santa ao longo do período estudado.

A medida da zona eufótica da Lagoa Santa variou ao longo do período de estudo, apresentando máxima de 3,5 metros em novembro/2017 e mínima de 1,3 metros nos meses de outubro e novembro/2018 (Figura 5). Houve uma diminuição da zona eufótica entre março/2017 a dezembro/ 2018, apresentando os menores valores entre agosto/2018 e novembro/2018.

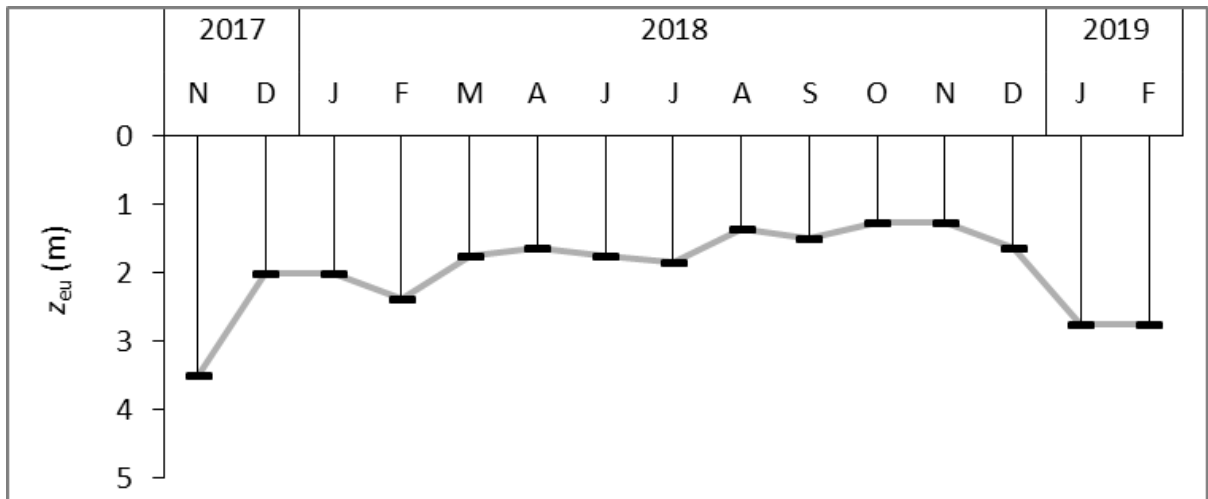


Figura 5. Medida da zona eufótica (Z_{eu}) da Lagoa Santa durante o período amostrado.

As variáveis condutividade elétrica e pH não apresentaram tendência sazonal (Figura 6 e 7). Entretanto, houve um pequeno aumento da condutividade elétrica a partir do mês de junho, com um pico no mês de dezembro ($299 \mu\text{S}/\text{cm}$) (Figura 6). Durante os outros meses, a condutividade elétrica oscilou entre $164 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (fevereiro/2018) e $212 \mu\text{S}/\text{cm}$ (outubro/2018). Em relação ao pH (Figura 7), houve uma oscilação entre $\text{pH}=6,82$ e $\text{pH}=9,3$. Houve um leve aumento a partir de dezembro/2018, onde foi registrado o valor máximo ($\text{pH}=9,3$), até fevereiro/2019.

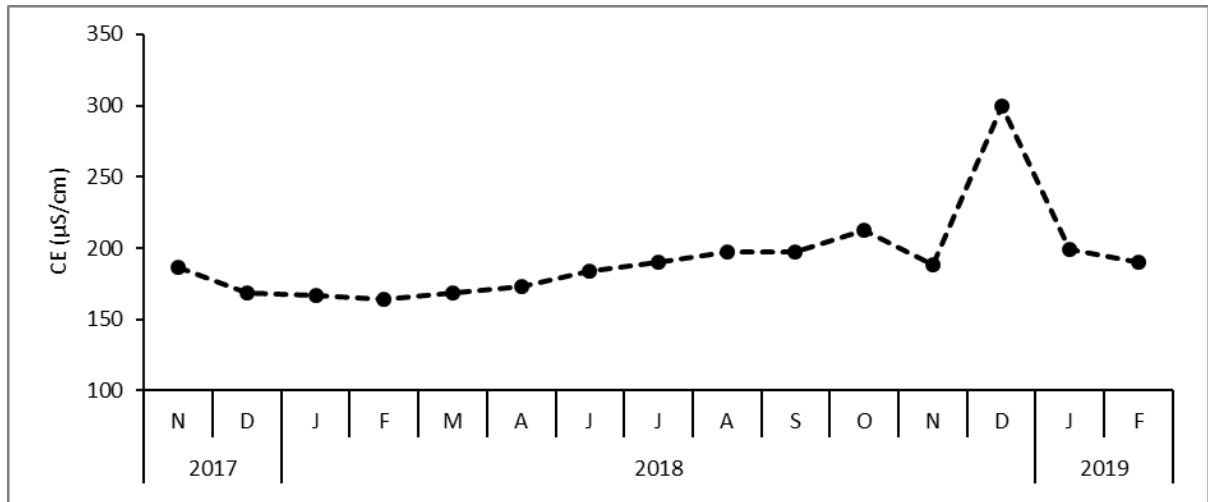


Figura 6. Variação da condutividade elétrica durante o período de estudo.

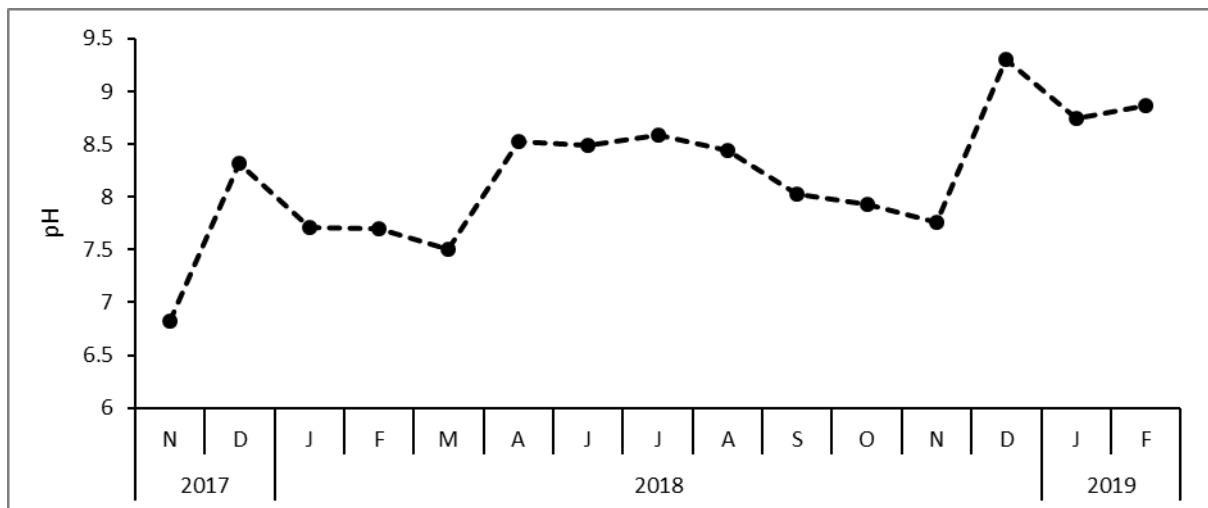


Figura 7. Variação da pH durante o período de estudo.

Os resultados das análises de sólidos em suspensão, mostraram uma maior concentração da fração inorgânica em relação a fração orgânica durante todo o período amostral, para a profundidade de 1,0 m (Figura 8a) e 3,0m (Figura 8b). No entanto, não foi possível observar um padrão sazonal. Em ambas as profundidades analisadas (1,0 m e 3,0 m), a concentração da fração orgânica foi maior durante os meses de novembro/2017 a janeiro/2018 e março/2018, que corresponde ao primeiro período chuvoso. Contudo, esse padrão não se repete no segundo período chuvoso analisado (2018-2019), nas amostras de superfície. Durante os outros meses, os valores da fração orgânica de sólidos totais foram muito baixos para a profundidade de 1,0 m. A profundidade de 3,0 m, correspondente ao fundo, também apresentou valores baixos para a fração orgânica, embora um pouco mais elevados nos meses chuvosos. A concentração da fração inorgânica apresentou concentrações que variaram ao longo das amostragens, com

maiores valores encontrados no início dos períodos chuvosos (outubro-novembro), assim como nos meses de inverno (junho-julho), que correspondem aos de mistura da coluna d'água.

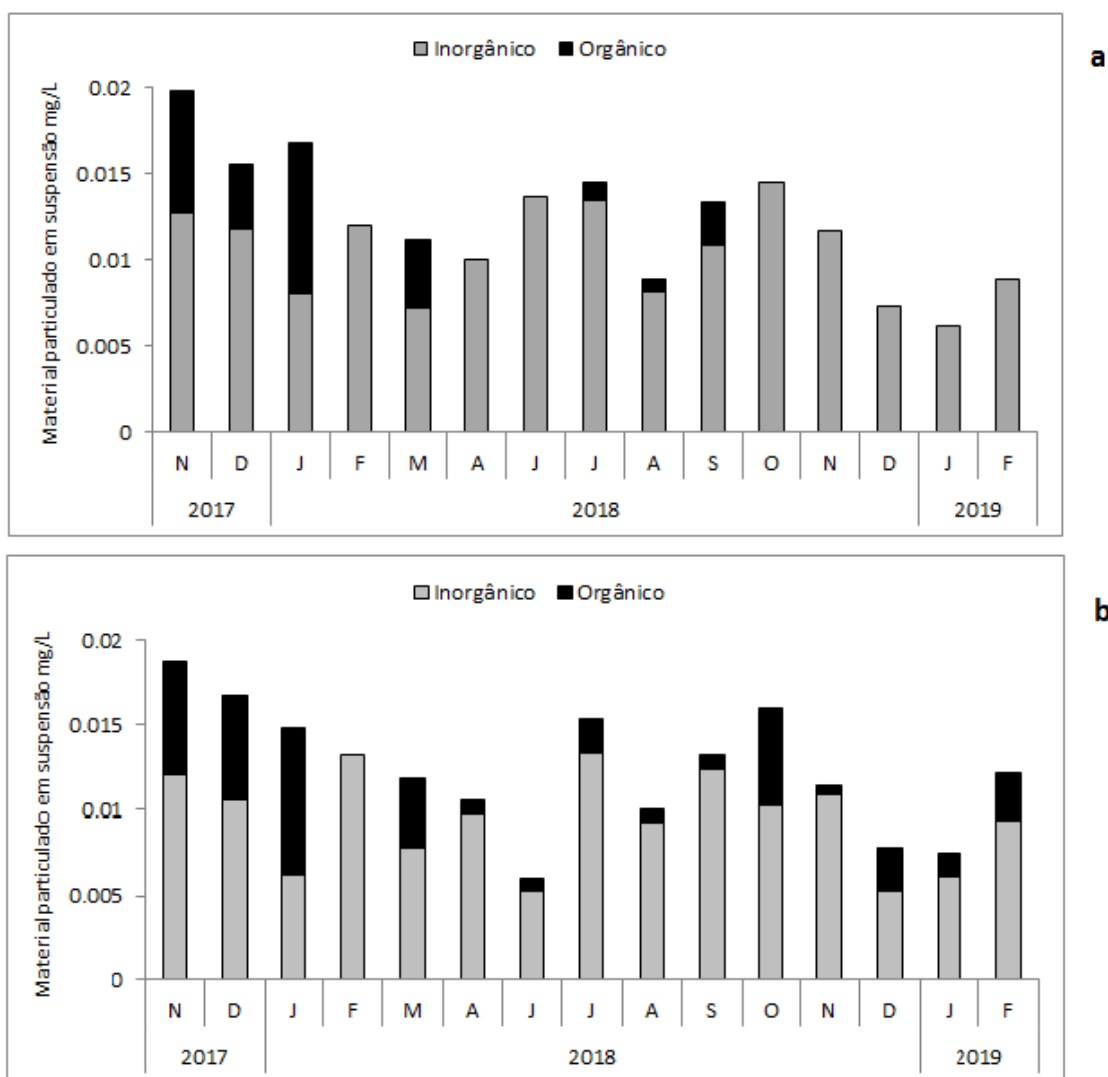


Figura 8. Variação de sólidos suspensos totais, referentes à fração inorgânica (mg/L) e orgânica (m) na profundidade de 1,0 m (a) e 3,0 m (b) da coluna d'água, na Lagoa Santa durante o período amostrado.

4.2 Nutrientes

As concentrações de fósforo solúvel (PO_4^-) e fósforo total (PT) para as profundidades de 1,0 m e 3,0 m, relativas a todo o período amostral, estão apresentados nas Figuras 9 e 10. As concentrações mínimas e máximas de PO_4^- foram 1,1 $\mu\text{g/L}$ – 8,5 $\mu\text{g/L}$ (1,0 m) e 2,8 $\mu\text{g/L}$ – 11,9 μg (3,0 m), respectivamente (Figura 9). Os valores para essa variável foram maiores para ambas as profundidades entre os meses de novembro/2017 a janeiro/2018 e em janeiro/2019 e fevereiro/2019, que correspondem ao período de chuva. As concentrações mínimas e máximas

de PT foram $17,8 \mu\text{g/L}$ – $33,0 \mu\text{g/L}$ (1,0 m) e $19,6 \mu\text{g/L}$ – $48,2 \mu\text{g/L}$ (3,0 m), respectivamente (Figura 10). As concentrações de PT mostraram maiores valores no período de seca. Em geral, não houve grande variação para PT entre as duas profundidades ao longo do estudo. Entretanto, é possível observar dois picos da concentração de PT em junho/2018 e setembro/2018 a 3,0 m, no período de seca.

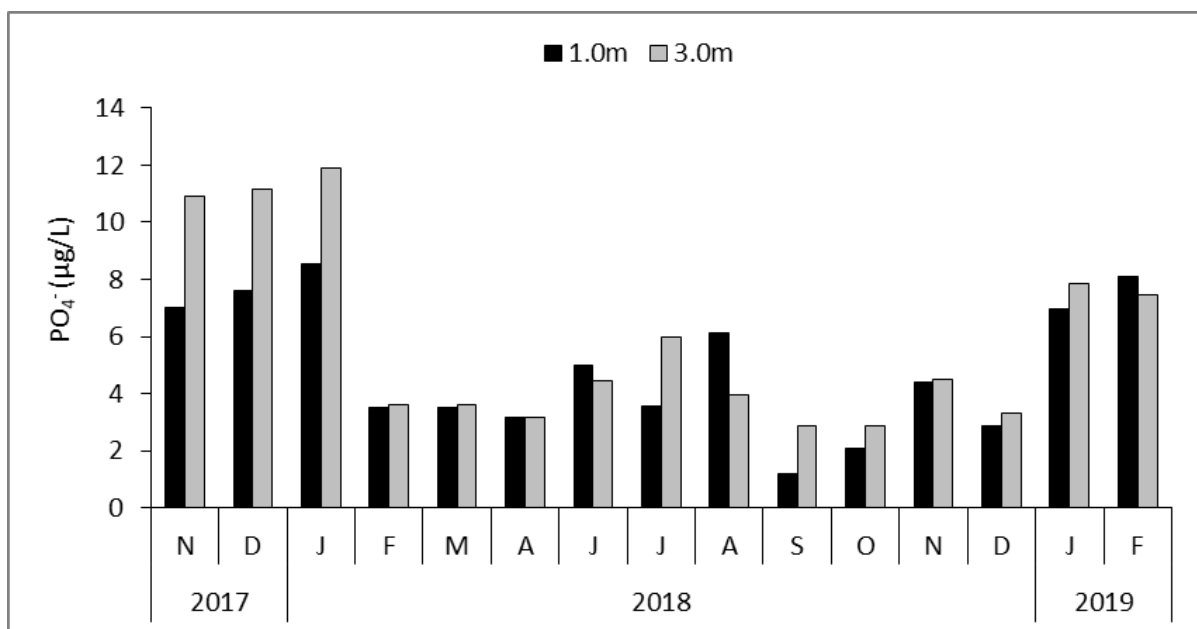


Figura 9. Variação da concentração de Fósforo solúvel (PO_4^{3-}) durante o período de estudo, referente às profundidades de 1,0 m e 3,0 m da coluna d'água.

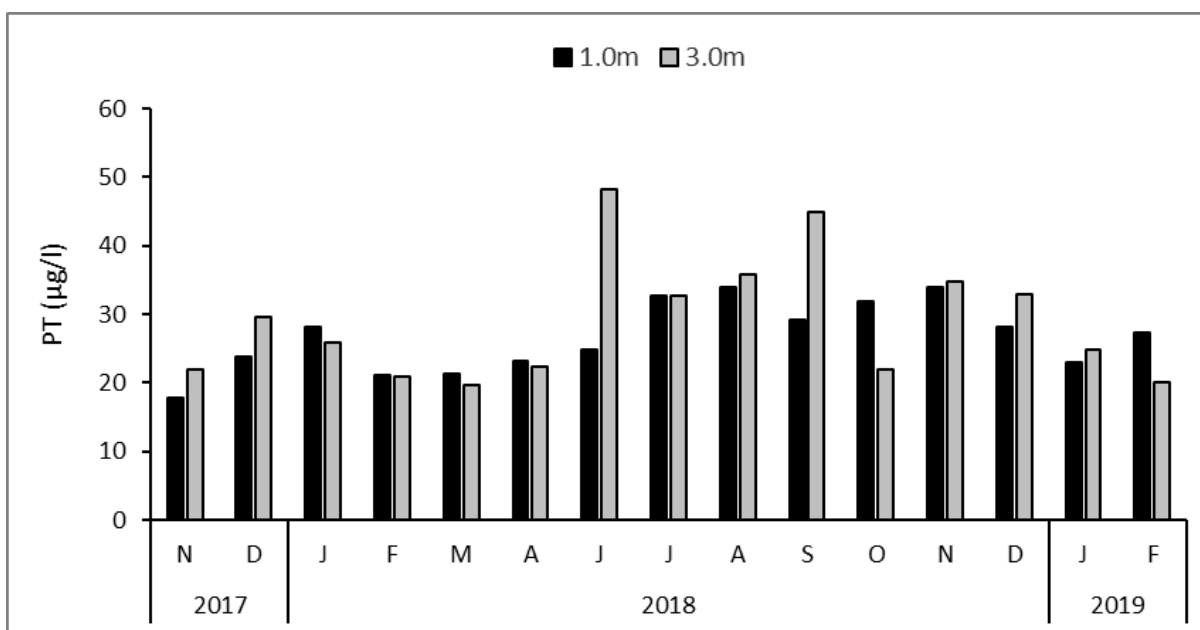


Figura 10. Variação da concentração de Fósforo total (PT) durante o período de estudo, referente às profundidades de 1,0 m e 3,0 m da coluna d'água.

As fontes de nitrogênio analisados durante o período de estudo para a Lagoa Santa, para as profundidades de 1,0 m e 3,0 m, estão apresentados na Figura 11 a e b. As concentrações mínimas e máximas para amônio (NH_4^+) foram 0 $\mu\text{g/L}$ – 41,2 $\mu\text{g/L}$ (1,0 m) e 0 $\mu\text{g/L}$ – 48,5 $\mu\text{g/L}$ (3,0m). Para nitrato (NO_3^-) as concentrações mínimas e máximas foram 0 $\mu\text{g/L}$ – 37,2 (1,0 m) $\mu\text{g/L}$ e 0 $\mu\text{g/L}$ - 31,6 $\mu\text{g/L}$ (3,0 m). As concentrações de nitrito (NO_2^-) foram muito baixas durante toda à amostragem, contribuindo pouco para o aporte de nitrogênio dissolvido na coluna d'água. A variável NH_4^+ apresentou um padrão sazonal, apresentando as maiores concentrações durante o período chuvoso, entretanto houve um pico no período de seca, em junho/2018 (3,0m). De modo similar, a variável NO_3^- apresentou um padrão sazonal, uma vez que as maiores concentrações foram também encontradas no período chuvoso. As concentrações tanto de NH_4^+ como de NO_3^- foram superiores no segundo período chuvoso amostrado (2018/2019), para ambas as profundidades. Ao analisar as fontes de nitrogênio como um todo, pode-se observar uma maior concentração desses nutrientes no período de chuva.

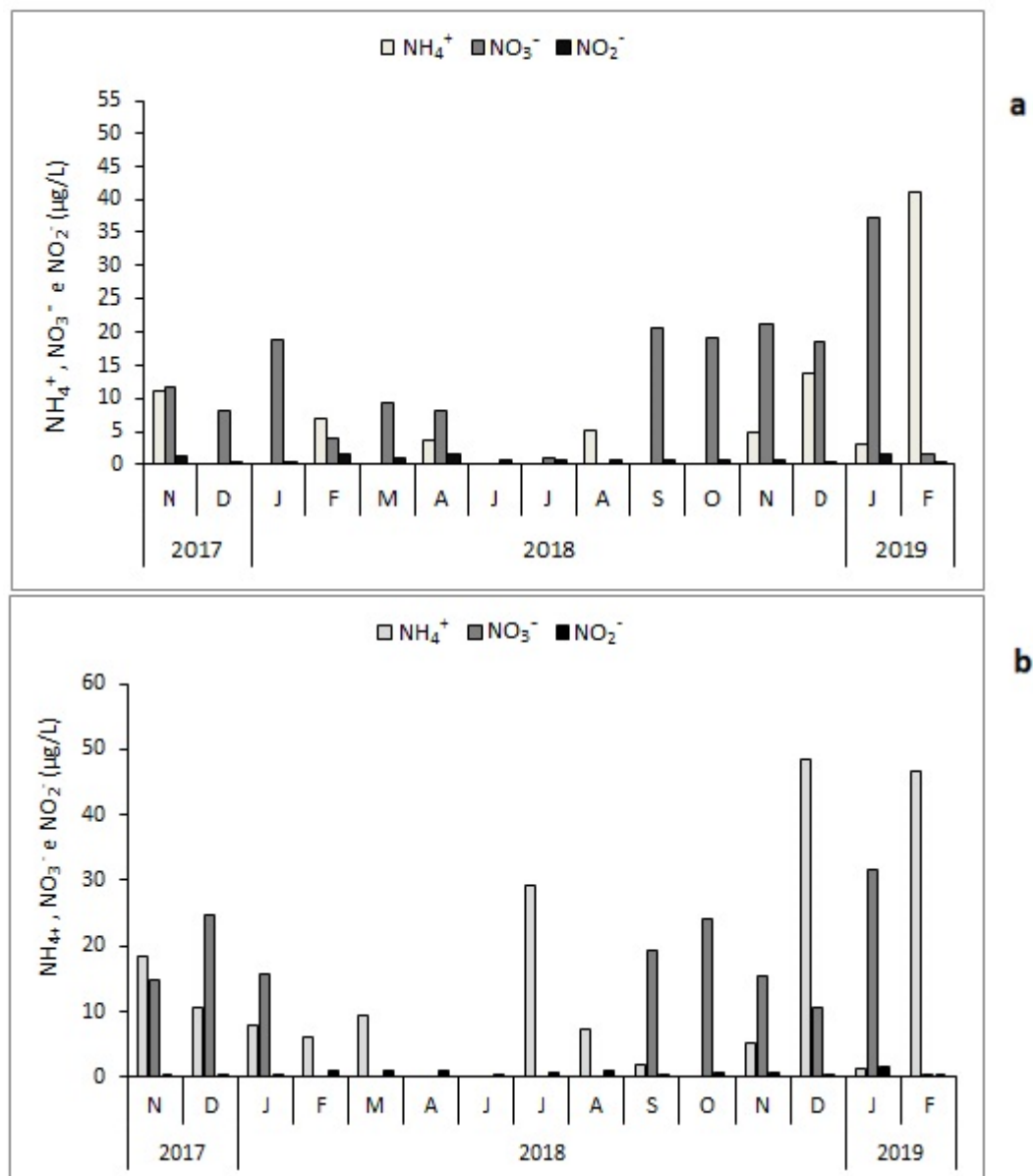


Figura 11. Variação da concentração de Amônio (NH_4), Nitrato (NO_3) e Nitrito (NO_2) durante o período de estudo, referente às profundidades de 1,0 m (a) e 3,0 m (b) da coluna d'água.

4.3 Metais

Os resultados referentes às concentrações de metais na Lagoa Santa estão apresentados na Tabela 1. Essa análise foi realizada com o intuito de explicar a mudança súbita da comunidade fitoplanctônica observada a partir do mês de julho/2018. A concentração de metais não mostrou grande alteração entre os períodos de coleta. Dentre os metais analisados, os que são mais importantes para o fitoplâncton, são o Manganês, Ferro, Cobre, Níquel e Zinco. Esses metais apresentaram baixa concentração nos meses analisados, mostrando pouca variação entre os períodos.

Tabela 1. Concentração de metais ($\mu\text{g/L}$) encontrados na Lagoa Santa durante o período de estudo.

Metais ($\mu\text{g/L}$)	FEV (2018)	ABR (2018)	JUL (2018)	SET (2018)	NOV (2018)	JAN (2019)
Lítio (Li)	0.31	0.18	0.15	0.00	0.00	0.15
Berílio (Be)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Alumínio (Al)	17.30	9.94	15.09	12.90	11.88	4.20
Vanádio (V)	0.67	0.66	0.73	0.83	0.73	0.79
Cromo (Cr)	0.44	0.35	0.34	0.39	0.44	0.47
Manganês (Mn)	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.29
Ferro (Fe)	7.52	3.43	5.78	3.15	1.46	1.96
Cobalto (Co)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Níquel (Ni)	0.66	0.26	0.00	0.00	0.11	0.34
Cobre (Cu)	1.72	1.13	0.90	0.45	0.53	1.08
Zinco (Zn)	4.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Arsênio (As)	1.80	1.45	1.50	1.41	1.37	1.57
Selênio (Se)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Estrôncio (Sr)	258.96	204.42	210.39	240.71	277.38	267.40
Prata (Ag)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cádmio (Cd)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Antimônio (Sb)	232.69	239.20	203.74	229.79	231.96	209.89
Bário (Ba)	10.92	15.19	9.72	9.61	14.51	9.90
Mércurio (Hg)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Chumbo (Pb)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Urânio (U)	0.14	0.11	0.14	0.15	0.16	0.12

4.4 Variáveis biológicas

4.4.1 Clorofila *a* e carotenoides

As concentrações de clorofila-*a* e carotenoides na Lagoa Santa estão apresentadas na Figura 12. A clorofila-*a* apresentou valor mínimo de (5,6 µg/L) na estação chuvosa (2018/2019) e valor máximo (23,6 µg/L) durante a estação seca, apresentando padrões sazonais ao longo do período de estudo. A concentração de carotenoides mostrou um aumento a partir de junho/2018, com valor máximo de 61,3 µg/L em novembro/2018. O valor mínimo da concentração de carotenoides foi encontrado no mês de novembro/ 2017, sendo igual a 0,8 µg/L. Ao contrário da concentração de clorofila-*a*, a concentração de carotenoides não apresentou uma tendência sazonal, uma vez que os maiores valores dessa variável ocorreram durante a estação seca e no início da segunda estação chuvosa (entre 2018 e 2019) do período de estudo. Durante as amostragens em campo, foi observada uma forte alteração da coloração da água entre o mês de agosto e o mês de dezembro. A coluna d'água apresentou a tonalidade amarelo-alaranjada durante esse período, fato nunca antes relatado sobre a Lagoa Santa (com. pess.). A partir do mês de janeiro/2019, a tonalidade da água voltou a apresentar coloração normal. Esse período de aumento de carotenoides coincidiu com uma mudança nas espécies dominantes na comunidade fitoplanctônica (Figura 13).

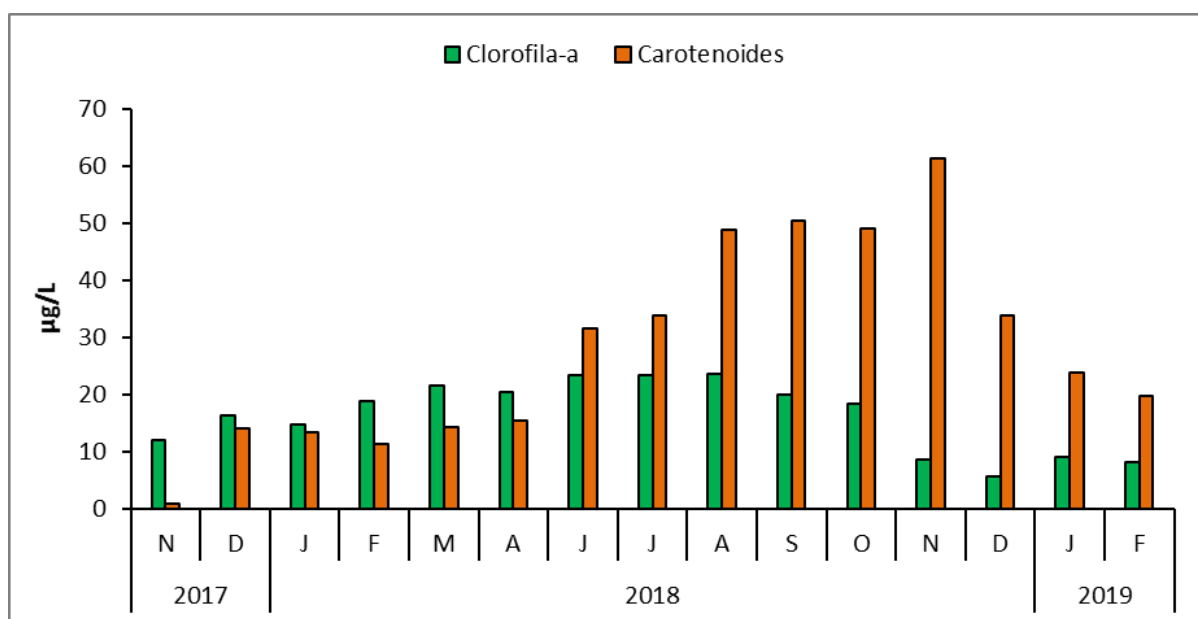


Figura 12. Variação sazonal da concentração de clorofila-*a* (µg/L) e carotenoides (µg/L) na Lagoa Santa a partir de amostras coletadas a 1,0 m de profundidade da coluna d'água, durante o período de amostragem.

4.4.2 Comunidade fitoplanctônica

Foram encontradas 36 espécies na comunidade fitoplanctônica, pertencentes aos filos Cyanobacteria, Chlorophyta, Chryptophyta, Bacillariophyta, Dinophyta, Euglenophyta e Ochrophyta. A contribuição dos principais grupos fitoplanctônicos de acordo com os respectivos biovolumes e a concentração da clorofila-*a* estão apresentados na Figura 13. A comunidade fitoplanctônica encontrada na Lagoa Santa variou ao longo do período amostral, apresentando biovolume mínimo de 5,46 mm³/L (novembro/2017) e máximo de 51,92 mm³/L (julho/2018). O biovolume total do fitoplâncton variou apresentando padrões sazonais, onde foi encontrado baixo biovolume nos períodos chuvosos amostrados e um grande aumento no período de seca. O biovolume total apresentou um pico no mês de julho/2018. A clorofila-*a* também mostrou uma tendência similar, uma vez que houve um aumento dessa variável no período de seca. As cianobactérias e as clorófitas foram os grupos mais abundantes encontrados na Lagoa Santa, os outros grupos contribuíram pouco para o biovolume total durante o estudo.

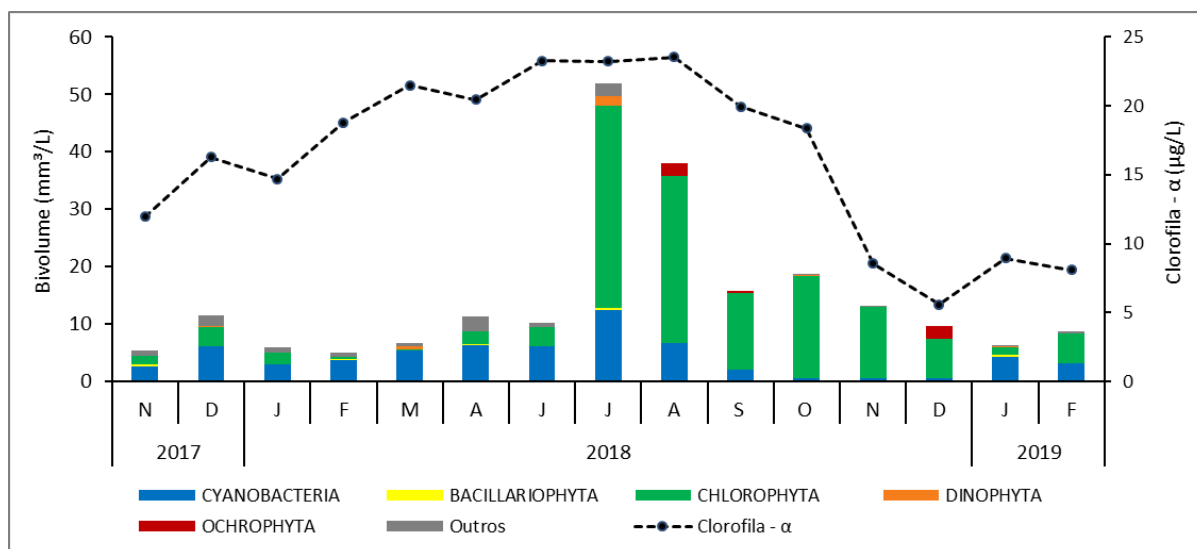


Figura 13. Eixo I: Biovolume dos principais grupos fitoplanctônicos (mm³/L) encontrados na Lagoa Santa ao longo do período de estudo. Eixo II: Concentração de Clorofila-a (µg/L) relativa ao mesmo local e período de estudo, linha tracejada.

A abundância relativa dos principais grupos fitoplanctônicos, calculada com base nos valores de biovolume (Figura 14), apresentou uma alternância do grupo dominante, entre o filo Cyanobacteria e microalgas pertencentes ao filo Chlorophyta. Entre os meses de novembro/2017 a junho/2018 e em janeiro/2019 foi observada a dominância de cianobactérias. No entanto, entre julho/2018 a dezembro/2018 e fevereiro/2019, foi observada a dominância

do filo Chlorophyta. Ao analisar os períodos de dominância verificou-se que as cianobactérias contribuíram com 59% do biovolume e clorófitas contribuíram com 24 % do biovolume no primeiro período (novembro/2017 a junho/2018) e no segundo período as cianobactérias contribuíram com 14% e as clorófitas com 77% (julho a dezembro/2018). Em janeiro/2019, as cianobactérias dominaram novamente, representando 67% do total nesse mês. Em fevereiro/2019 foi observada uma maior contribuição de clorófitas, representando 59% do total nesse mês. Os filos Bacillariophyta, Dinophyta e Ochrophyta apresentaram baixa abundância relativa.

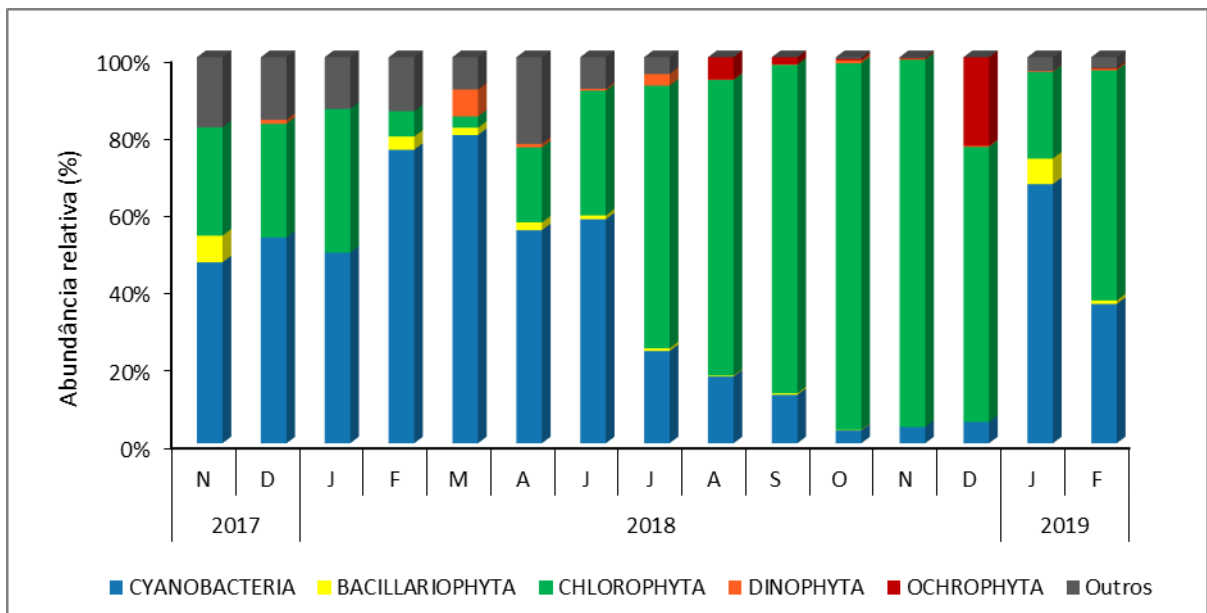


Figura 14. Abundância relativa, baseada no biovolume, dos principais grupos fitoplanctônicos encontrados na Lagoa Santa, ao longo do período de estudo.

Dentre as cianobactérias, as espécies filamentosas pertencentes às ordens Nostocales e Oscillatoriales, foram as mais representativas na Lagoa Santa (Figura 14). As principais espécies foram *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Limnothrix* sp., *Pseudoanabaena galeata*, *Planktolyngbya brevicelulares* e *Planktolyngbya limnetica*, sendo essas encontradas durante todo o período de estudo. A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi a mais abundante dentre as filamentosas entre novembro/2017 e outubro/2018. Essa espécie correspondeu a 44% do biovolume das espécies filamentosas. As espécies *Planktolyngbya brevicelularis* e *Planktolyngbya limnetica* também apresentaram importante contribuição no biovolume das espécies filamentosas, correspondendo a 18% e 23%, respectivamente. A contribuição das espécies filamentosas não apresentou um padrão sazonal, uma vez que os maiores biovolumes foram encontrados no primeiro período chuvoso (entre 2017 e 2018) e durante o início da

estação seca. No mês de julho/2018 foi observado um aumento do biovolume das espécies filamentosas, principalmente *C. raciborskii*. As espécies filamentosas tiveram importante contribuição no biovolume total nesses períodos. No entanto a partir de agosto/2018, houve uma diminuição do biovolume dessas espécies.

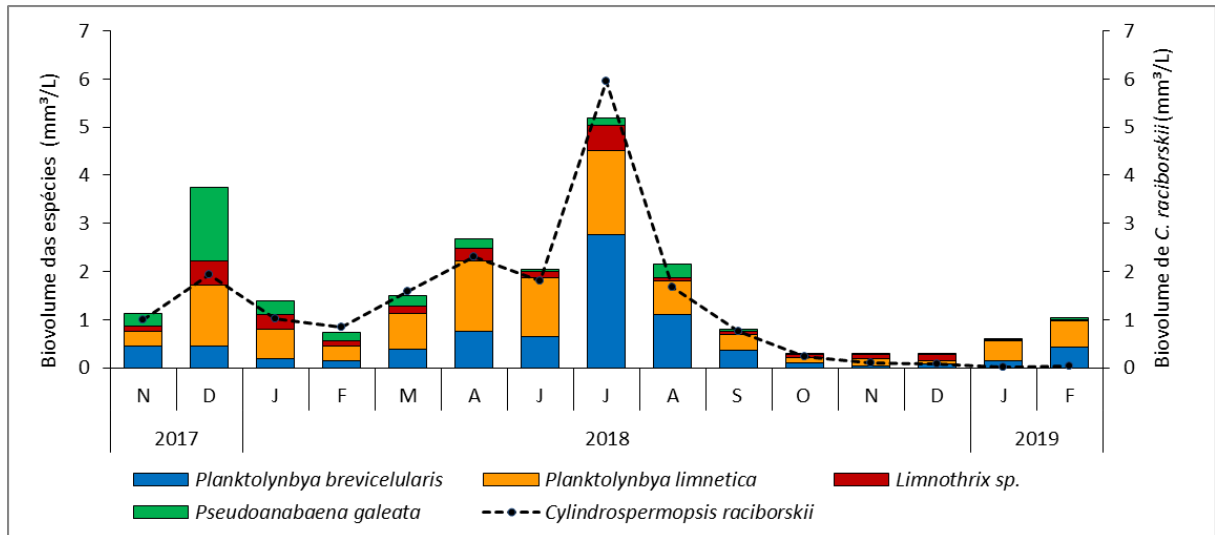


Figura 15. Eixo I: Biovolume das espécies *Planktolyngbya brevicularis*, *Planktolyngbya limnetica*, *Limnothrix* sp. e *Pseudoanabaena galeata* (mm³/L). Eixo 2: Biovolume de *Cylindrospermopsis raciborskii* (linha tracejada), na Lagoa Santa durante o período de estudo.

As espécies de cianobactérias pertencentes à ordem Chroococcales encontradas na Lagoa Santa foram *Microcystis aeruginosa*, *M. brasiliensis* e *M. protocystis* (Figura 16). Além disso, células isoladas de *Microcystis* sp. foram identificadas durante todo o período de amostragem, contribuindo para o biovolume total. A espécie *M. aeruginosa*, foi encontrada com maior frequência que as outras espécies, ocorrendo tanto no período de seca como no período chuvoso. A espécie *M. protocystis* foi registrada no período de seca, apenas nos meses de agosto/2018 e setembro/2018. A ocorrência de *M. brasiliensis* foi registrada apenas no mês de fevereiro/2019. Foi verificada uma queda do biovolume de Chroococcales entre setembro/2018 e dezembro/2018, seguido de um pico no mês de janeiro/2019.

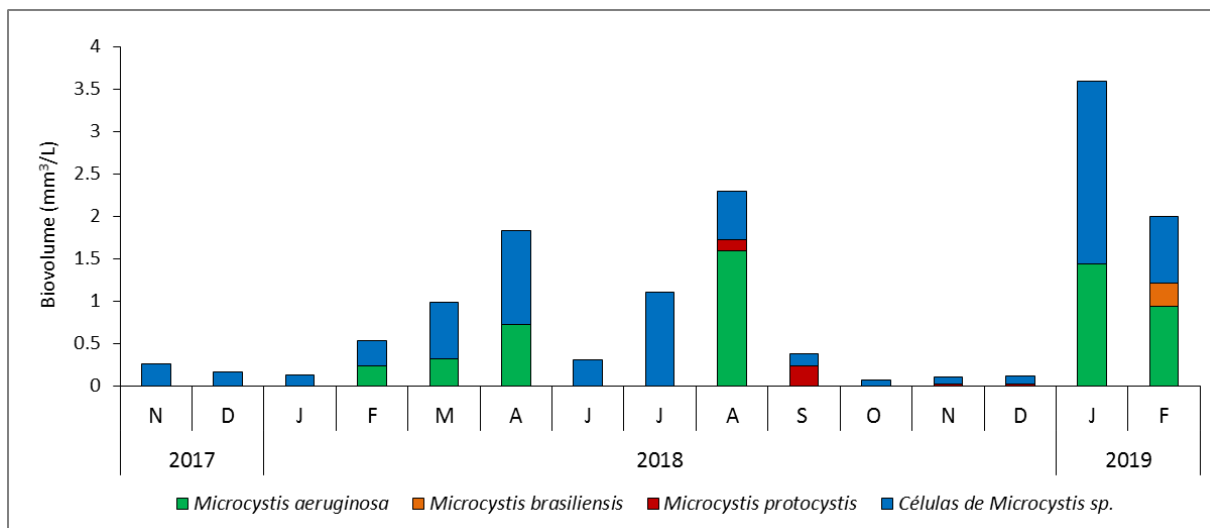


Figura 16. Biovolume das espécies de *Microcystis sp.* (mm³/L) e de células isoladas de *Microcystis sp.* encontradas na Lagoa Santa.

As espécies do filo Chlorophyta mais abundantes na Lagoa Santa foram *Monoraphidium contortum*, *Coelastrum reticulatum*, *Chorella vulgaris*, *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus acuminatus*, *Chlamydomonas sp.*, *Tetradon minimum* e *Oocystis lacustres* (Figura 17). A espécie *Monoraphidium contortum* foi a que mais contribuiu para o biovolume total, entre os meses de junho/2018 a dezembro/2018. Dessa forma, essa espécie foi a principal responsável pela dominância do filo Chlorophyta nesse período do estudo. Durante a dominância de *M. contortum*, entre agosto/2018 a outubro/2019, ocorreu também um intenso crescimento de *Botryococcus braunii* na Lagoa Santa. A expressiva ocorrência de colônias de *B. braunii*, observada nas amostras qualitativas e visualmente na lagoa, não foi evidenciada de forma tão clara nas amostras quantitativas. A espécie *Coelastrum reticulatum* também apresentou importante contribuição para o biovolume, principalmente em alguns meses da estação chuvosa (dezembro/2017-janeiro/2018 e janeiro e fevereiro/2019).

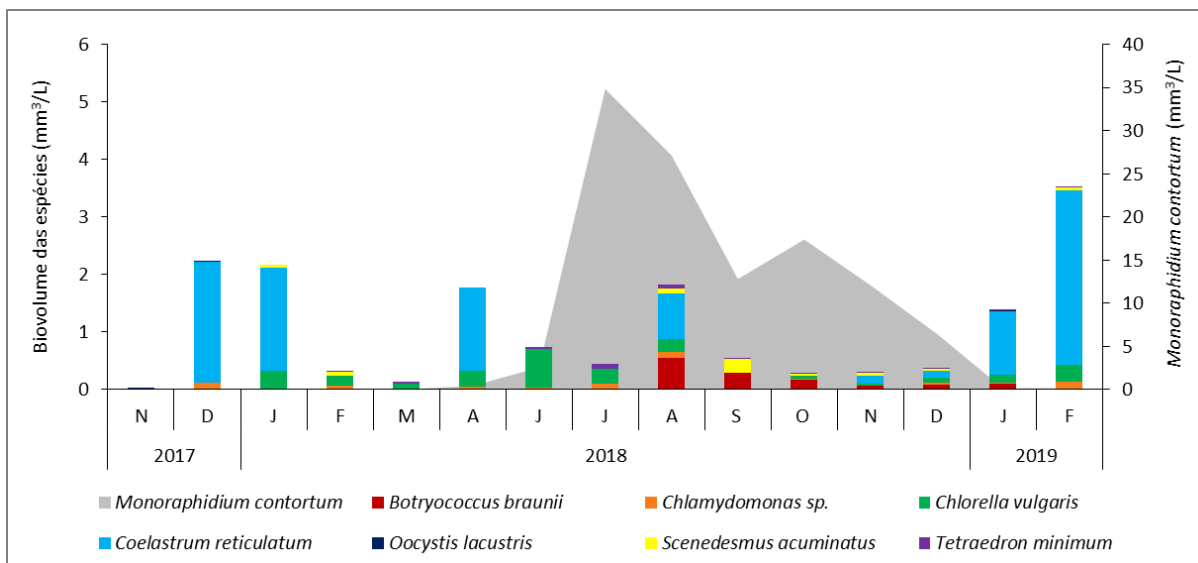


Figura 17. Eixo I: Biovolume das espécies do filo Chlorophyta (mm³/L) (eixo Y principal) e biovolume de *Monoraphidium contortum* (mm³/L) (eixo Y secundário), encontrados na Lagoa Santa durante o período de estudo.

A comunidade fitoplanctônica da Lagoa Santa variou ao longo do período de estudo. A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* mostrou ser a espécie dominante durante a primeira estação chuvosa (2017 e 2018) e durante parte da estação seca, apresentando um pico em julho/2018. Após esse período, ocorreu uma alternância de dominância, onde microalgas pertencentes ao filo Chlorophyta, *Monoraphidium contortum* e *Botryococcus braunii*, apresentaram um intenso crescimento. Consequentemente, o biovolume de *C. raciborskii* diminuiu consideravelmente. Após o período de dominância das clorófitas, que ocorreu entre julho e dezembro/2018, observa-se em janeiro/2019 um intenso crescimento de Chroococcales (Cyanobacteria). Os dados mostram uma importante contribuição de células isoladas de *Microcystis sp.* e de colônias de *Microcystis aeruginosa*. Devido a essa alternância de espécies, os dados mostram uma comunidade fitoplanctônica que mudou sua composição a partir de julho/2018.

4.4.3 Análise de diversidade da comunidade fitoplanctônica

O índice de diversidade de Shannon para a comunidade fitoplanctônica, apresentou diferenças sazonais ao longo do estudo (Figura 18). Esse índice apresentou média de 2,2 bits/mm³, sendo esse considerado um valor baixo de diversidade. O valor máximo obtido foi 3,2 bits/mm³ (fevereiro/2018) na primeira estação chuvosa e o valor mínimo foi de 0,6 bits/mm³ (outubro/2018) no início da segunda estação chuvosa. O índice de diversidade apresentou pouca

variação entre novembro/2017 (2,7 bits/mm³) e junho/2018 (2,9 bits/mm³). Entretanto, observou-se uma forte diminuição a partir do mês de julho/2018 (1,8 bits/mm³), ocorrendo na estação seca e início da segunda estação chuvosa. Os valores tornaram a aumentar a partir do mês de dezembro/2018, atingindo 2,7 bits/mm³, em janeiro/2019. Os menores valores de diversidade ocorreram nos meses em que a espécie *Monoraphidium contortum* apresentou expressiva abundância causando, com isso, uma diminuição da diversidade.

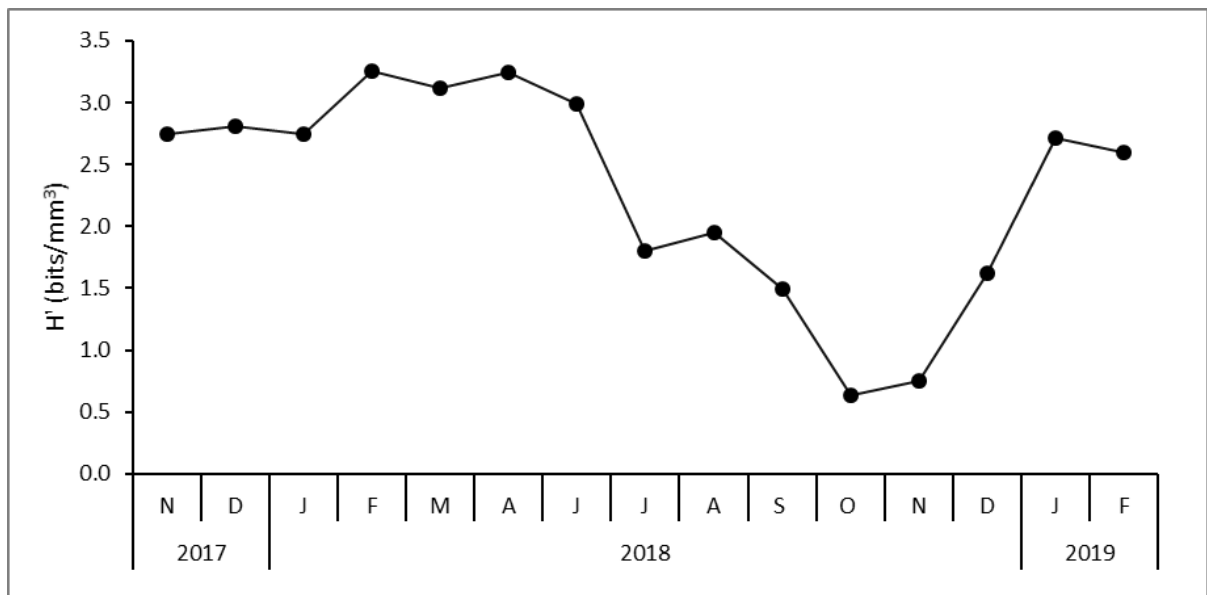


Figura 18. Índice de Shannon baseado no biovolume (bits/mm³) para a comunidade fitoplanctônica da Lagoa Santa.

4.4.3 Análises moleculares

Os resultados da PCR, referentes as amostras ambientais da Lagoa Santa, geraram produtos de amplificação, em todo o período amostrado, ao utilizar os iniciadores 356F e 1391R para a detecção do gene 16S-rRNA, que detecta presença de indivíduos do filo Cyanobacteria (Figura 19). Esse resultado pode ser observado pela presença de bandas de aproximadamente 900pb nos géis de agarose, produzidas a partir da eletroforese. Os resultados obtidos indicaram a presença de cianobactérias ao longo de todo o estudo, corroborando com os resultados obtidos na análise microscópica.

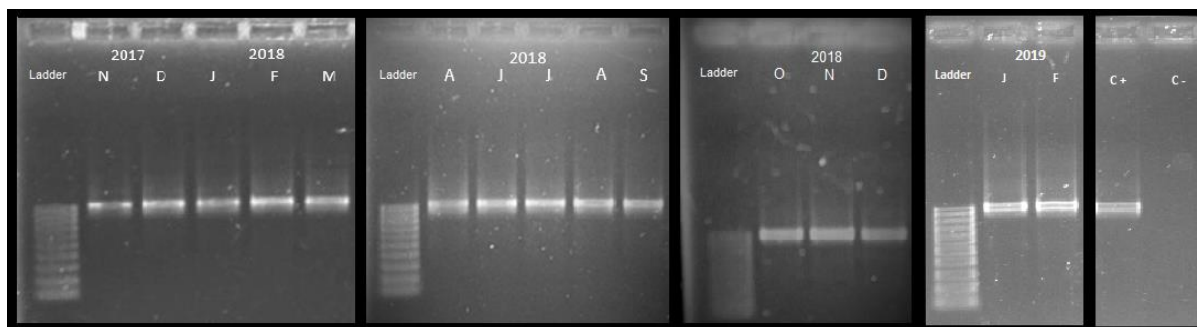


Figura 19. Produtos da amplificação para o conjunto de iniciadores 356F e 1391R para a detecção do gene 16S-rRNA com a finalidade de verificar a presença de cianobactérias da Lagoa Santa, durante o período de estudo. No alto do gel, estão indicadas as datas de cada amostra; C+ e C- indicam, respectivamente, o controle positivo e negativo. Ladder 100pb. Géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio.

Os resultados da PCR para os iniciadores c-mycDF e q-mycDR estão apresentados na figura 20. Esse iniciador não gerou produtos de amplificação em todos os meses de amostragem, como em novembro e dezembro/2017 e agosto e setembro/2018. Nos demais meses, foi gerado produto de *mycD*, mas foram observadas bandas fracas (Figura 20). Os resultados apresentados indicam que houve cepas potencialmente produtoras de microcistina no local de estudo, em vários períodos do ano. Uma vez que o gênero *Microcystis* foi identificado a partir das análises microscópicas, gênero que engloba espécies potencialmente produtoras de microcistina, é possível inferir que há cepas tóxicas desse gênero na Lagoa Santa.

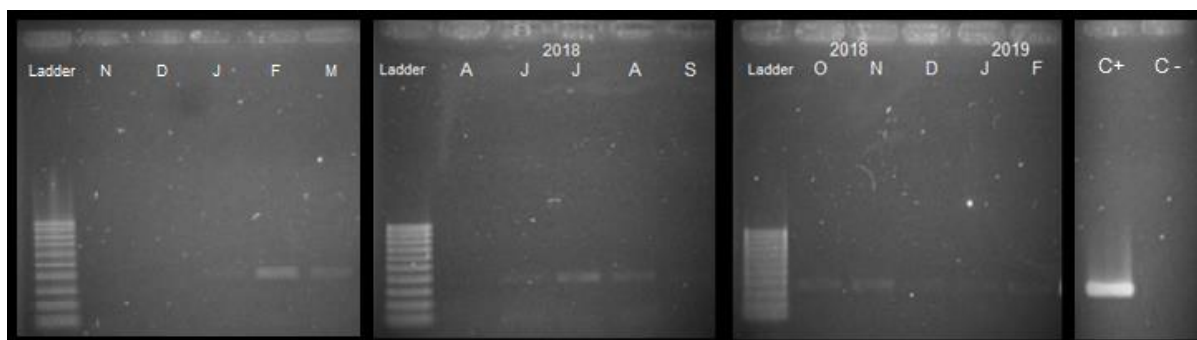


Figura 20. Produtos da amplificação para os iniciadores c-mycDF e q-mycDR com a finalidade de detectar o gene *mycD* para verificar a presença de cepas potencialmente produtoras de microcistina, para todo o período de estudo na Lagoa Santa. No alto do gel, estão indicadas as datas de cada amostra; C+ e C- indicam, respectivamente, o controle positivo e negativo. Ladder 100pb. Géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio.

Os produtos da amplificação das amostras ambientais para o iniciador sxtA4, desenhado para detectar a presença de espécies potencialmente produtoras de saxitoxinas, estão

apresentados na Figura 21. O iniciador sxtA4 apresentou amplificação em todas as amostras analisadas. Através desse resultado, é possível constatar que há cepas potencialmente produtoras de saxitoxina na Lagoa Santa em todo o período amostrado (novembro/2017 a fevereiro/2019). Nas análises microscópicas, a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi identificada nas amostras quantitativas, espécie relatada na literatura como potencialmente produtora de saxitoxina. Portanto, os resultados indicam a presença de cepas potencialmente tóxicas de *C. raciborskii* na Lagoa Santa.

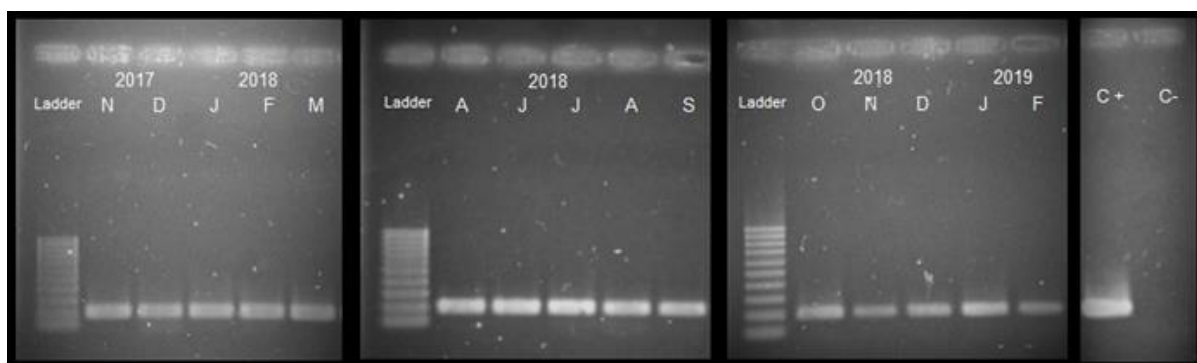


Figura 21. Produtos da amplificação para o iniciador sxtA4, com a finalidade de detectar o gene sxtA para verificar a presença de cepas potencialmente produtoras de saxitoxina, na Lagoa Santa, durante o período de estudo. No alto do gel, estão indicadas as datas de cada amostra; C+ e C- indicam, respectivamente, o controle positivo e negativo. Ladder 100pb. Géis de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio.

4.5 Análises estatísticas

O resultado da análise de redundância (RDA) foi apresentada na figura 22. A RDA mostrou que o modelo foi significativo (F ratio= 1,9327, $p < 0,033$) e explicou 78 % da variabilidade dos dados. A porcentagem acumulada de variação, explicada pelos primeiros dois eixos canônicos foi de 58,53%, sendo o primeiro eixo 32,89% e o segundo 25,63%. As variáveis clorofila-*a* (chl_a) e oxigênio dissolvido (OD), assim como as espécies *C. raciborskii* (Craci), *P. limnetica* (Plim) e *P. brevicellularis* (Pbrev), estiveram positivamente associadas ao eixo1 (Tabela 2). A precipitação (Prec), temperatura da água (Temp), os nutrientes nitrato (NO₃) e amônia (NH₄), e os carotenoides (Carot) mostraram uma associação negativa com o eixo1. *M. aeruginosa* (Maeru) também apresentou uma correlação negativa ao eixo 1, embora fraca. Com relação ao eixo 2 da RDA, o fósforo total (PT) e as espécies *B. braunii* (Bbraunii) e *M. contortum* (Mrcont) apresentaram uma correlação positiva, enquanto a zona eufótica (Zeu), o

fósforo solúvel (PO₄), assim como as células isoladas de *Microcystis sp.* - Chroococcales (Chrooco), estiveram negativamente associados a esse eixo.

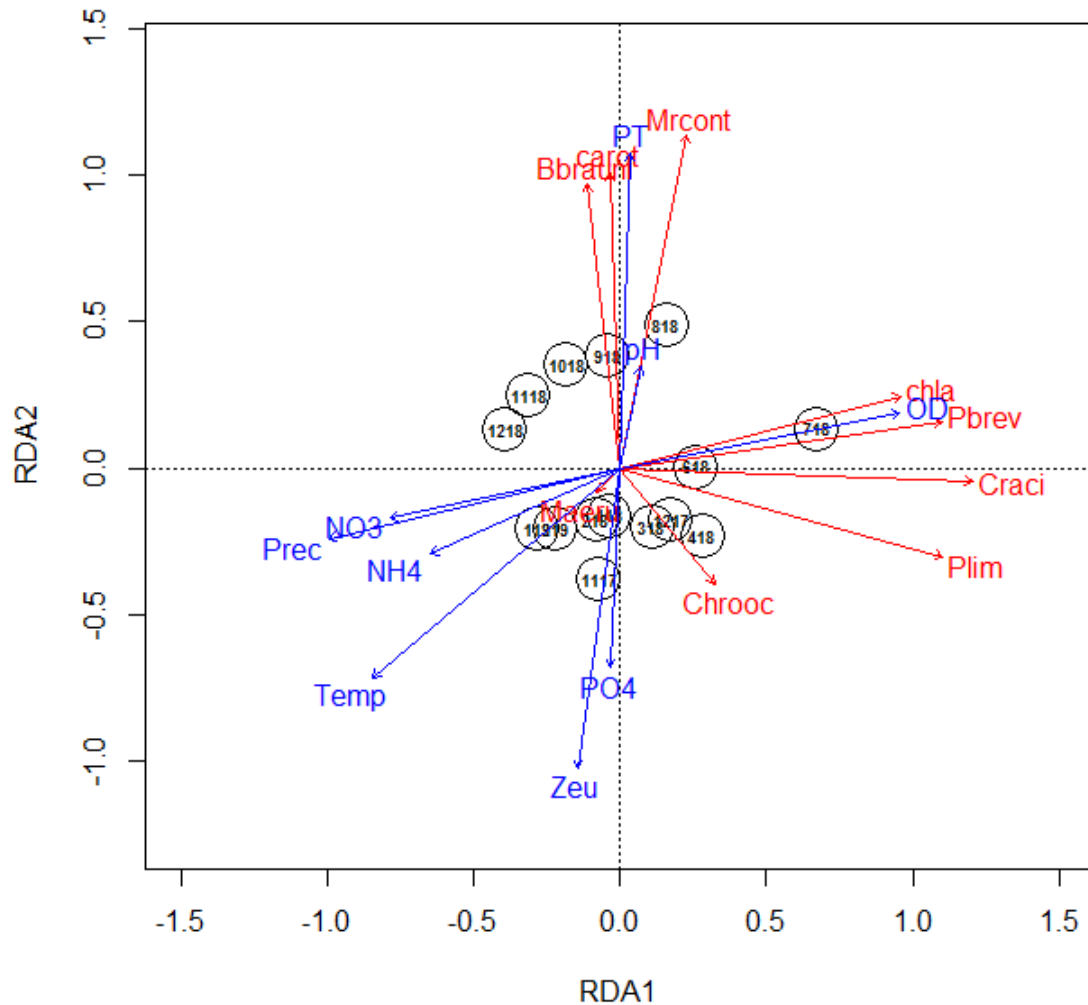


Figura 22. Triplot da análise de redundância (RDA) da interação entre as variáveis bióticas (vetores vermelhos) e abióticas (vetores azuis) referente ao período de estudo que ocorreu na Lagoa Santa (novembro/2017 e fevereiro/2019). Os círculos são referentes a cada amostragem, sendo que os números indicam o mês e o ano. Os vetores indicam a direção de aumento das variáveis. Os ângulos entre as variáveis indicam a correlação existente (ângulos próximos a 0° indicam alta correlação, ângulos próximos a 90° indicam que não há correlação, ângulos próximos a 180° indicam alta correlação negativa). Proporção de explicação: 32,89% para a RDA 1 e 25,63% para RDA 2, total 58,53%. Temp= Temperatura da água; Prec= precipitação; Zeu = Zona eufótica; OD= oxigênio dissolvido; pH= potencial hidrogeniônico; PT= fósforo total; PO₄= fósforo solúvel; NH₄= amônio; NO₃= nitrato; chla: clorofila-a; carot= carotenoides; Craci= *Cylindrospermopsis raciborskii*; Chrooc: células livres de *Microcystis aeruginosa*; Bbraun= *Botryococcus braunii*; Maeru= *Microcystis aeruginosa*; Mrcont= *Monoraphidium contortum*; Pbrev= *Planktolyngbya brevicelulares*; Plim= *Planktolyngbya limnetica*.

Tabela 2. Resultados da análise de redundância para o eixo-1 (RDA1) e eixo-2 (RDA2) para fatores ambientais e espécies do fitoplâncton na Lagoa Santa.

Variáveis abióticas	RDA1	RDA2	Variáveis bióticas	RDA1	RDA2
PT	0.02526	0.8509	chla	0.85469	0.1845
PO4	-0.02578	-0.539	carot	-0.01439	0.9101
NH4	-0.53358	-0.2231	pbrev	0.90116	0.1412
pH	0.05808	0.273	plim	0.94793	-0.2499
NO3	-0.64444	-0.1273	craci	1.05224	-0.037
OD	0.78343	0.1425	bbrauni	-0.18775	0.8413
Temp	-0.70245	-0.5524	mrcont	0.18633	1.0204
Prec	-0.81665	-0.1809	maeru	-0.23091	-0.1288
Zeus	-0.12049	-0.8098	chrooc	0.14262	-0.4066

*Legenda das variáveis presentes na tabela 2: ver figura 22.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou variação da estrutura da comunidade fitoplanctônica, em um lago raso e mesotrófico, relacionada a fatores climáticos, períodos de estratificação térmica e disponibilidade de nutrientes. Sabe-se que as mudanças na estrutura da comunidade fitoplanctônica tem sido relacionadas às perturbações causadas pelas variações ambientais, onde a instabilidade física da coluna d'água é considerada um dos principais fatores responsáveis por determinar a composição de espécies fitoplanctônicas (Harris, 1980; Harris & Baxter, 1996; Calijuri et al., 2002). Nossos resultados mostraram alternância de dominância na Lagoa Santa, entre cianobactérias e microalgas pertencentes ao filo Chlorophyta. A dominância de cianobactérias foi registrada durante as duas estações chuvosas, caracterizadas por maiores temperaturas e estratificação térmica, e no início da estação seca. Entretanto, a dominância de clorófitas ocorreu durante a estação seca, quando foram registradas menores temperaturas e mistura da coluna d'água, e no início da segunda estação chuvosa.

A composição da comunidade fitoplanctônica, bem como a sua distribuição vertical e a produtividade primária, estão diretamente relacionadas à estrutura térmica e química da coluna d'água (Klausmeier & Litchman, 2001; Cantin et al., 2011). Os processos de mistura e estratificação são de grande importância para ecologia desses organismos (Reynolds, 1984). Esses processos afetam a distribuição do fitoplâncton na coluna d'água pois, em razão de serem fotossintetizantes, esses organismos necessitam de acesso à luz. Frequentemente, lagos rasos encontram-se submetidos a uma constante mistura da coluna d'água, diferentemente de lagos profundos onde as estratificações são mais frequentes (Padisák & Reynolds, 2003). Apesar da baixa profundidade da Lagoa Santa, foram identificados, nesse estudo, padrões definidos de estratificação durante os dois períodos de estação chuvosa. Brighenti et al. (2011), ao contrário, descreveram instabilidade da coluna d'água na Lagoa Santa, e sugeriram que esta instabilidade física seria devido ao seu volume reduzido e ausência de conexões com outros corpos d'água, sendo difícil estabelecer um gradiente térmico e químico estável. Os processos de estratificação e mistura que, por outro lado, foram claramente observados no presente estudo, podem ter favorecido as mudanças ocorridas na composição das espécies e nos padrões de dominância na comunidade fitoplanctônica.

Os nutrientes também apresentam grande importância nos sistemas aquáticos onde sua disponibilidade pode variar sazonalmente de acordo com as condições climáticas (Sommer et al., 1986; Arhonditsis et al., 2004). Dentre os fatores ambientais, os nutrientes tem um papel importante, influenciando a estrutura da comunidade fitoplanctônica e o aumento da sua

biomassa, sendo o fósforo e o nitrogênio os mais relevantes (Levich, 1996). Nossos resultados mostraram que na Lagoa Santa nem todos os nutrientes variaram sazonalmente. O fósforo solúvel e o nitrato apresentaram maiores concentrações nas duas estações chuvosas. Foi observada a dominância de espécies de cianobactérias nos períodos de chuva, sendo a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* dominante no primeiro período chuvoso (2017-2018) e *Microcystis aeruginosa* no segundo período chuvoso (2018-2019). No segundo período chuvoso também houve picos de amônio. O fósforo total mostrou um aumento da sua concentração na estação seca, período em que as espécies do grupo Chlorophyta, *Monoraphidium contortum* e *Botryococcus braunii*, foram as mais abundantes. Nesse período também foi observado um pico de amônio no mês de junho/2018.

A espécie filamentosa *Cylindrospermopsis raciborskii*, foi a espécie de cianobactéria mais abundante e foi encontrada em todo período de estudo, apresentando períodos de dominância na primeira estação chuvosa, onde a coluna d'água apresentava-se estratificada e durante parte da estação seca, onde houve mistura. Diferentemente dos nossos resultados, Figueredo & Giani (2009) verificaram a dominância estável e permanente de *Cylindrospermopsis raciborskii* na Lagoa Santa, e registraram constante mistura da coluna d'água, tanto na estação seca como na estação chuvosa. A ocorrência de *C. raciborskii* já foi registrada tanto em ambientes que apresentam condições de mistura da coluna d'água e instabilidade como também em condições de estratificação e estabilidade (Tucci & Sant'Anna, 2003; Moustaka-Gouni et al., 2007; Figueredo & Giani, 2009; Dantas et al., 2012; Soares et al., 2013). O estabelecimento e a proliferação de *C. raciborskii* em sistemas aquáticos com diferentes condições ambientais, pode ser relacionado à sua plasticidade fisiológica (Padisák, 1997; Antunes et al. 2015).

Apesar de parte do período em que *C. raciborskii* apresentou dominância ter maiores concentrações de fósforo solúvel e disponibilidade de nitrato, essa espécie não mostrou relação clara com nenhum nutriente na RDA, sugerindo que outros fatores ambientais, podem ter sido responsáveis pela sua maior abundância. A capacidade dessa espécie em fixar nitrogênio, em conjunto com a habilidade em estocar fósforo (Padisák, 1997), podem ter favorecido a sua permanência e dominância no lago até a estação seca. As únicas variáveis com as quais essa espécie apresentou correlação foram oxigênio dissolvido e clorofila-*a*. Contudo, essas variáveis são mais consequência do seu crescimento em massa do que causa do seu aparecimento na lagoa. A correlação de *Cylindrospermopsis raciborskii*, bem como de *Planktolyngbya brevicellularis* e *Planktolyngbya limnetica*, com o oxigênio dissolvido pode indicar a importância dessas espécies em termos de produtividade primária na Lagoa Santa. De fato, os

maiores valores de oxigênio dissolvido, foram obtidos nos meses de grande abundância dessas espécies. A correlação encontrada entre essas espécies com a concentração de clorofila-*a*, pode indicar uma maior contribuição de cianobactérias filamentosas para a biomassa total da comunidade fitoplanctônica nesses períodos.

As espécies filamentosas *Planktolyngbya limnetica* e *Planktolyngbya brevicularis*, pertencentes à ordem Oscillatoriales, foram as espécies de cianobactérias consideradas subdominantes, durante todo o estudo, tanto nos períodos de maior abundância de cianobactérias como durante a maior abundância das clorófitas. Consideradas r-estrategistas, *P. brevicularis* e *P. limnetica*, possuem moderada tolerância a limitação de recursos e são adaptadas a baixa incidência luminosa (Kruk et al., 2012; Kruk et al., 2010). Essas espécies apresentaram uma tendência de diminuição de suas abundâncias a partir do mês de julho/ 2018. A abundância de *C. raciborskii* também diminuiu a partir de julho, mas de forma mais abrupta do que o crescimento das clorófitas, sugerindo até uma possível competição entre elas, como será discutido em seguida. As Oscillatoriales co-ocorreram durante todo o período de estudo. No entanto, os resultados da RDA, mostram uma forte associação de *C. raciborskii* com *P. limnetica* e *P. brevicularis*. McGregor & Fabbro (2000) encontraram associações de *C. raciborskii* e Oscillatoriales, pertencentes a família Pseudanabaenaceae, em reservatórios profundos estratificados de regiões tropicais e subtropicais da Austrália. Essa associação também foi verificada em lagos rasos e desestratificados (Figueredo & Giani, 2009; Tonetta et al., 2013).

Abordagens moleculares foram aplicadas nesse estudo com o intuito de verificar a presença de cepas tóxicas na Lagoa Santa. Análises de PCR convencional foram realizadas para a detecção do gene *sxtA* nas amostras ambientais, que é parte do operon, responsável pela síntese da saxitoxina. Foi detectada a presença do gene *sxtA* em todo os meses de estudo, quando a espécie *C. raciborskii* também foi identificada. Culturas de cepas isoladas de *C. raciborskii* provenientes da Lagoa Santa, analisadas em laboratório em outros estudos, também mostraram a presença do gene *sxtA* (Reis, 2019). Apesar dessa espécie ter sido encontrada em todo o período amostral, como mencionado anteriormente, observou-se um grande declínio a partir do mês de julho/2018. Entretanto, devido a sensibilidade dessa técnica, foi possível identificar a presença do gene *sxtA* mesmo nesses períodos de menor ocorrência da espécie.

Esse foi o primeiro estudo a avaliar a presença de genótipos com *sxtA* em *C. raciborskii* na Lagoa Santa. Lagos et al. (1999) fizeram o primeiro registro da presença de SXTs em cepas de *C. raciborskii* provenientes de reservatórios localizados no estado de São Paulo (Brasil). Segundo Antunes et al. (2015), apenas cepas de *C. raciborskii* da América do Sul, como do

Brasil e Uruguai (Abreu et al., 2018) são identificadas como potencialmente produtoras de SXTs. Sendo que em outros países as cepas de *C. raciborskii* foram registradas como potencialmente produtoras de cilindrospermopsina, como na Austrália (Ohtani, 1992), Nova Zelândia (Wood et al., 2003), Tailândia (Li et al., 2001) e China (Jiang et al., 2014). Entretanto, Hoff-Rissetti et al. (2013) fizeram o primeiro registro da presença de todos os genes *sxt*, responsáveis pela produção de SXT, como também alguns genes *cyr*, responsáveis pela produção de cilindrospermopsina nas mesmas cepas de *C. raciborskii* provenientes do reservatório de Billings (Brasil). Os autores, porém, mostraram que o operon referente a produção de cilindrospermopsina estava incompleto, sendo as cepas, portanto, incapazes de produzir esta toxina.

A dominância de *Microcystis aeruginosa*, em sua forma colonial e isolada, foi verificada na segunda estação chuvosa (2018-2019), onde novamente houve estratificação da coluna d'água. As maiores temperaturas desse período, juntamente com a estabilidade da coluna d'água, também podem ter favorecido a dominância dessa espécie, como observado também em outros estudos (Reynolds 1980; Paerl, 1988; Calijuri et al., 2002; Vázquez et. al, 2005). O sucesso de *M. aeruginosa* em ambientes estratificados pode estar relacionado a sua capacidade de controlar a flutuabilidade na coluna d'água, devido a presença de aerótopos (Reynolds, 1980; Winder & Hunter, 2008; Komárek, 2016). Dessa forma, através de movimentos verticais, essa espécie consegue utilizar a disponibilidade de luz e nutrientes eficientemente, conferindo vantagem em relação as outras espécies fitoplancônicas (Reynolds, 1984; Reynolds et al., 2002; Moustaka-Gouni et al., 2007). A presença de *M. aeruginosa* na Lagoa Santa foi associada com a disponibilidade de amônio e nitrato na coluna d'água. Espécies que não possuem a capacidade de fixar nitrogênio, podem ser favorecidas pela disponibilidade desse nutriente em suas diferentes formas como amônio e nitrato (Blomqvist et al., 1994).

Visto que o gênero *Microcystis* foi identificado nas amostras ambientais através da microscopia, optou-se por também utilizar abordagens moleculares para verificar a presença do gene *mycD*, ligado a produção de microcistina, e avaliar a potencialidade tóxica das espécies desse gênero neste ambiente. O gene cluster *mcy*, é utilizado como marcador molecular para detectar a potencial capacidade de produzir microcistina (Kaebernick et al., 2002). Esse gene cluster codifica a biossíntese da microcistina, que envolve uma via mista, de policetídeo sintase e sintetase peptídica não-ribossomal (Kaebernick et al., 2002; Jungblut, 2006). Diferentemente dos resultados obtidos para a verificação da presença do gene *sxtA*, o gene *mycD* não foi detectado em todos os meses de estudo. Contudo, apesar de apresentarem bandas fracas na análise de PCR, o gene foi detectado nas amostras ambientais na maior parte do estudo. Esse

resultado indica a potencialidade de produção de microcistina por espécies do gênero *Microcystis* na Lagoa Santa. Essa cianotoxina, é uma hepatotoxina, em relação ao seu potencial tóxico, e é frequentemente encontrada em sistemas aquáticos (Paerl et al., 2001; Chorus & Bartram, 1999) e o gênero *Microcystis* é o encontrado com maior frequência em florações contendo microcistina (Chorus & Bartram, 1999).

Durante esse estudo, foi verificada a dominância de clorófitas, principalmente *Monoraphidium contortum* e *Botryococcus braunii*, a partir da estação seca até o início da estação chuvosa, período marcado por menores temperaturas e desestratificação térmica. Em lagos rasos, quando há a mistura da coluna d'água e se observa maior concentração de nutrientes, induzida pela ressuspensão do sedimento, além de maiores valores de pH, clorófitas tendem a dominar ao invés de cianobactérias (Jeppesen et al. 1990; Jensen et al., 1994; Watson, 1997). As variáveis ambientais mostraram ser importantes no padrão de dominância dessas espécies. Há uma forte correlação das espécies *M. contortum* e *B. braunii* com o pH e com a disponibilidade de fósforo total como foi demonstrado através da análise de RDA. Jensen et al. (1994) demonstraram em um estudo feito em lagos rasos da Dinamarca, que clorófitas possuem a habilidade de competir com cianobactérias em lagos rasos, com maior concentração de fósforo total e em condições de desestratificação. As condições físicas da água em conjunto com a maior disponibilidade de fósforo total podem ter contribuído para a alternância de dominância entre os dois grupos observados na Lagoa Santa. Com o intuito de entender os fatores responsáveis pela abrupta mudança da comunidade, foram realizadas análise de metais. Alguns elementos-traço mostram ser importantes para o crescimento do fitoplâncton, como para taxa de crescimento e aumento de biomassa (Sunda et al, 2005). Dentre esses, é possível citar o Ferro, Manganês, Cobre, Cobalto, Níquel e Molibdênio (Trollope & Evans, 1976; Baar et al., 1990; Pérez, , 2006). No entanto, a concentração desses metais não mostrou grande variação durante o período de estudo. Sendo assim, o expressivo crescimento da microalga *M. contortum* e a ocorrência de *B. braunii*, não pode ser explicada por esse fator.

A Lagoa Santa apresentou uma mudança de cor durante o período de estudo, quando as clorófitas apresentavam maior abundância na comunidade fitoplanctônica (com. pess.). A coloração amarelo-alaranjada observada nesse sistema aquático pode ser relacionada a presença da microalga *Botryococcus braunii*. As florações de *B. braunii* podem conferir essa coloração à água, devido à capacidade dessa espécie em produzir lipídeos de cor alaranjada e por acumular carotenóides na matriz de suas colônias (Esteves, 2011; Aaronson et al., 1983). Embora *B. braunii* seja pertencente ao filo Chlorophyta, grupo das algas verdes, ele pode apresentar mudança em sua coloração quando está submetido a condições de stress (Grung, 1989). Dentre

essas condições, é possível citar a deficiência de nitrogênio ou uma alta intensidade luminosa, o que leva a uma estimulação da produção de carotenoides (Grung, 1989; Grung, 1994). De fato, observou-se um aumento de carotenoides na Lagoa Santa a partir de junho/2018 até novembro/2018. A presença de *B. braunii*, juntamente com *Monoraphidium contortum*, foi fortemente correlacionada com a concentração de carotenoides no presente estudo.

O índice de Shannon foi utilizado para medir a diversidade da comunidade fitoplanctônica da Lagoa Santa. Foi observada variação da diversidade ao longo do estudo, apontando para as mudanças ocorridas na estrutura da comunidade. Os maiores índices de diversidade (H') foram observados durante a primeira estação chuvosa (2017-2018) e início da estação seca e novamente na segunda estação chuvosa (2017-2018). Uma forte queda foi observada a partir do mês de julho, no período de seca e mistura da coluna d'água, quando *M. contortum* apresentou expressiva abundância e dominância na comunidade. A diversidade de espécies tende a diminuir quando uma ou poucas espécies são dominantes no ambiente (Ignatiades, 1969). Dessa forma, o índice de Shannon mostrou a variação da diversidade do fitoplâncton ao longo de estudo, apontando para mudanças ocorridas na estrutura da comunidade.

As abordagens utilizando traços funcionais podem ser utilizados para explicar como espécies fitoplanctônicas distribuem-se e respondem as condições ambientais. As cianobactérias que apresentaram períodos de dominância nesse estudo, *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, pertencem a diferentes grupos funcionais baseados em traços morfológicos, de acordo com a classificação proposta por Kruk et al. (2010). *C. raciborskii* pertence ao grupo de filamentos grandes com aerótopos. São organismos que possuem a capacidade fixar nitrogênio, o que permite serem encontrados em ambientes com baixa concentração desse nutriente (Padisák, 1997). *M. aeruginosa* pertence ao grupo das grandes colônias mucilaginosas com a presença de aerótopos, além de serem moderadamente sensíveis a baixa concentração de nutrientes (Kruk et al., 2010). De fato, a ocorrência de *C. raciborskii* não foi correlacionada com nenhum nutriente, contudo *M. aeruginosa* foi correlacionada com o nitrato e amônio. Apesar de pertencerem a diferentes grupos, ambas as espécies são consideradas k-estrategistas sendo então consideradas boas competidoras em ambientes aquáticos (Kruk et al., 2010). Ambas possuem adaptações à flutuabilidade além da potencialidade em formar florações tóxicas. A capacidade dessas espécies em migrar na coluna d'água, pode ter favorecido o estabelecimento de ambas durante o período de estratificação, uma vez que conseguem obter recursos em diferentes profundidades. Essas espécies foram abundantes em períodos de maior estabilidade da água, sendo que *C. raciborskii*, também foi encontrada em períodos de desestratificação.

Estudos propõe a sucessão de espécies fitoplanctônicas K-estrategistas em ambientes estáveis e r-estrategistas em ambientes instáveis (Reynolds, 1984; Harris, 1996; Santos & Calijuri, 1998). Segundo MacArthur & Wilson (1967), as espécies r-estrategistas possuem um alto potencial de reprodução, já as espécies k-estrategistas, possuem menor potencial reprodutivo, mas apresentam melhores habilidades em relação a competição por recursos. Nosso estudo mostrou uma grande abundância de *Monoraphidium contortum*, espécie tipicamente r-estrategista (Kruk et al., 2010), quando a Lagoa Santa apresentava maior instabilidade, devido a mistura da coluna d'água. Segundo a classificação de Kruk et al. (2010), esta espécie é caracterizada pela ausência de estruturas especializadas, sendo capaz de tolerar de forma moderada a limitação de recursos (Kruk et al., 2010). A espécie *B. braunii* surge logo em sequência no mesmo período, apresentando características de espécie K-estrategista (Kruk et al., 2010). *B. braunii* pertence ao mesmo grupo de *M. aeruginosa*, onde se encontram grandes colônias mucilaginosas (Kruk et al., 2010). A presença de lipídios nas colônias dessa espécie confere a capacidade de flutuação na coluna d'água. São espécies moderadamente sensíveis a baixa concentração de nutrientes (Kruk et al., 2010). Essa espécie foi fortemente relacionada com o fósforo total, assim como *M. contortum*, indicando a importância do aumento desse nutriente durante esse período.

A competição entre as espécies fitoplanctônicas foi um fator determinante da composição da comunidade encontrada na Lagoa Santa, sendo uma das causas das alterações ocorridas nos padrões de dominância observados. Alguns traços funcionais são ecologicamente relevantes para o fitoplâncton, como os relacionados a captura de luz e nutrientes, taxas de crescimento, morfologia e habilidade em evitar predadores (Litchman & Klausmeier, 2008). Os traços funcionais relacionados às habilidades competitivas presentes nas cianobactérias e nas clorófitas podem ter sido importantes na estruturação dessa comunidade. O tamanho da célula é fator determinante que impacta o metabolismo, o crescimento e o acesso aos recursos do ecossistema (Osborn, 1985; Finkel et al., 2010; Marañón, 2009). Uma maior taxa de crescimento pode ser vantajosa em ambientes que possuem flutuação em relação a disponibilidade de recurso, levando a diminuição de competidores que possuem menores taxas de crescimento (Litchman & Klausmeier, 2001). As espécies que possuem células de menores tamanhos tendem a possuir altas taxas de crescimento (Banse, 1976; Osborn, 1985). O pequeno tamanho das células de *M. contortum*, juntamente ao fato de não ser uma espécie colonial, pode ter favorecido o seu rápido crescimento durante os períodos instáveis, facilitando assim a obtenção de recursos, como luz e nutrientes, já que possuem uma maior razão superfície-volume. As cianobactérias, *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, por outro lado, podem ter sido

favorecidas nos períodos de maior estabilidade, devido ao seu investimento em estruturas especializadas, como por exemplo aerótopos, acinetos e também heterócitos no caso de *C. raciborskii*. Além disso, o maior tamanho observados nessas espécies, assim como a formação de colônias no caso de *M. aeruginosa*, ou a produção de toxinas, pode diminuir o consumo pelos predadores, como o zooplâncton e moluscos filtradores (DeMott et al., 1991; Rohrlack et al., 1999; Chorus & Bartram, 1999; Vanderploeg et al., 2011).

As estratégias observadas em cianobactérias, que favorecem sua dominância sobre outros grupos fitoplanctônicos, não impediram a dominância de *M. contortum* e *B. braunii* em parte do período de estudo. A mistura da coluna d'água observada na estação seca, pode ter funcionado como um distúrbio, o que pode ter levado o favorecimento e dominância de espécies anteriormente menos abundantes ou mesmo não identificadas nesse sistema aquático. Nesse período *M. contortum*, espécie r-estrategista, foi favorecida, apresentando alta taxa de crescimento. Essa espécie pode, por sua vez, então ter facilitado o crescimento de *B. braunii*. Consequentemente, as populações de cianobactérias diminuíram drasticamente. Nos meses seguintes, quando novamente a coluna d'água apresenta-se estratificada, as cianobactérias tornaram a dominar, mas ao invés de *C. raciborskii*, que tinha sido a espécie mais abundante durante a primeira parte do estudo, foi a espécie *M. aeruginosa* quem apresentou maior abundância.

As condições de não-equilíbrio observadas na Lagoa Santa, podem ter levado o favorecimento de espécies com determinados traços funcionais em detrimento de outros, de acordo com as condições ambientais observadas em cada período. Os padrões sazonais que alteram a estrutura física e química dos sistemas aquáticos causam perturbações no ambiente. Consequentemente, a comunidade fitoplanctônica vai responder a esses distúrbios, e estará sujeita a exclusão competitiva entre as espécies presentes. Como discutido anteriormente, as variações temporais dessa comunidade podem ser consideradas como uma alternância entre espécies K-estrategistas e r-estrategistas, reguladas pelas alterações ambientais.

O monitoramento da dinâmica temporal do fitoplâncton é de grande importância para identificar modificações no ambiente (Padisák, 1993; Paerl, 1988; Chellappa et al., 2009). As espécies presentes na comunidade, assim como os padrões de dominância, funcionam como indicadores biológicos em sistemas aquáticos (Paerl, 1988; Javed, 2006; Tanoi, 2014; Gomes et al., 2012), pelo fato desses organismos responderem rapidamente as mudanças ambientais e estarem na base da cadeia trófica (Padisák, 1993; Whitton & Kelly, 1995; Elliott et al., 2010). Apesar de terem sido apontados alguns fatores que poderiam ser os responsáveis pelas mudanças ocorridas na comunidade fitoplanctônica da Lagoa Santa, é possível que outros

fatores, não mensurados nesse estudo, podem ter sido responsáveis pelas mudanças observadas. Brighenti et al. (2011) sugeriram que, devido a simples morfometria, esse sistema aquático apresenta baixa resistência aos impactos externos, sendo que uma interferência alóctone poderia se propagar por toda massa d'água. Dessa forma, a dinâmica do fitoplâncton encontrada na Lagoa Santa pode ser um indicativo de alterações na qualidade da água desse ambiente.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo foi capaz de investigar a dinâmica da comunidade fitoplanctônica e as alternâncias de dominância em um lago raso e mesotrófico. Os padrões de circulação e a estrutura física e química do sistema aquático são fundamentais para a composição do fitoplâncton. Lagoa Santa apresentou tanto períodos de estratificação como mistura da coluna d'água. Diferentemente de trabalhos realizados anteriormente, a espécie de cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii*, dominou a comunidade apenas durante parte do estudo. O distúrbio ocorrido no lago, devido à mistura da coluna d'água, pode ter favorecido a dominância das clorófitas, *Monoraphidium contortum* e *Botryococcus braunii*, período marcado pela diminuição da diversidade da comunidade, como demonstrado pela diminuição dos valores do índice de diversidade de Shannon. Após esse período, no entanto, a espécie de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* tornou-se mais abundante. Dessa forma, ficaram evidentes as alterações sazonais da estrutura da comunidade fitoplanctônica presente na Lagoa Santa.

As abordagens morfológicas, baseadas em traços funcionais, como o tamanho e forma da célula, presença de estruturas especializadas e formação ou não de colônias, foram importantes para entender as estratégias adotadas por cada espécie nesse estudo. Os conceitos de espécies r-estrategistas e K-estrategistas puderam então ser aplicados, onde as variações ambientais ocorridas sobre um gradiente temporal, podem ter sido responsáveis pela alternância entre essas estratégias. A exclusão competitiva, à qual as espécies fitoplanctônicas estão sujeitas, deve também ter contribuído nas mudanças observadas na comunidade.

Esse estudo também mostrou a importância da aplicação de técnicas moleculares as quais podem ser vantajosas para identificar espécies potencialmente tóxicas. O primeiro passo foi de avaliar a ocorrência de cepas de cianobactérias. Em seguida, através de PCR convencional, foram detectados genes ligados a produção de saxitoxinas (STX), e de microcistinas (MCYSTs). As análises de microscopia, juntamente a dados de literatura, sugerem que as espécies potencialmente produtoras destas toxinas seriam *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*, respectivamente produtoras de saxitoxina e microcistina.

Como perspectivas futuras, espera-se quantificar as populações tóxicas nas amostras ambientais, através de PCR quantitativa (qPCR). Como a produção de toxina é uma característica intrapopulacional, essa ferramenta irá permitir quantificar a porcentagem de cepas tóxicas dentro das populações de *C. raciborskii* e *M. aeruginosa*. Além disso, através da aplicação de análises cromatográficas (HPLC), será possível medir a concentração das toxinas

presentes no ambiente. A aplicação desse conjunto de técnicas será importante para avaliar o nível de toxicidade das florações de cianobactérias encontradas na Lagoa Santa.

A importância do monitoramento da qualidade da água e o estudo da comunidade fitoplanctônica em lagos urbanos é evidenciada nesse estudo. A detecção de espécies de cianobactérias potencialmente produtoras de toxinas no sistema aquático estudado, em conjunto com a aplicação de parâmetros limnológicos de rotina, permitiu acompanhar as alterações sazonais que ocorrem no ambiente e, a partir de então, criar eventuais medidas de controle. Por exemplo, a mudança abrupta da comunidade observada nesse estudo, quando a comunidade deixou de ser dominada por cianobactérias e passou a ser dominada por clorofíceas, é algo que precisa ser investigado mais profundamente. Embora tenham sido medidos vários parâmetros da qualidade de água, que poderiam justificar essa alteração, nenhum deles se mostrou suficiente para explicar a mudança observada, com exceção talvez do padrão de estratificação e mistura da coluna d'água. É possível que outros parâmetros não mensurados possam estar envolvidos. Portanto, seria necessário, que estudos sobre um gradiente temporal maior fossem realizados, a fim de investigar se esses padrões se repetem periodicamente na comunidade fitoplanctônica.

REFERÊNCIAS

- Aaronson, S., Berner, T., Gold, K., Kushner, L., Patni, N. J., Repak, a., & Rubin, D. (1983). Some observations on the green planktonic alga, *Botryococcus braunii* and its bloom form. *Journal of Plankton Research*, 5(5), 693–700.
- Abreu, V. A. C., Popin, R. V., Alvarenga, D. O., Schaker, P. D. C., Hoff-Risseti, C., Varani, A. M., & Fiore, M. F. (2018). Genomic and genotypic characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii*: Toward an intraspecific phylogenetic evaluation by comparative genomics. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–12.
- Al-Tebrineh, J., Mihali, T. K., Pomati, F., & Neilan, B. a. (2010). Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7836–7842.
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful Algal Blooms and Eutrophication Nutrient Sources , Composition , and Consequences. *Estuaries*, 25(4b), 704–726.
- Antunes, J. T., Leão, P. N., & Vasconcelos, V. M. (2015). *Cylindrospermopsis raciborskii*: Review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–13.
- Apeldoorn, M.E., Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. & Bakker, G.J.I. (2007) Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 1-7.
- APHA – American Public Health Association (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, EUA: American Public Health Association.
- Arhonditsis, G. B., Winder, M., Brett, M. T., & Schindler, D. E. (2004). Patterns and mechanisms of phytoplankton variability in Lake Washington (USA), 38, 4013–4027.
- Arment, A. R., Carmichael, W. W. (1996) Evidence that microcystin is a thiotemplate product. *Journal of Phycology*, 32, 591–597.
- Baar, H., Buma, A., Nolting, R., Cadée, G., Jacques, G., & Treguer, P. (1990). On iron limitation of the Southern Ocean: experimental observations in the Weddell and Scotia Seas. *Marine Ecology Progress Series*, 65, 105-122.
- Balch, W. M., & Byrne, C. F. (1994). Factors affecting the estimate of primary production from space. *Journal of Geophysical Research*, 99(C4), 7555–7570.
- Banse, K. (1976). Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size - a review. *Journal of Phycology*, 12, 135–140.
- Blomqvist, P., Pettersson, a. and Jyenstrand, P. (1994). Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing Cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv für Hydrobiologie*, 132 (2), 141–164.
- Boehrer, B., & Schultze, M. (2008). Stratification of lakes. *Reviews of Geophysics*, 46, 1–27.

- Bouvy, M., Molica, R., De Oliveira, S., Marinho, M., & Beker, B. (1999). Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology*, 20, 285–297.
- Brighenti, L. S. (2009). Avaliação limnológica da lagoa central (município de Lagoa Santa – MG): uma abordagem espacial. Dissertação de mestrado (requisito parcial para obtenção de do título de mestre em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Brighenti, L. S., Pinto-Coelho, R. M., Bezerra-Neto, J. F., & Gonzaga, A. V. (2011). Parâmetros morfométricos da Lagoa Central (Lagoa Santa, Estado de Minas Gerais): Comparação de duas metodologias. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 33(3), 281–287.
- Bryant, D. A. (2009). Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. *Microbiology*, 128, 835–844.
- Calijuri, M. C., Dos Santos, A. C. A., Jati, S. (2002). Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, S.P.--Brazil). *Journal of Plankton Research*, 24(7), 617–634.
- Cantin, A., Beisner, B. E., Gunn, J. M., Prairie, Y. T., & Winter, J. G. (2011). Effects of thermocline deepening on lake plankton communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68, 260–276.
- Carey, C. C., Ibelings, B. W., Hoffmann, E. P., Hamilton, D. P., & Brookes, J. D. (2011). Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, 46, 1394–1407.
- Carmichael, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*. 270, 78–86.
- Carmichael, W. W. (2001). Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs.” *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7(5), 1393–1407.
- Chellappa, N., Câmara, F., & Rocha, O. (2009). Phytoplankton community: indicator of water quality in the Armando Ribeiro Gonçalves Reservoir and Pataxó Channel, Rio Grande do Norte, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 69(2), 241–251.
- Chorus, I. & Bartram, J (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water : A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E and FN Spon, London, UK.401pp.
- Connell, J. H. (1978). Diversity in Tropical Rain Forests and Coral Reefs High diversity of trees and corals is maintained, 199, 1302–1310.
- Da-gloria, P., Neves, W. A., & Hubbe, M. (2017). História das pesquisas bioarqueológicas em Lagoa Santa , Minas Gerais , Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Humanas*, 12, 919–936.

- Dantas, E. W., Bittencourt-Oliveira, M. do C., & Moura, A. do N. (2012). Dynamics of phytoplankton associations in three reservoirs in northeastern Brazil assessed using Reynolds' theory. *Limnologica*, 42, 72–80.
- De La Torre, J. R., Goebel, B. M., Friedmann, E. I., & Pace, N. R. (2003). Microbial Diversity of Cryptoendolithic Communities from the. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3858–3867.
- DeMott W., R., Qing-Xue, Z., & W., C. W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1346–1357.
- Elliott, J. A. (2011). Is the future blue-green ? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water Research*, 46, 1364–1371.
- Elliott, J. A., Irish, A. E., & Reynolds, C. S. (2010). Modelling Phytoplankton Dynamics in Fresh Waters: Affirmation of the PROTECH Approach to Simulation. *Freshwater Reviews*, 3(1), 75–96.
- Esteves, F. D. A. (2011). *Fundamentos de Limnologia*. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, Brasil. 790pp.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305, 354–360.
- Fee, E. J. (1979). A relation between lake morphometry and primary productivity and its use in interpreting whole-lake eutrophication experiments. *Limnology and Oceanography*, 24(3), 401–416.
- Figueredo, C. C., & Giani, A. (2009). Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologica*, 39(4), 264–272.
- Finkel, Z. V, Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T. A. V., & Raven, J. A. (2010). Phytoplankton in a changing world : cell size and elemental stoichiometry. *Journal Of Plankton Research.*, 32 (1), 119-137.
- Fonseca, B. M., & Bicudo, C. E. M. (2008). Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 600, 267–282.
- Gause, G. F. (1934). *The Struggle for Existence*. Baltimore (MD): Williams and Wilkins Company.
- Gemelgo, M. C. P., Sant'Anna, C. L. & Tucci, A., Barbosa, H. R. (2008). Population dynamics of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju , a Cyanobacteria toxic species , in water supply reservoirs in São Paulo , Brazil. *Hoehnea* ,35(2), 297–307.

- Gomes, L. N. L., Oliveira, S. M. A. C. O., Giani, A., & Von Sperling, E. (2012). Association between biotic and abiotic parameters and the occurrence of cyanobacteria in a Brazilian reservoir. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 4635–4645.
- Grung, M., Metzger, P., Berkloff, C., & Liaaen-Jensen, S. (1994). Studies on the formation and localization of primary and secondary carotenoids in the green alga *Botryococcus braunii*, including the regreening process. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107(2), 265–272.
- Grung, M., Metzger, P., & Liaaen-jensen, S. (1989). Primary and secondary carotenoids in two races of the green alga *Botryococcus braunii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(4), 263–269.
- Harris, G. P. (1980). Temporal and Spatial Scales in Phytoplankton Ecology. Mechanisms, Methods , Models , and Management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 877–900.
- Harris, P. G., & Baxter, G. (1996). Interannual variability in phytoplankton biomass and species composition in a subtropical reservoir. *Freshwater biology*, 35, 545–560.
- Hawkins, P. R., Runnegar, M. T. C., Jackson, A. R. B., & Falconer, I. A. N. R. (1985). Severe Hepatotoxicity Caused by the Tropical Cyanobacterium (Blue-Green Alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju Isolated from a Domestic Water Supply Reservoir. *Applied and environmental microbiology*, 50 (5), 1292–1295.
- Hillebrand, H., Durlsen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Jornaul of Phycology*, 35, 403–424.
- Hoff-risetti, C, Dorr, F. A, Schaker , P. D. C., Pinto, E., Werner, R., & Fiore, M. F. (2013). Cylindrospermopsin and Saxitoxin Synthetase Genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* Strains from Brazilian Freshwater. *Plos One*, 8(8), e74238.
- Holten, B.; Sterll, M. (2011) *Peter Lund e as grutas com ossos em Lagoa Santa*. Ed. UFMG, Belo Horizonte, Brasil. 335pp.
- Hutchinson G.E (1961) The paradox of the plankton. *The American Naturalis*, 95, 137–45
- Ignatiades, L. (1969). Annual cycle, species diversity and succession of phytoplankton in lower Saronicos Bay, Aegean Sea. *Marine Biology*, 3, 196–200.
- Javed, M. (2006). Studies on metal contamination levels in plankton and their role as biological indicator of water pollution in the river Ravi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(2), 313–317.
- Jensen, J. P., Jeppesen, E., Olrik, K., & Kristensen, P. (1994). Impact of Nutrients and Physical Factors on the Shift from Cyanobacterial to Chlorophyte Dominance in Shallow Danish Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1692–1699.

- Jeppesen, E., Jensen, J. P., Kristensen, P., Søndergaard, M., Mortensen, E., Sortkjær, O., & Olrik, K. (1990). Fish manipulation as a lake restoration tool in shallow, eutrophic, temperate lakes 2: threshold levels, long-term stability and conclusions. *Hydrobiologia*, 200–201, 219–227.
- Jiang, Y., Xiao, P., Yu, G., Shao, J., Liu, D., & Azevedo, S. M. F. O. Li, R. (2014). Sporadic Distribution and Distinctive Variations of Cylindrospermopsin Genes in Cyanobacterial Strains and Environmental Samples from Chinese Freshwater Bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5219–5230.
- Jonas, M., & Dake, K. (1969). Thermal Stratification in Lakes : Analytical and laboratory studies. *Water Resources research*, 5(2), 484–495.
- Jungblut, A., & Neilan, B. A. (2006). Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins , microcystin and nodularin , synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology* ,185, 107–114.
- Kaebernick, M., Dittmann, E., Borner, T, Neilan, B. A. (2002). Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin , a cyanobacterial nonribosomal peptide Multiple Alternate Transcripts Direct the Biosynthesis of Microcystin , a Cyanobacterial Nonribosomal Peptide. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2), 449–455
- Kaebernick, M., & Neilan, B. A. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 1–9.
- Kellmann, R., Mihali, T. K., Young, J. J., Pickford, R., Pomati, F., & Neilan, B. A. (2008). Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4044–4053.
- Klausmeier, C. A., & Litchman, E. (2001). Algal games: The vertical distribution of phytoplankton in poorly mixed water columns. *Limnology and Oceanography*, 46(8), 1998–2007.
- Klausmeier, C. A., Litchman, E., Daufresne, T., & Levin, S. A. (2004). Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*, 429, 171–174.
- Komárek, J. (2016). Review of the cyanobacterial genera implying planktic species after recent taxonomic revisions according to polyphasic methods: State as of 2014. *Hydrobiologia*, 764(1), 259–270.
- Kruk, C., Huszar, V. L. M., Peeters, E. T. H. M., Bonilla, S., Costa, L., Lürling, M., Reynolds, C. S., Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, 55, 614–627.
- Kruk, C., & Segura, A. M. (2012). The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia*, 698, 191–202.
- Kruk, C., Segura, A. M., Peeters, E. T. H. M., Huszar, V. L. M., Costa, L. S., Kosten, S., Lacerot, G., Scheffer, M. (2012). Phytoplankton species predictability increases towards warmer regions. *Limnology and Oceanography*, 57(4), 1126–1135.

Kurmayer, R., Christiansen, G., & Christiansen, G. (2009). The Genetic Basis of Toxin Production in Cyanobacteria The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria *Freshwater Reviews*, 2, 31–50.

Kurmayer, R.; Christiansen, G.; Chorus, I. (2003). The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determinates its microcystin net production in lake. *Wannsee Applied Environmental Microbiology*, 69, 787–795.

Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. Q., & Oshima, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, 37, 1359–1373.

Levich, A. P. (1996). The role of nitrogen-phosphorus ratio in selecting for dominance of phytoplankton by cyanobacteria or green algae and its application to reservoir management. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 5, 55–61.

Lewis, W. M. (1978). Dynamics and Succession of the Phytoplankton in a Tropical Lake : Lake Lanao, Philippines. *British Ecological Society*, 66 (3), 849–880.

Li, R., Carmichael, W. W., Brittain, S., Eaglesham, G. K., Shaw, G. R., & Watanabe, M. M. (2001). First Report Of The Cyanotoxins Cylindrospermopsin And Deoxycylindrospermopsin From *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 37, 1121–1126.

Litchman, E., & Klausmeier, C. A. (2001). Competition of Phytoplankton under Fluctuating Light. *The american naturalist*, 157(2), 170 – 187.

Litchman, E., & Klausmeier, C. A. (2008). Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39, 615–639.

Lopes, M. R. M., Bicudo, C. E. D. M., & Ferragut, M. C. (2005). Short term spatial and temporal variation of phytoplankton in a shallow tropical oligotrophic reservoir, southeast Brazil. *Hydrobiologia*, 542, 235–247.

MacArthur R. H. & Wilson E.O. 1967. The Theory of Island Biogeography. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. 203.

Marañón, E (2009) Phytoplankton size structure. *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Academic Press, Oxford, 4252–4256.

McGregor G. B., & Fabbro, L. D. (2000). Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes & Reservoirs Research & Management*. 5, 195-205

Moustaka-Gouni, M., Vardaka, E., & Tryfon, E. (2007). Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): Steady-state dominance of *Limnothrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 571, 129-140.

- Neves, W. A., Hubbe, M., & Bernardo, D. (2013). Early Human Occupation of Lagoa Santa , Eastern Central Brazil : Craniometric Variation of the Initial Settlers of South America, *Paleoamerican Odyssey*, Chapter 23, 397–412.
- Nusch, E. A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination. *Archiv für Hydrobiologie–Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, 14, 14-36.
- Ohtani, I., Moore, R. E., & Runnegar, M. T. C. (1992). Cylindrospermopsin: A Potent Hepatotoxin from the Blue-Green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *American Chemical Society*, 114, 7941–7942.
- Osborn, T. R. (1985). Algal cell size and the maximum density and biomass of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 32 (4), 983–986.
- Padisák, J. (1993). Use of algae in water quality monitoring. *Limnological Bases of Lake Management*, 73–82.
- Padisák, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie*, 107, 563–593.
- Padisák, J., & Reynolds, C. S. (2003). Shallow lakes : the absolute, the relative, the functional and the pragmatic. *Hydrobiologia*, 506–509: 1–11.
- Paerl, H. W. (1988). Nuisance phytoplankton and inland waters blooms in coastal , estuarine. *Limnology and Oceanography*, 33 (4), 823–847.
- Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisander, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World*, 1, 76–113.
- Paerl, H. W., & Millie, D. F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35(6), 160–167.
- Parizzi, M. G., Salgado-Labouriau, M. L., & Kohler, H. C. (1998). Genesis and environmental history of Lagoa Santa, southeastern Brazil. *The Holocene*, 8(3), 311–321.
- Pérez, P., Estévez-blanco, P., Beiras, R., & Fernández, E. (2006). Effect of copper on the photochemical efficiency , growth , and chlorophyll a biomass of natural phytoplankton assemblage. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), 137–143.
- Pimentel, J. S. M., & Giani, A. (2013). Estimating toxic cyanobacteria in a Brazilian reservoir by quantitative real-time PCR, based on the microcystin synthetase D gene. *Journal of Applied Phycology*, 25, 1545–1554.
- Pomati, F., Sacchi, S., Rossetti, C., Giovannardi, S., Onodera, H., Oshima, Y., & Neilan, B. A. (2000). The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology*, 36, 553–562.

R Development Core Team. (2013). R Development Core Team R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.

Rangel, L. M., Silva, L. H. S., Arcifa, M. S., & Peticarrari, A. (2009). Driving forces of the diel distribution of phytoplankton functional groups in a shallow tropical lake (Lake Monte Alegre, Southeast Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 69 (21), 75–85.

Reis, L. A. (2019). Dominância de cianobactérias em um reservatório tropical hipereutrófico: aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos. Tese de doutorado (requisito parcial para obtenção de do título de doutor em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Reynolds, C. S. (1976). Succession and Vertical Distribution of Phytoplankton in Response to Thermal Stratification in a Lowland Mere, with Special Reference to Nutrient Availability. *Journal of Ecology*, 64(2), 529–551.

Reynolds, C. S. (1984). Phytoplankton periodicity : the interactions of form , function and environmental variability. *Freshwater Biology*, 14, 111–142.

Reynolds, C. S., Huszar, V., Krul, C., Naselli-Flores, L. & Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24(5), 417–428.

Reynolds, C. S. (1980). Phytoplankton assemblages and their periodicity in stratifying lake systems. *Holarctic Ecology*, 3, 141–159.

Rinehart, K. L., M. Namikoshi, & Choi, B. W. (1994). Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6, 159–176

Rohrback, T., Dittmann, E., Henning, M., Börner, T., & Kohl, J. G. (1999). Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 737–739.

Rosa, C. A., Resende, M. A., Barbosa, F. A. R., Morais, P. B., & Franzot, S. P. (1995). Yeast diversity in a mesotrophic lake on the karstic plateau of Lagoa Santa, MG-Brazil. *Hydrobiologia*, 308(2), 103–108.

Rott, E. (1981). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie*, 43(1), 34–62.

Salmaso, N. (2000). Factors affecting the seasonality and distribution of cyanobacteria and chlorophytes: A case study from the large lakes south of the Alps, with special reference to Lake Garda. *Hydrobiologia*, 438, 43–63.

Santos, A. C. A. Dos, & Calijuri, M. C. (1998). Survival strategies of some species of the phytoplankton community in the Barra Bonita Reservoir (São Paulo , Brazil), 367, 139–152.

- Schembri, M. A., Neilan, B. A., & Christopher, P. (2001). Identification of Genes Implicated in Toxin Production in the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 16, 413–421.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). A Mathematical Theory of Communication. *University of Illinois Press*, 117.
- Shirai, M., Ohtake, A., Sano, T., Matsumoto, S., Sakamoto, T., Sato, A. Nakano, M., Tokujiro, A., Ken-Ichi, H., Shimada, T. & Suzuki, M & Nakano, M. (1991). Toxicity and Toxins of Natural Blooms and Isolated Strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and Improved Procedure for Purification of Cultures. *Applied and environmental microbiology*, 57(4), 1241–1245.
- Soares, M. C. S., Huszar, V. L. M., Miranda, M. N., Mello, M. M., Roland, F., & Lüring, M. (2013). Cyanobacterial dominance in Brazil: Distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*, 717(1), 1–12.
- Sommer, U. (1993). Disturbance-diversity relationships in 2 lakes of similar nutrient chemistry but contrasting disturbance regimes. *Hydrobiologia*, 249, 59–65.
- Sommer, U., Gliwicz, Z. M, Lampert, W. & Duncan, A. (1986). The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie*, 106, 433–471
- Sunda, W.G., Price, N.M. & Morel, F.M.M. (2005) Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In *algal Culturing techniques* (R.A. Andersen, ed.). Elsevier academic Press, london, 35-64
- Tanoi, T., Kawachi, M., & Watanabe, M. M. (2014). Iron and glucose effects on the morphology of *Botryococcus braunii* with assumption on the colony formation variability. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1–8.
- Te, S. H., Chen, E. Y., & Gin, K. Y. H. (2015). Comparison of quantitative PCR and droplet digital PCR multiplex assays for two genera of bloom-forming cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5203–5211.
- Tilman, D. (1977). Resource competition between plankton algae, an experimental and theoretical approach. *Ecology*, 58(2), 338–348.
- Tilzer, M. M., & Goldman, C. R. (1978). Importance of Mixing, Thermal Stratification and Light Adaptation for Phytoplankton Productivity in Lake Tahoe (California-Nevada). *Ecological Society of America*, 59(4), 810–821.
- Tonetta, D., Petrucio, M. M., & Laudaes-silva, R. (2013). Temporal variation in phytoplankton community in a freshwater coastal lake of southern Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25(1), 99–110.
- Trollope, D. R., & Evans, B. (1976). Concentrations of copper, iron, lead, nickel and zinc in freshwater algal blooms. *Environmental Pollution*, 11, 109–116.

- Tucci, A., & Sant'Anna, C. L. (2003). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(1), 97–112.
- Turner, S.; Pryer, K.M.; Miao, V.P.W.; Palmer, J.D (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46 (4), 327–338.
- Utermöhl. (1958). Vervollkomnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 9, 1–38.
- Vanderploeg, H. A., Liebig, J. R., Carmichael, W. W., Agy, M. A., Johengen, T. H., Fahnenstiel, G. L., & Nalepa, T. F. (2011). *Zebra mussel* (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie . *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(6), 1208–1221.
- Vázquez, G., Jiménez, S., Favila, M. E., & Martínez, A. (2005). Seasonal dynamics of the phytoplankton community and cyanobacterial dominance in a eutrophic crater lake in Los Tuxtlas, Mexico. *Écoscience*, 12(4), 485–493.
- Walsby, A. E. (1994). Gas Vesicles. *Microbiological reviews*, 58(1), 94–144.
- Watson, S. B., McCauley, E., Dowing, J. (1997). Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of different trophic status. *Limnology and Oceanography*, 42(3), 487–495.
- Whitton, B. A., & Kelly, M. G. (1995). Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Australian Journal of Ecology*, 20, 45–56.
- Winder, M., & Hunter, D. A. (2008). Temporal organization of phytoplankton communities linked to physical forcing. *Oecologia*, 156, 179–192
- Wiese, M., Agostino, P. M. D., Mihali, T. K., & Moffitt, M. C. (2010). Neurotoxic Alkaloids : Saxitoxin and its Analogs. *Marine Drugs*, 8, 2185–2211
- Wood, S. A., Stirling, D. J. (2003). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research First identification of the cylindrospermopsin - producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37, 821–828.
- Yin, Q., Carmichael, W. W., & Evans, W. R. (1997). Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *Journal of Applied Phycology*, 9, 55–63.