

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e**  
**Manejo da Vida Silvestre**

**Composição da comunidade de  
cianobactérias e outros grupos  
microbianos em dois reservatórios  
tropicais**

**Ana Maria Moreira Batista Lopes**

**Belo Horizonte**  
**2013**

**Ana Maria Moreira Batista Lopes**

**Composição da comunidade de  
cianobactérias e outros grupos  
microbianos em dois reservatórios  
tropicais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Orientadora: Dra. Alessandra Giani

**Belo Horizonte  
2013**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar, fortalecer e direcionar meus passos.

Ao meu esposo, Wendell, pelo apoio incondicional, pela compreensão e pelo exemplo de pesquisador dedicado, curioso e sempre empolgado com os vários campos do conhecimento.

Às minhas amadas mãe e irmã, pelo carinho, amor e apoio.

Aos meus sogros, pelo suporte nos momentos de dificuldade e por acreditarem na minha capacidade.

Às minhas amigas de infância e adolescência, Elaine, Aline e Mariana, por entenderem minha “crônica” ausência, e mesmo assim não desistirem de mim!

À minha amiga Graziella, pelas longas conversas, risadas, lágrimas e confidências; com certeza teria sido muito mais difícil sem seu apoio.

À minha orientadora, professora Dra. Alessandra Giani, pelo suporte teórico, prático e técnico, por saber direcionar meus passos e por ter paciência com minha ansiedade de finalizar as tarefas.

Ao professor Dr. Hans-Peter Grossart, do *Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries* (IGB/Alemanha), por me receber para o estágio sanduíche com tanto carinho e solicitude, e a toda equipe do IGB, pelos valiosos ensinamentos durante minha permanência na Alemanha.

Ao pessoal do laboratório de Ficologia: Alessandra, Elenice, Cleber, Jú, Val, Deborah, Fê, Naíla, Arthur, Danieis, Marcelle, Simone, Bruna, Maria, Priscilla e Pedro, pela valiosa ajuda durante estes quatro anos, pela compreensão nos meus picos de estresse e pelos momentos divertidos!

À CEMIG/Fundep, pela bolsa de pesquisa e pela disponibilização de verba e recursos para execução do projeto, e à Capes, pela bolsa PDSE.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Minas Gerais - DESA: Grazi, Cíntia, Aline, Luciana, Cristina, Izabel, Marcela, Vitor e Renata, por me cederem espaço e pelo auxílio. Em especial à querida Érika, por me ajudar com o DGGE e toda parte da biomol, por me ensinar a desmistificar essa área da ciência e ser sempre tão otimista quando eu estava pessimista. À professora Juliana Calabria, por ceder seu laboratório para execução de grande parte deste trabalho.

À Fabiana, pela valiosa ajuda com as análises estatísticas. Ao Cleber Chaves e Danilo Neves, pelo auxílio com o programa R.

À minha querida amiga Lenora, exemplo de pesquisadora e ser humano. Ao meu amigo Cleber, pelo auxílio incondicional desde minha entrada no doutorado, com as aulas para prova teórica, e durante todo o curso, me auxiliando, ouvindo e direcionando. À Bruna, pela ajuda nas coletas de Volta Grande e por ter se tornado uma amiga querida. Todos vocês contribuíram para a finalização deste projeto, Obrigada!

## RESUMO

A diversidade do fitoplâncton em ambientes aquáticos é um importante indicador da qualidade da água e também das relações ecológicas estabelecidas no ambiente. A correta avaliação dessa diversidade é de grande importância nos estudos ecológicos, assim como na tomada de medidas de intervenção, caso sejam necessárias. Dentro do fitoplâncton, o grupo das cianobactérias tem recebido especial atenção, devido à sua capacidade de crescer e dominar em ambientes aquáticos eutrofizados, além da potencial toxicidade de algumas espécies, o que pode dificultar, ou até mesmo inviabilizar, o uso da água para fins de recreação e potabilidade.

Durante muitos anos a avaliação da diversidade de cianobactérias em ambientes aquáticos focou-se na classificação taxonômica tradicional, que tem como base as características morfológicas do grupo. Porém esse método é complexo, por ser a variabilidade morfológica das colônias muito grande, o que dificulta a definição dos limites entre as espécies. Consequentemente, cada vez mais têm sido utilizadas técnicas moleculares que auxiliem na identificação das cianobactérias, assim como de outros grupos microbianos, contribuindo para caracterização da composição de comunidades microbianas em ambientes aquáticos, pois essas técnicas complementam as informações obtidas por técnicas tradicionais, maximizando a descrição do ambiente.

No presente estudo foi avaliada a composição da comunidade de cianobactérias, e suas mudanças sazonais e espaciais em dois reservatórios localizados em Minas Gerais (Pampulha e Volta Grande), além de ter sido feito um estudo preliminar sobre a presença de outras bactérias e arqueias nesses ambientes e sobre a possível associação entre as cianobactérias e estes dois grupos microbianos.

O reservatório da Pampulha localiza-se no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. O principal problema desse reservatório é a contínua entrada de esgotos

domésticos e industriais, que aumentam o aporte de nutrientes e, conseqüentemente, a eutrofização e a floração de cianobactérias.

O reservatório de Volta Grande está situado no baixo Rio Grande, entre os estados de Minas Gerais e São Paulo. Devido às correntezas e à sua elevada capacidade de diluição, Volta Grande pode ainda ser caracterizado como um reservatório oligotrófico (Greco 2002).

Para realização deste estudo, utilizou-se a técnica de identificação e contagem das espécies de cianobactérias por microscopia tradicional (Utermöhl 1958), associada ao uso da técnica molecular PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer et al. 1993). Os resultados evidenciaram que as técnicas são complementares e contribuem para uma visão mais completa da composição da comunidade das cianobactérias nos dois ambientes. A mesma técnica molecular foi utilizada para o estudo de microrganismos dos grupos Bacteria e Archaea, com iniciadores específicos para esses organismos.

Os resultados obtidos evidenciaram: a) a alta dominância de cianobactérias durante todo o período de estudo no reservatório da Pampulha; b) a presença de cianobactérias, principalmente do grupo das picocianobactérias, no reservatório de Volta Grande; e c) a elevada diversidade de organismos do domínio Archaea, mais especificamente do grupo das arqueias metanogênicas, nas amostras dos reservatórios e em culturas de cianobactérias.

Palavras-chave: Composição, comunidade, cianobactérias, arqueias e bactérias, reservatórios, eutrofização, oligotrofia.

## ABSTRACT

The diversity of phytoplankton in aquatic environments is an important indicator of water quality and of ecological relationships established in environment. The accurate assay of this diversity is of great importance in ecological studies as well as in any recovery action, when needed. Within the phytoplankton, the group of cyanobacteria has received special attention due to the ability of these organisms to grow and dominate in eutrophic freshwater ecosystems, as well as the potential toxicity of some species that may hinder or even prevent the use of water for recreational and drinking purposes.

For several years the cyanobacteria diversity in aquatic environments has been assessed primarily using traditional taxonomic methods, which are based on morphological characteristics. However because of the large morphological variability of the colonies, it can be difficult to define the boundaries between species, hampering the use these methods. Thus, the use of molecular techniques has increased to assist in the identification of cyanobacteria, as well as other microbial groups, contributing to the characterization of microbial communities in aquatic environments, maximizing the information needed for the description of the environment.

In this study we evaluated the composition of the cyanobacteria community and its seasonal and spatial changes in two reservoirs located in Minas Gerais (Pampulha and Volta Grande), in addition to a preliminary study on the presence of other bacteria and arquea in these same environments and on the possible association between cyanobacteria and these two microbial groups.

Pampulha reservoir is located in Belo Horizonte city, Minas Gerais. The main problem of this reservoir is the continuous input of domestic and industrial sewage,

which increases the supply of nutrients with the consequent increase in eutrophication and cyanobacterial blooms.

Volta Grande Reservoir is located in the Rio Grande river, between the states of Minas Gerais and São Paulo. Due to its low retention time and high dilution rate, Volta Grande can still be characterized as an oligotrophic reservoir (Greco 2002).

In this study, the identification and enumeration of cyanobacteria species was made by traditional microscopy (Utermöhl 1958), associated with the molecular technique PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer et al. 1993). The results showed that these techniques are complementary and help giving a more complete picture of the cyanobacteria community composition in both environments. Using specific primers, the same molecular technique was used for the study of microorganisms from the Bacteria and Archaea groups.

The results showed: a) high dominance of cyanobacteria during the whole study period in Pampulha reservoir; b) presence of cyanobacteria, mainly belonging to picocyanobacteria, in Volta Grande reservoir; c) high diversity of organisms of the Domain Archaea, more specifically the group of methanogenic archaea, in samples of both reservoirs and in cyanobacterial cultures.

**Keywords:** Cyanobacteria, community, composition, archaea and bacteria, reservoirs, eutrophication, oligotrophy.

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 A IMPORTÂNCIA DO MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 A UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 A INVESTIGAÇÃO DE OUTROS GRUPOS MICROBIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM CIANOBACTÉRIAS .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....</b>	<b>19</b>
<b>3. ÁREA DE ESTUDO.....</b>	<b>20</b>
<b>4. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO.....</b>	<b>21</b>
<b>5 CAPÍTULO 1 - Permanent cyanobacteria dominance in a tropical hypereutrophic reservoir: molecular and morphological characterization .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Introduction.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Materials and methods .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2.1 Sampling .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2.3 Nucleic acid extraction .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.4 PCR, DGGE and sequencing .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.7 Nutrients .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.8 Thermal resistance of the water.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.9 Statistical methods .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 Results.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3.1 Morphological characterization and succession dynamics of cyanobacteria.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3.2 Temporal variations of cyanobacteria community by DGGE .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3.3 Environmental variables .....</b>	<b>43</b>
<b>5.4 Discussion .....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Acknowledgements .....</b>	<b>54</b>
<b>5.6 References.....</b>	<b>54</b>
<b>6 CAPÍTULO 2 - Variação espacial e temporal da comunidade de cianobactérias em um reservatório tropical oligotrófico: a dominância das picocianobactérias .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1 Introdução .....</b>	<b>59</b>
<b>6.2 Material e métodos.....</b>	<b>62</b>
<b>6.2.1 Coleta das amostras .....</b>	<b>62</b>
<b>6.2.2 Análises microscópicas .....</b>	<b>64</b>
<b>6.2.3 Extração de ácido nucleico.....</b>	<b>64</b>
<b>6.2.4 PCR, DGGE e sequenciamento.....</b>	<b>64</b>
<b>6.2.5 DGGE.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2.6 Análises filogenéticas das sequências de DGGE.....</b>	<b>66</b>
<b>6.2.7 Variáveis físicas e químicas.....</b>	<b>66</b>
<b>6.2.8 Métodos estatísticos .....</b>	<b>66</b>
<b>6.3 Resultados.....</b>	<b>67</b>



6.3.1	Variação espacial e temporal da comunidade de cianobactérias.....	67
6.3.2	Diversidade molecular de populações de picocianobactérias.....	70
6.3.3	Análises físicas e químicas.....	75
6.4	Discussão.....	78
6.5	Agradecimentos.....	84
6.6	Referências.....	85
7	<b>CAPÍTULO 3 - Diversidade microbiológica em dois reservatórios tropicais e sua possível associação com cianobactérias.....</b>	<b>90</b>
7.1	Introdução.....	90
7.2	Material e métodos.....	92
7.2.1	Área de estudo.....	92
7.2.2	Amostras de culturas.....	94
7.2.3	Extração de DNA.....	95
7.2.4	PCR.....	96
7.2.5	DGGE e sequenciamento.....	96
7.2.6	Análises filogenéticas das sequências de DGGE.....	97
7.2.7	Métodos estatísticos.....	98
7.3	Resultados.....	98
7.3.1	Composição da comunidade bacteriana (CCB) em amostras de campo e de cultivo e sua associação com cianobactérias.....	98
7.3.2	Composição da comunidade de arqueias em amostras de campo e de cultivo e sua associação com cianobactérias.....	102
7.3.3	Associação microbiana com cepas de cianobactérias em culturas e similaridade filogenética.....	104
7.4	Discussão.....	109
7.5	Agradecimentos.....	113
7.6	Referências.....	113
7.7	Informações complementares.....	117
8	Conclusão geral.....	120
9	Anexos.....	124

## 1 – INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 A IMPORTÂNCIA DO MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

A partir do século XX, período em que se evidenciou a eutrofização das águas continentais e marinhas por causa do aumento excessivo da concentração de nutrientes nesses ambientes, principalmente nitrogênio e fósforo, houve a proliferação incontrolável de cianobactérias (Smith et al. 2006). Os despejos de esgotos domésticos, industriais e agrícolas nos cursos d'água são considerados os principais causadores desse fenômeno, a qual, conseqüentemente, leva às florações ou blooms de cianobactérias (Newcombe et al. 2012).

As cianobactérias pertencem ao domínio Bacteria, realizam fotossíntese oxigênica usando os fotossistemas I e II (PSI e PSII). Apesar de não serem as únicas bactérias fototróficas, são as únicas que possuem os dois sistemas PSI e PSII completos e, geralmente, são os microrganismos fototróficos bacterianos dominantes na coluna d'água (Yannarell & Kent 2009).

Elas possuem distribuição cosmopolita e tendem a dominar em ambientes aquáticos com elevadas temperaturas e disponibilidade de nutrientes. Podem se agregar em colônias esféricas, ovóides ou filamentosas e se distribuem na coluna d'água, de acordo com a disponibilidade de luz (Chorus & Bartram 1999).

As vantagens competitivas de alguns gêneros de cianobactérias, como a capacidade de flutuar devido à presença de vesículas gasosas, a habilidade de fixação de  $N_2$  por células especializadas (heterocitos) e a formação de colônias, são fatores que favorecem a formação dos blooms (Shapiro 1973; Reichwaldt & Ghadouani 2012).

Dentro desse contexto, surge a importância dos programas de monitoramento nos ambientes aquáticos, principalmente em águas destinadas ao abastecimento, pois os

florações constituem sério problema à saúde pública, uma vez que alguns gêneros de cianobactérias são potenciais produtores de substâncias neurotóxicas, hepatotóxicas ou dermatotóxicas, colmatam filtros e alteram o odor e o sabor da água tratada (Chorus & Bartram 1999; Carmichael et al. 2001).

Em vista disso, a Portaria do Ministério da Saúde – MS 2914/2011 – definiu normas-padrão de potabilidade de água para consumo humano no Brasil, incluindo a obrigatoriedade do monitoramento da ocorrência de gêneros de cianobactérias potencialmente nocivas e cianotoxinas m água bruta, e definiu planos de amostragem de acordo com a concentração de células na água (Capítulo VI, Art. 40 § 1º).

Para o adequado monitoramento da qualidade da água torna-se de extrema importância a caracterização da composição da comunidade de cianobactérias. A classificação taxonômica separa o grupo (Cyanobacteria) em três ordens: Chroococcales, Nostocales e Oscillatoriales (Gugger & Hoffman 2004), porém a correta caracterização requer, além de conhecimento taxonômico, que outros aspectos sejam considerados, para que o elevado número de espécies da comunidade de interesse seja identificado de forma completa, uma vez que essas espécies exibem ampla faixa de variações morfológicas (Knoll 2008).

## 1.2 A UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS

A taxonomia de cianobactérias iniciou-se em 1753, com Carolus Linnaeus, que as identificou como formas “menos complexas”, conhecidas naquele tempo como algas-azuis pela nomenclatura botânica. O sistema taxonômico desenvolvido durante o século XIX é quase inteiramente baseado na morfologia, e o Código Internacional de Nomenclatura Botânica considera vários trabalhos publicados durante o período de 1886 a 1892 como o ponto de partida para publicação válida de nomes de formas

filamentosas. A Tabela 1 apresenta um histórico da taxonomia de cinaobactérias a partir de 1929 até 2001.

Tabela 1 - Breve histórico da taxonomia de cianobactérias.

<b>Ano de Publicação</b>	<b>Autor e Descrição</b>
(1929 a 1933)	Frémys descreveu sua primeira experiência com a flora do Equador (1929) e marinha (1933).
(1932)	Geitler fez uma descrição focada na Europa Central, mas de grande importância para todo o mundo.
(1956)	Drouet e Daily fizeram uma série de monografias sobre o tema, revisando a nomenclatura desde 1890.
(1959)	Desikachary's descreveu a flora da Índia, sem muita repercussão porque não foi escrita em inglês.
(1960-1970)	Simplificação da nomenclatura, baseada na revisão feita por Drouet em 1956, que usou poucos caracteres morfológicos para classificação, reduzindo mais de 2.000 espécies em apenas 62.
(1970)	Revisões foram feitas por Komárek, mas publicadas apenas em alemão.
(1971)	Rippaka separou a divisão Cyanobacteria em quatro ordens (Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales e Stignomatales).
(1978)	Stanier et al. propuseram inserir as cianobactérias sob o Código Internacional de Nomenclatura de Cianobactérias. Mas alguns gêneros foram descritos primeiro pelo Código de Bactérias e depois revisados pelo Código Botânico. Aproximadamente 113 caracteres são observados para descrição de uma espécie.
(1998-1999)	Komárek e Anagnostidis publicaram novas revisões na língua inglesa.
(1999)	Komárek e Anagnostidis publicaram um volume único que reduz os problemas do grupo Chroococcales.
(2000)	Whitton et al. registraram informações sobre 320 sp. das ilhas britânicas.
(2001)	Castenholz publica o manual Bergey de Sistemática Bacteriológica

Adaptado de Whitton & Potts (2000); Castenholz (2001).

O breve histórico apresentado na Tabela 1 ilustra o progresso da identificação das cianobactérias com base na caracterização morfológica (Komárek & Komárková

2002; Knoll 2008). Em síntese, as características morfológicas mais utilizadas para a identificação das cianobactérias são: forma, polaridade, dimensões, planos de divisão, coloração, bainha e motilidade. A observação de estruturas de especialização como heterocitos, acinetos, baeocitos, e necrídeos, ou de ultraestruturas como a organização dos tilacoídes, estrutura da parede celular, vesículas de gás e estrutura da bainha, também é de grande utilidade. Fatores como a fisiologia e bioquímica do grupo, que se baseiam na descrição de características como pigmentação, temperatura ótima de crescimento, pH, salinidade, formas de nutrição (químio/fotoheterotrófica, diazotrófica) e composição lipídica, também são utilizados (Castenholz 2001).

Os caracteres morfológicos são os mais usados em análises de rotina, uma vez que as amostras utilizadas para quantificação ao microscópio são sempre preservadas com fixadores próprios e algumas características, como a pigmentação, são observáveis apenas em amostras *in vivo*. Fatores bioquímicos e fisiológicos, como a temperatura e salinidade ótimas de crescimento e o pH, apenas podem ser observados se a espécie for isolada do ambiente e cultivada.

Para auxiliar na caracterização da comunidade de cianobactérias, alguns métodos moleculares usados para estudos taxonômicos de bactérias têm sido aplicados. Essas técnicas incluem: hibridização DNA:DNA (Wilmotte et al. 1997), *fingerprinting*, baseada na PCR com iniciadores específicos para o grupo de interesse (Rasmussen & Svenning 1998), classificação de cultura de clones baseada em sequências do 16S rRNA de regiões variáveis (Rudi et al. 1997) e análises de restrição do DNA ribossomal (Scheldeman et al. 1999).

Por ser bastante conservado e presente em todos os seres vivos, o gene 16S rRNA é muito usado em estudos de diversidade e composição de comunidades microbianas em diversos ambientes (Nübel et al. 1997; Garcia-Pichel et al. 2001). A

crítica ao uso desse gene é pelo fato de, por ser conservado, nem sempre ele fornece boa resolução em nível específico, uma vez que suas sequências RNA também são conservadas de acordo com suas funções, não variando suficientemente para que se possa diferenciar uma espécie e uma subespécie.

Por outro lado, o sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizado rotineiramente em taxonomia de procariotos, fornece dados mais robustos para construção de afiliações filogenéticas, sendo excelente alternativa para identificação taxonômica (Yannarell & Kent 2009). Esse gene pode ser utilizado na caracterização de comunidades microbianas, inclusive se aliado às técnicas moleculares de *fingerprinting*, que são agora amplamente adotadas no campo da ecologia bacteriana por permitir a análise simultânea de várias amostras (Ferrari & Hollibaugh 1999).

Outros genes têm sido descritos como alvo alternativo para análise de filogenia e estrutura da comunidade de cianobactérias, entre os quais podem ser destacados os genes: *hetR*, que está envolvido na diferenciação do heterocito (Janse et al. 1998); o gene *nifH*, que é responsável pela codificação da proteína do ferro da nitrogenase, sendo altamente conservado (Zehr & McReynolds 1989); o operon da ficocianina (PC), um pigmento acessório específico, e seu espaço intergênico (PC-IGS) entre as subunidades  $\beta$  (*CpcB*) e  $\alpha$  (*CpcA*) (Neilan et al. 1995); e os genes *mcy*, envolvidos na biossíntese da microcistina (Kurmayer et al. 2002).

O uso desses genes, embora seja uma boa alternativa, também possui limitações. O espaço intergênico (ITS), por exemplo, possui operons rRNA não múltiplos e não idênticos. Portanto, estudos que dependem da amplificação da região ITS podem enfrentar o problema de amplificação preferencial de alguns operons (Boyer et al. 2001). Além disso, há limitação da disponibilidade de dados de sequências de genes

específicos das cianobactérias nos bancos de dados, o que dificulta a identificação taxonômica por comparação.

Um desses métodos é a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), criado em 1989 com o objetivo inicial de detectar mutações no DNA humano (Sheffield et al. 1989), e introduzido em 1993 na ecologia microbiana molecular por Muyzer et al. com o objetivo de avaliar a diversidade microbiológica de biofilmes isolados de reatores de tratamento de esgoto.

A técnica envolve a separação de segmentos de DNA de comprimento igual, porém de diferentes sequências, em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente de desnaturante químico composto por ureia e formamida. A separação baseia-se em diferenças nas características de deslocamento (*melting*) dos segmentos de cadeia dupla, que são, por sua vez, dependentes de diferenças nas sequências. O resultado é a detecção simultânea de moléculas de 16S rRNA como um padrão de bandas. O perfil de *melting*, específico para cada genótipo, gera, então, uma impressão digital (*fingerprinting*) com perfil da diversidade da comunidade de interesse (Muyzer & Smalla 1998).

Desde seu primeiro uso na ecologia microbiana há cerca de 20 anos (Muyzer et al. 1993), o DGGE já foi utilizado para caracterização da diversidade de comunidades microbianas de sedimentos marinhos (Roselló-Mora et al. 1999), da comunidade de picoplâncton marinho (Díez et al. 2001), de cianobactérias em lagos eutróficos (Zwart et al. 2005; Rajaniemi-Wacklin et al. 2008; Tian et al. 2009) e oligotróficos (Jasser et al. 2013), em campos de arroz (Galhano et al. 2011) e de outros diversos grupos microbianos nos mais distintos ambientes naturais.

Entretanto, em virtude de algumas limitações inerentes ao método de DGGE, como a detecção mais segura apenas das principais populações (que tenham valores

acima de 1%-1,6% na comunidade geral) (Muyzer et al. 1993), é necessária a aplicação de metodologias polifásicas, isto é, que abrangem mais de uma técnica (Vandamme et al. 1996).

Furtado et al. (2009), Heath et al. (2010) e Galhano et al. (2011) fizeram uso de metodologias moleculares em combinação com técnicas tradicionais de identificação por microscopia, e afirmaram que os resultados entre a identificação morfológica e análises filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA eram congruentes e complementares na grande maioria das amostras testadas, o que evidencia a importância da inclusão de outras técnicas na caracterização da comunidade de cianobactérias, cujo método de identificação morfológica, conforme mencionado, é bastante complexo.

### 1.3 A INVESTIGAÇÃO DE OUTROS GRUPOS MICROBIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM CIANOBACTÉRIAS

Em ambientes aquáticos, os procariotos podem ser de vida livre, estar associados a partículas e outros organismos, ou generalistas, podendo viver das duas formas (Grossart et al. 2006). As bactérias encontradas livres na coluna d'água, compõem o bacterioplâncton, que por sua vez é constituído pelos organismos procariotos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea (Kirchman 2012).

As bactérias são organismos unicelulares, procariotos; possuem morfologia cocoide (arredondada), cilíndrica (bacilos) ou em forma de vírgula (vibriões); e podem estar sozinhos ou em colônias. O bacterioplâncton tem papel importante no metabolismo dos ecossistemas aquáticos, pois as diversas espécies de bactérias e arqueias participam de diversas reações biogeoquímicas que ocorrem na água (Kirchman 2012).

Sabe-se que as bactérias e arqueias ocupam reinos distintos. O domínio Archaea foi separado do domínio Bacteria (*true bacteria*) na década de 1970, por Woese et al.



que se basearam em características bioquímicas de composição da parede e membrana celular, como também no fato de as arqueias possuírem RNA polimerases (enzimas responsáveis pela síntese de enzimas polimerases) mais complexas e vias metabólicas incomuns às bactérias.

As arqueias têm ampla diversidade metabólica e são adaptadas a vários ambientes inóspitos, como fontes geotermiais (hipertermófilos), habitat com elevada salinidade (hiperhalófilos), solos e sistemas aquáticos altamente ácidos (termoacidófilos) ou alcalinos e ambientes anóxicos naturais – sedimentos aquáticos profundos, pântanos, trato digestivo de ruminantes, animais endotérmicos e alguns insetos, digestores anaeróbios de tratamento de resíduos e de efluentes e aterros sanitários (Vazoller et al. 1999).

Citam-se como exemplos as arqueias metanogênicas (termoacidófilas), que participam da decomposição anaeróbia final da matéria orgânica por duas vias: 1) produzem o metano e  $\text{CO}_2$  a partir da redução do acetato (fermentação), processo realizado pelas arqueias metanogênicas acetoclásticas; ou 2) reduzem o  $\text{CO}_2$  a metano e usam  $\text{H}_2$  como doador de elétrons e liberam  $\text{H}_2\text{O}$ , processo em que as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas atuam (Whitman et al. 1992).

As arqueias metanogênicas também têm sido relatadas na coluna d'água oxigenada, o que caracteriza um paradoxo, pois a metanogênese acontece principalmente em ambientes anóxicos (Grossart et al. 2011; Dziallas & Grossart 2012).

As pesquisas sobre esse grupo enfocam, por exemplo, a importância funcional das arqueias nesses ecossistemas, sua atuação nos processos biogeoquímicos em ambientes não extremos (Yu et al. 2005) e também a composição das comunidades (Farjalla et al. 2011).

Além disso, é importante avaliar a comunidade microbiana que não está livre na coluna d'água, mas associada a outros microrganismos. As interações microbianas com cianobactérias são pouco entendidas, mas seu potencial para controlar o desenvolvimento de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas tem sido sugerido (Rashidan & Bird 2001; Dziallas & Grossart 2011).

O estabelecimento das associações pode se dar por várias rotas ecológicas (Grossart et al. 2006), sendo a simbiose bastante comum entre bactérias e cianobactérias, por exemplo, onde as bactérias podem auxiliar na remineralização de exudatos (Kirkwood et al. 2006), na degradação ou produção de toxinas (Dziallas & Grossart 2011), aumentando a disponibilidade de dióxido de carbono durante a respiração (Kühl et al. 1996), e na produção de fatores de crescimento, como vitaminas (Paerl & Pinckney 1996).

Em contrapartida, as cianobactérias fornecem um micro-habitat único, denominado ficosfera (*phycosphere*), aumentando as concentrações de substratos orgânicos (Cole 1982; Worm & Sondergaard 1998), e, devido aos vacúolos de gás, são capazes de manter as bactérias em profundidades distintas na coluna d'água, onde as variáveis ambientais estiverem favoráveis, além de aumentar a resistência contra a predação, por causa da mucilagem e do tamanho da colônia (Casamatta & Wickstrom 2000). As interações das bactérias com outros organismos podem afetar profundamente a estrutura e a dinâmica da comunidade bacteriana (Yannarell & Kent 2009).

Como estudos da composição da comunidade bacteriana são escassos em ambientes aquáticos brasileiros, principalmente se forem consideradas a extensão do território, a abundância de rios, lagos e reservatórios e o grande número de trabalhos realizados com outras comunidades de microrganismos aquáticos, como o fitoplâncton e

o zooplâncton (Farjalla et al. 2011), ampliar a caracterização incluindo esses grupos agrega valioso conhecimento à estrutura dos ambientes aquáticos.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

O objetivo geral desta pesquisa foi caracterizar a composição e a dinâmica sazonal da comunidade de cianobactérias nos reservatórios Pampulha e Volta Grande.

Os objetivos específicos foram:

1. Investigar a diversidade taxonômica, no nível morfológico, das cianobactérias e entender sua variação sazonal.
2. Investigar a diversidade molecular da comunidade de cianobactérias e compará-la com a diversidade morfológica.
3. Conhecer as características físicas e químicas da água e sua influência na composição e na dinâmica do grupo Cyanobacteria.
4. Caracterizar a composição da comunidade microbiana (bactérias e arqueias) em ambos os reservatórios e sua possível associação à comunidade de cianobactérias.

As seguintes hipóteses foram testadas:

- I. Em um ambiente altamente eutrofizado haverá maior possibilidade de dominância de cianobactérias potencialmente tóxicas.
- II. Um ambiente menos rico em nutrientes apresentará uma comunidade fitoplanctônica onde a maioria das espécies de cianobactérias, se presentes, irá pertencer a gêneros picoplanctônicos.
- III. A diversidade morfológica da comunidade de cianobactérias poderá ser distinta da diversidade molecular, e ambas serão complementares.
- IV. É possível detectar outros microrganismos nesses ambientes potencialmente associados às cianobactérias, como bactérias e arqueias.

### 3. ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho teve dois cenários distintos como áreas de estudo: (A) reservatório da Pampulha, com elevada concentração de nutrientes e escassez de luz, ocasionada pela elevada turbidez, o que favorece a predominância de cianobactérias típicas de ambientes eutrofizados durante todo o período de monitoramento; e (B) reservatório de Volta Grande, com baixa concentração de nutrientes e elevada disponibilidade de luz em toda coluna d'água, favorecendo a ocorrência de grupos de cianobactérias com menores exigências nutricionais.

O reservatório da Pampulha, popularmente conhecido por Lagoa da Pampulha, foi inaugurado na década de 1940, pelo então prefeito de Belo Horizonte (MG) Juscelino Kubstschek. A área foi intensamente utilizada por banhistas em atividades recreacionais e até mesmo para fins mais nobres como o abastecimento público de água até meados de 1980, quando a descarga de efluentes domésticos e principalmente industriais no reservatório inviabilizou seu uso, que atualmente é apenas turístico e paisagístico (Giani, 1994; Pinto-Coelho 1998, Coutinho 2007). Medidas de intervenção, como a construção de uma Estação de Tratamento de Águas Fluviais (ETAF-Pampulha), foram tomadas há cerca de dez anos, mas ainda não se mostraram suficientes na revitalização da qualidade da água (Coutinho 2007; Figueredo et al. submetido).

O reservatório de Volta Grande foi construído em 1974. Em sua bacia, cuja área é de 7.305 km<sup>2</sup>, vivem aproximadamente 34.5000 habitantes, a maioria em áreas urbanas. Apesar dessa alta concentração urbana, a atividade agrícola existente na bacia é muito intensa, ocupando mais de 50% da área total dos municípios (CETESB 1976). Embora do ponto de vista limnológico seja um reservatório, Volta Grande possui pontos caracterizados como lênticos, mas também pontos lóticos, e tem como

característica marcante o baixo tempo de residência da água, o que provavelmente auxilia na diluição de compostos afluentes ao reservatório e manutenção do seu baixo grau de trofia (Greco 2002).

#### 4. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

No presente estudo foram utilizadas duas ferramentas para classificação das cianobactérias nos dois ambientes: (i) caracterização morfológica, por meio de chaves taxonômicas (Anagnostidis & Komárek (1988), Komárek & Anagnostidis (1989, 1999, 2005), Sant'anna & Azevedo (1989, 2000) Azevedo & Sant'anna (2003), Bicudo & Menezes (2006), e posterior contagem em câmara de sedimentação, desenvolvida por Üthermol em 1931 e revisada em 1958, e (ii) DGGE, após posterior amplificação de um fragmento específico do gene 16S rRNA das cianobactérias (Nübel et al. 1997).

Utilizou-se também o DGGE para avaliar a composição da comunidade microbiana (Bacteria e Archaea), com o intuito de obter uma caracterização microbiológica mais completa dos ambientes de estudo.

Os resultados deste estudo geraram três manuscritos. O primeiro (*A permanente dominância de cianobactérias em um reservatório hipereutrófico: caracterização morfológica e molecular*), apresentado no capítulo 1 da tese, evidenciou que a acentuada eutrofização do reservatório da Pampulha tem proporcionado, ao longo dos últimos anos, a dominância e a sucessão entre duas espécies de cianobactérias; (i) *Cylindrospermopsis raciborskii*, espécie potencialmente tóxica e que pode dominar por muito tempo sobre os demais grupos fitoplanctônicos (Lagos et al. 1999, McGreggor & Fabbro 2000), e (ii) *Sphaerocavum brasiliense*, espécie descrita por Sant'Anna et al. (2004), com ocorrência relatada apenas no Brasil e no Uruguai, conhecida até agora por sua toxicidade baixa ou ausente.

A ocorrência de florações persistentes ao longo de todo ano no reservatório da Pampulha apresentou sucessão sazonal entre *C. raciborskii*, dominante entre os meses chuvosos de outubro a março, e *S. brasiliense*, mais frequente nos meses de seca, de abril a setembro. Dentre as variáveis que poderiam justificar essa dominância de duas espécies de ordens distintas, podem ser citadas a estratificação e a desestratificação da coluna d'água, além dos elevados valores de temperatura e nutrientes durante todo o período de estudo.

Seguindo a mesma linha, no segundo manuscrito (*Variação espacial e temporal da comunidade de cianobactérias em um reservatório tropical oligotrófico: a dominância das picocianobactérias*), apresentado no capítulo 2, constata-se que no reservatório de Volta Grande houve acentuada dominância das picocianobactérias, um grupo de cianobactérias constituído por gêneros de tamanho reduzido, medindo entre 0,2 e 2µm de diâmetro (Sieburth et al. 1978), e de ocorrência ampla em ambientes com baixas concentrações de nutrientes, como oceanos abertos e lagos oligotróficos (Kirchman 2012).

Volta Grande possui baixas concentrações de nutrientes (P e N), o que pode ser explicado pelo pouco tempo de detenção da água, uma vez que o reservatório possui pontos caracterizados como lóticos, e outros como lênticos (Greco 2002), características que aumentam a capacidade de diluição de poluentes que chegam ao reservatório. Além disso, nos pontos lóticos há relativa dificuldade de estabelecimento do fitoplâncton.

A coluna d'água apresentou-se transparente ao longo de todo o monitoramento, isto é com elevados valores de disco se Secchi, (entre janeiro e dezembro de 2011), nas cinco estações amostrais (VG1 a VG5), o que evidencia a presença de luz suficiente para atividade fotossintética. Entretanto, a pouca disponibilidade de nutrientes essenciais ao metabolismo da comunidade fitoplanctônica, com destaque para as

cianobactérias, provavelmente foi um dos principais motivos da baixa diversidade encontrada e para a dominância das picocianobactérias, sendo principalmente representada pelos gêneros *Aphanocapsa*, *Chroococcus* e *Merismopedia*.

A composição da comunidade microbiana (bactérias e arqueias) foi o tema do terceiro artigo, no terceiro capítulo da tese (*Diversidade microbiológica em dois reservatórios tropicais e sua possível associação com cianobactérias*). Surpreendentemente, observou-se a presença acentuada de arqueias, com destaque para o grupo das arqueias metanogênicas, nas amostras do reservatório da Pampulha entre outubro de 2009 e dezembro de 2010, assim como nas amostras de Volta Grande (ponto de coleta VG3) entre janeiro e dezembro de 2011, mesmo em amostras coletadas na região eufótica, onde foi constatada a presença de oxigênio.

Esse resultado é paradoxal, pois a metanogênese acontece principalmente em ambientes anóxicos (Grossart et al. 2011), mas eventos similares já foram relatados e discutidos por outros autores (Schulz et al. 2001; Grossart et al. 2011), que também observaram a presença das arqueias metanogênicas em ambientes com oxigênio.

A associação entre cianobactérias, bactérias e arqueias foi constatada em culturas de cepas de cianobactérias das espécies *Microcystis* sp., *M. aeruginosa* e *S. brasiliense*. Embora não tenha sido possível determinar a relação ecológica estabelecida entre esses organismos, pode-se afirmar que há associação entre cianobactérias e comunidades microbianas nas amostras analisadas.

## Referências

- Anagnostidis, K., Komárek, J. (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes, Oscillatoriales. *Archiv fur Hydrobiologie Supplement* **80** (1-4):327-472.
- Azevedo, M. T. P. and Sant'anna, C. L. (2003) *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* **109**:79-92.
- Bicudo, C. E. M., Menezes, M. *Gêneros de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)*. São Carlos. Brasil, RiMa Press, 2006, 502p.

- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. and Johansen, J. R. (2001) Boyer, S. L., Flechtner, V. R., Johansen, J. R. (2001) Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution* **18(6)**:1057–1069.
- BRASIL. (2011) Portaria n. 2914 de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial, Poder Executivo, Brasília, DF.
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., et al. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* **109(7)**:663-668.
- Casamatta, D. A. and Wickstrom, C., E. (2000) Sensitivity of two disjunct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützing. *Microbial Ecology* **41**:64-73.
- Castenholz, R. W. Phylum BX. Cyanobacteria. Oxigenic Photosynthetic Bacteria. In: Garrity, G., Boone, D. R. and Castenholz, R. W. (Comp.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria*. 2. ed. New York: Springer Verlag, 2001. p. 474-484.
- CETESB. *Relatório Final do Levantamento Ecológico-Sanitário das Represas do Rio Grande*: Considerações sobre a Piscicultura e a Recreação. São Paulo: Sistemas Furnas-Cemig, 1976. 78 p.
- Chorus, I. and Bartram, J. (Ed.). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London, New York: St. Edmundsbury Press, Suffolk, 1999.
- Cole, J. J. (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**: 291-314.
- Coutinho, W. *Emprego da flotação a ar dissolvido no tratamento de cursos d'água - avaliação de desempenho da estação de tratamento dos córregos Ressaca e Sarandi, afluentes à Represa da Pampulha*. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- Diez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L., Massana, R. (2001) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **67(7)**: 2942-2951.
- Dziallas, C. and Grossart, H-P. (2011) Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic *Microcystis* sp. *PLoS ONE* **6(9)**: e25569. doi:10.1371/journal.pone.0025569
- Dziallas, C. and Grossart, H-P. (2012) Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. *Marine Biology* **159(11)**:2389-2398.
- Farjalla, V. F., Amado, A. M. and Esteves, F. A. Bacterioplâncton. In: Esteves, Francisco (Comp.). *Fundamentos de Limnologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. p. 355-369.
- Ferrari, V.C., and Hollibaugh, J.T. (1999) Distribution of microbial assemblages in the central Arctic ocean basin studied by PCR/DGGE: Analysis of a large data set. *Hydrobiologia* **401**:55-68.
- Figueredo, C. C., Lopes, A. M. M. B, Lima, P. H. O., Giani, A. Submitted. Increasing phosphorus level by urban influence is the main cause of a persistent cyanobacterial bloom in a tropical ecosystem – the Pampulha reservoir revisited.



- Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. D. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuário, D. B., Fiore, M. F. (2009) Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* **627**(1):195–209.
- Galhano, V., Figueiredo, D. R., Alves, A., Correia, A., Pereira, M. J., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F. (2011) Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia* **663**(1):187-203.
- Garcia-Pichel, F., López-Cortez, A. and Nübel, U. (2001) Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(4):1902-1910.
- Giani, A. Limnology in Pampulha Reservoir: some general observations with emphasis on the phytoplankton community. In: Pinto-Coelho, R. M. et al. Ecology and Human Impact on Lakes and Reservoirs in Minas Gerais. Belo Horizonte: Segrac, 1994. p. 151-154.
- Greco, M. K. B. *Balanço de Massa de Fósforo, Evolução da Eutrofização e o Crescimento de Macrófitas Flutuantes no Reservatório de Volta Grande (MG/SP)*. 2002. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- Grossart, H-P., Frindte, K., Dziallas, C., Eckert, W., & Tang, K. W. (2011) Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *PNAS Environmental Science* **108**(49):19657-19661.
- Grossart, H-P., Kiørboe, T., Tang, K. W., Allgaier, M., Yam, E. M., Ploug, H. (2006) Interactions between marine snow and heterotrophic bacteria: aggregate formation and microbial dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* **42**:19-26.
- Gugger, M. & Hoffman, L. (2004) Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:349-357.
- Heath, M. W., Wood, S. A. and Ryan, K. G. (2010) Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology* **73**(1):95-109.
- Jasser, I., Krolicka, A., Jakubiec, K., Chróst, R. J. (2013) Seasonal and Spatial Diversity of Picocyanobacteria Community in the Great Mazurian Lakes Derived from DGGE Analyses of 16S rDNA and cpcBA-IGS Markers. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(6):739-749.
- Kirchman, L. D. Microbial primary production and phototrophy. In: Kirchman, David L. *Process in Microbial Ecology*. New York: Oxford University Press, 2012. p. 55-77.
- Kirkwood, A. E., Nalewajko, C. and Fulthorpe, R. R. (2006) The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants. *Microbial Ecology* **51**:4–12.
- Knoll, A. H. Cyanobacteria and earth history. In: Herrero, Antonia; Flores, Enrique (Comp.). *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. Cap. 1, p. 1-19.
- Komárek, J. and Komárková, J. (2002) Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology Olomuc* **2**:1-24.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. (1989) Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4. Nostocales. *Archiv fur Hydrobiologie Supplement* **82** (3):247-345.
- Komárek, J., Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chlorococcales. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heyning, H., Mollenhauer, D. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Stuttgart, p. 545, 1999.

- Komárek, J., Anagnostidis, K. Cyanoprokaryota, 2. Teil: Oscillatoriales. In: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G., Schagerl, M. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Stuttgart, p. 759, 2005.
- Kühl, M., Glud, R. N., Ploug, H., Ramsing, N. B. (1996) Microenvironmental control of photosynthesis and photosynthesis-coupled respiration in an epilithic cyanobacterial biofilm. *Journal Phycology* **32**:799–812.
- Kurmayer, R., Dittmann, E., Fastner, J., Chorus, I. (2002) Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microbial Ecology* **43**(1):107-118.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. O., Oshima, S. M. F. Q. (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon* **37**:1359-1373.
- McGreggor, G. B. and Fabbro, L. D. (2000) Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoptokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs Research Management* **5**:195-205.
- Muyzer, G. and Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**(1):127–141.
- Muyzer, G., Waal, D. E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3):695-700.
- Neilan, B., Jacobs, D. and Goodman, E. A. (1995) Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(11):3875-83.
- Newcombe, G., Chorus, I., Falconer, I. and Lin, T. F. (2012) Cyanobacteria: impacts of climate change on occurrence, toxicity and water quality management. *Water Research* **46**(5):1347-1584.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8):3327-3332.
- Pinto-Coelho, R. M. (1998) Effects of eutrophication on seasonal patterns of mesozooplankton in a tropical reservoir: a 4-year study in Pampulha Lake, Brazil. *Freshwater Biology* **40**:159-173.
- Rajaniemi-Wacklin, P., Rantala, A., Kuuppo, P., Haukka, K., Sivonen, K. (2008) Cyanobacterial community composition in shallow, eutrophic Lake Tuusulanjärvi studied by microscopy, strain isolation, DGGE and cloning. *Algological Studies* **126**(1):137-157
- Rashidan, K. K. and Bird, F.D. (2001) Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microbial Ecology* **41**:97-105.
- Rasmussen, U. and Svenning M. V. (1998) Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:265-272.
- Reichwaldt, E. S. and Ghadouani, A. (2012) Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water Research* **4**:1372-1393.
- Rippka, R., Neilson, A., Kumisawa, R., Cohen-Bazire, C. (1971) Nitrogen fixation by unicellular blue-green algae. *Archiv für Mikrobiologie* **76**:341-349.

- Rosselló-Mora, R., Thamdrup, B., Schäfer, H., Weller, R., Amann, R. (1999) The Response of the Microbial Community of Marine Sediments to Organic Carbon Input under Anaerobic Conditions. *Systematic and Applied Microbiology* **22**(2):237-248.
- Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F., Jakobsen, K. S. (1997) Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, 7 and V8. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:2593-2599.
- Sant'Anna, C. L. and Azevedo, M. T. P. (1989) Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) from São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia* **16**(89):131-1989.
- Sant'Anna, C. L. and Azevedo, M. T. P. (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* **71**(3):359-385.
- Sant'Anna, C. L., Azevedo, M. T., Senna, P. A.C., Komarék, J., Komárková. (2004) Planktic cyanobacteria from São Paulo state, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica* **27**(2): 213-227.
- Scheldeman, P., Baurain, D., Bouhy, R., Scott, M., Muhling, M., Whitton, B. A., Belay, A., Wilmotte, A. (1999) *Arthrospira* ('Spirulina') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed space. *FEMS Microbiology Letters* **172**: 213-222.
- Schulz, M., Faber, E., Hollerbach, A., Schröder, H. G., Güde, H. (2001) The methane cycle in the epilimnion of Lake Constance. *Archiv für Mikrobiologie* **151**:157-176.
- Shapiro, J. (1973) Blue-green algae: why they become dominant. *Science* **179**(4071):382-384.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **86**:232-236.
- Sieburth, J., Smetacek, V. and Lenz, J. (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology Oceanography* **23**(6):1256-1263.
- Smith, V. H., Joye, S. B. and Howarth, R. W. (2006) Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* **51**:351-355.
- Tian, C., Tan, J., Wu, X., Ye, W., Liu, X., Li, D., Yang, H. (2009) Spatiotemporal transition of bacterioplankton diversity in a large shallow hypertrophic freshwater lake, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Plankton Research* **31**(8):885-897.
- Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* **9**: 141-38.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P. De, Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Reviews* **60**(2):407-438.
- Vazoller, R. F., Manfio, G. P. and Canhos, V. P. Domínio Archaea: Reinos Crenarcheota, Euryarcheota e Korarcheota. In: Canhos, V. P.; Vazoller, R. F. (comp.). *Série biodiversidade do estado de São Paulo: microrganismos e vírus*. São Paulo: 1999. 249p.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L. and Boone, D. R. The methanogenic bacteria. In: Balows, H. G. T. A., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer K. H. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application*. New York, Springer Verlag: 1992. 719-767p.
- Whitton, B. A. and Potts, M. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2000.649p.

- Wilmotte, A., Stam, W., Demoulin, V. (1997) Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanophyceae, Cyanobacteria) with narrow trichomes. III. DNA-DNA hybridization studies and taxonomic conclusions. *Algological Studies* **87**:11-28.
- Woese, C. R. Bacterial evolution. (1987) *Microbiology Review* **51**:221-271.
- Worm, J. and Sondergaard, M. (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquatic Microbial Ecology* **14**:19-28.
- Yannarell, A. C. and Kent, A. D. Bacteria, distribution and community structure. In: LIKENS, Gene E. *Encyclopedia of Inland Waters*. Chicago: Elsevier Science & Technology Books, 2009. v.3. p. 201-210. (Illustrada).
- Yu, Y., Lee, C. and Hwang, S. (2005) Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Science and Technology* **52**(1-2):85-91.
- Zehr, J. P. and McReynolds, L. A. (1989) Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2522–2526.
- Zwart, G., Agterveld, M. P. K., Werff-staverman, I. Van Der, Hagen, F., Hoogveld, H. L., and Gons, H. J (2005) Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environmental Microbiology* **7**(3):365-377.

## 5 Permanent cyanobacteria dominance in a tropical hypereutrophic reservoir: molecular and morphological characterization

Ana M. M. B. Lopes<sup>a</sup>, Cleber C. Figueredo<sup>a</sup>, Alessandra Giani<sup>a\*</sup>

a. Department of Botany, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

\* Corresponding author: agiani@icb.ufmg.br

### Abstract

The cyanobacterial community composition in Pampulha reservoir, a hypereutrophic urban and shallow reservoir, was assessed monthly from October 2009 to December 2010. The temporal variation in the cyanobacterial community was investigated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and subsequent sequencing of 16S rRNA gene from the DGGE bands, as well as by microscopy analysis. Chemical and physical data were measured in the field and in the laboratory for the same sampling dates. The results showed similar number of species at the molecular and morphological level: 17 morphospecies were observed by microscopy and 14 species were identified according to the sequencing of DGGE bands. The cyanobacterial community was dominated by two species throughout the year, the potentially toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Sphaerocavum brasiliense*, a cyanobacterium similar to *Microcystis*, but apparently with lower or no toxicity. However, *S. brasiliense* was not detected by molecular tools, due to the lack of sequences deposited in the databases for this species, and sequences were identified as *Microcystis*. The heavy dominance of toxic *C. raciborskii* and *S. brasiliense* throughout the year was mainly correlated to high temperature and elevated nutrients` concentration in Pampulha reservoir, providing evidence of the decreasing water quality of this environment. Finally, it was possible to observe a clear seasonal pattern between *C. raciborskii* (Nostocales), which dominated in the rainy season with higher temperature and water stratification, and the Order of Chroococcales (mainly *S. brasiliense*) more abundant during the dry season and especially at the end of the dry season, period when the highest concentration of total phosphorus was recorded.

**Keywords:** cyanobacteria community composition, DGGE, microscopy analysis, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis*, *Sphaerocavum brasiliense*.

### 4.1 Introduction

Since the middle of the twentieth century, the process of accelerated eutrophication of freshwater and marine ecosystems became more common (Smith et al. 2006) and major concerns about the factors that play a role in the periodical occurrence of cyanobacteria in these environments became a topic of research and discussion

(Shapiro 1973; Tilman et al. 1982; Talling 1986; Zohary et al. 1996; Chen et al. 2003; Carey et al. 2012; Elliott 2012). The input of nutrients, resulting from urbanization, modern agricultural practices and erosion of fertile soils, were detected as the main source of eutrophication, which consequently would cause cyanobacteria blooms (Newcombe et al. 2012).

Cyanobacteria present some features that distinguish them among phytoplanktonic species. For example, because of the presence of gas-vacuoles in their cells, some cyanobacteria are buoyant and can regulate their position in the water column according to the availability of nutrients and light (Chorus & Bartram 1999). Some species can fix N<sub>2</sub> that makes them great competitors at low nitrogen levels (Shapiro 1973). Bloom-forming cyanobacteria may dominate eutrophic environments and they have the ability of producing powerful toxins that can be the cause of human and animal health hazards and even death (Carmichael et al. 2001).

Seasonal changes can alter the community composition of cyanobacteria (Gomes et al. 2012), however species descriptions are mostly based on phenotypic morphological characteristics, which may themselves vary in response to environmental conditions, such as nutrient availability and seasonality (Komárek 2003). Furthermore, the cyanobacteria wide range of morphologies (Knoll 2008) can make it difficult to separate species only by their morphological traits. This explains why lately many authors prefer the use of polyphasic techniques that cover more than one methodology for the assessment of cyanobacterial community temporal variations (Taton et al. 2003; Furtado et al. 2009; Health et al. 2010; Galhano et al. 2011; Lopes et al. 2012).

Galhano et al. (2011) used a polyphasic approach to confirm the identity of three strains of the order Nostocales (*Anabaena cylindrica*, *Aphanizomenon gracile* and *Nostoc muscorum*), using classical morphological and phylogenetic analyses, with partial

sequences of the genes 16S, *hetR* and *nifH*. The results of the molecular analyses were congruent, separating the three strains belonging to different clusters in the same genera classified by morphological analysis.

On the other hand, Furtado et al. (2009) observed that the phylogenetic trees revealed good congruence with morphology-based classifications for the order Nostocales, but 16S rRNA sequences showed that strains belonging to the orders Chroococcales and Oscillatoriales were dispersed within the tree, indicating that they did not form natural clades. Thus sometimes the diversity observed in nature and (partially) in cultures not necessarily reflect the genetic diversity (Palinska et al. 1996), and for this reason, some authors (Garcia-Pichel et al. 2001; Fiore et al. 2005; Heath et al. 2010) recommend a combination of traditional and molecular methods to increase our understanding of the cyanobacterial community structure and dynamic.

In this study, we investigated the cyanobacteria community composition in a tropical reservoir (Pampulha reservoir, Brazil), by morphological and molecular characterization. Quantitative analyses were done by microscopy (Utermöhl 1958) and the molecular approach used the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of the 16S rRNA gene, a technique developed by Gerard Muyzer and collaborators, in order to evaluate prokaryotes' diversity in natural environments and to monitor their population dynamic (Muyzer et al. 1993).

Pampulha reservoir is a hypereutrophic environment, mainly due to the continuous inflow of sewage and increased urbanization (Giani 1994). Studies about the water quality decline in Pampulha reservoir showed that the high levels of nutrients that run into the lake directly affects phytoplankton composition, resulting in the dominance of cyanobacteria over other species, including the occurrence of persistent blooms

throughout the year and consequent diminution of diversity (Giani 1994; Giani et al. 1988; Pinto-Coelho 1998; Figueredo & Giani 2001).

An effort to restore the water quality of the reservoir has been made in 2003, with the implementation of a wastewater treatment plant (Coutinho 2007). However, data generated by this and other studies (Figueredo et al. submitted) show that the treatment is not effective at removing nutrients such as phosphorus and nitrogen, the main players for increasing eutrophication in the reservoir (Reynolds 2006).

The major aim of this study was to investigate the cyanobacterial community composition and dynamics in Pampulha reservoir and to verify if the results obtained by molecular tools could add new information to the obtained by classical taxonomic identification.

## **5.2 Materials and methods**

### **5.2.1 Sampling**

Pampulha reservoir is located in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil (19° 55'09 "S, 43° 56 '47" W). The reservoir is an artificial lake created by the construction of a dam in 1938, and its water was used as drinking water supply up to 1980s, but due to high concentration of pollutants its only purpose is now recreational (Giani 1994).

The climate of the region has two distinct seasons: (i) a hot, rainy season, in general from October to March, and (ii) a colder, dry season from April to September.

For this study, sampling was performed in a site located near the central pelagic region (known in earlier publications as station E09) with a maximum depth of 7m. The site was chosen because of the existence of historical data from previous studies that showed averages values for many limnological variables and therefore proved representative for the entire reservoir (Giani 1994; Giani et al. 1988; Pinto-Coelho 1998; Figueredo & Giani 2001).



The sampling was carried on from October 2009 to December 2010 at monthly intervals at Secchi disk depth that is equivalent to 10% of light penetration, using a Van Dorn bottle. In the laboratory, water samples were filtered through a filter of porosity 0.7  $\mu\text{m}$  (GF1, Macherey & Nagel) until filter saturation and the volume was recorded. The filters were preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  until genomic DNA extraction. A fraction of the unfiltered water sample was preserved with Lugol's iodine solution for subsequent phytoplankton analyses on microscopy.

Additionally, profiles of temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen (DO) were obtained *in situ* at 0.5 m interval, by aid of a 556 YSI multi-parameter probe. Samples for later analyses of nutrients (total and soluble phosphorus, nitrate, nitrite and ammonium) were also collected with a Van Dorn bottle at Secchi disk depth.

Meteorological data (precipitation, air temperature and net solar radiation) were obtained at the Center for Development of Nuclear Technology (CDTN), an institute of the National Commission for Nuclear Energy (CNEN), located approximately 2 Km from the sampling point (Barreto & Lambertucci 2010).

### **5.2.2 Microscopy analysis**

Phytoplankton quantification was performed on a Zeiss Axio Observer D1 inverted microscope, according to the Utermöhl's technique (1958). To evaluate the community structure on a biovolume basis, measurements of at least 20 individuals of each species were taken to calculate the specific biovolume using geometrical models (Rott 1981).

### **5.2.3 Nucleic acid extraction**

DNA extraction was performed using the phenol-chloroform isoamyl alcohol procedure as described by Kurmayer et al. (2003), with some modifications. The

extracted DNA was quantified by spectrophotometer at wavelengths of 260 and 280 nm corresponding to DNA and protein respectively. The results were expressed in  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  and the ratio DNA/protein was used to assess DNA quality.

#### **5.2.4 PCR, DGGE and sequencing**

The PCR reaction was performed with the primers CYA 359F-GC and an equimolar mixture of the primers CYAR 781R(a) and (b) (Nübel et al. 1997) that targeted gene fragment of the cyanobacterial 16S rRNA. For the PCR, a volume of isolated DNA (2  $\mu\text{L}$ ) corresponding to 10 ng of DNA was added to 48  $\mu\text{L}$  of amplification mixture, resulting in a final concentration of 1x Taq Dream Buffer, 4 mg/mL BSA (bovine serum albumin), 0.4 mM dNTP, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 pmol/ $\mu\text{L}$  of each primer and 1U of Taq polymerase (Fermentas) in a final volume of 50  $\mu\text{L}$ . The following PCR program was used: initial denaturation 95°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C, 58°C (annealing), 72°C (extension) for 1 min each and final extension of 72°C for 10 min.

#### **5.2.5 DGGE**

PCR-DGGE of the cyanobacterial 16S rRNA gene was performed on the field samples collected in 2009 and 2010. Electrophoresis was performed using the Vertical Electrophoresis System (BIO-Rad/USA). The amplified PCR products, containing 450 bp were subjected to DGGE as described in Zwart et al. (1998, 2005) and Muyzer et al. (1993) with modifications. The fragments of 450 bp amplified by the primers CYA 359F-GC (5'GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC 3') and 781R(a) (5'GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T 3') plus 781R(b) (5' GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T 3') (Nübel et al. 1997) were used in a denaturing gradient ranging from 40 to

70% of the urea and formamide, 6% acrylamide, 0.5 X TAE running and held at 80V for 16 hours at 60°C. The PCR product was quantified using a Low Mass Ladder (Invitrogen) and concentration of 400ng/DNA of each sample was applied to the gel. For the sequencing of the SSU rDNA (small ribosomal subunits) fragments, DGGE bands of the central part of the band was excised from the gel with a scalpel carefully cleaned after each incision and the DNA was resuspended in 50 µL of 1X TE, reamplified and sequenced as described by Zwart et al. (1998). An aliquot of 3 µL was used for reamplification with the PCR primers (without the GC-clamp). Sequencing was performed on purified PCR and the samples were sent for sequencing to Macrogen (South Korea).

Before running the DGGE gel, samples were analyzed on a parallel gel, with the goal of determining gradient, temperature and running time. After setting these parameters all samples were applied on the gel.

### **5.2.6 Phylogenetic analysis of DGGE band sequences**

The phylogenetic affiliation of sequenced DGGE bands was calculated using the ARB software package (Ludwig et al., 2004). Obtained sequences and contigs were aligned with an ARB SINA aligner, available at <http://www.arb-silva.de>. Low quality sequences were excluded from further analysis. The resulting alignment was merged with an ARB SSU rRNA database (January 2013) on a local computer, manually adjusted and added to the basic SSU rRNA, used the Maximum-likelihood algorithm to calculate the tree and added the DGGE sequences with maximum-parsimony quick-add. To validate tree topology, we used a bootstrap analysis with 1000 replicates.

### **5.2.7 Nutrients**

Concentration of ammonium, nitrate, nitrite and dissolved phosphorus were determined by spectrophotometric methods on the filtered fraction of the samples (APHA 2005). The unfiltered fraction was submitted to the analysis of total phosphorus by buffered persulphate oxidation and final reading in the spectrophotometer (APHA 2005).

### **5.2.8 Thermal resistance of the water**

The calculation of the thermal resistance of the water, which is a measure of stratification of the water column, was made from the values of the surface and bottom temperature of the water column (that were measured in field with the aid of a YSI 556 probe) and transformed to density values. Relative units of thermal resistance were determined from:

$$\text{Resist.} = ((\text{dens 2} - \text{dens 1}) \times 10^6) / 8 \text{ (Wetzel \& Likens, 2000).}$$

#### **Where**

Resist. = thermal resistance of the water

Dens 2 = density of water at the bottom

Dens 1 = density of water at the surface

### **5.2.9 Statistical methods**

The similarities among DGGE band patterns from different samples were calculated by cluster analysis using Jaccard's coefficient based on the presence or absence of DGGE bands at certain positions in each lane of the gel, and by applying the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA). This generates a dendrogram depicting the genetic relationships among samples using the open-source program R (R Development Core Team 2005).

The evaluation of the changes occurred in Pampulha reservoir was performed by linear mixed-effect models comparing the data obtained (2009-2010). The analyses were done within the R statistical package (R Development Core Team 2005). Before the analysis, residuals of the data pool were evaluated for normality by the Shapiro–Wilk’s test and for homocedasticity by the Brown-Forsythe test.

To evaluate specific relationships between biological variables (total phytoplankton biovolume and cyanobacteria biovolume), Secchi depth, net solar radiation, precipitation, and nutrients ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and Total-P), the normality of data was evaluated independently for each variable. Due to the absence of normality, a non-parametric Spearman correlation analyses were performed for the 5 variables.

For the extraction of the main trends between environmental variables and phytoplankton variables, we performed a principal component analysis (PCA) using the program STATISTICA 7.0 (2004, Tulsa, USA). Due to the high amount of autocorrelations in Spearman analyses, not all the variables were included in the PCA. Therefore, the PCA was performed using some environmental variables (Secchi, temperature, thermal water resistance, net solar radiation, precipitation,  $[\text{NH}_4^+]$ ,  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $[\text{Total-P}]$ ) and phytoplankton variables (concentrations of chlorophyll and Chroococcales biovolume, *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Sphaerocavum brasiliense* biovolume).

## **5.3 Results**

### **5.3.1 Morphological characterization and succession dynamics of cyanobacteria**

Based on their morphological characterization 16 morphospecies of cyanobacteria were identified in Pampulha reservoir, between October 2009 and December 2010: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix* sp., *Planktothrix isothrix*, *Pseudanabaena* sp., *Geitlerinema* sp., *Cyanodictyon imperfectum*,

*Merismopedia* sp., *Merismopedia tenuissima*, *Aphanocapsa holsatica*, *Chroococcus* sp., *Coelosphaerium* sp., *Romeria okensis*, *Sphaerocavum brasiliense*, *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* and *Radiocystis* sp.

Cyanobacteria presented an average total biovolume of  $28.5 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$  and typically comprised >80% of total phytoplankton biovolume for almost the whole study period (Fig. 1A). We observed a replacement in the Nostocales *Cylindrospermopsis raciborskii* with very high biomass throughout the rainy season, from October 2009 to March 2010, when the total biomass was almost exclusively made up of this species (Fig 1B). A peak was observed in June 2010 produced by Chroococcales (mainly *Sphaerocavum brasiliense*) and a second peak in September 2010, when *S. brasiliense*, *Microcystis aeruginosa*, *M. panniformis* and *Radiocystis fernandoii* were the dominant species. Therefore, according to the microscopy analysis, *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Sphaerocavum brasiliense* were the two dominant species in Pampulha reservoir, followed by *Planktothrix* spp. *Microcystis* spp. and *R. fernandoi* (Fig. 1B). Figure 1C represents other less abundant cyanobacteria, like the filamentous species *Pseudanabaena* sp., *Geitlerinema* sp. and the picocyanobacteria *Merismopedia* sp., *Merismopedia tenuissima*, *Aphanocapsa holsatica*, and *Chroococcus* sp.

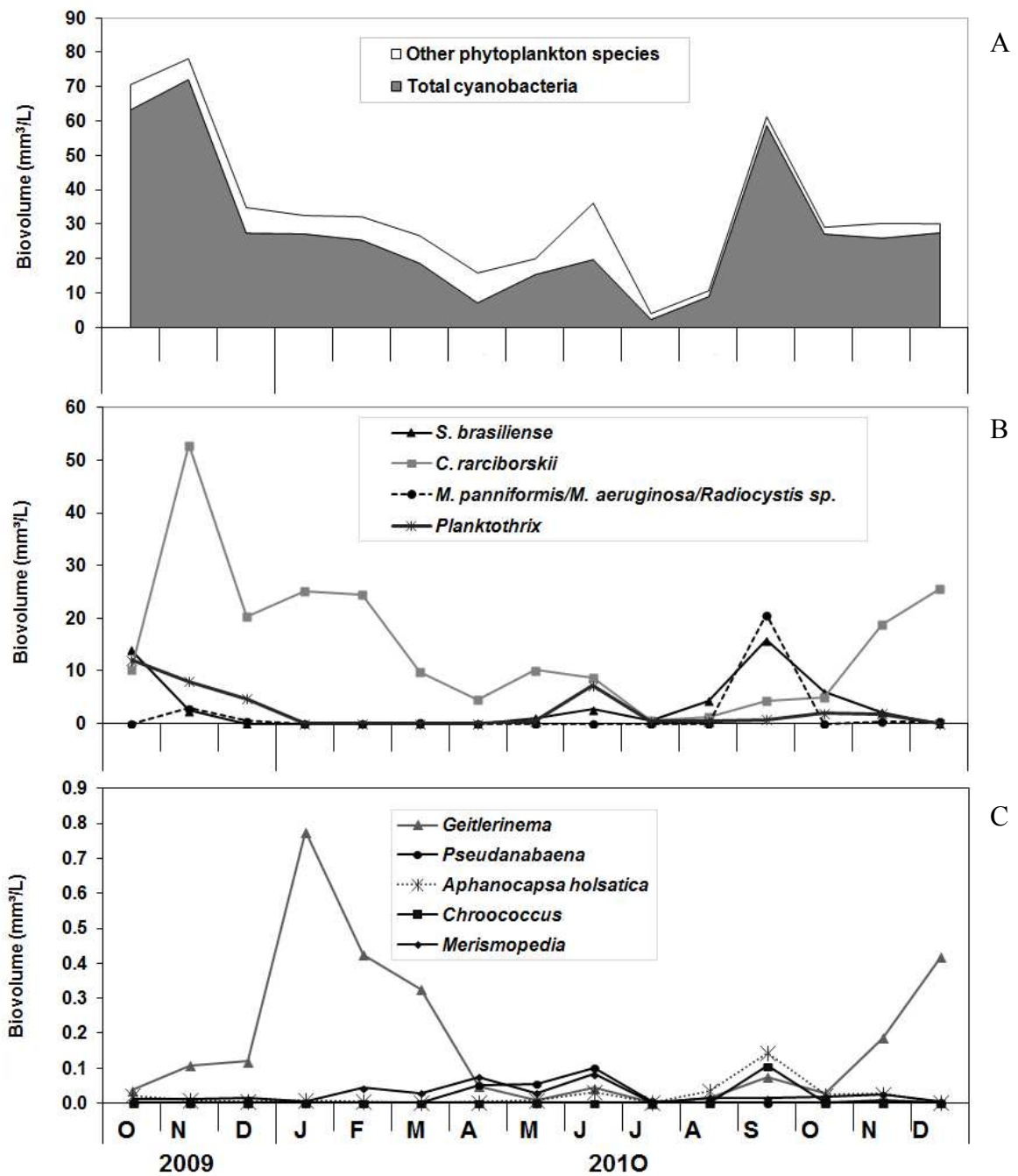


Fig. 1 – Biomass levels of (A) total cyanobacterial plus phytoplankton total (B) *S. brasiliense*, *C. raciborskii* plus other Chroococcales and *Planktothrix* spp. (C) Filaments species and picocyanobacteria in Pampulha reservoir from October 2009 December 2010 results from microscopic analysis.

### 5.3.2 Temporal variations of cyanobacteria community by DGGE

A total of 161 bands were observed in the gel, which were present in 12 different band positions (Fig. 2A). Sequences obtained from 38 of the detected bands in 8 different positions were successfully sequenced and compared to Cyanobacteria

sequences in the GenBank database and were finally used to construct the phylogenetic tree.

The DGGE banding profile was relatively homogeneous throughout the 15 months of sampling. However, we saw some temporal variations such as indicated in Figure 2A, where the band pointed by arrow 1 was identified as *C. raciborskii* that decreased its intensity in June and was missing in July 2010, but it was again detected in October of the same year.

The arrows 2, 3 and 4 indicate bands detected only in some months during the study period and these bands represented sequences of *Limnothrix redekei*. A new band emerged in September and October 2010 (arrow 7) and was identified as *Synechococcus* sp. The bands identified as *Microcystis* species (arrows 5 and 6), were present over the entire sampling period.

Cluster analyses of the DGGE banding profile showed the formation of five clusters (Fig. 2B). The **cluster A** comprised sequences of bands observed in July, August, September and October 2010. **Cluster B** consisted of bands from June, November and December 2010. **Cluster C** contained bands from February and March 2010, **cluster D** bands from November, December 2009 and January 2010, and finally **cluster E** included the months October 2009, April and May 2010.



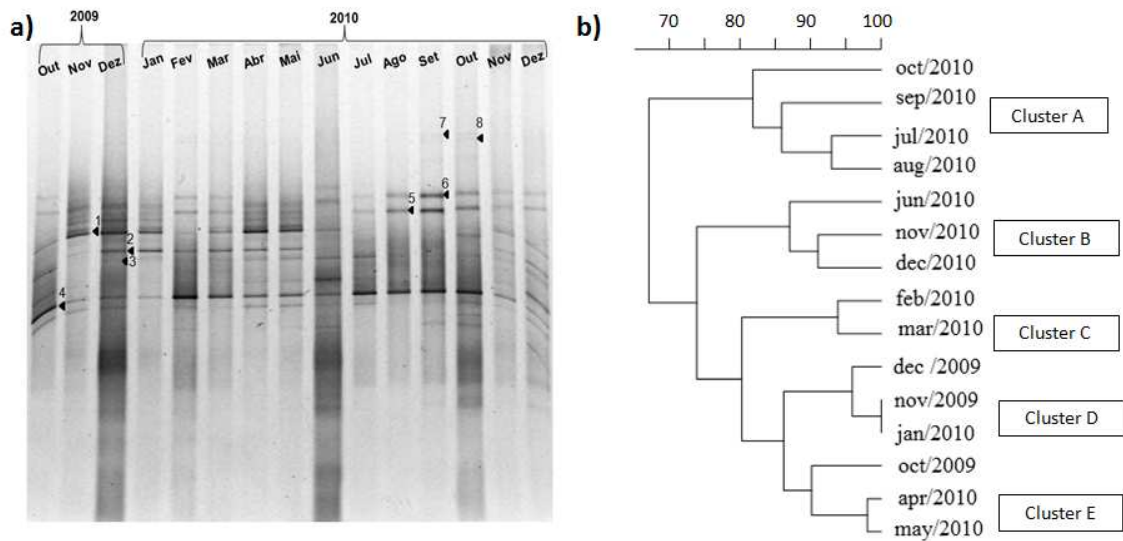


Fig. 2 – (a) DGGE gel image of the cyanobacterial 16S rRNA gene in environmental samples from Pampulha reservoir from October 2009 to December 2010. Arrows point to some of the sequenced bands. (b) Dendrogram generated based on the presence or absence of cyanobacterial bands in DGGE gel expressed as percentage of similarity.

The sequences extracted from the DGGE bands were used to construct a phylogenetic tree and bootstrap values of 50% or higher were included (Fig. 3). Four clades were formed and the phylogenetic tree showed that most sequences of DGGE bands were grouping with species of the genus *Microcystis* (Chroococcales), and *Cylindrospermopsis* (Nostocales).

The first clade was represented by nine DGGE bands numbered in the tree as Bands 344, 376, 341, 363, 379, 338, 339. These sequences were clustering with three *Microcystis* species (*M. aeruginosa*, *M. viridis* and *M. smithii*) and one *Synechocystis* sp. forming a clade where the sequences obtained had a minimum of 98% 16S rRNA gene sequence similarity by Blast search (Fig.3).

The second clade of DGGE bands sequences (Bands 351, 356, 358, 348, 398, 361, 352, 372, 373) clustered with heterocystous cyanobacteria (Nostocales) and most sequences (5=62.5%) showed high similarity with *Cylindrospermopsis raciborskii* with a minimum of 98% 16S rRNA gene sequence similarity. In the same clade, three bands had sequences that were grouped with *Aphanizomenon ovalisporum* and *Umezakia*

*natans* (Nostocales) and also with Oscillatoriales (*Jaaginema homogenum*, *Planktothrix* sp. and *Limnothrix redekei*). This clade consisted of two orders.

The third clade comprised Chroococcales, but only picocyanobacteria were identified in the sequences of these bands (401 and 402) that clustered with *Synechococcus* sp. and *Prochlorococcus marinus* with a minimum of 96% 16S rRNA gene sequence similarity.

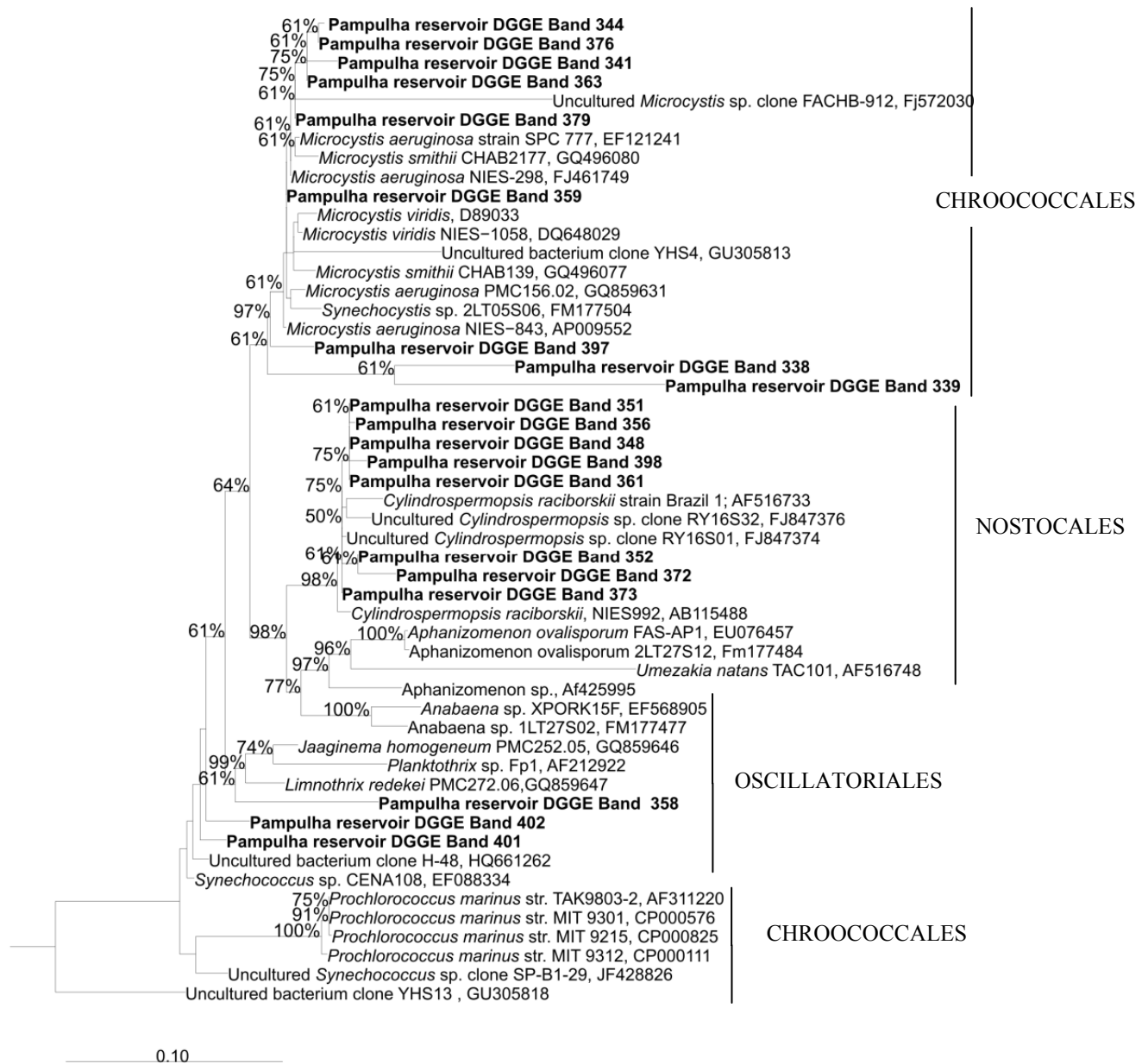


Fig. 3 – Phylogenetic tree of gene 16S rRNA obtained from 20 bands extracted from the DGGE gel in Fig. 1A. The tree topology was tested by bootstrapping analysis, and bootstrap values above 50% percentage are shown.

### 5.3.3 Environmental variables

Mean values of nutrients (nitrate, nitrite, ammonium, total and dissolved phosphorus) and dissolved oxygen are represented in Table 1. The occasionally high standard deviations, like in ammonium, indicate strong variation along the seasons. For example, high concentration of ammonium was observed during the dry season, from June 2010 to September 2010 (data not represented. See Figueredo et al. submitted). Like ammonium, phosphorus and nitrate showed high values in Pampulha reservoir (Tab. 1). Concentrations of dissolved oxygen were around  $2.86 \text{ mgL}^{-1}$  in May 2010 and had a maximum  $10.90 \text{ mgL}^{-1}$  in October 2009 (data not represented. See Figueredo et al. submitted).

Table 1 – Mean values and standard deviation of nutrients (nitrate, nitrite, ammonium, total and dissolved phosphorus) and dissolved oxygen, in Pampulha reservoir. Values correspond to the period from October 2009 to December 2010.

		Dry season		Rainy season	
		mean values	SD	mean values	SD
$\text{NO}_3^-$	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	163.03	127.57	29.75	33.97
$\text{NO}_2^-$	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	32.15	31.75	4.73	3.87
$\text{NH}_4^+$	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	1778.56	690.50	4052.37	838.38
<b>Total-P</b>	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	174.56	58.30	180.42	53.47
$\text{PO}_4^{4-}$	( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	38.98	71.79	6.31	9.20
<b>DO</b>	( $\text{mgL}^{-1}$ )	6.80	2.87	5.49	2.52

The figure 4 shows the seasonal variation of precipitation (mm), water resistance ( $\text{g.cm}^3$ ), net solar radiation ( $\text{W.m}^{-2}$ ), air and water temperature in Pampulha reservoir and clearly represents the seasons typical of the region rainy and dry. The rainy season, from November to March, is characterized by higher air and water temperatures, higher precipitation and water resistance. The dry season displays lower temperatures, precipitation and water resistance. Net solar radiation is sometimes more intense during

the rainy season, however clouds may interfere like observed in December 2009 and during high precipitation periods.

The air temperature ranged between 22-27°C in the rainy season and between 21-23°C in the dry season and the water temperature was between 21-27°C in the rainy season and 19-23°C in the dry season. The water resistance minimum was 3.0 and maximum 126.62 g.cm<sup>-3</sup>. Precipitation showed a maximum of 498.9 mm in December 2009 and a minimum of 0 mm in July 2010. The highest record of net solar radiation was 162.2 W.m<sup>-2</sup> in February 2010 and the lowest was 89.2 W.m<sup>-2</sup> in June of the same year.

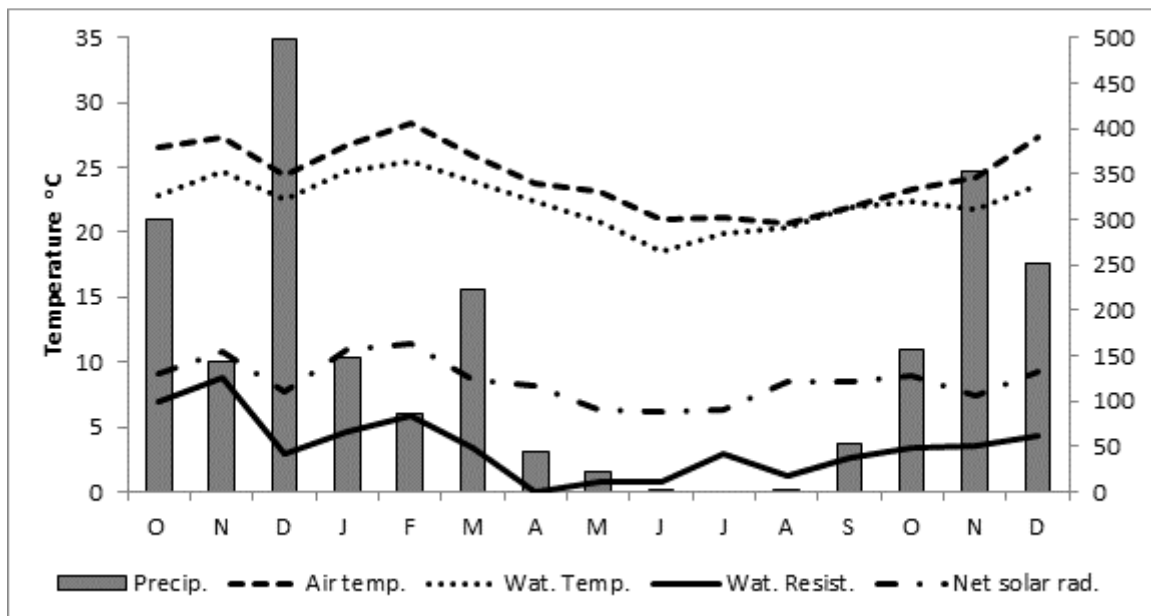


Fig.4 - Air and water temperature (primary Y axis) and on the secondary Y axis, water resistance (g.cm<sup>3</sup>), net solar radiation (W.m<sup>-2</sup>) and precipitation (mm), in Pampulha reservoir from October 2009 to December 2010.

The PCA (Fig. 5) showed that factor 1 was correlated with the variables NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, water thermal resistance, net solar radiation, Secchi depth, water temperature and *C. raciborskii*, and was able to explain 46.68% of the total system variability. Factor 2 was mainly correlated to P-total, *S. brasiliense*, chlorophyll and Total Chroococcales biovolume (consisting of *S. brasiliense*, *Microcystis* and *Radiocystis*) and explained 22.90% of the total variability. Together these two factors were able to explain 70% of

the environmental variability in the reservoir. Precipitation and dissolved oxygen (DO) did not contribute significantly to the variability of this data set.

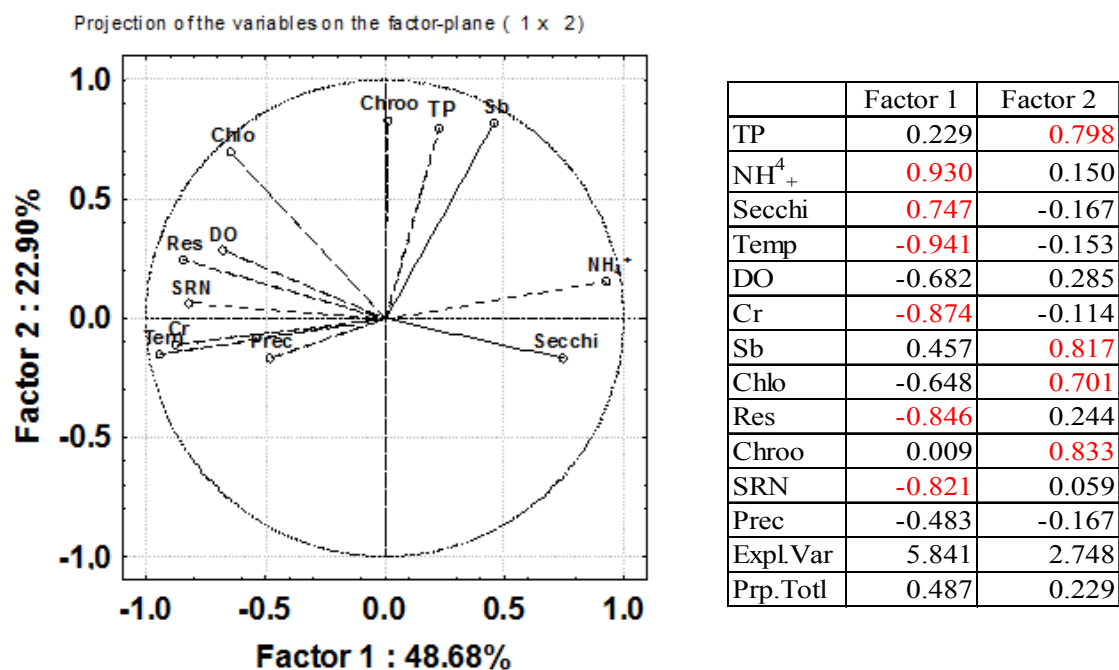


Fig. 5 – PCA of biotic and abiotic variables at Secchi disc depth analyzed from October 2009 to December 2010 in Pampulha reservoir. Chl=Chlorophyll; TP=Total-Phosphorus; Res= thermal water resistance; Tem= water temperature; SRN= net solar radiation; Prec= precipitation Chroo= Chroococcales biovolume; Cr= *C. raciborskii* biovolume; Sb=*S. brasiliense* biovolume and the Table with the significant values in red.

Table 2 represents the results from nonparametric Spearman correlation among variables. The nitrogen sources, ammonium and nitrate, were not significantly different between the dry and rainy periods compared by statistical analysis ( $F = 0.608$ ,  $p = 0.783$  for ammonium and  $F = 0.655$ ,  $p = 0.739$  for nitrate). Spearman analysis (Tab. 2) pointed to highly significant correlations ( $p < 0.0001$ ) between total phytoplankton biomass and total Cyanobacteria biomass ( $\rho = 0.864$ ), between water temperature and ammonium ( $\rho = -0.875$ ), dissolved oxygen (DO) and total phytoplankton biomass ( $\rho = 0.829$ ). *C. raciborskii* had significant and inverse correlation with ammonium ( $p = < 0.001$ ;  $\rho = -0.886$ ) and with temperature ( $p = < 0.001$ ;  $\rho = 0.862$ ). *S. brasiliense* showed significant correlation also with ammonium ( $p = 0.040$ ;  $\rho = 0.535$ ) and correlation

almost significant and inverse with temperature ( $p = 0.053$ ;  $\rho = 0.056$ ). The water thermal resistance also showed a positive and highly significant correlation with *C. raciborskii* ( $p = 0.005$ ;  $\rho = 0.675$ ), precipitation ( $p = 0.016$ ;  $\rho = 0.611$ ) and net solar radiation ( $p = 0.020$ ;  $\rho = 0.592$ ). The precipitation showed significant positive correlation with nutrients like nitrate ( $p = 0.006$ ;  $\rho = 0.677$ ), nitrite ( $p = 0.000$ ;  $\rho = 0.811$ ), soluble phosphorus ( $p = 0.009$ ;  $\rho = 0.646$ ) and an negative correlation with ammonium ( $p = 0.006$ ;  $\rho = -0.671$ ). Other significant correlations ( $<0.05$ ) are represented in Table 2.

Table 2 – Results of nonparametric Spearman Correlation between biological (total biovolume, cyanobacteria biovolume, *C. raciborskii* and *S. brasiliense* biovolume) and physico-chemical data (N, P and transparency, temperature, DO, water thermal resistance and pH).

<b>Variable</b>	<b>by variable</b>	<b>Rho</b>	<b>P-value</b>
Secchi	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.642	0.013
Secchi	Total Biovolume*	-0.649	0.012
Secchi	Resistance	-0.653	0.011
Secchi	SRN	-0.647	0.012
Cyanobacteria	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.532	0.041
Cyanobacteria	Total Biovolume*	0.864	0.000
Cyanobacteria	Secchi	-0.704	0.005
Cyanobacteria	Resistance	0.703	0.003
Cyanobacteria	SRN	0.543	0.036
Cyanobacteria	Precipitation	0.629	0.012
Temperature	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.548	0.034
Temperature	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.875	0.000
Temperature	Secchi	-0.642	0.013
Temperature	Cyanobacteria	0.546	0.035
Temperature	Resistance	0.782	0.000
Temperature	SRN	0.788	0.000
Temperature	Precipitation	0.625	0.013
DO	Total Biovolume*	0.829	0.000
DO	Cyanobacteria	0.710	0.004
DO	Temperature	0.477	0.085
<i>C. raciborskii</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.886	0.000
<i>C. raciborskii</i>	Total Biovolume*	0.546	0.035
<i>C. raciborskii</i>	Secchi	-0.785	0.001
<i>C. raciborskii</i>	Cyanobacteria	0.629	0.012
<i>C. raciborskii</i>	Temperature	0.864	0.000
<i>C. raciborskii</i>	Resistance	0.675	0.005
<i>C. raciborskii</i>	Precipitation	0.611	0.016
<i>C. raciborskii</i>	SRN	0.592	0.020
<i>S. brasiliense</i>	Total-P	0.889	0.000
<i>S. brasiliense</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.535	0.040
<i>S. brasiliense</i>	Chroococcales	0.791	0.000
SRN	Resistance	0.777	0.001
Precipitation	nitrate	0.677	0.006
Precipitation	nitrite	0.811	0.000
Precipitation	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.671	0.006
Precipitation	PS	0.646	0.009
Precipitation	Resistance	0.582	0.023

\*Total Biovolume = biovolume of all phytoplankton species including cyanobacteria. This and the values of Biovolume of total Cyanobacteria and of *C. raciborskii* and *S. brasiliense* are expressed as (mm<sup>3</sup>.L<sup>-1</sup>).

## 5.4 Discussion

This is the first study in which morphological and molecular characterization of the cyanobacteria community in Pampulha reservoir were brought together. Based on morphological data, 16 morphospecies of cyanobacteria were identified in Pampulha reservoir from October 2009 to December 2010. Molecular tools, revealed 14 species, following a similar pattern. Both showed the dominant presence of the Nostocales *Cylindrospermopsis raciborskii* and of the Chroococcales, *Sphaerocavum* and *Microcystis*.

The species *Sphaerocavum brasiliense* was detected in all microscopic analyses, but was never detected in the DGGE bands sequences, maybe because *Sphaerocavum brasiliense* occurrence has nowadays only been reported in freshwater environments in Brazil and Uruguay (Sant'Anna et al. 2004). Since it is a genus proposed by Azevedo & Sant'Anna in 2003, it is still poorly studied and no sequences have been deposited in databases. Additionally, the specie *Sphaerocavum brasiliense* form heavy blooms during the spring and summer and can easily be misinterpreted as *Microcystis* from its morphological observation (Sant'Anna et al. 2004). In our molecular characterization, sequences of *Sphaerocavum brasiliense* from Pampulha reservoir samples were the probably grouped with closest identified genus, in this case, *Microcystis*.

Therefore, a review of sequences deposited in databases is required. Fiore et al. (2005) and Galhano et al. (2011) also highlighted the need for more deposits of sequences in the Gen Bank, especially for of the genera *Anabaena*, *Nostoc* and *Aphanizomenon*. The present study could then contribute to the future deposit of *Sphaerocavum brasiliense* sequences in the databases, since strains have been isolated from Pampulha reservoir and kept in the Phycological Culture Collection of the Federal University of Minas Gerais (data not shown).

The main difference between *Microcystis* and *Sphaerocavum* is the presence of hollow colonies in *Sphaerocavum* as a consequence of cell division in two planes. *Microcystis* presents compact colonies and cell division in three planes (Sant'Anna et al. 2004). Furthermore, bioassays with mice, previously performed on *S. brasiliense* isolated from reservoirs in São Paulo, Brazil, showed that it did not produce toxins (Azevedo & Sant'Anna 2003), unlike the potentially hepatotoxic *Microcystis* that is well known for its high toxicity potential (Carmichael et al. 2001; Chorus & Bartram 1999).

The results obtained from physical and chemical analyses showed that water temperature and ammonium had a statistically significant correlation with *C. raciborskii* (Table 2). This species was favored by slightly lower ammonium concentrations (1.000-2.000µg/L) and high temperatures (22-27°C) – results obtained from the analysis of Spearman correlation. On the other hand *S. brasiliense* grew better at higher concentrations of ammonium (3.000-5.000 µg/L) and lower temperatures (21-23°C) (Fig. 1B and Table 2).

Rajaniemi-Wacklin et al. (2008) observed in Lake Tuusulanjärvi, Finland, a decrease in the water temperature at the time when heterocytous cyanobacteria replaced *Microcystis*. Bloom-forming cyanobacteria like *Microcystis* are sensitive to lower temperatures and temperature-connected instability (turbulence) of the water column has been suggested to limit the periodic dominance of *Microcystis* in temperate lakes. In tropical lakes *Microcystis* could dominate almost all year (Reynolds 1984, 2006). In the shallow Pampulha reservoir, which is easily mixed by wind or heavy rain, the temporary instability of the water column might not to be favoring growth of Chroococcales (*Sphaerocavum*, *Radiocystis* and *Microcystis*) during the whole year. However, Chroococcales were never dominant in periods of stronger water resistance



(Figures 1 and 4). James et al. (2008) observed in a tropical shallow eutrophic lake a decrease in biomass of *Microcystis* and *Anabaena* after rainfall, mainly caused by increased turbidity and high turbulence in water column.

It was observed that when the ammonium concentration was lower (rainy season) the cyanobacterial bloom was caused by the heterocytic *C. raciborskii*, and when the ammonium concentrations increased the not-heterocytic *Sphaerocavum brasiliense*, *Microcystis* spp. e *Radiocystis* sp. dominated. This may suggest that ammonium could also have an effect on the dominance patterns and succession of the main Cyanobacteria groups in Pampulha reservoir. The great competitive advantage of *Cylindrospermopsis* is beyond the ability to fix nitrogen, because the species also has high affinity for ammonium, allowing it to capitalize on the cheapest N source while other not-heterocytic species cannot (Isvánovics et al. 2000). However, in Pampulha reservoir, even during the rainy season, when ammonium concentration was lower due to dilution effects, values were always higher than  $1000\mu\text{g.L}^{-1}$  (Table 1), therefore this cannot be considered a serious limiting factor.

Although the municipality of the city of Belo Horizonte has recently built a new wastewater treatment plant (called “ETAF-Pampulha”) to treat the input of wastewater into the reservoir, the plant only catches discharge of two of the eight tributaries. Even if these streams are the main contributors to the pollution load (around 70%), the other streams reach the reservoir without receiving any treatment. This means that 30% of the influent wastewater to the reservoir is not treated (Coutinho, 2007). Our data shows that ETAF-Pampulha seems not to be efficient in the removal of nitrogen in the reservoir, but is effective to remove sources nitrogen in water. Furthermore, it is also insufficient for phosphorus removal, since the plant does not treat any of the phosphorus bound in the sediments that can be released at any time, following stratification changes in the

water column (Coutinho, 2007; Figueredo et al. submitted). This probably causes increasing P concentrations, establishing conditions of very poor water quality (Anderson et al. 2005).

During this work, phosphorus concentration detected in Pampulha reservoir was between 100-300 $\mu\text{L}^{-1}$  (Tab. 1), and the high phosphorus levels could be the main cause of a persistent cyanobacterial bloom in Pampulha reservoir (Figueredo et al. submitted), since in lakes the phytoplankton is more likely to be limited by phosphorus than by any other nutrient (Reynolds 2006). Nevertheless, when lakes and reservoirs reach these highly eutrophic conditions, it is very difficult to identify the impact of each of environmental parameter upon the diversity and temporal evolution of the microbial community (López-Archilla et al. 2004).

The hyper-eutrophic state and the constant decrease of the water quality in Pampulha reservoir since the 80s, when the water was still used for human consumption (Giani et al. 1988), have contributed to the maintenance of a permanent cyanobacterial bloom in the reservoir and making the water unsuitable for drinking, recreation and any other proposal that is not landscape. This may justify our observation of the permanent dominance of the cyanobacterial community, registered in the microscopy and the DGGE analyses, where the dominant species (especially *S. brasiliense* and *C. raciborskii*) were present throughout the year, even if in a few occasions at a lower density.

In Pampulha reservoir the occurrence of high cyanobacteria biomass of *C. raciborskii* was already recorded in 1984 and 1985 and *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* and *Woronichinia naegelianum* (old *Coelosphaerium naegelianum*) in 1990 and 1991, high biomass of *Microcystis* spp. was again observed between the years 1996 and 1997 (Pinto-Coelho 1992; Figueredo & Giani 2001). But, in all the years studied by these

authors, the cyanobacterial populations always showed a decrease between March and July, or during the colder winter months. They never dominated during the entire year, unlike the observed in the present research.

Figueredo & Giani (2009) studied a dominant bloom of *C. raciborskii* in a shallow natural lake, Lagoa Santa, located in Brazilian savannah (cerrado) in southeastern Brazil. Because of the unchanging dominance of the species, the authors suggested that biological interactions, like allelopathy (Figueredo et al. 2007), could be more important in this system than environmental variables to explain the success of *C. raciborskii*. In a shallow eutrophic tropical reservoir (Mundaú) located in northeastern of Brazil, and according to Bouvy et al. (1999) typified by limnological and meteorological conditions distinct to those in the reservoirs in the south of the country; Bittencourt-Oliveira et al. (2011) observed that the absence of thermal stratification favored an increase in the populations of *C. raciborskii*. In another eutrophic reservoir (Arcoverde), also situated in a semi-arid region in northeastern Brazil, Bittencourt-Oliveira et al. (2012) attributed the very high biomass of *C. raciborskii* to physical variables and seasonal climatic factors associated to periods of stratification and de-stratification.

We observed the highest biomass of *C. raciborskii* in Pampulha reservoir during the rainy season in the stratification period, in which were recorded the highest values of water thermal resistance, between 126.63 and 42.87 g.cm<sup>-3</sup> (Tables 1 and 2) and higher temperatures (Fig.5). Similar results were previously reported in Tapacurá reservoir when researchers studied the temporal variation of phytoplankton and observed that stratification conditions favored the rapid growth and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Ferreira 2002; Bouvy et al. 2003), which together with the specie *Anabaena spiroides* caused a toxic bloom (neurotoxins) in that environment

(Molica et al. 2005). Dantas et al. (2011) also reported an increase in *C. raciborskii* populations in the stratified waters of Arcoverde and Pedra in the same reservoirs. During periods of mixing, the structure of the phytoplankton community was formed by different species, including *Microcystis*, as observed in our study.

Therefore, it is possible that physical and climatic factors (temperature, net solar radiation, precipitation, stratification and mixing) are strong determinant to explain the dominance of *C. raciborskii* in Pampulha reservoir, and unlike expected in a tropical system, temperature could be an important controlling factor in the species dynamic of the cyanobacteria community.

Bonilla et al. (2012) constructed a database of 940 samples taken from 28 lakes representing three climate regions (tropical, subtropical and temperate) to evaluate the global distribution and ecological preferences of *C. raciborskii* and *P. agardhii*, and they concluded that *C. raciborskii* could have a competitive advantage over *P. agardhii* in conditions of high light and high temperature. A good example of the importance of temperature for *C. raciborskii* is that global warming has been cited as responsible for its recent wider geographical distributions (reviewed in Reichwaldt & Ghadouani 2012). Additionally, Bouvy et al. (1999) suggested that in Ingazeira reservoir temperature should not be important for *C. raciborskii* development, once the recorded values were always higher than 24°C. Furthermore, the authors showed that blooms of *C. raciborskii* occurred during the lowest light intensities, and in this case the potential drivers of the *C. raciborskii* occurrence could be the drought that caused long water residence time, eutrophic conditions and reduced transparency.

To conclude, the cyanobacterial community composition in Pampulha reservoir in the study period was basically composed by species described as resistant and capable of surviving and growing in eutrophic environments (Sant'Anna & Azevedo

2000; Komárek & Komárková 2002; Reynolds 2006). A succession was observed between species of the Nostocales Order (*C. raciborskii*), which dominated in the rainy season, with higher temperature and water stratification, and the Order of Chroococcales (mainly *S. brasiliense*), more dominant during the dry season and especially at the end of the dry season, when the highest concentration of total-P was registered.

Both techniques employed in this work, microscopy and DGGE, showed similar results, with high biomass of cyanobacteria and dominance of the main species *Cylindrospermopsis*, *Sphaerocavum* and *Microcystis*, over the 15 months of study. Regarding the composition of species within the community of cyanobacteria, accessed by the two techniques, the results were complementary, with some species identified only by the microscopy technique, and others only by molecular analysis.

In general, by the morphological characterization, an overestimation of the richness and diversity may be attributed to the erroneous distinction of one species as two by their apparent singular morphological characteristic that may just be a different stage of development of the same species or may indicate phenotypic plasticity (Komárek 2010). This is the case of several *Microcystis* species that are frequently characterized morphologically, but they do not generate different sequences. On the other hand, DGGE is a technique able to detect only the main species inside a population, those that represent more than 1%-1.6% of the total community, thus a sub-estimation of rare species is possible (Muyzer et al. 1993; Ferris & Ward 1997). Therefore, the use of the two techniques together is recommended to better identify and understand the structure and composition of the cyanobacteria community.

## 5.5 Acknowledgements

This study was supported by a scholarship to A.M.M.B.L. from CEMIG (Companhia Eletrica de Minas Gerais) and by funds provided by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal Docente) and FAPEMIG (Fundação de Apoio a Pesquisa de Minas Gerais). We thank to Center for Development of Nuclear Technology (CDTN) for providing the meteorological data. We are very grateful to Pedro Lima for the phytoplankton counting and identification, to Cleber Chaves for assistance with the R program, to Fabiana Cerqueira for help with statistics analyses, to professor Juliana Calabria and PhD student Érika Abreu from DESA/UFMG for their guidance and assistance with the Vertical Electrophoresis System (BIO-Rad/USA), and also to Ivette Salka and Katrin Attermeyer (IGB, Germany) for their support with the phylogenetic analysis.

## 5.6 References

American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington Dc: American Public Health Association Publications, 2005.

Anderson, J. N., Jeppesen, E., and Sondergaard, M. (2005) Ecological effects of reduced nutrient loading (oligotrophication): an introduction. *Freshwater Biology* **50**(10):1589-1593.

Azevedo, M. T. P. and Sant'anna, C. L. (2003) *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* **109**:79-92.

Barreto, A. A., Lambertucci, A. A. F. and Jacomino, F. M. V. Estudo das informações meteorológicas da região da Pampulha em Belo Horizonte no período de 1997 a 2009. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CLIMATOLOGIA GEOGRÁFICA, 9, 2010, Fortaleza. *Estudo das informações meteorológicas da região da Pampulha em Belo Horizonte no período de 1997 a 2009*. Fortaleza: Sbcg, 2010.

Bittencourt-Oliveira, M. C., Moura, A. N., Hereman, T. C. Dantas, E. W. (2011) Increase in Straight and Coiled *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) Populations under conditions of thermal de-stratification in a shallow tropical reservoir. *Journal of Water Resource and Protection* **3**:245-252.

Bittencourt-Oliveira, M. C., Dias, S. N., Moura, A. N., Codeiro-Araújo M. K., Dantas. E. W. (2012) Seasonal dynamics of cyanobacteria in a eutrophic reservoir (Arcoverde) in a semi-arid region of Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **72**(3):533-544.

Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lüring, M., et al. (2012) What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology* **79**(3): 594-607.

Bouvy, M., Molica, R., 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 Microbiol Ecology* **20**:285-297.

Bouvy, M., Nascimento, S. M., Molica, R. J. R., Ferreira, A., Huszar, V., & Azevedo, S. M. F. O. (2003) Limnological features in Tapacurá reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. *Hydrobiologia* **493**:115-130.

Carey, C. C. A., Ibelings B. W., Hoffmann, E. P., Hamilton, D. P., Brookes, J. D. (2012) Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research* **46**:1394-1407.

Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., et al. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* **109**(7): 663-668.

Chen, Y., Qin, B., Teubner, K. and Dokulil, M. T. (2003) Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: *Microcystis*-domination in Lake Taihu, a large shallow lake in China. *Journal of Plankton Research* **25**:445-453.

Chorus, I. and Bartram, J. (Ed.). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. London, New York: St. Edmundsbury Press, Suffolk, 1999.

Coutinho, W. *Emprego da flotação a ar dissolvido no tratamento de cursos d'água - avaliação de desempenho da estação de tratamento dos córregos Ressaca e Sarandi, afluentes à Represa da Pampulha*. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

Dantas, E. W., Moura, A. N. and Bittencourt-Oliveira, M. C. (2011) Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **83**(4):1327-1338.

Elliott, J. A. (2012) Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water Research* **46**(5):1364-1371.

Ferreira, A. *Dinâmica do fitoplâncton de um reservatório hipereutrófico (reservatório Tapacurá, Recife, PE), com ênfase em *Cylindrospermopsis raciborskii* e seus morfotipos*. 2002. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Taxonomia e Ecologia de Algas, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

Ferris, M. J. and Ward, D. M. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. (1997) *Applied and Environmental Microbiology* **63**:340-346.

Figueredo, C. C. and Giani, A. (2001) Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia* **445**:165-174.

Figueredo, C. C., Giani, A., and Bird, D. F. (2007) Does Allelopathy Contribute To *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology* **43**(2):256-265.

Figueredo, C. C. and Giani, A. (2009). Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologia* **39**:264-272.

Figueredo, C. C., Lopes, A. M. M. B, Lima, P. H. O., Giani, A. Submitted. Increasing phosphorus level by urban influence is the main cause of a persistent cyanobacterial bloom in a tropical ecosystem – the Pampulha reservoir revisited.

- Fiore, M. F., Neilan, B. a., Copp, J. N., Rodrigues, J. L. M., Tsai, S. M., Lee, H., Trevors, J. T. (2005) Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. *Water Research* **39**(20):5017-5026.
- Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. D. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuário, D. B., Fiore, M. F. (2009) Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* **627**(1):195–209.
- Galhano, V., Figueiredo, D. R., Alves, A., Correia, A., Pereira, M. J., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F. (2011) Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia* **663**(1):187-203.
- Garcia-Pichel, F., López-Cortez, A. and Nübel, U. (2001) Phylogenetic and morphological diversity of Cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado Plateau. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(4):1902-1910.
- Giani, A., Pinto-Coelho, R. M., Oliveira, S. J. M., Pelli, A. (1988) Ciclo sazonal de parâmetros físico-químicos da água e distribuição horizontal de nitrogênio e fósforo no reservatório da Pampulha (Belo Horizonte, MG, Brasil). *Ciência e Cultura* **40**(1):69-77.
- Giani, A. Limnology in Pampulha Reservoir: some general observations with emphasis on the phytoplankton community. In: Pinto-Coelho, R. M. et al. Ecology and Human Impact on Lakes and Reservoirs in Minas Gerais. Belo Horizonte: Seprac, 1994. p. 151-154.
- Gomes, L. N. L., Oliveira, S. M. A. C.; 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**(8):4635-4645.
- Heath, M. W., Wood, S. A. and Ryan, K. G. (2010) Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology* **73**(1):95-109.
- Isvánovics, I., Shafik, H. M., Présing, M. and Juhos, S. (2000) Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology* **43**: 257-275.
- James, R. T., Chimney, M. J., Sharfstein, B., Engstrom, D. R., Schottler, S. P., East, T., Jin, K. R. (2008) Hurricane effects on a shallow lake ecosystem, Lake Okeechobee, Florida (USA). *Fundamental and Applied Limnology* **172**(4):273-287.
- Knoll, A. H. Cyanobacteria and earth history. In: Herrero, Antonia; Flores, Enrique (Comp.). *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. Cap. 1, p. 1-19.
- Komárek, J. and Komárková, J. (2002) Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology Olomuc* **2**:1-24.
- Komárek, J. (2003) Problem of the taxonomic category “species” in cyanobacteria. *Algological Studies Cyanobacterial Research* **4109**:281-297.
- Komárek, J. (2010) Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. *Hydrobiologia* **639**:231-243.



- Kurmayer, R., Christiansen, G. and Chorus, I. (2003) The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2): 787-795.
- Lopes, V. R., Ramosa, V., Martins, A., Sousa, M., Welker, M., Antunes, A., Vasconcelos, V. M. (2012) Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research* **73**:7-16.
- López-Archilla, A. I., Moreira, D., López-García, P., Guerrero, C. (2004) Phytoplankton diversity and cyanobacterial dominance in a hypereutrophic shallow lake with biologically produced alkaline pH. *Extremophiles* **8**(2):109-115.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A. et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4):1363-1371.
- Molica, R. J. R., Oliveira, E. J. A., Carvalho, P. V. V. C., Costa, A. N. S. F., Cunha, M. C. C., Melo, G. L., Azevedo, S. M. F. O. (2005) Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* **4**(4):743-753.
- Muyzer, G., Waal, D. E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3): 695-700.
- Newcombe, G., Chorus, I., Falconer, I. and Lin, T. F. (2012) Cyanobacteria: impacts of climate change on occurrence, toxicity and water quality management. *Water Research* **46**(5):1347-1584.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8):3327-3332.
- Palinska, K., Liesack, W., Rhiel, E., Krumbein, W. (1996) Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia* like isolates. *Archives of Microbiology* **166**(4):224-233.
- Pinto-Coelho, R. M. Evolução do grau de eutrofização na Lagoa da Pampulha: comparação de ciclos sazonais de nutrientes (N e P) e organismos planctônicos. In: ANAIS DO SEMINÁRIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DA PAMPULHA, 1992, Belo Horizonte. *Evolução do grau de eutrofização na Lagoa da Pampulha: comparação de ciclos sazonais de nutrientes (N e P) e organismos planctônicos*. Belo Horizonte: Sebrac, 1992. p. 1 - 14.
- Pinto-Coelho, R. M. (1998) Effects of eutrophication on seasonal patterns of mesozooplankton in a tropical reservoir: a 4-year study in Pampulha Lake, Brazil. *Freshwater Biology* **40**:159-173.
- R Development core team (2005) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rajaniemi-Wacklin, P., Rantala, A., Kuuppo, P., Haukka, K., Sivonen, K. (2008) Cyanobacterial community composition in shallow, eutrophic Lake Tuusulanjärvi studied by microscopy, strain isolation, DGGE and cloning. *Algological Studies* **126**(1):137-157.

- Reichwaldt, E. S., & Ghadouani, A. (2012) Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water Research* **46**(5):1372-93.
- Reynolds, C. S. *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 551 p.
- Reynolds, C. S. *Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. 184 p.
- Rott, E. (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* **43**:34-62.
- Sant'Anna, C. L. and Azevedo, M. T. P. (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* **71**(3):359-385.
- Sant'Anna, C. L., Azevedo, M. T., Senna, P. A.C., Komarék, J., Komárková. (2004) Planktic cyanobacteria from São Paulo state, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica* **27**(2): 213-227.
- Shapiro, J. (1973) Blue-green algae: why they become dominant. *Science* **179**(4071):382-384.
- Smith, V. H., Joye, S. B. and Howarth, R. W. (2006) Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* **51**:351-355.
- Talling, J. F. (1986) The seasonality of phytoplankton in African lakes. *Hydrobiologia* **138**:139-160.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, R. De, Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(9):5157-5169.
- Tilman, D., Kilham, P. and Kilham, S. S. (1982) Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**:349-372.
- Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* **9**: 141-38.
- Wetzel, R. G. and Likens, G. E. *Limnological Analyses*. New York: Springer Science, 2002. 425 p.
- Zohary, T., Pais-Madeira, A. M., Robarts, R., Hambright, K. D. (1996) Interannual phytoplankton dynamics of a hypertrophic African lake. *Archiv für Hydrobiologie* **136**(1):105-126.
- Zwart, G., Hiorns, W. D., Methé, B. A., Agterveld, M. P. K., Huisman, R., Nold, S. C. (1998) Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **21**:546-556.
- Zwart, G., Agterveld, M. P. K., Werff-staverman, I. Van Der, Hagen, F., Hoogveld, H. L., and Gons, H. J (2005) Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environmental Microbiology* **7**(3):365-377.

## 6 Variação espacial e temporal da comunidade de cianobactérias em um reservatório tropical oligotrófico: a dominância das picocianobactérias

Ana M. M. B. Lopes<sup>a</sup>, Alessandra Giani<sup>a\*</sup>

a. Departamento de Botânica, Laboratório de Ficologia, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. PO Box 486, 31270–010 Belo Horizonte, MG, Brasil.

\* autor para correspondência: agiani@icb.ufmg.br

### Abstract

The spatiotemporal variability of the cyanobacteria community was studied in Volta Grande reservoir (MG, Brazil) during 12 months in five sampling sites. Samples for physical, chemical, biological and environmental variables were always collected in the euphotic zone (integrated sample). To evaluate the molecular diversity of the community, we used the fingerprinting method DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), and taxonomic analyses based on species morphology were performed by classical microscopy (Üthermol, 1958). The genera that presented higher cell biovolume were *Merismopedia*, *Aphanocapsa* and *Chroococcus* and they were observed in all five sampling sites, showing no spatial variation of the presence of these genera in the reservoir. However a seasonal variation was detected between dry and rainy season, with higher picocyanobacterial biomass during the rainy season. Other genera as *Snowella*, *Cyanodictyon*, *Aphanothece* and *Coelosphaerium* were also registered in most of the study period. Sites VG1 and VG2 had the same composition of picocyanobacteria, sites VG4 and VG5 showed similar patterns of species and site VG3 was slightly different from the other sampling sites. The results obtained by the two techniques, morphological and molecular, revealed to be complementary and pointed to the dominance of picocyanobacteria species within of the total cyanobacteria community representing on average 85% of total biovolume. The oligotrophic state in Volta Grande reservoir was probably the main factor responsible for the dominance of this group.

**Keywords:** Cyanobacteria, picocyanobacteria, spatiotemporal variability, oligotrophy, reservoir.

### 6.1 Introdução

A importância do fitoplâncton para caracterização e entendimento de um ecossistema aquático é inquestionável e tem sido tópico relevante de estudo nas últimas décadas (Evans 1988; Zohary et al. 1996; Chen et al. 2003). As cianobactérias destacam-se dentro do fitoplâncton por causa de sua importância ambiental e sanitária, pois podem crescer excessivamente em ambientes eutrofizados e predominar sobre as

demais espécies, formando florações (*blooms*). Elas podem também apresentar risco à saúde humana e de animais, devido à potencial toxicidade de alguns gêneros (Carmichael et al. 2001).

Em ambientes oligotróficos e mesotróficos, onde as concentrações de nutrientes não são elevadas o suficiente para promover florações de cianobactérias, alguns grupos, como o do picoplâncton cocoide (picocianobactérias), tendem a prevalecer, em virtude de sua habilidade de sobreviver e crescer em ambientes com limitação de nutrientes. Segundo Kirchman (2012), as células menores competem com as células maiores, graças à sua maior razão superfície/volume, explorando melhor os nutrientes limitantes.

As picocianobactérias têm de 0,2 a 2µm de diâmetro (Sieburth et al. 1978), possuem distribuição cosmopolita e estão presentes em todos os tipos de ambientes aquáticos com diferentes graus de trofia (Stockner & Shortreed 1991), entretanto as picocianobactérias são mais abundantes e consideradas responsáveis por 80-90% da produtividade primária em ambientes oligotróficos (Stockner & Porter 1988), como oceanos abertos, onde as concentrações de nutrientes como amônia e fosfato são extremamente baixas, chegando a atingir  $<10\text{nmol.L}^{-1}$  (Kirchman 2012).

Devido ao pequeno tamanho e à morfologia simples, a identificação das picocianobactérias por meio da microscópica óptica é extremamente difícil (Stockner & Antia 1986), e o reconhecimento inicial do grupo foi facilitado pelo uso da microscopia de epifluorescência, que foi adaptada de seu uso inicial para contagem de bactérias heterotróficas (Daley & Hobbie 1975). Contudo, para classificar novas espécies e gêneros de cianobactérias, inclusive de picocianobactérias, faz-se necessário o uso de métodos citomorfológicos, ecofisiológicos e bioquímicos (Komárek 2010).

Os gêneros de picocianobactérias de morfologia colonial com ocorrência mais comum em ambientes de água doce são: *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*,

*Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Snowella* e *Tetrarcus* (Callieri & Stockner 2002). Os outros gêneros dominantes são de morfologia unicelular; *Synechococcus* e *Cyanobium*, ao passo que *Prochlorococcus marinus* possui ocorrência mais relatada em ambientes marinhos (Callieri et al. 2012).

O uso de métodos tradicionais com base na morfologia celular, em combinação com técnicas moleculares baseadas em marcadores moleculares, tem oferecido a melhor solução para identificação das picocianobactérias (Callieri & Stockner 2002; Callieri 2007). As técnicas de *fingerprint*, como a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) (Muyzer et al. 1993), fornecem um perfil da diversidade da comunidade microbiana de interesse baseada na separação física de ácidos nucleicos. Uma técnica polifásica (Vandamme et al. 1996), abrangendo a caracterização morfológica e molecular, é capaz de detectar as espécies e as mudanças de composição na comunidade microbiana em diferentes ambientes naturais (Taton et al. 2003; Furtado et al. 2009; Heath et al. 2010; Galhano et al. 2011; Lopes et al. 2012).

O reservatório de Volta Grande está classificado na categoria oligomesotrófico (baixa à média disponibilidade de nutrientes). Essa condição tem sido mantida pela eminente capacidade que o sistema possui para absorver o elevado aporte externo de fósforo e pelo baixo tempo de retenção de suas águas. Portanto, apesar das cargas de esgotos domésticos e industriais afluentes ao reservatório, ele ainda mantém baixas concentrações de fósforo e nitrogênio (Greco 2002). Pesquisas recentes evidenciaram que o reservatório de Volta Grande não apresentou tendência à eutrofização nas últimas décadas (Greco 2002; Campos 2003; Mota 2006).

Neste estudo foram estimadas a variação espacial e temporal das cianobactérias, especialmente da comunidade de picocianobactérias, no reservatório de Volta Grande, utilizando um método polifásico, tendo a microscopia clássica (Utermöhl 1958) sido

somada à técnica molecular de DGGE (Muyzer et al. 1993), após a amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA, específico para o grupo Cyanobacteria (Nübel et al. 1997).

## **6.2 Material e métodos**

### **6.2.1 Coleta das amostras**

O reservatório de Volta Grande (S 20 ° 01 '76.8", W 48 ° 19' 11.5") está incluído na área drenada pela bacia do Rio Paraná, sub-bacia do Rio Grande, e localiza-se entre os estados de Minas Gerais e São Paulo, Brasil (CETESB 1976). O reservatório possui área superficial de 222 km<sup>2</sup>, volume de 2,3 bilhões de m<sup>3</sup> (Braga & Gomiero 1997), perímetro de 80 km (Rolla & Rosa 1990) e tempo de residência da água de aproximadamente 21 dias (CETESB 1976).

O reservatório é usado para geração de energia elétrica, e sua operação iniciou-se em 1974 com uma capacidade instalada de 380 MW (Campos 2003). O clima local apresenta dois períodos bem definidos: (i) estação chuvosa (de outubro a março) e (ii) estação seca (de abril a setembro) (Greco, 2002).

As amostras foram coletadas mensalmente entre janeiro e dezembro de 2011, na zona eufótica, em cinco pontos de amostragem: **VG1**, localizado próximo a piscicultura em direção à barragem (20°01'36.0" S e 48°12'59.8" W); **VG2** localizado no corpo principal do reservatório, próximo ao tributário Água Comprida (20°07'45.2" S e 48°08'42.0" W); **VG3**, próximo a um local frequentado por banhistas (praia de Miguelópolis), e também perto dos tributários São Miguel e Lageado (20°09'05.0" S e 48°03'09.6" W); **VG4** (20°06'57.1 S e 47°55'04.6" W); e **VG5** (20°00'40" S e 47°52'19" W), localizados mais próximos à entrada do rio no reservatório, na região mais distante à barragem, representando uma zona de transição entre os ambientes lântico e lótico (Fig.1).

Antes de iniciar cada amostragem a transparência da coluna d'água foi medida com o auxílio de um disco de Secchi, e o valor obtido foi multiplicado por 2,5 para determinar a profundidade da zona fótica ( $z_{eu}$ ). Todas as amostras foram coletadas com o uso de uma mangueira de silicone, que permitiu uma amostragem integrada de toda a zona eufótica.

Para identificação e quantificação do fitoplâncton, uma subamostra de 250 mL foi preservada em solução de Lugol acético. Com exceção da amostra destinada à análise de fósforo total (P-total), as demais amostras de água foram passadas por filtros com porosidade de 0,7  $\mu\text{m}$  (GF1, Macherey & Nagel), até a completa saturação dos filtros, e o volume anotado. As amostras de água e os filtros foram preservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o processamento das análises e extração do DNA genômico. *In situ* também foram obtidos os perfis de temperatura, o pH, a condutividade e o oxigênio dissolvido (OD) sempre em intervalos de 0,5 m, com o auxílio de uma sonda multiparâmetros 556 YSI.

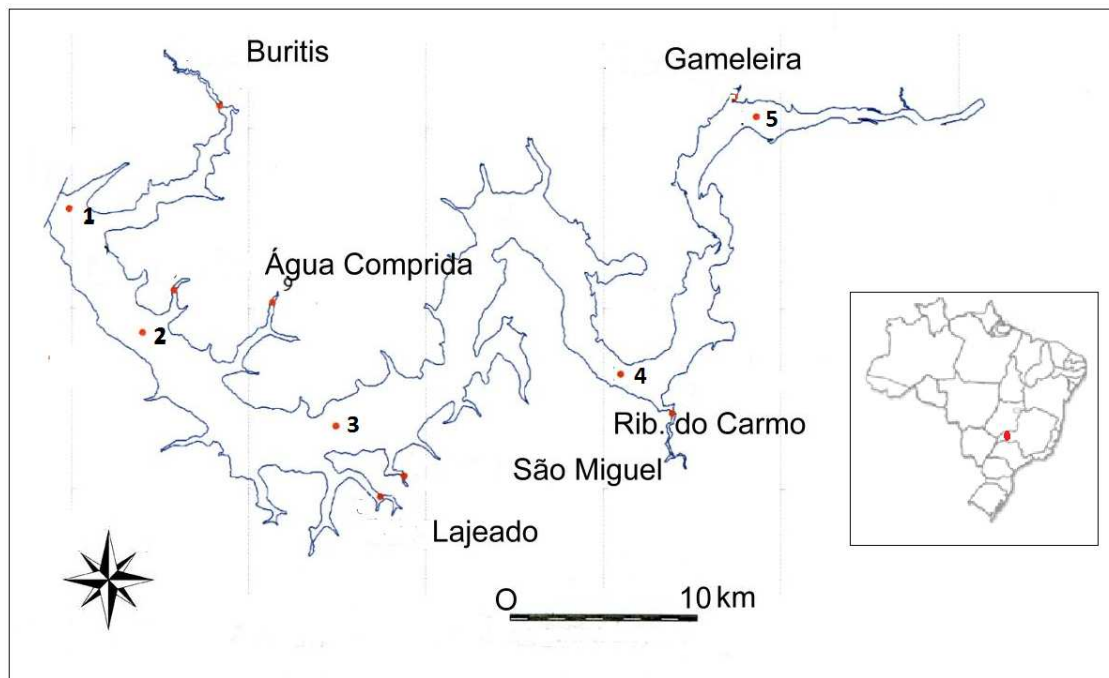


Fig. 1 – Distribuição dos pontos de amostragens e tributários no reservatório de Volta Grande: 1 (VG1), 2 (VG2), 3 (VG3), 4 (VG4) e 5 (VG5). Figura adaptada de Greco (2002).

### **6.2.2 Análises microscópicas**

A quantificação do fitoplâncton foi realizada por meio da observação em microscópio óptico invertido Zeiss Axio D1, de acordo com a técnica de Utermöhl (1958). Para avaliar a estrutura da comunidade em uma base de biovolume, foram medidos pelo menos 20 indivíduos de cada espécie, e o biovolume específico foi calculado, usando os modelos geométricos similares (Rott 1981).

### **6.2.3 Extração de ácido nucleico**

A extração do DNA foi realizada a partir dos filtros, utilizando fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, conforme descrito por Kurmayer et al. (2003), com algumas modificações. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, que correspondem aos valores de DNA e proteína, respectivamente. Os resultados foram expressos em ng.µL e a razão DNA:proteína foi usada para avaliar a qualidade do DNA.

### **6.2.4 PCR, DGGE e sequenciamento**

A reação de PCR foi realizada com os iniciadores CYA 359F-GC (5'GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC 3'), e uma mistura equimolar dos iniciadores CYA 781R(a) (5'GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T 3') e CYA 781R(b) (5' GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T 3') (Nübel et al. 1997). Para a primeira PCR, um volume de 2 µL, correspondente a 10 ng de DNA, foi adicionado em 48 µL do "mix" de amplificação, resultando na concentração final de Tampão 1x (Taq Buffer Dream), 4 mg/mL BSA (albumina de soro bovino), 0,4 mM dNTP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol/ µL de cada iniciador e 1U de Taq polymerase (Fermentas) em um volume final de 50 µL. As reações ocorreram no termociclador Eppendorf Mastercycle, com o seguinte



programa: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida por 30 ciclos de 94°C, 58°C (anelamento), 72°C (extensão) por 1 min cada e extensão final de 72°C por 10 min.

### **6.2.5 DGGE**

Os produtos de PCR amplificados, contendo 450 pb, foram submetidos à Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante, conforme descrito por Zwart et al. (1998, 2005) e Muyzer et al. (1993), com algumas modificações e utilizando um sistema de Eletroforese Vertical BIO-Rad (USA). Para os fragmentos amplificados pelos iniciadores CYA 359F-GC e 781R(a) mais 781R(b), foi utilizado um gradiente desnaturante composto de ureia e formamida, variando de 40 a 70%, 6% de acrilamida e TAE 0,5 X. No gel foi aplicada uma concentração de 400ng/DNA de cada amostra, previamente medida com o auxílio de um padrão de DNA *Low Mass Ladder* (Invitrogen). A corrida no gel deu-se por 16 horas a 80V e 60°C. Para o sequenciamento dos fragmentos SSU rDNA das bandas de DGGE, a parte central da banda foi extraída do gel com o auxílio de um bisturi devidamente esterilizado após cada incisão e o DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE 1X, reamplificado e sequenciado, como descrito por Zwart et al. (1998). Uma alíquota de 3 µL foi utilizada para reamplificação com os iniciadores usados para PCR, porém sem o grampo GC. O sequenciamento foi realizado com os produtos de PCR previamente purificados com 11,25 µL de EDTA 125 mM mais 135 µL de etanol absoluto e centrifugado por 25 min a 13.000 rpm e ressuscitado em 10 µL de água ultrapura. As amostras foram enviadas para sequenciamento na Macrogen (Coréia do Sul).

Antes de iniciar a corrida no gel de DGGE, as amostras foram analisadas em um gel paralelo, com o objetivo de determinar o gradiente desnaturante, a temperatura e o tempo de corrida ideais. Após a definição desses parâmetros, todas as amostras foram aplicadas simultaneamente no gel.

### **6.2.6 Análises filogenéticas das sequências de DGGE**

A afiliação filogenética das bandas de DGGE sequenciadas foi calculada pelo pacote do *software* ARB (Ludwig et al. 2004). As sequências e contigs obtidos foram alinhados com um *aligner* ARB SINA, disponível em <http://www.arb-silva.de>. As sequências de baixa qualidade foram excluídas das análises. O resultado do alinhamento foi incorporado a um banco de dados ARB SSU rRNA database (janeiro de 2013), em um computador local, ajustado manualmente e adicionado à base SSU rRNA, utilizando o algoritmo *Maximum-likelihood* para calcular a árvore a as sequências de DGGE adicionadas com Máxima Parcimônia. Para validar a topologia da árvore, foi utilizada uma análise de bootstrap com 100 réplicas.

### **6.2.7 Variáveis físicas e químicas**

As concentrações de fósforo solúvel, amônio, nitrito e nitrato foram determinadas por métodos colorimétricos, com o auxílio do espectrofotômetro (APHA 2005). A fração não filtrada das amostras foi submetida à análise para determinação da concentração de fósforo total, após oxidação em solução tamponada de persulfato de potássio.

### **6.2.8 Métodos Estatísticos**

As similaridades entre os perfis de bandas de DGGE das amostras foram calculadas pela análise de agrupamento (*cluster analysis*), utilizando o coeficiente de Jaccard, com base na presença ou ausência de bandas de DGGE em uma determinada posição em cada linha (altura) do gel, e aplicando o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Average linkages*). Este procedimento resulta em um dendograma que representa as relações genéticas entre as amostras, gerado pelo programa de acesso livre R (R Development Core Team 2005).

A avaliação das mudanças sazonais foi realizada pelo Modelo Linear de Efeito Misto, comparando os dados obtidos. As análises foram feitas no pacote estatístico R. Antes das análises, os resíduos do conjunto de dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade pelo teste Brown-Forsythe.

Para avaliar as correlações entre as variáveis biológicas (clorofila-*a* e biovolume de Cyanobacteria e Picocyanobacteria, *Merismopedia*, *Aphanocapsa*, *Chroococcus*), transparência do disco de Secchi e nutrientes (nitrato e fósforo total), a normalidade dos dados foi avaliada independentemente para cada variável. Devido à ausência de normalidade, uma correlação não paramétrica (correlação de Spearman) foi realizada.

Previamente a esse procedimento, realizou-se a análise de componentes principais (PCA) com o auxílio do programa STATISTICA 7.0 (Tulsa, USA, 2004), para extração das principais tendências entre as variáveis ambientais e variáveis fitoplanctônicas. Por causa da elevada quantidade de autocorrelações na análise de correlação de Spearman, nem todas as variáveis foram incluídas na PCA. Portanto, a PCA foi realizada para as variáveis ambientais (Secchi, temperatura da água, nitrato, fósforo total e ortofosfato) e para as variáveis biológicas (clorofila e biovolume total de picocianobactérias).

## **6.3 Resultados**

### **6.3.1 Variação espacial e temporal da comunidade de cianobactérias**

Em geral, o biovolume total de cianobactérias foi uniformemente distribuído entre os cinco pontos de coleta. Entre os meses de janeiro e abril o biovolume foi maior que entre maio a julho (estação seca), quando o biovolume diminuiu substancialmente, voltando a aumentar a partir de agosto para VG2 até dezembro nos demais pontos de

coleta. Durante os meses de outubro a dezembro, o maior biovolume foi observado no ponto VG2 (Fig. 2).

Em 44 das 60 amostras analisadas (73%), as picocianobactérias representaram, em média, 85% do biovolume da comunidade total de cianobactérias. Os gêneros nanoplantônicos da ordem Chroococcales como os *Microcystis* e *Sphaerocavum*, ficaram em segundo lugar, mas junto com as ordens Nostocales e Oscillatoriales representaram apenas uma pequena porcentagem da comunidade total de cianobactérias (Fig. 3). Constatou-se a dominância de três gêneros de picocianobactérias, *Chroococcus* spp., *Aphanocapsa* spp. e *Merismopedia* spp., detectados nos cinco pontos de amostragem, na maioria dos meses de monitoramento (Figs. 3A, 3B, 3C e 3D).

Houve variação espacial e temporal da riqueza de espécies (Fig. 3), tendo os pontos VG1 e VG2 apresentado similaridade com relação à composição de espécies, e os mesmos gêneros foram detectados em ambos, *Snowella*, *Cyanodictyon*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Aphanocapsa* e *Merismopedia*, nos 12 meses de monitoramento. Em geral, o ponto VG2 apresentou maior biovolume. No mês de fevereiro, por exemplo, esse biovolume foi basicamente representado por *Chroococcus* spp. No mês de março a densidade de células diminuiu em ambos os pontos, com a redução da biomassa das picocianobactérias em abril, que continuou baixa durante toda a estação seca (de abril a setembro), comparada com a estação chuvosa (de outubro a março).

Constatou-se a ocorrência dos gêneros *Aphanocapsa*, *Chroococcus*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia* e *Epigloeosphaera* (Fig. 3C) no ponto VG3. O gênero *Epigloeosphaera* foi observado no ponto VG3 nos últimos quatro meses de monitoramento (de setembro a dezembro), com a distribuição das espécies seguindo a mesma tendência sazonal observada nos pontos VG1 e VG2, com maior biovolume de células durante a estação chuvosa. Entretanto, o biovolume de picocianobactérias

observado na estação VG3, na estação seca, foi um pouco maior do que o registrado nos pontos VG1 e VG2.

Assim como nos pontos VG1 e VG2, os pontos VG4 e VG5 também tiveram composição similar da comunidade de picocianobactérias: *Cyanodictyon*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Aphanocapsa*, *Merismopedia* e *Coelomoron* (Fig. 3D), e a variação temporal foi a mesma observada anteriormente nos pontos VG1, VG2 e VG3, com a maior densidade de células na estação chuvosa.

Porém, entre os meses de abril e agosto (estação seca) a densidade de células foi próxima a zero nos pontos VG4 e VG5. A ordem Chroococcales, representada pelas espécies *Microcystis aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. smithii*, *M. protocystis* e *Sphaerocavum brasiliense*, foi somente detectada em poucos meses e nos seguintes locais: VG1 (novembro), VG2 (dezembro) e VG3 (fevereiro e outubro).

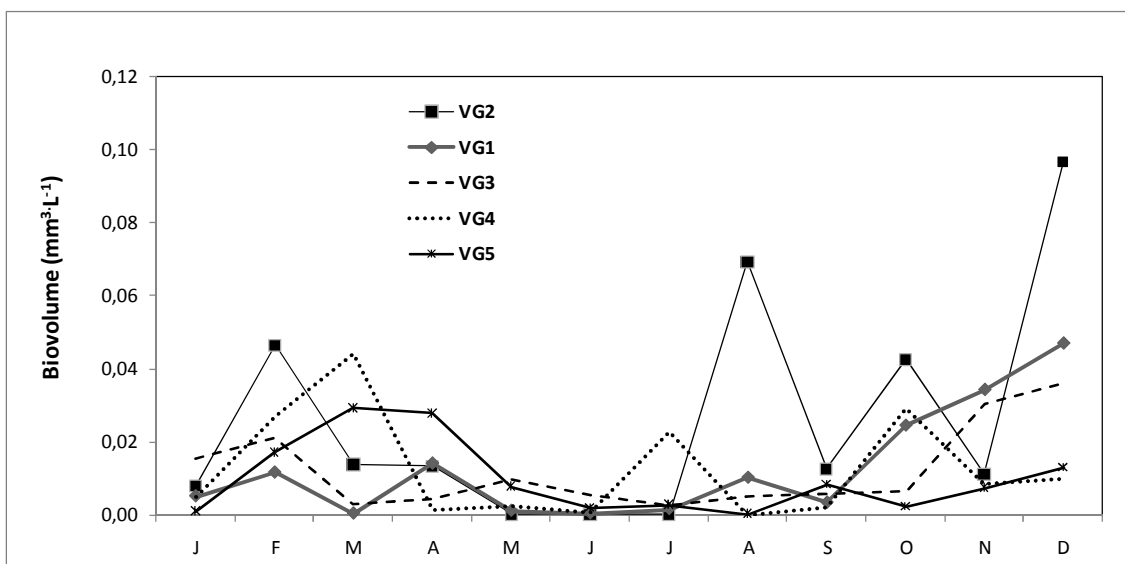


Fig. 2 – Biovolume total da comunidade de cianobactérias no reservatório de Volta Grande, em 2011.

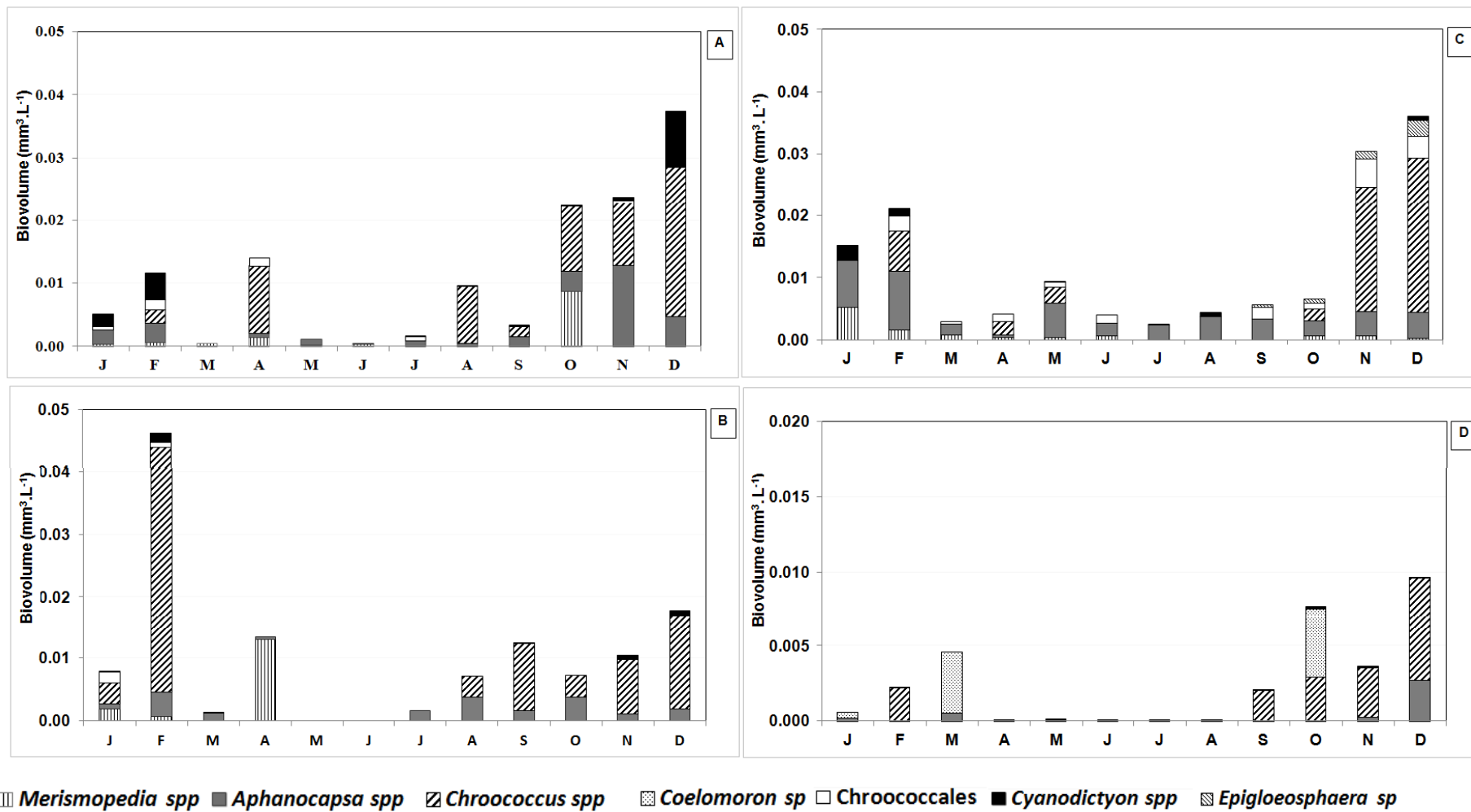


Fig. 3 – Gêneros dominantes de picocianobactérias e de Chroococcales (todas as espécies juntas) nos pontos VG1 (A); VG2 (B); VG3(C) e VG4 (D). O ponto de amostragem VG5 não foi representado devido à similaridade dos resultados com o ponto VG4.

### 6.3.2 Diversidade molecular de populações de picocianobactérias

No total, foram feitos seis géis de DGGE com as amostras coletadas no reservatório de Volta Grande, cada gel incluindo dois meses de coleta nos cinco pontos de amostragem, completando assim um ano de estudo (Fig. 4). Nos seis géis, 358 bandas foram observadas em 20 diferentes posições; 78 dessas bandas foram extraídas dos géis em 18 diferentes posições e sucessivamente sequenciadas e comparadas com as espécies de cianobactérias depositadas no banco de dados GenBank. Como não houve diversidade entre as bandas sequenciadas, pois apenas três gêneros de picocianobactérias unicelulares foram detectados, 35 bandas foram usadas na construção da árvore filogenética (Fig. 6).

Embora o gel de DGGE tenha apresentado uma aparente variação temporal do perfil de bandas (bandas em diferentes posições) entre os cinco pontos de coleta, todas as bandas extraídas e sequenciadas agruparam-se com os gêneros *Synechococcus* sp. ou *Cyanobium* sp. no Blast, como indicado pelas setas (S e C) na Fig. 4. O gênero *Prochlorococcus marinus* também foi detectado e utilizado na construção da árvore filogenética (Fig. 6).

A análise de agrupamento *cluster analysis* do perfil de bandas de DGGE mostrou a formação de sete clusters no gel de DGGE com valores de bootstrap > 95 (retângulo vermelho), e pelo menos 75% de similaridade entre as amostras (Fig. 5). No cluster 1, com a exceção do VG1, todos os demais pontos de amostragem agruparam-se em um único cluster para o mês de agosto, o que indica que não houve diferença espacial nesse mês.

O cluster 2 foi constituído por amostras dos meses de março e abril, onde todos os pontos de coleta agruparam-se. No cluster 3 as bandas de DGGE dos meses de

fevereiro, setembro, outubro, novembro e dezembro agruparam-se na maioria dos pontos de coleta, mostrando uma similaridade no perfil de bandas na estação chuvosa.

Os meses de maio e junho formaram dois clusters separados (4 e 5). O cluster 4 foi formado pelos pontos VG1, VG2 e VG3 e o cluster 5, pelos pontos VG4 e VG5, apresentando, portanto, uma diferença espacial entre os pontos de amostragem nestes dois meses de coleta. No cluster 6 as amostras dos pontos VG2, VG4 e VG5, de julho, agruparam-se. No cluster 7 as amostras de outubro e novembro dos primeiros dois pontos de amostragem (VG1 e VG2) e dos dois últimos (VG4 e VG5) formaram um cluster único (Fig. 5).

2011

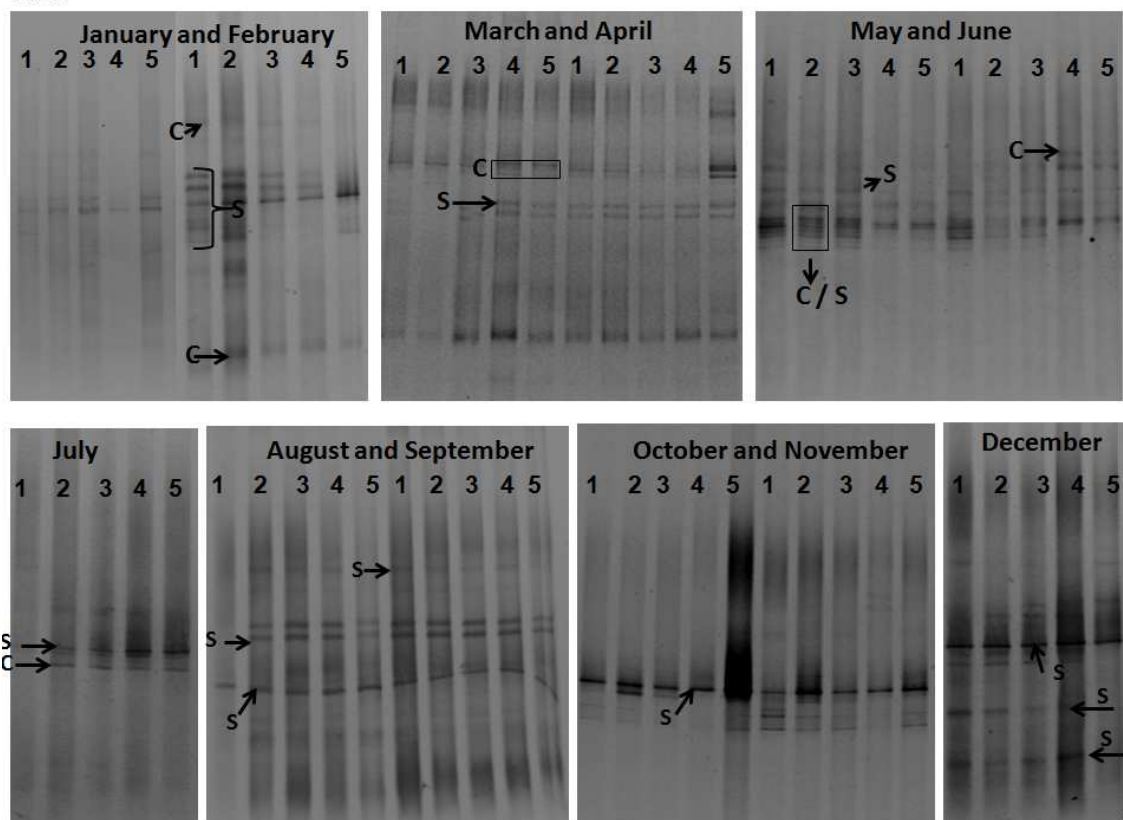


Fig. 4 – Perfil de bandas de DGGE das amostras de água do reservatório de Volta Grande (de janeiro a dezembro de 2011), nos cinco pontos de coleta. S= *Synechococcus* sp.; C=*Cyanobium* sp.



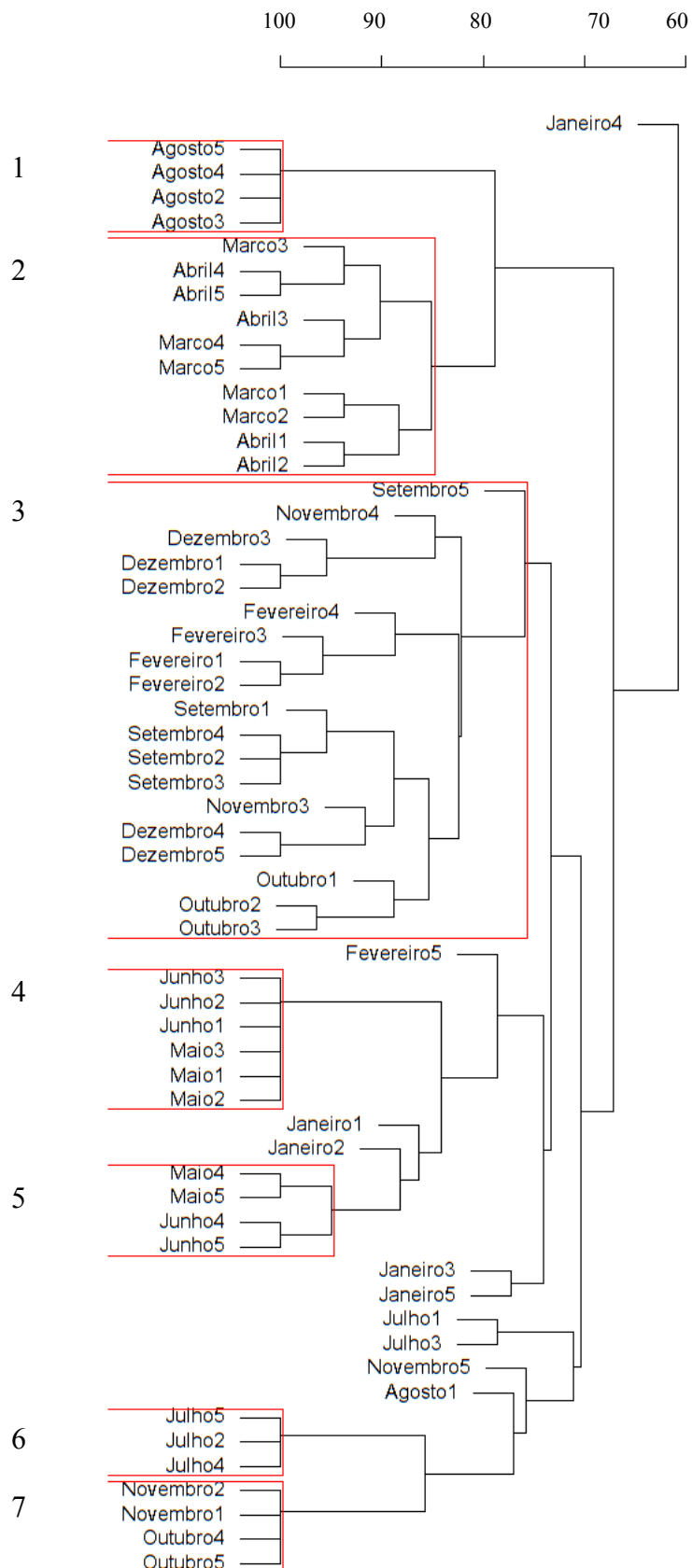


Fig. 5 – Dendrograma gerado com base na presença ou ausência de bandas no gel de DGGE da Figura 4 e expresso como porcentagem de similaridade. O número em frente ao mês refere-se ao local de coleta.

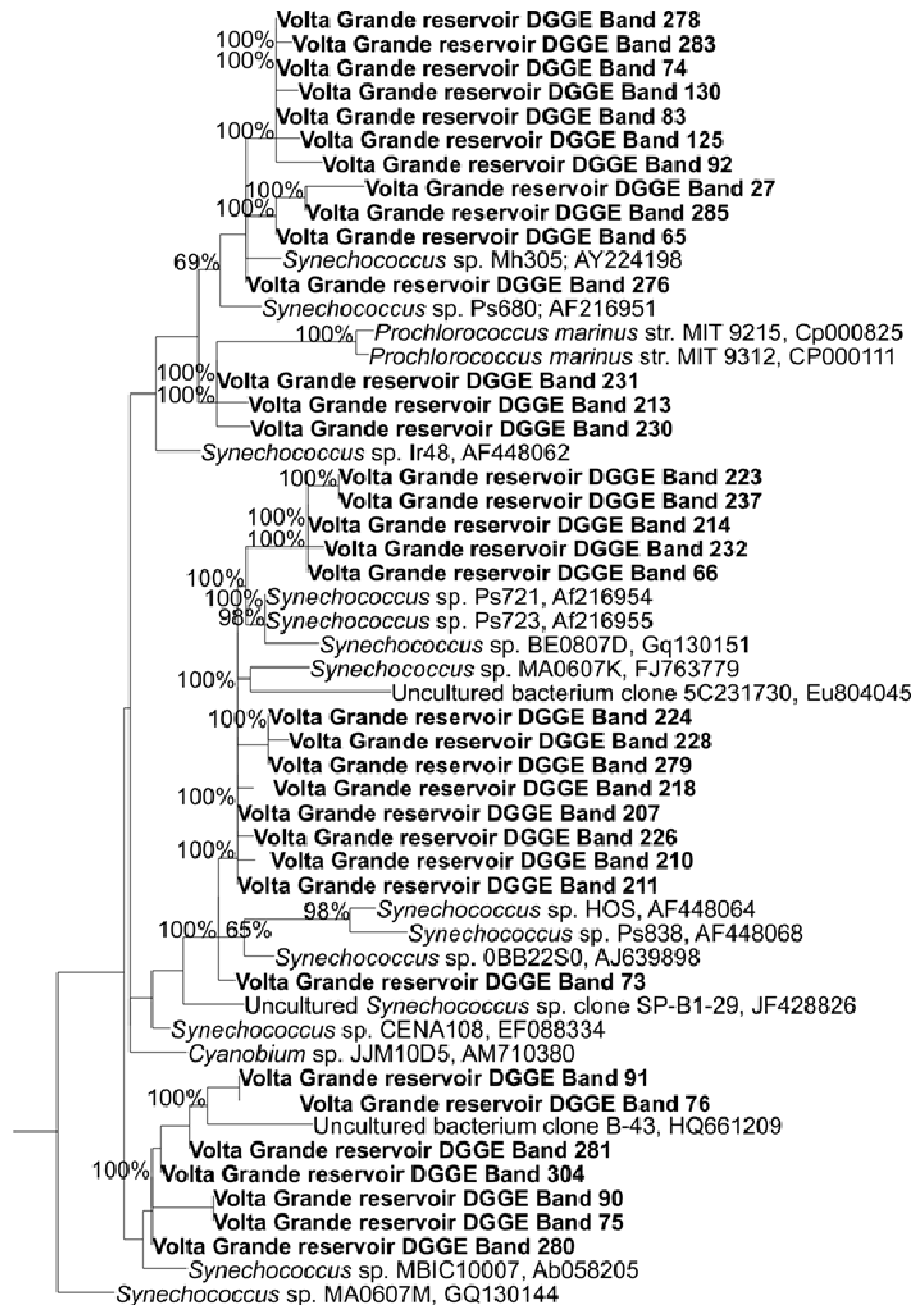
As sequências obtidas a partir das bandas de DGGE foram utilizadas para construir árvores filogenéticas e os valores de bootstrap acima de 50% foram incluídos na árvore (Fig. 6). Foram formados três clados, todos relacionados a espécies de picocianobactérias *Synechococcus* sp., *Prochlorococcus marinus* e *Cyanobium* sp.

O primeiro clado foi representado pelas bandas listadas na árvore como 278, 283, 74, 130, 83, 125, 92, 27, 285, 65, 276,231, 213, 230. Essas sequências agruparam-se com duas picocianobactérias, *Synechococcus* sp. e *Prochlorococcus marinus*, formando um clado onde as sequências obtidas obtiveram o mínimo de 99% de similaridade com as sequências do gene 16S rRNA depositadas no GenBank (Fig. 6).

O segundo clado foi formado pelas sequências das bandas de DGGE 223, 237,214, 232, 66, 224, 228, 279, 218, 207, 226, 210, 211, 73, que se agruparam com as picocianobactérias *Synechococcus* sp. e *Cyanobium* sp., com o mínimo de 98% de similaridade com as sequência do gene 16S rRNA no Blast.

O terceiro clado também foi constituído pelas picocianobactérias a partir do sequenciamento das bandas 281, 304, 90, 75, 280, que se agruparam apenas com o gênero *Synechococcus* sp., com um mínimo de 99% de similaridade com as sequências do gene 16S rRNA no Blast.

No total, 30 bandas (85%) agruparam-se com espécies de *Synechococcus*.



0.10

Fig. 6 – Árvore filogenética do gene 16S rRNA obtida com o sequenciamento das 35 bandas extraídas do gel de DGGE da Figura 1. A topologia da árvore foi testada por análises de bootstrap (*bootstrapping analysis*), e os valores de *bootstrap* com porcentagem acima de 50% são apresentados. **Legenda:** Bandas do ponto VG1 em fevereiro: 276, 279, 278, 281, 283.; maio: 207; junho: 206, 224,226, 228, 230, 231; e dezembro: 73, 74, 75, 76, 304. Bandas do ponto VG2 em fevereiro: 285; maio: 210, 211, 213, 214; julho: 66, 65; e agosto: 125. Bandas do ponto VG3 em fevereiro: 27; maio: 218; e dezembro: 83. Bandas do ponto VG4 em junho: 232, 233, 237; agosto: 130; e dezembro: 90, 91. Bandas do ponto VG5 em dezembro: 92. Além dessas bandas, também foram sequenciadas e utilizadas para verificar a similaridade no Blast algumas bandas dos pontos: VG1 janeiro (3,4), março (35), abril (44) e maio (247, 248). Do ponto VG2 janeiro (5,6), março (36,37) e maio (250). Do ponto VG3 maio (249) e junho (256). Do ponto VG4 fevereiro (31), março (38, 39, 40, 41) e agosto (131). E do ponto VG5 janeiro (15,17), março (42,43) e maio (254, 255).

### 6.3.3 Análises físicas e químicas

A PCA (Fig. 7) foi feita com as variáveis ambientais (Secchi, temperatura da água e oxigênio dissolvido), nutrientes (nitrato, ortofosfato e fósforo total) e variáveis biológicas (clorofila e biovolume de picocianobactérias). As principais variáveis que influenciaram o sistema no período de estudo foram fósforo total, temperatura e Secchi, representadas pelo fator 1, responsável por explicar 36,47% da variabilidade. Com relação ao fator 2, a variável explicativa mais importante foi o ortofosfato (24,05%). Deste modo, os dois eixos foram capazes de explicar 61% da variabilidade total do sistema. Por estar associado com a temperatura, o eixo 1 sugere uma relação com a sazonalidade. De fato, o período chuvoso, com suas temperaturas mais elevadas, coincide com o aumento da biomassa das picocianobactérias, e esta relação foi confirmada na PCA. É possível que o eixo 2 seja mais explicado por pequenas variações observadas entre os pontos de coleta, com relação a parâmetros físicos e químicos e à biomassa de cianobactérias.

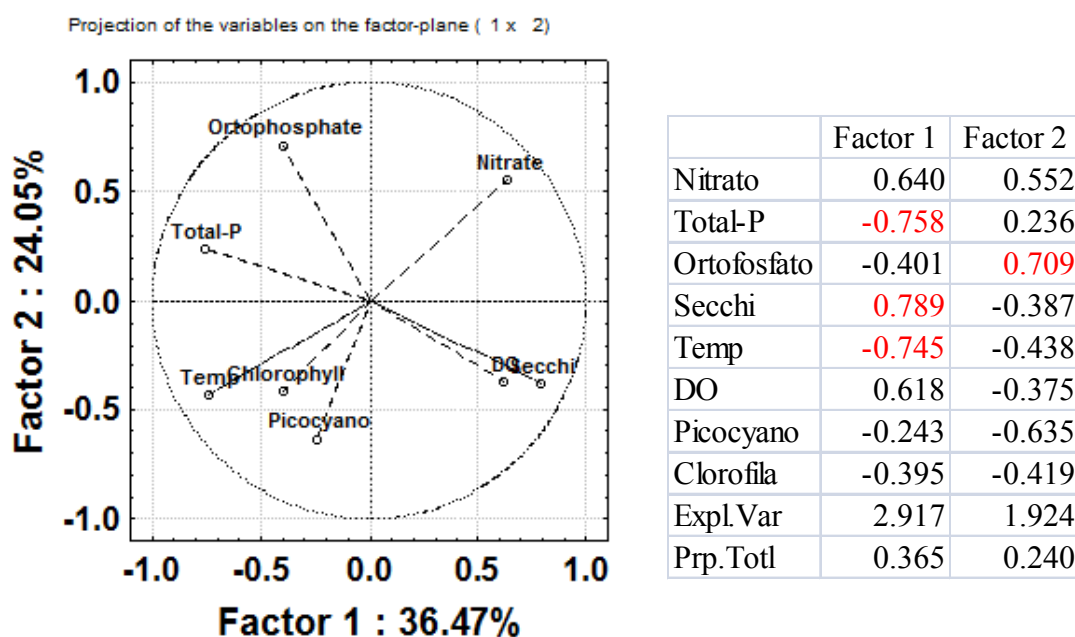


Fig. 7 – PCA das variáveis bióticas e abióticas na zona eufótica, analisadas de janeiro a dezembro de 2011 no reservatório de Volta Grande, com as variáveis; nitrato (nitrato), DO (oxigênio dissolvido), Secchi, orthophosphate (ortofosfato), P-total (fósforo total), Temp. (temperatura), Chlorohyll (clorofila) e

biovolume total de picocianobactérias com os valores das variáveis que foram significativas em vermelho.

Na Tabela 1 estão a média dos valores de nutrientes e as variáveis ambientais. As concentrações médias de nitrato e ortofosfato foram maiores na estação seca do que na estação chuvosa, exceto para os pontos VG4 e VG5. O fósforo total apresentou, em geral, maiores concentrações na estação chuvosa, ou concentrações similares nos dois períodos.

Os valores de oxigênio dissolvido (média da coluna d'água) foram similares entre todos os pontos de coleta (VG1 a VG5), e também entre as estações seca e chuvosa. A concentração mínima de OD foi de 7,6 mgL<sup>-1</sup> no ponto VG1 na estação seca, e o máximo de 7,9 mgL<sup>-1</sup> no ponto VG4 também na estação seca. As temperaturas mais elevadas foram observadas na estação chuvosa em todos os pontos de amostragem, porém não houve diferença estatisticamente significativa, tendo os valores permanecido entre 23,4°C, nos pontos VG4 e VG5, e 27,4°C, no ponto VG2. A transparência da coluna d'água foi mais elevada na estação chuvosa nos pontos VG1 e VG5, no ponto VG2 não variou significativamente, e nos pontos VG3 e VG4 foram observados maiores valores de transparência na estação seca.

Tabela 1 - Valores médios de nutrientes e variáveis ambientais no reservatório de Volta Grande de janeiro a dezembro de 2011.

Ponto de coleta	Estação	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µgL <sup>-1</sup> )	DP	P-total (µgL <sup>-1</sup> )	DP	P-PO <sub>4</sub> <sup>4-</sup> (µgL <sup>-1</sup> )	DP	OD (mgL <sup>-1</sup> )	DP	Temp. (°C)	DP	Secchi (m)	DP
VG1	Seca	156,5	25,8	21,3	20,1	9,9	6,8	7,6	0,5	24,2	2,3	4,6	1,6
	Chuvosa	111,4	15,4	20,8	12,6	7,8	4,5	7,6	0,4	27,4	1,6	4,8	2,0
VG2	Seca	166,7	20,7	20,3	6,2	10,1	8,0	7,7	0,8	23,6	1,8	4,2	1,5
	Chuvosa	114,5	15,1	22,6	8,3	6,0	4,0	7,7	0,3	27,4	1,5	4,2	1,9
VG3	Seca	164,0	32,3	18,7	6,2	9,5	5,6	7,8	0,5	24,1	1,9	4,0	1,2
	Chuvosa	124,9	9,3	27,1	12,7	6,5	5,2	7,7	1,6	27,1	1,4	3,7	1,7
VG4	Seca	139,7	24,7	26,3	9,7	9,5	5,3	7,9	0,6	23,4	1,5	4,9	1,2
	Chuvosa	166,1	22,6	24,1	13,2	8,5	7,0	7,6	0,9	26,6	1,2	3,9	1,7
VG5	Seca	145,7	12,9	24,6	7,6	9,0	6,3	7,8	0,7	23,4	1,5	4,1	1,3
	Chuvosa	173,9	20,8	28,5	16,5	9,1	6,9	7,7	0,8	26,3	1,2	4,4	2,4

As variáveis *Aphanocapsa* ( $p = 0,023$ ) e *Chroococcus* biomassa ( $p = 0,008$ ) foram significativamente diferentes entre as estações seca e chuvosa, quando comparadas pelas análises estatísticas. A correlação de Spearman (Tabela 2) apresentou-se negativa e altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre Secchi e Ortofosfato ( $\rho = -0,570$ ), Secchi e OD ( $\rho = 0,475$ ), OD e P-total ( $\rho = -0,471$ ), e correlações positivas entre *Merismopedia* spp., biomassa e P-total ( $\rho = 0,494$ ), biomassa de Cyanobacteria e de *Aphanocapsa* spp. ( $\rho = 0,512$ ) e biomassa de Cyanobacteria e de *Chroococcus* spp. ( $\rho = 0,580$ ), e entre a biomassa do grupo Picocyanobacteria e Cyanobacteria ( $\rho = 0,493$ ) e Picocyanobacteria e *Aphanocapsa* ( $\rho = 0,504$ ).

O grupo Picocyanobacteria também apresentou correlação significativa com a temperatura ( $\rho = 0,492$ ), e a temperatura correlacionou-se positiva e significativamente com todas as variáveis biológicas, Cyanobacteria ( $\rho = 0,387$ ;  $p = 0,002$ ), *Aphanocapsa* spp. ( $\rho = 0,263$ ;  $p = 0,042$ ), *Chroococcus* spp. ( $\rho = 0,322$ ;  $p = 0,011$ ) e *Merismopedia* spp. biomassa ( $\rho = 0,292$ ;  $p = 0,023$ ).

Os nutrientes nitrato e ortofosfato apresentaram correlação negativa com Cyanobacteria ( $\rho = -0,368$ ;  $p = 0,003$ ;  $\rho = -0,397$ ;  $p = 0,016$ ), biomassa de picocianobactérias ( $\rho = -0,432$ ;  $p = 0,001$ ;  $\rho = -0,327$ ;  $p = 0,011$ ) e de *Chroococcus* spp. ( $\rho = -0,285$ ;  $p = 0,027$ ;  $\rho = -0,385$ ;  $p = 0,023$ ).

As demais correlações importantes e que também foram significativas ( $< 0,05$ ) estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados da correlação não paramétrica de Spearman para avaliação da relação entre as variáveis biológicas (biovolume de Picocyanobacteria e Cyanobacteria, *Aphanocapsa*, *Chroococcus* e *Merismopedia*) e alguns dados físicos e químicos (nitrito, ortofosfato, P-total, Secchi, temperatura e OD).

Variável	pela variável	Rho	P-value
Secchi	Ortofosfato	-0,570	<0,001
Secchi	Temperatura	-0,397	0,001
Secchi	OD	0,475	<0,001
Temperatura	P-total	0,315	0,014
OD	P-total	-0,471	<0,001
OD	Ortofosfato	-0,383	0,002
<i>Aphanocapsa</i>	Temperatura	0,263	0,042
<i>Merismopedia</i>	P-total	0,492	<0,001
<i>Merismopedia</i>	Temperatura	0,292	0,023
<i>Merismopedia</i>	<i>Aphanocapsa</i>	0,404	0,001
<i>Chroococcus</i>	Nitrato	-0,285	0,023
<i>Chroococcus</i>	Ortofosfato	-0,385	0,023
<i>Chroococcus</i>	Temperatura	0,322	0,011
Cyanobacteria	Nitrato	-0,368	0,003
Cyanobacteria	Ortofosfato	-0,397	0,016
Cyanobacteria	Temperatura	0,387	0,002
Cyanobacteria	<i>Aphanocapsa</i>	0,512	<0,001
Cyanobacteria	<i>Chroococcus</i>	0,580	<0,001
Picocyanobacteria	Nitrato	-0,432	0,001
Picocyanobacteria	Ortofosfato	-0,327	0,011
Picocyanobacteria	Temperatura	0,492	<0,001
Picocyanobacteria	<i>Aphanocapsa</i>	0,504	<0,001
Picocyanobacteria	<i>Chroococcus</i>	0,360	0,005
Picocyanobacteria	Cyanobacteria	0,493	<0,001

Todos os valores de biovolume total de Cyanobacteria/Picocyanobacteria e dos gêneros *Aphanocapsa* spp., *Chroococcus* spp. e *Merismopedia* spp. são expressos em  $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ .

#### 6.4 Discussão

O nosso estudo sobre a composição da comunidade de cianobactérias em um reservatório oligotrófico revelou uma constante e elevada abundância de picocianobactérias, principalmente representadas pelos gêneros *Aphanocapsa*, *Chroococcus* e *Merismopedia*, em todos os pontos de coleta. De acordo com os resultados obtidos por meio das análises microscópicas, 44 das 60 amostras analisadas (73%) apresentaram uma média de 85% do biovolume total formado pelas picocianobactérias. Nos cinco locais de coleta nós observamos os gêneros coloniais de

picocianobactérias, com ocorrência relatada por Callieri & Stockner (2002) em ambientes de água doce: *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Snowella* e *Epigloeosphaera*.

O gênero planctônico *Aphanocapsa*, compreendendo células de 0,5-2  $\mu\text{m}$  em diâmetro, representa um grupo de espécies de características particularmente difíceis, que diferem apenas pela densidade, com colônias capazes de alcançar 50 a 300  $\mu\text{m}$ . O gênero *Chroococcus* possui colônias microscópicas, geralmente com 4-16 células, com algumas dessas dispostas de forma irregular, formando grupos livres no centro. A taxonomia de populações tropicais de determinadas espécies de *Chroococcus*, como *C. dispersus*, observada no reservatório de Volta Grande, é ainda confusa, portanto todos os dados sobre populações desses gêneros são úteis. Já as colônias do gênero *Merismopedia* podem consistir de agrupamentos de muito poucas a muitas células (em algumas espécies chegando a mais 4.000) com 3-5  $\mu\text{m}$  em diâmetro e dispostas em raios perpendiculares, distantes ou próximas entre si. A espécie *M. tenuissima*, muito presente no reservatório de Volta Grande, é comum em comunidades planctônicas, porém mais frequente em ambientes de água doce eutrofizados (Sant'Anna & Azevedo 2000; Sant'Anna et al. 2004).

No reservatório de Volta Grande houve, em todos os cinco pontos de coleta, correlação significativa entre a estação chuvosa com as picocianobactérias, em geral sob condições de estratificação. A relação negativa observada entre nutrientes dissolvidos (nitrato e ortofosfato) e as picocianobactérias provavelmente se deve ao uso por esses organismos, no período em que eles apresentam maior biomassa (Sarmiento et al. 2006). Uma explicação alternativa para o relativo sucesso das picocianobactérias em baixas concentrações de P é dada pela habilidade dessas células em utilizar, adicionalmente,



fontes orgânicas de fosfato (Callieri 2007), além dos baixos custos para manutenção de seu metabolismo (Raven 1986).

Sarmento et al. (2008) também constataram, em um lago tropical oligotrófico, que a proporção de duas subpopulações de picocianobactérias era maior com uma limitação de nutrientes mais forte e sob condições de estratificação. Gomes et al. (2012) verificaram a dominância de *Aphanocapsa* em um reservatório tropical no Brasil durante o último período chuvoso monitorado, que previamente fora dominado por gêneros potencialmente tóxicos, como *Microcystis*. A dominância da picocianobactéria *Aphanocapsa* foi justificada pela melhoria da qualidade da água no reservatório e consequente diminuição nas concentrações de nutrientes.

Houve variação da estrutura da comunidade de picocianobactérias no reservatório de Volta Grande, e os pontos mais centrais (VG2 e VG3) e próximos à barragem (VG1) se diferenciaram dos pontos mais a montante (VG4 e VG5), localizados na região de entrada do rio Grande. Estes dois últimos pontos de coleta estão localizados em um ambiente com características lótic, com elevada correnteza e menor tempo de residência da água, e essa diferença de estrutura pode ser relacionada ao espectro da variabilidade ambiental, como maior flutuação no suprimento de nutrientes e maior turbidez da água (Harris 1980; Callieri 2007).

Em ambientes de água doce como lagos e reservatórios, o fósforo tem sido apontado como o principal nutriente limitante para o fitoplâncton (Reynolds 2006). No entanto, dados de lagos ultraoligotróficos da região da Patagônia, na Argentina, demonstraram que a deficiência de nitrogênio, mais do que o fósforo, pode ser a causa da baixa produtividade (Diaz et al. 2007). Com relação ao reservatório de Volta Grande, tanto o fósforo como o nitrogênio apresentaram valores baixos, caracterizando-o como oligomesotrófico. Valores similares também foram encontrados em estudos prévios

(Greco 2002; Campos 2003; Mota 2006), que atribuíram essa condição à capacidade que o sistema possui de absorver o elevado aporte externo de fósforo (Greco 2002).

O estado trófico é, sem dúvidas, uma condição necessária para o crescimento predominante das picocianobactérias em uma comunidade fitoplanctônica (Callieri & Stockner 2000), o que justifica a presença e a dominância deste grupo no reservatório em estudo. Contudo, o estado trófico apenas não é capaz de explicar completamente a prevalência ou não das picocianobactérias, que aparentemente são favorecidas sob limitação de nutrientes, mas também são sensíveis à pressão por herbivoria e luz. A luz e a temperatura, por exemplo, podem interferir na absorção de carbono pela fotossíntese (Callieri & Stockner 2000), e em alguns casos o estado trófico, somado à temperatura, pode explicar cerca da metade da variação na abundância das picocianobactérias no ambiente aquático (Contant & Pick 2013).

A importância da temperatura pode ser observada no nosso estudo, pois as picocianobactérias foram mais abundantes no período do verão. Toda a comunidade de picocianobactérias, incluindo os gêneros dominantes, apresentou correlação positiva e significativa com a temperatura no reservatório de Volta Grande (Tabela 2). Por outro lado, os valores de transparência da água no reservatório de Volta Grande, estimados pelo disco de Secchi, foram elevados durante todo o período de estudo (Tabela 1), portanto a disponibilidade de luz não poderia ser considerada limitante.

A abundância do picoplâncton afetada pela temperatura da água parece não ser uma condição essencial em ambientes tropicais, onde a temperatura e a disponibilidade de luz são elevadas durante todo ano, o que permite que a atividade biológica seja permanentemente alta (Sarmiento 2012). Há poucos estudos sobre a comunidade de picocianobactérias em ambientes tropicais (Sarmiento et al. 2008), mesmo quando há alta abundância picoplanctônica nas águas quentes, como seria esperado de acordo com

modelos gerais, baseados na temperatura (Agawin et al. 2000), sobre a contribuição do picoplâncton na biomassa fitoplanctônica total. Daí a importância de estudos sobre a composição e as dinâmicas do picoplâncton em ambientes de água doce tropicais.

Embora a abundância e a produtividade picoplanctônica aumentem com a elevação do estado trófico, a contribuição relativa para a biomassa fitoplanctônica e a produtividade total diminuem com esse aumento, tanto em ambientes de água doce como marinhos (Callieri 2007). Portanto, em ambientes oligomesotróficos, como o reservatório de Volta Grande, a importância desse grupo é maior e deveria ser mais bem explorada.

Dessa forma, a constante presença e a elevada biomassa das picocianobactérias observadas neste estudo podem estar relacionadas com a maior produtividade primária média em lagos tropicais, do que em lagos de regiões temperadas (Kilham & Kilham, 1990; 1991), devido à permanente e elevada radiação, à alta transparência da água e à maior eficiência na reciclagem de nutrientes na coluna d'água, favorecida pela alta atividade biológica. Fatores como limitação de nutrientes, variação do regime de luz, competição com outros organismos fitoplanctônicos e estrutura da cadeia alimentar (Isumbisho et al. 2006) podem ser mais significativos nesse tipo de ambiente do que o estado trófico na determinação da abundância das picocianobactérias (Sarmiento et al. 2006; Sarmiento et al. 2008).

A identidade taxonômica das espécies de picocianobactérias detectadas no reservatório de Volta Grande por meio das análises microscópicas não foi confirmada pelas análises moleculares realizadas por meio da Eletroforese em Gel (DGGE). De acordo com as análises moleculares foram detectadas as espécies *Prochlorococcus marinus*, de ocorrência relatada em ambientes marinhos; *Cyanobium*, gênero unicelular de ocorrência comum em ambientes de água doce (Callieri et al. 2012); e

*Synechococcus*, também unicelular, que além de habitar ambientes de água doce e marinho possui a versatilidade de viver e explorar diferentes nichos ecológicos, incluindo ambientes pelágicos, assim como crescer em consórcios perifíticos, o que pode explicar sua dispersão global (Callieri et al. 2013).

Como mencionado, o reservatório de Volta Grande é classificado como oligomesotrófico (Greco 2002), sendo as picocianobactérias de morfologia unicelular muito abundantes nesses ambientes, enquanto as formas coloniais ocorrem principalmente em ambientes mesoeutróficos (Callieri & Stockner 2000; Callieri 2007), portanto os métodos tradicionais de identificação e contagem (Uthermöhl 1958), embora amplamente reconhecidos e utilizados para todo o grupo Cyanobacteria, não foram capazes de detectar a presença dos gêneros unicelulares de picocianobactérias devido ao pequeno tamanho ( $\leq 2.0\mu\text{m}$ ) e à simples morfologia (Crosbie et al. 2003), pois esse método é aconselhável para formas nanoplanctônica. Para as formas picoplanctônicas seria mais adequadas a identificação e a quantificação de células por microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo (Diamond & DeMaggio 2000).

Ademais, a diversidade genética de microrganismos é estritamente dependente dos iniciadores escolhidos e das análises realizadas (Wilmotte & Golubić 1991). Portanto, embora tenha sido usado um conjunto de iniciadores específicos para o grupo Cyanobacteria, CYA 359F + CYA 781R(a) e (b) (Nübel et al. 1997), esses não apresentaram especificidade para as sequências de picocianobactérias coloniais, e amplificaram apenas com as sequências dos gêneros unicelulares (*Synechococcus*, *Cyanobium* e *Prochlorococcus marinus*). Essa inespecificidade pode também ser atribuída à reação, ao número de ciclos da PCR, à temperatura de anelamento e aos parâmetros de difícil padronização em amostras ambientais, onde a composição é desconhecida. Por outro lado, a dificuldade de isolamento e cultivo de espécies

coloniais deste grupo faz com que o número de sequências depositadas seja muito pequeno, o que dificulta a comparação dos dados obtidos com a sequências do GenBank.

Jasser et al. (2013), estudando as variações sazonais da comunidade de picocianobactérias em nove lagos, desde mesotróficos a hipereutróficos, destacaram que o DGGE é um método tendencioso para as populações mais abundantes e possivelmente subestima a diversidade genética total da comunidade. No entanto, é de extrema importância ressaltar que devido à dificuldade de isolar e cultivar as picocianobactérias em estudos ambientais o advento da Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante tornou possível a caracterização de DNA *in situ* (Caravati et al. 2010). Porém, os dados moleculares não fornecem uma informação filogenética inequívoca (Wilmotte & Golubić 1991), e por isso a combinação de métodos moleculares, morfológicos e ecofisiológicos oferece a mais favorável abordagem para o entendimento da diversidade picoplanctônica (Callieri 2007).

Concluindo, de acordo com a microscopia nós constatamos a dominância de gêneros de picocianobactérias com ocorrência comumente relatada para ambientes de água doce, *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Snowella* (Callieri & Stockner 2002) e *Epigloeosphaera*.

As técnicas utilizadas para avaliar a composição e as dinâmicas das picocianobactérias no reservatório foram complementares, e certamente apresentaram resultado mais assertivo em relação à diversidade de cianobactérias do que se apenas um método tivesse sido utilizado (Callieri & Stockner 2002; Callieri 2007).

## 6.5 Agradecimentos

Ao Pedro Henrique O. Lima e à Marcele Laux pela contagem e identificação do fitoplâncton, ao Cleber Chaves e Danilo Neves, pela assistência com o programa R; à professora Juliana Calabria e à Érika Abreu do DESA/UFMG, pelo empréstimo e pela assistência com uso do

Sistema de Eletroforese Vertical (BIO-Rad/USA); e também à Ivette Salka e Katrin Attermeyer (IGB, Alemanha), pelo suporte com as análises filogenéticas.

## 6.6 Referências

Agawin, N. S. R., Duarte, C.M. and Agusti, S. (2000) Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* **45**(3):591-600.

American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington Dc: American Public Health Association Publications, 2005.

Braga, F. M. S. and Gomiero, L.M. *Análise da pesca experimental realizada no reservatório de Volta Grande, rio Grande (MG-SP)*: Boletim do Instituto de Pesca. 24 ed. São Paulo: Instituto de Pesca, 1997. 7p.

Callieri, C. and Stockner J. G. (2000) Picocyanobacteria success in oligotrophic lakes: fact or fiction? *Journal of Limnology* **59**(1):72-76.

Callieri, C and Stockner J. G. (2002) Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology* **61**(1):1-14.

Callieri, C. (2007) Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews* **1**:1-28.

Callieri, C., Gronberg G. and Stockner, J. G. Single cells, microcolonies and colonies forms. In: Whitton, A. Brian; Potts, Malcolm (Comp.). *Ecology of cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers, 2012. p. 229-270.

Callieri, C., Coci, M., Corno, G., Macek, M., Modenutti, B., Balseiro, E., Bertoni, R. (2013) Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **85**:293-301.

Campos, M. C. S. *Pesquisa para o desenvolvimento de ecotecnologias de prevenção e controle de *Limnoperna fortunei*; Estudo de caso: Reservatório de Volta Grande: Relatório parcial*. Belo Horizonte: Cetec, 2003. 48 p.

Caravati, E., Callieri, C., Modenutti, B., Corno, G., Balseiro, E., Bertoni, R., Michaud, L. (2010) Picocyanobacterial assemblages in ultraoligotrophic Andean lakes reveal high regional microdiversity. *Journal of Plankton Research* **32**(3): 357-366.

Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., et al. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* **109**(7):663-668.

CETESB. *Relatório Final do Levantamento Ecológico-Sanitário das Represas do Rio Grande*: Considerações sobre a Piscicultura e a Recreação. São Paulo: Sistemas Furnas-Cemig, 1976. 78 p.

Contant, J. and Pick, F. R. (2013) Picophytoplankton during the ice-free season in five temperate-zone rivers. *Journal of Plankton Research* **35**(3):553-565.

- Crosbie, N. D., Pöckl, M. and Weisse, T. (2003) Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria, Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-Intergenic Spacer Sequence Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(9):5716-5721.
- Daley, R.J. and Hobbie, J. E. (1975) Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescence technique. *Limnology and Oceanography* **20**:875-882.
- Diamond, R. A. and De Maggio, S. *In Living Color. Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin: Springer Verlag, 2000. 800 p.
- Diaz, M., Pedrozo, F., Reynolds, C. and Temporetti, P. (2007) Chemical composition and the nitrogen-regulated trophic state of Patagonian lakes. *Limnologica* **37**:17-27.
- Evans, G. T. (1988) A framework for discussing seasonal succession and coexistence of phytoplankton species. *Limnology and Oceanography* **33**(5):1027-1036.
- Furtado, A. L. F. F., Calijuri, M. D. C., Lorenzi, A. S., Honda, R. Y., Genuário, D. B., Fiore, M. F. (2009) Morphological and molecular characterization of cyanobacteria from a Brazilian facultative wastewater stabilization pond and evaluation of microcystin production. *Hydrobiologia* **627**(1):195–209.
- Galhano, V., Figueiredo, D. R., Alves, A., Correia, A., Pereira, M. J., Gomes-Laranjo, J., Peixoto, F. (2011) Morphological, biochemical and molecular characterization of *Anabaena*, *Aphanizomenon* and *Nostoc* strains (Cyanobacteria, Nostocales) isolated from Portuguese freshwater habitats. *Hydrobiologia* **663**(1):187-203.
- Gomes, L. N. L., Oliveira, S. M. A. C.; 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**(8):4635-4645.
- Greco, M. K. B. *Balanço de Massa de Fósforo, Evolução da Eutrofização e o Crescimento de Macrófitas Flutuantes no Reservatório de Volta Grande (MG/SP)*. 2002. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- 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.
- Heath, M. W., Wood, S. A. and Ryan, K. G. (2010) Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology* **73**(1):95-109.
- Isumbisho, M., Sarmiento, H., Kaningini, B., Micha, J. C., Descy, J-P. (2006) Zooplankton of Lake Kivu, half a century after the Tanganyika sardine introduction. *Journal of Plankton Research* **28**:971-989.
- Jasser, I., Krolicka, A., Jakubiec, K., Chróst, R. J. (2013) Seasonal and Spatial Diversity of Picocyanobacteria Community in the Great Mazurian Lakes Derived from DGGE Analyses of 16S rDNA and *cpcBA*-IGS Markers. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(6):739-749.
- Kilham S. S. and Kilham, P. (1991) Tropical limnology: do African lakes violate the ‘first law’ of limnology? *Verhandlungen der Internationale Vereinigung für tische und angewandte Limnologie* **24**:68-72.

- Kilham, P. and Kilham, S. S. (1990) Endless summer: internal loading processes dominate nutrient cycling in tropical lakes. *Freshwater Biology* **23**:379-389.
- Kirchman, L. D. Microbial primary production and phototrophy. In: Kirchman, David L. *Process in Microbial Ecology*. New York: Oxford University Press, 2012. p. 55-77.
- Komárek, J. (2010) Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept):review. *Hydrobiologia* **639**(1):245-259.
- Kurmayer, R. Christiansen, G. and Chorus, I. (2003) The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2): 787-795.
- Lopes, V. R., Ramosa, V., Martins, A., Sousa, M., Welker, M., Antunes, A., Vasconcelos, V. M. (2012) Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Marine Environmental Research* **73**:7-16.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A. et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4):1363-1371.
- Mota, R. H. *Análise da influência da geoquímica do ambiente e das características do substrato na estruturação da população de Corbicula fluminea, Muller 1974 (mollusca, bivalvia) no reservatório da usina hidrelétrica de volta grande – MG/SP*. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geologia Ambiental e Conservação de Recursos Naturais, Departamento de Geologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.
- Muyzer, G., Waal, D. E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3):695-700.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. and Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8):3327-3332.
- R Development core team (2005) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Raven, J. A. Physiological consequences of extremely small size for autotrophic organisms in the sea. In: Platt, Trevor; Willian, K. W. Li (Comp.). *Photosynthetic picoplankton*. 214. ed. Ottawa: Canadian Bulletins of Fishers Aquatic Science, 1986. p. 1-70.
- Reynolds, C. S. *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 551 p.
- Rolla, M. E. and Rosa, S. G. (1990) Composição físico-química e biológica do sedimento do reservatório de Volta Grande, Minas Gerais/ São Paulo. *Acta Limnológica Brasileria* **3**:201-218.
- Rott, E. (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* **43**:34-62.
- Sant'Anna, C. L. and Azevedo, M. T. P. (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* **71**(3):359-385.



- Sant'Anna, C. L., Azevedo, M. T., Senna, P. A.C., Komarék, J., Komárková. (2004) Planktic cyanobacteria from São Paulo state, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica* **27**(2): 213-227.
- Sarmento, H., Isumbisho, M. and Descy, J. P. (2006) Phytoplankton ecology of Lake Kivu (eastern Africa). *Journal of Plankton Research* **28**:815-829.
- Sarmento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J. M., Descy, J-P. (2008) Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology* **53**(4):756-771.
- Sarmento, H. (2012) New paradigms in tropical limnology: the importance of the microbial food web. *Hydrobiologia* **686**(1):1-14.
- Sieburth, J., Smetacek, V. and Lenz, J. (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology Oceanography* **23**(6):1256-1263.
- Stockner, J. G. and Antia, N. J. (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater: a multidisciplinary perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43**:2472-2503.
- Stockner, J. G. and Porter, K.G. Microbial food webs in freshwater planktonic ecosystems. In: Carpenter, Steven (Comp.). *Complex interactions in lake communities*. London: Springer London, 1988. p. 69-83.
- Stockner, J. G. and Shortreed, K.S. (1991) Autotrophic picoplankton: community composition abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yukon Territory lakes. *Internationale Revue der Gesanten Hydrobiologie* **76**:581-601.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, R. De, Wilmotte, A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(9):5157-5169.
- Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* **9**: 141-38.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P. De, Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Reviews* **60**(2):407-438.
- Wilmotte, A. and Golubić, S. (1991) Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. *Archiv für Hydrobiologie*. **92**:1-24.
- Zohary, T., Pais-Madeira, A. M., Robarts, R. and Hambright, K. D. (1996) Interannual phytoplankton dynamics of a hypertrophic African lake. *Archiv für Hydrobioogie* **136**(1):105-126.
- Zwart, G., Hiorns, W. D., Methé, B. A., Agterveld, M. P. K., Huismans, R., Nold, S. C. (1998) Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **21**:546-556.

Zwart, G., Agterveld, M. P. K., Werff-staverman, I. Van Der, Hagen, F., Hoogveld, H. L., and Gons, H. J (2005) Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environmental Microbiology* 7(3):365-377.

## 7 Diversidade microbiológica (Bacteria e Archaea) em dois reservatórios tropicais e sua possível associação com cianobactérias

Ana M. M. B. Lopes<sup>a</sup>, Hans-Peter Grossart<sup>b</sup>, Alessandra Giani<sup>a</sup>

a. Departamento de Botânica, Laboratório de Ficologia, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais. PO Box 486, 31270–010 Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: agiani@icb.ufmg.br

b. Instituto de Ecologia de Águas Doce e Pesca, Departamento de Limnologia de Lagos Estratificados, Alte Fischerhuetten 2, 16775 Neuglobsow, Alemanha.

### Abstract

In this study we assessed the microbial community composition (bacteria and archaea) in two tropical reservoirs, Pampulha and Volta Grande, located in southeastern Brazil. Samples were collected monthly at one site in Pampulha reservoir, from October 2009 to December 2010 and at one site in Volta Grande reservoir, from January to December 2011. Furthermore, we also tested the possible association of these microbial groups with cyanobacteria, using strains of *Microcystis* sp., *M. aeruginosa* and *Sphaerocavum brasiliense* from Brazil, Japan, Canada, Netherlands and Germany. The methodology used was the DGGE fingerprinting technique (Muyzer et al. 1993) with specific primers for the Archaea and Bacteria. The results revealed high richness of bacteria and archaea in the two study areas. A significant concentration of methanogenic archaea in the environmental samples as well as in the cultures was observed in association with the cyanobacteria.

**Keywords:** tropical reservoirs, Bacteria, methanogenic Archaea, Cyanobacteria.

### 7.1 Introdução

Em ambientes aquáticos naturais, condições como variações de temperatura, diferentes fontes de matéria orgânica, disponibilidade de oxigênio dissolvido e concentração de nutrientes têm influência direta na composição da comunidade microbiana (Grossart 2010; Dziallas & Grossart 2011a), ocasionando o aumento ou a diminuição da diversidade.

A elevada disponibilidade de oxigênio, por exemplo, poderia prevenir a ocorrência de grupos microbianos anaeróbios como as arqueias metanogênicas, pois a metanogênese ocorre principalmente em ambientes anóxicos. Contudo, paradoxalmente, a acumulação de metano em águas oxigenadas é possível (Reeburgh 2007; Conrad

2009) como resultado de transporte físico de sedimento anóxico e água (Hofmann et al. 2010) ou da produção *in situ* dentro de microzonas anóxicas (Schulz et al. 2001). Essa hipótese já foi confirmada em alguns estudos (Karl et al. 2008; Damm et al. 2010; Grossart et al. 2011), que detectaram a presença de arqueias, inclusive de anaeróbios metanogênicos, contribuindo para a composição de comunidade microbiana em ambientes com oxigênio.

Outra importante variável em ambientes aquáticos é a concentração de nutrientes, como o fósforo e o nitrogênio, essenciais para o desenvolvimento do fitoplâncton, que é a base da cadeia alimentar nestes ambientes (Reynolds 2006). Contudo, o aumento das concentrações de fósforo e nitrogênio pode ocasionar o excessivo crescimento de cianobactérias, conhecido como floração ou *bloom* (Wetzel 1983).

Pelo fato de os florações de cianobactérias serem potencialmente tóxicos (Carmichael et al. 2001), o entendimento de sua ocorrência e de seu controle tem sido enfocado em vários estudos (Smith et al. 2006; Azevedo & Sant'Anna 2000; Giani et al. 2005; Figueredo & Giani 2009), especialmente naqueles ambientes utilizados para abastecimento de água potável, em regiões onde as tecnologias de tratamento não são disponíveis, ou totalmente eficientes (McGreggor & Fabbro 2000).

Uma vez que as interações microbianas com cianobactérias estão na maioria das vezes altamente correlacionadas (Cole 1982; Grossart et al. 2005; Grossart & Simon 2007), elas podem representar a resposta de ambos, bactéria e fitoplâncton, às mesmas alterações externas, e também indicar a influência direta de uma comunidade na outra. Portanto, o conhecimento dessas relações pode contribuir para o entendimento de todo o sistema e auxiliar na busca de medidas de controle e manejo, visto que as interações

entre outros microrganismos e cianobactérias parecem ter o potencial para controlar o desenvolvimento das florações (Rashidan & Bird 2001; Dziallas & Grossart 2011a).

Todos os microrganismos associados às cianobactérias estão localizados dentro ou ao redor da chamada “fícosfera” *phycosphere* (Cole 1982), um micro-habitat caracterizado pela presença de gradientes físico-químicos e elevadas concentrações de matéria orgânica. Paerl (1982) descreveu a associação entre cianobactérias e bactérias, e reconheceu sua importância na criação de microzonas em torno das células das cianobactérias, onde as condições físicas e químicas são peculiares. Dziallas & Grossart (2011b) sugerem que essas mudanças ocorrem pela degradação, respiração e liberação de componentes orgânicos.

No presente estudo foram caracterizados os principais grupos microbianos (bactérias e arqueias) que ocorrem em dois reservatórios tropicais: (a) reservatório da Pampulha, um ambiente hipereutrófico, e (b) reservatório de Volta Grande, oligotrófico.

Complementarmente, tivemos como objetivo descrever a comunidade microbiana (bactérias e arqueias) associada com algumas cepas de cianobactérias de distintos lugares: *Microcystis aeruginosa* do Canadá, da Holanda, da Alemanha e do Japão, além de cepas de *Microcystis* sp. e *Sphaerocavum brasiliense* do Brasil.

Dessa forma, avaliamos: (i) Quais os microrganismos (Bacteria e Archaea) que ocorrem associados com as cianobactérias? e (ii) As bactérias e arqueias observadas em culturas de cianobactérias são as mesmas encontradas em amostras ambientais?

## **7.2 Material e métodos**

### **7.2.1 Área de Estudo**

O presente estudo foi desenvolvido em dois reservatórios tropicais localizados na Região Sudeste do Brasil. O reservatório da Pampulha (A) (19° 55'09" S, 43° 56' 47" W) é hipereutrófico e foi criado pela construção de uma represa em 1938. Sua água foi

utilizada para abastecimento até a década de 1980, porém, devido ao forte impacto antropogênico, sua atual proposta é apenas paisagística (Giani 1994). O reservatório possui profundidade máxima de 12 m, área de captação de 100 km<sup>2</sup> e área superficial de 1,8 km<sup>2</sup> (Giani et al. 1988). O programa de monitoramento foi realizado em um ponto de coleta (E09) que possui profundidade máxima de 7 m, localizado próximo à região pelágica central do reservatório. As coletas foram realizadas entre outubro de 2009 e dezembro de 2010, com amostras coletadas mensalmente na profundidade do disco de Secchi, que é equivalente a 10% de penetração da luz. Sequencialmente, as amostras foram filtradas em filtros com porosidade de 0,7 µm (GF1, Macherey & Nagel), até a completa colmatação dos filtros, tendo o volume filtrado sido anotado. Após este procedimento, os filtros foram preservados a -20°C, até o processamento das análises e a extração do DNA genômico.

O segundo local de coleta (B) foi o reservatório de Volta Grande (20° 01 '76.8" S, 48° 19' 11.5" W), caracterizado como oligomesotrófico e utilizado para geração de energia elétrica, cuja operação foi iniciada em 1974, com capacidade instalada de 380 MW (Greco 2002; Campos 2003). Volta Grande possui área superficial de 222 km<sup>2</sup>, volume de 2,3 bilhões de m<sup>3</sup> (Braga & Gomiero 1997), perímetro de 80 km (Rolla & Rosa 1990) e tempo de residência da água estimado em 21 dias (CETESB 1976).

As amostras foram coletadas mensalmente, entre janeiro e dezembro de 2011 na zona eufótica, nos cinco pontos de coleta, abrangendo toda a área do reservatório, sendo o primeiro ponto próximo à estação de piscicultura e mais próximo à barragem, e o último ponto na entrada do rio no reservatório. Neste estudo apenas as amostras de um ponto de amostragem foram analisadas, o ponto **VG3** (20°09'05.0" S 48°03'09.6" W), situado na porção intermediária. As amostras foram coletadas com o uso de uma mangueira de silicone, com o objetivo de cobrir toda a coluna d'água que tivesse

disponibilidade de luz, o que permitiu a amostragem integrada ao longo da zona eufótica. Sequencialmente, as amostras de água foram filtradas e preservadas de acordo com os mesmos critérios descritos no primeiro parágrafo deste tópico.

*In situ* também foram obtidos os perfis de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD), em intervalos de 0,5 m, com o auxílio de uma sonda multiparâmetros 556 YSI, para os dois reservatórios.

### **7.2.2 Amostras de culturas**

Para testar se houve associação entre comunidades microbianas e cianobactérias foram utilizadas três cepas de *Sphaerocavum brasiliense*: **175** (isolada do reservatório da Pampulha, Brasil em 2012), **168** (isolada do reservatório da Pampulha, Brasil em 2011) e **176** (isolada do reservatório da Pampulha, Brasil em 2012); e cinco cepas de *Microcystis* sp.: **170** (isolada do reservatório de Volta Grande, Brasil em 2011), **172** (isolada do reservatório de Volta Grande, Brasil em 2011), **174** (isolada do reservatório de Volta Grande, Brasil em 2011), **173** (isolada do reservatório da Pampulha, Brasil em 2012) e **165** (isolada do reservatório de Volta Grande, Brasil em 2011). Essas culturas são mantidas no banco de cultivo do laboratório de Ficologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Além dessas, também foram utilizadas cepas provenientes de outros lugares, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas de *Microcystis* sp. do Canadá, da Alemanha, da Holanda e do Japão e Archaea não cultivada de amostras de lagos da Alemanha.

<b>Cód.</b>	<b>Espécie</b>	<b>Local</b>	<b>Cond.</b>
PCC 7806	<i>M. aeruginosa</i>	Reservatório, Holanda	tóxica
PCC 7806	<i>M. aeruginosa</i>	Reservatório, Holanda	não tóxica
SAG 14.85	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Canadá	tóxica
UTEX 2386	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Canadá	não tóxica
NIES 1114	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Japão	tóxica
NIES 101	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Japão	não tóxica
NIES 102	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Japão	tóxica
HUB 524	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Alemanha	tóxica
HUB P461	<i>M. aeruginosa</i>	Lago, Alemanha	não tóxica
1 JQ268043	Methanomicrobiaceae <sup>a</sup>	Lago, Alemanha	*
9 JQ7924261	Methanoregula <sup>a</sup>	Lago, Alemanha	*
13 AB 2005/30	Methanospilillum <sup>a</sup>	Lago, Alemanha	*

<sup>a</sup>Não cultivada; e \*não se aplica.

As culturas foram conservadas em meio-Z “Z-Medium” Zehnder & Gorham (1960) a 24°C, com um fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro e intensidade luminosa de 72  $\mu$ E. Na fase de crescimento exponencial, cerca de 10 mL da cultura foram removidos e filtrados sobre uma membrana de policarbonato Nuclepore com uma porosidade de 5,0  $\mu$ m para microrganismos aderidos a partículas e, subsequentemente, sobre uma membrana de policarbonato Nuclepore com porosidade de 0,2  $\mu$ m para microrganismos de vida livre. Em seguida os filtros foram estocados a -20°C, até a extração de DNA.

### 7.2.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir dos filtros com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (Zhou et al. 1996). O extrato de DNA foi quantificado por espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm, correspondentes ao DNA e à proteína, respectivamente. Os resultados foram expressos em ng/ $\mu$ L e a razão DNA/proteína foi utilizada na avaliação da qualidade do DNA. Para visualização do DNA extraído, 5  $\mu$ L foram analisados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídeo. O gel foi submetido à eletroforese a 100V, por 25 min.



#### 7.2.4 PCR

As PCRs foram feitas com os pares de iniciadores para amplificação do gene universal 16S rRNA, alvo bactéria; 341F-GC CCT ACG GGA GGC AGC AG; e 803R CTA CCA GGG TAT CTA ATC C (Muyzer et al. 1993). O programa de PCR seguiu os passos: 95 °C por 3 min; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 54 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min a 72 °C.

Para o gene 16S rRNA, alvo arqueia metanogênica, 357F-GC CCC TAC GGG GCG CAG CAG e 691R GGA TTA CAR GAT TTC AC (Watanabe et al. 2004), o programa de PCR foi: 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 seg a 54 °C, 45 seg a 72 °C e 10 min a 72 °C.

Para cada reação de PCR foi adicionada uma alíquota de 2 µL com aproximadamente 10 ng de DNA, resultando em uma concentração final de 20 pmol/µL de cada iniciador, Tampão 1x, 4 mg/mL BSA (albumina de soro bovino), 0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 U de BIOTAQ Red DNA polymerase (Bioline), em um volume total de 50 µL.

#### 7.2.5 DGGE e sequenciamento

As reações de PCR–DGGE para os alvos do gene 16S rRNA de bactérias e arqueias foram realizadas nas amostras do ponto E09, entre outubro de 2009 e dezembro de 2010, no reservatório da Pampulha, e do ponto VG3, entre janeiro e dezembro de 2011 no reservatório de Volta Grande, e também para as culturas de cianobactérias descritas anteriormente. A eletroforese foi realizada com o auxílio do Sistema de Eletroforese Vertical (*Netherlands*). Os produtos de PCR amplificados, contendo aproximadamente 500 bp, foram submetidos ao DGGE, conforme descrito em Muyzer et al. (1993). Para os fragmentos amplificados pelos iniciadores 341F-GC e 803R alvo

bactéria (Muyzer et al. 1993), foi utilizado um gradiente desnaturante composto por ureia e formamida que variou de 35 a 65%, 7% de acrilamida, TAE 1X, e a corrida se deu durante 20 horas, a 100 V e 60°C. Para os fragmentos amplificados pelos iniciadores 357F-GC e 691R, alvo arqueia, utilizou-se um gradiente desnaturante que variou de 40 a 65%, com a mesma concentração de acrilamida e condições de corrida. Uma concentração de aproximadamente 400 ng de DNA (amplicon) de cada amostra foi aplicada no gel. Para o sequenciamento dos fragmentos SSU rDNA das bandas de DGGE, a parte central da banda foi extraída do gel com o auxílio de um bisturi devidamente esterilizado a cada extração, e o DNA foi ressuspendido em 20 µL de TE 1X, reamplificado e sequenciado. Uma alíquota de 1-3 µL foi utilizada para reamplificação com os mesmos iniciadores utilizados para PCR. O sequenciamento foi desenvolvido a partir dos produtos previamente purificados com solução PEG 1:1 mais 80 µL de etanol 70%, centrifugado duas vezes a 13.000 rpm, durante 20 min e posteriormente ressuspendido em 20 µL de água ultrapura. As amostras foram enviadas para sequenciamento com um *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit - Applied Biosystems*, seguindo as instruções do fabricante.

### **7.2.6 Análises filogenéticas das sequências de DGGE**

A afiliação filogenética das bandas de DGGE sequenciadas foi calculada pelo pacote do *software* ARB (Ludwig et al. 2004). As sequências e contigs obtidos foram alinhados com um *aligner* ARB SINA, disponível em <http://www.arb-silva.de>. As sequências de baixa qualidade foram excluídas das análises. O resultado do alinhamento foi incorporado em um banco de dados ARB SSU rRNA database (janeiro de 2013) em um computador local, ajustado manualmente e adicionado à base SSU rRNA, utilizando o algoritmo *Maximum-likelihood* para calcular a árvore e as sequências de DGGE

adicionadas com Máxima Parcimônia. Para validar a topologia da árvore, foi utilizada uma análise de *bootstrap* com 100 réplicas.

### **7.2.7 Métodos estatísticos**

As similaridades entre os perfis de bandas de DGGE das amostras foram calculadas pela análise de agrupamento *cluster analysis*, utilizando o coeficiente de Jaccard, com base na presença ou ausência de bandas de DGGE em uma determinada posição em cada linha (altura) do gel, e aplicando o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Average linkages*). Esse procedimento resulta em um dendrograma representando as relações genéticas entre as amostras, gerado pelo programa gratuito R (R Development Core Team 2005).

Além disso, as imagens dos géis de DGGE foram analisadas quanto à sua similaridade em uma análise de escalonamento multidimensional não métrica (NMDS). A vantagem da análise de NMDS é representar os objetos em duas ou três dimensões, com objetos diferentes e distantes e objetos similares próximos um do outro em um espaço de ordenação (Fromin et al. 2002). Essas análises (cluster e NMDS) geraram dendrogramas utilizando o programa R (R Development Core Team 2005).

## **7.3 Resultados**

### **7.3.1 Composição da Comunidade Bacteriana (CCB) em amostras de campo e de cultivo e sua associação com cianobactérias**

O gel de DGGE das amostras de campo dos reservatórios da Pampulha (15 amostras) e de Volta Grande (12 amostras), e também com as culturas de cepas de *Microcystis* sp. *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* do Brasil, do Japão, do Canadá, da Alemanha e da Holanda, resultando em um total de dez cepas (Tabela 1, Figs. S1e S2), teve o objetivo de comparar a filogenia de grupos microbianos naturais em amostras de

campo com aqueles presentes nas culturas. Não foi observada diferença clara entre a CCB associada às cepas do Brasil e de outros lugares (Fig. 1ab), porém a CCB foi significativamente diferente entre as culturas e as amostras de campo nos reservatórios da Pampulha (Fig. 1a) e de Volta Grande (Fig. 1b). As amostras de campo criaram uma associação de organismos claramente diferente daquelas encontradas nas culturas. A CCB apresentou, em todas as amostras (cultura e campo), pelo menos 60% de similaridade (Figs. 2a e 2b). O resultado evidenciou a formação de seis clusters no reservatório da Pampulha (Fig. 2a) e sete clusters no reservatório de Volta Grande (Fig. 2b). Os clusters na Figura 2a e 2b mostraram que cepas de *Microcystis* sp. e *S. brasiliense* do Brasil agruparam-se sem diferenças entre as bactérias de vida livre e aderidas. As amostras de campo dos dois reservatórios, Pampulha e Volta Grande, também formaram um cluster único (Figs. 2a e 2b), sem o agrupamento com amostras de cultura. Portanto, a CCB das amostras de campo e de culturas foi diferente.

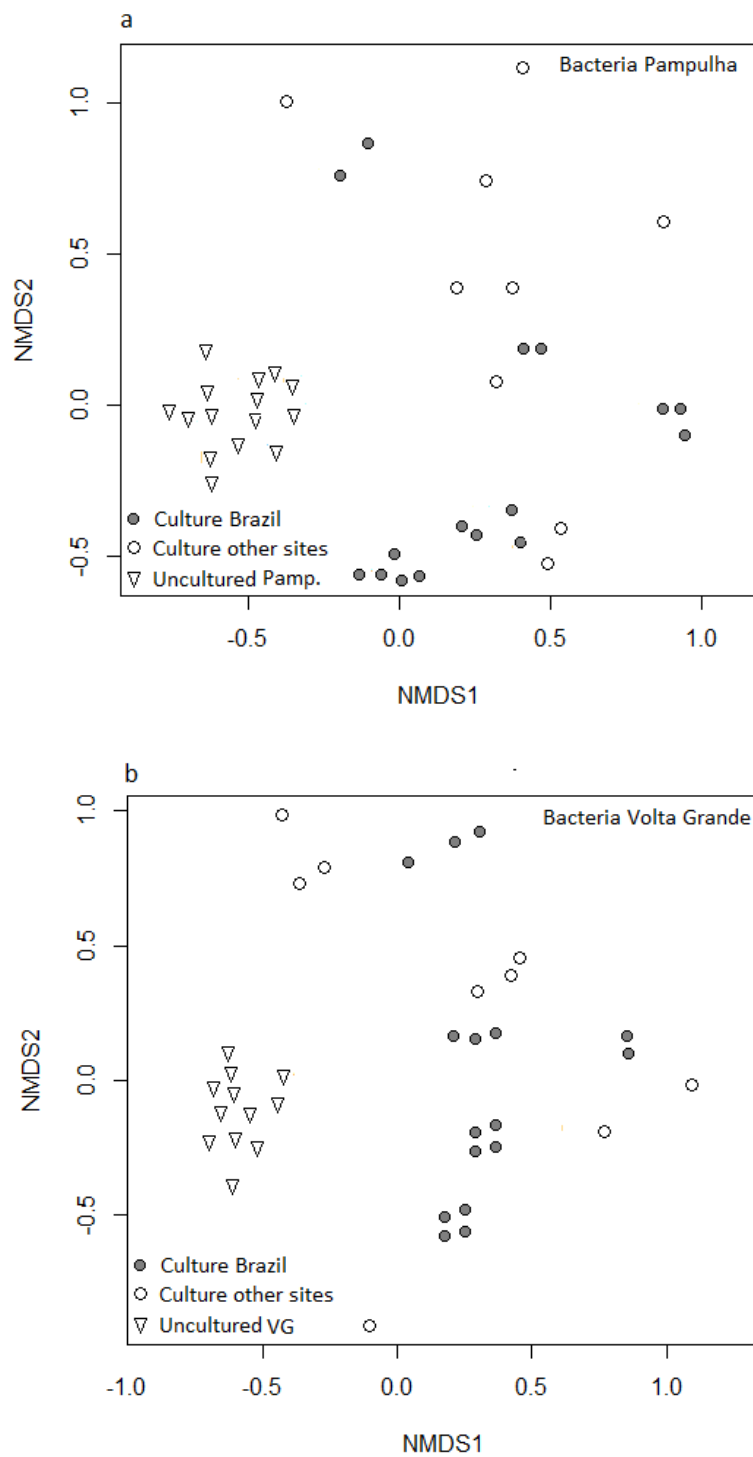


Fig. 1 – NMDS do perfil de bandas de DGGE das bactérias associadas às cepas de *Microcystis* sp. *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* do Brasil, do Japão, do Canadá, da Alemanha e da Holanda mais as amostras de campo dos reservatórios da Pampulha (a) e Volta Grande (b).

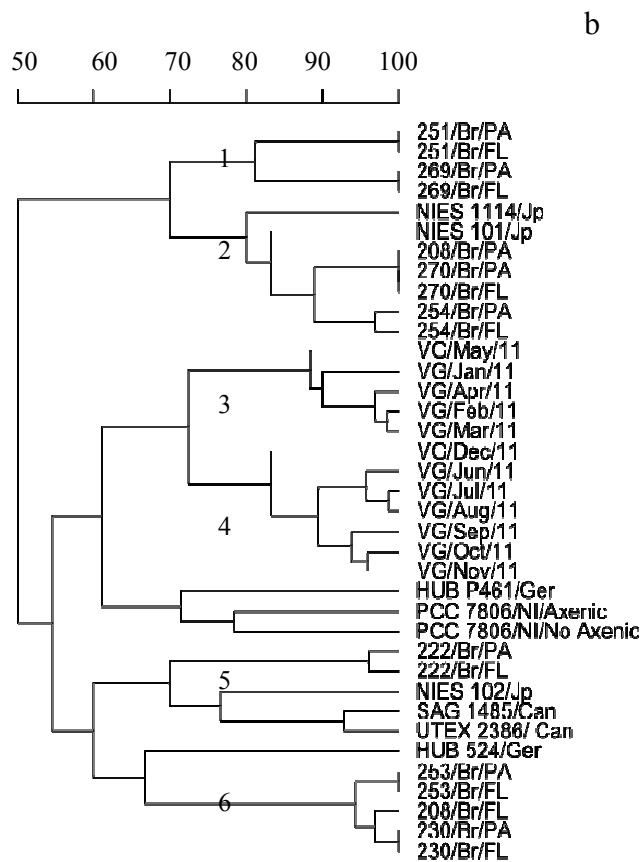
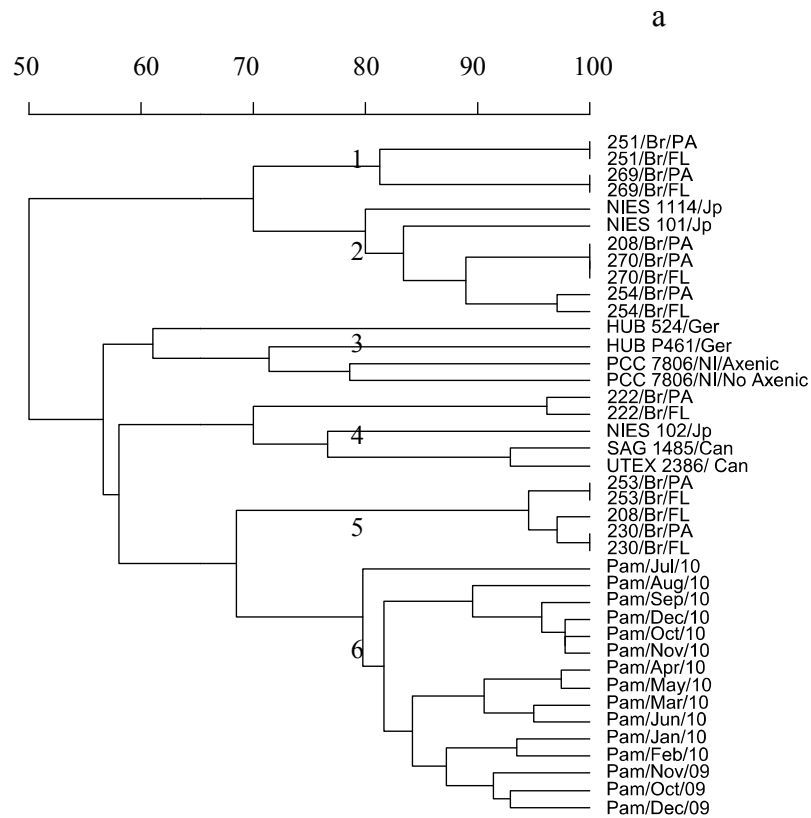


Fig. 2 – Dendrograma gerado com base na presença ou ausência de bandas relativas às sequências de bactérias nas culturas de cianobactérias e em amostras de campo da Pampulha (a) e Volta Grande (b) no gel de DGGE, expresso como porcentagem de similaridade.

Foi observado um padrão de DGGE com bandas em 29 posições diferentes (Fig. S1), mas apenas seis dessas bandas foram sequenciadas com sucesso e relacionadas às espécies de bactérias no banco de dados GenBank, e essas sequências foram utilizadas na construção da árvore filogenética juntamente com as sequências de arqueias (ver árvore na Figura 6). As sequências recuperadas das bandas de DGGE foram distribuídas dentro de três filos distintos; Proteobacteria (B–*Acidovorax*, C–Methylococcaceae, D–*Methylocystis* and E–*Roseomonas*), Bacteroidetes (F– *Algoriphagus*) e Cyanobacteria (A– *Microcystis panniformis*).

### **7.3.2 Composição da comunidade de arqueias em amostras de campo e de cultivo e sua associação com cianobactérias**

Foram detectadas bandas em 35 posições diferentes do gel de DGGE, referentes ao reservatório da Pampulha (Fig. 3a), e em 20 posições (Fig. 3b) no reservatório de Volta Grande, evidenciando maior riqueza de arqueias no reservatório da Pampulha do que no reservatório de Volta Grande.

As sequências das bandas foram relacionadas com o filo Euryarchaeota (arqueia metanogênica) no banco de dados do GenBank; (1–Methanomicrobiaceae, 2–*Methanolinea*, 3– *Methanospirillum*, 4– *Thermoplasmata*, 5– *Methanoregula*, 6–*Methanospirillaceae*, 7– *Methanoregula*, 8– *Methanosaeta*, 9– *Methanospirillum*, 10–Methanomicrobiales e 11– *Methanospirillum*). Os números são os mesmos do gel utilizado na Figura 3.

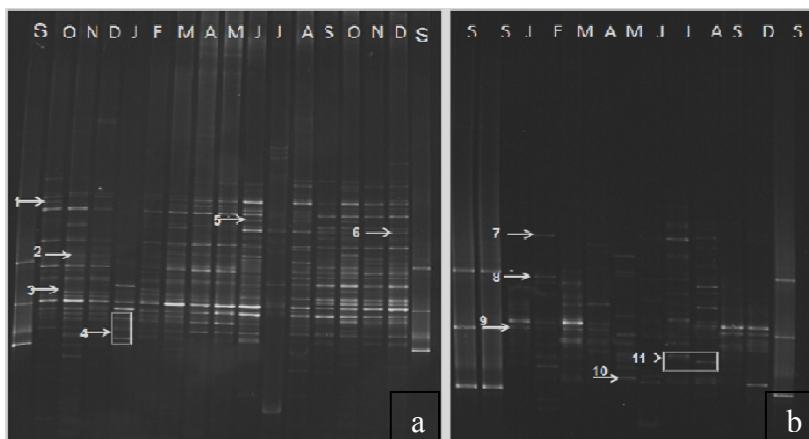


Fig. 3 - (a) Imagem do gel de DGGE do gene 16S rRNA, alvo Archaea, em 2009 e 2010 no reservatório da Pampulha e (b) em 2011 no reservatório de Volta Grande .

Em oposição aos resultados observados na CCB, os resultados da composição de arqueias, apresentaram um padrão de DGGE similar entre as amostras de campo e de cultura, sugerindo que os mesmos genótipos microbianos (arqueias) que estão presentes nas culturas também estão presentes nas amostras de campo testadas (Fig. 4 e Fig. S3). As amostras do reservatório de Volta Grande agruparam-se com cepas de *Microcystis* do Brasil, e as amostras do reservatório da Pampulha formaram um cluster com cepas de *M. aeruginosa* da Holanda e do Japão. As cepas de arqueias Methanomicrobiaceae e *Methanoregula* da Alemanha também se agruparam com amostras de campo do reservatório de Volta Grade.

As análises de agrupamento confirmaram esse resultado com o mínimo de 60% de similaridade, agrupando todas as amostras de campos com amostras de cultura (Fig. 4).



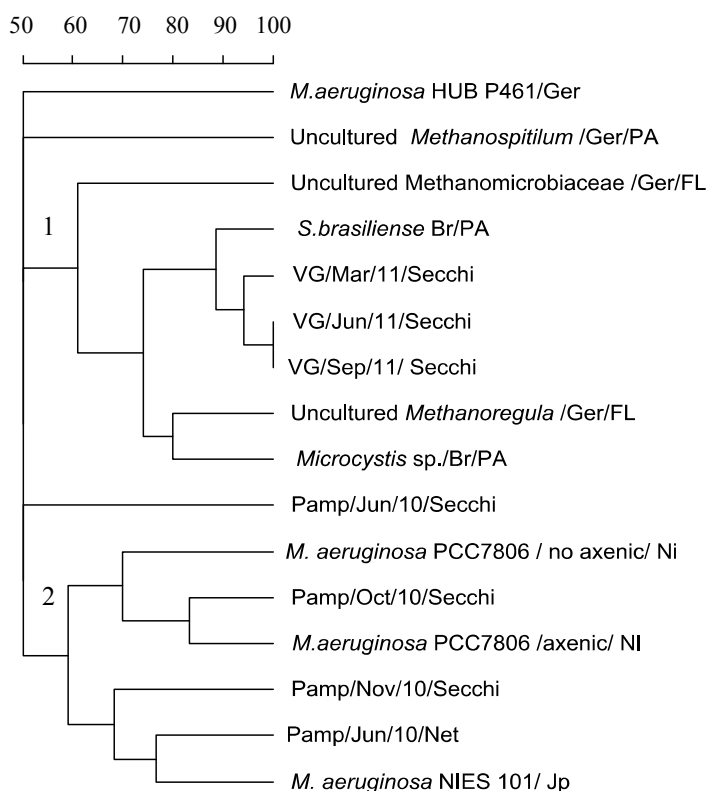


Fig. 4 - Dendrograma gerado com base na presença ou ausência de bandas de bactérias e arqueias nas culturas de cianobactérias e amostras de campo no gel de DGGE e expresso como porcentagem de similaridade.

### 7.3.3 Associação microbiana com cepas de cianobactérias em culturas e similaridade filogenética

No DGGE (Fig. S1ab) relativo a Archaea e Bacteria associadas com cepas de cianobactérias do Brasil, do Canadá, da Holanda e da Alemanha (Tabela 1), *S. brasiliense* (175) e *Microcystis* sp. (165) foram as únicas cepas das culturas analisadas do Brasil que apresentaram resultado positivo para o par de iniciadores 357F e 691R, alvo arqueias. As cepas de *M. aeruginosa* do Japão (NIES 101) e da Holanda (PCC 7806 não tóxica e PCC 7806 tóxica) também amplificaram com os iniciadores para arqueias.

Todas as cepas foram testadas com os iniciadores para bactéria e os resultados apontaram a maior diversidade de bandas relacionadas a bactérias do que arqueias, com bandas em 20 diferentes posições no gel *versus* dez posições com o iniciador para

arqueias. As cepas 165 (*Microcystis* sp.) e 175 (*S. brasiliense*) apresentaram maior número de bandas (7), indicando associação significativa entre arqueias e *Microcystis* sp. e *S. brasiliense* (Fig. S2a).

Em relação às culturas das cepas 168 e 174 (Fig. S1) do Brasil, filtradas com filtros de diferente porosidade, não foram observadas diferenças significativas entre bactérias de vida livre e aderidas às partículas nas culturas das cepas de *S. brasiliense* e *Microcystis* sp. (Figs. S2b e Fig. 5).

A análise de cluster (Fig. 5) sobre a composição da comunidade bacteriana (CCB) mostrou, em todas as culturas (perfil de bandas do DGGE da Figura S1b), a formação de cinco clusters no gel de DGGE com o mínimo de 55% de similaridade. O cluster 1 compreende sequências de bandas relativas a bactérias observadas nas culturas das cepas do Brasil (*S. brasiliense* e *Microcystis* sp.) e uma *M. aeruginosa* do Japão. O cluster 2 consiste de bandas de bactérias ocorrendo com cepas de *M. aeruginosa* da Alemanha, da Holanda e do Canadá. O cluster 3 compreende sequências de bandas de bactérias também de cepas de *M. aeruginosa* do Canadá, do Japão, da Alemanha e da Holanda e uma cepa de *Microcystis* sp. do Brasil. Os clusters 4 e 5 foram formados apenas por bandas de bactérias ocorrendo com as cepas de *S. brasiliense* e *Microcystis* sp. do Brasil. Nesse dendograma é possível observar que não houve diferença entre as bactérias de vida livre (FL) e aderidas às partículas (PA) nas culturas das cepas de *S. brasiliense* e *Microcystis* sp. do Brasil, cepas 168 e 174 (Figs. S1 e S2).

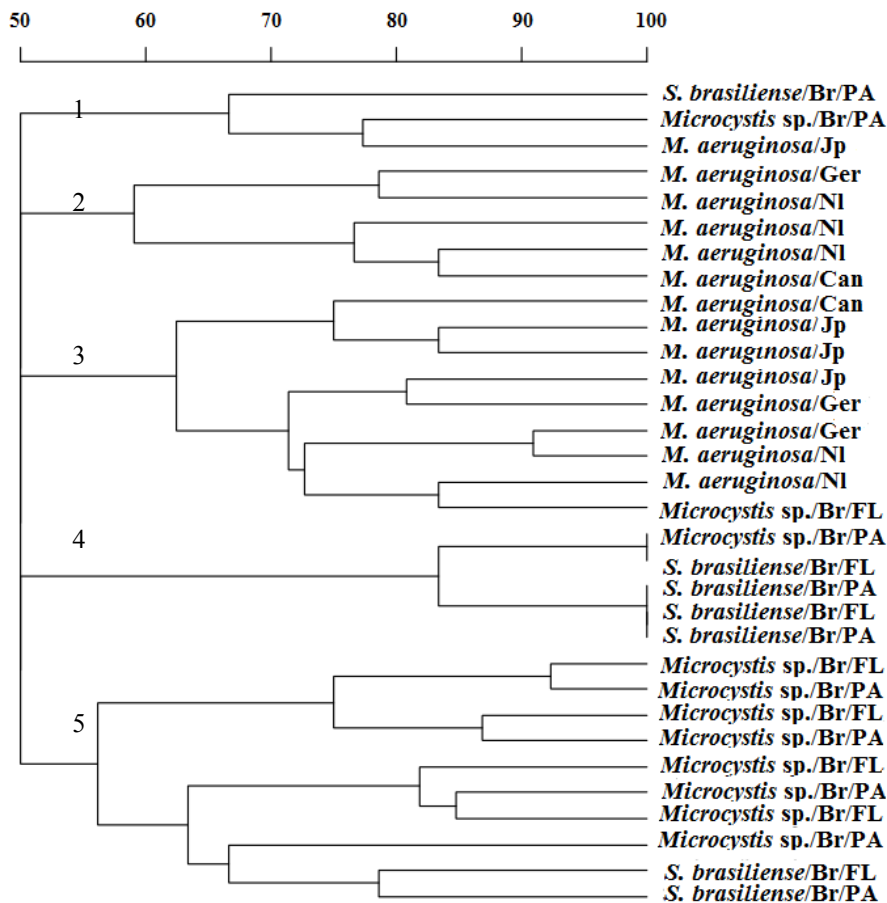


Fig. 5 – Dendrograma gerado com base na presença ou ausência de bandas relativas a bactérias ou arqueias nas culturas de cianobactérias em um gel de DGGE e expresso como porcentagem de similaridade. Legenda: PA (*particule attached*) FL (*free live*).

A árvore filogenética (Fig. 6) foi feita a partir de 40 sequências, sendo 34 relativas às arqueias e seis de bactérias, previamente extraídas de bandas de DGGE, tendo os valores de bootstrap acima de 50% sido incluídos na árvore. Todas as sequências obtidas tiveram o mínimo de 98% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA no Blast. O primeiro grupo de clados (arqueias não cultivadas) foi formado pelas bandas das amostras de campo dos reservatórios da Pampulha (bandas 4, 70, 69, 63, 48, 55, 49, 71, 50, 45, 60 e 56) e de Volta Grande (bandas 82, 87, 93, 99 e 97), do gel apresentado na Fig. 2, onde se agruparam com sequências de arqueias não cultivadas. As bandas de DGGE das culturas de cepas de cianobactérias (bandas 101, 102, 107, 136, 129 e 238) também apresentaram similaridade com as sequências de arqueias não cultivadas. No próximo clado (arqueias metanogênicas), uma banda do reservatório da

Pampulha (banda 51), quatro bandas do reservatório de Volta Grande (bandas 78, 81, 92, e 79) e seis bandas das culturas de cepas de cianobactérias (bandas 109, 134, 103, 106, 105 e 11) agruparam-se com arqueias não cultivadas ou arqueias metanogênicas de cultivo, como *Methanospirillum* sp., *Methanolinea* sp., *Methanosarcina* sp., *Methanosaeta* sp. e *Methanoregula* sp. Finalmente, no último clado (filó Bacteroidetes) as bandas 132, 140, 125, 110, 206 e 200, todas referentes a culturas de cepas de cianobactérias, formaram um clado agrupando com o gênero *Niabella*.

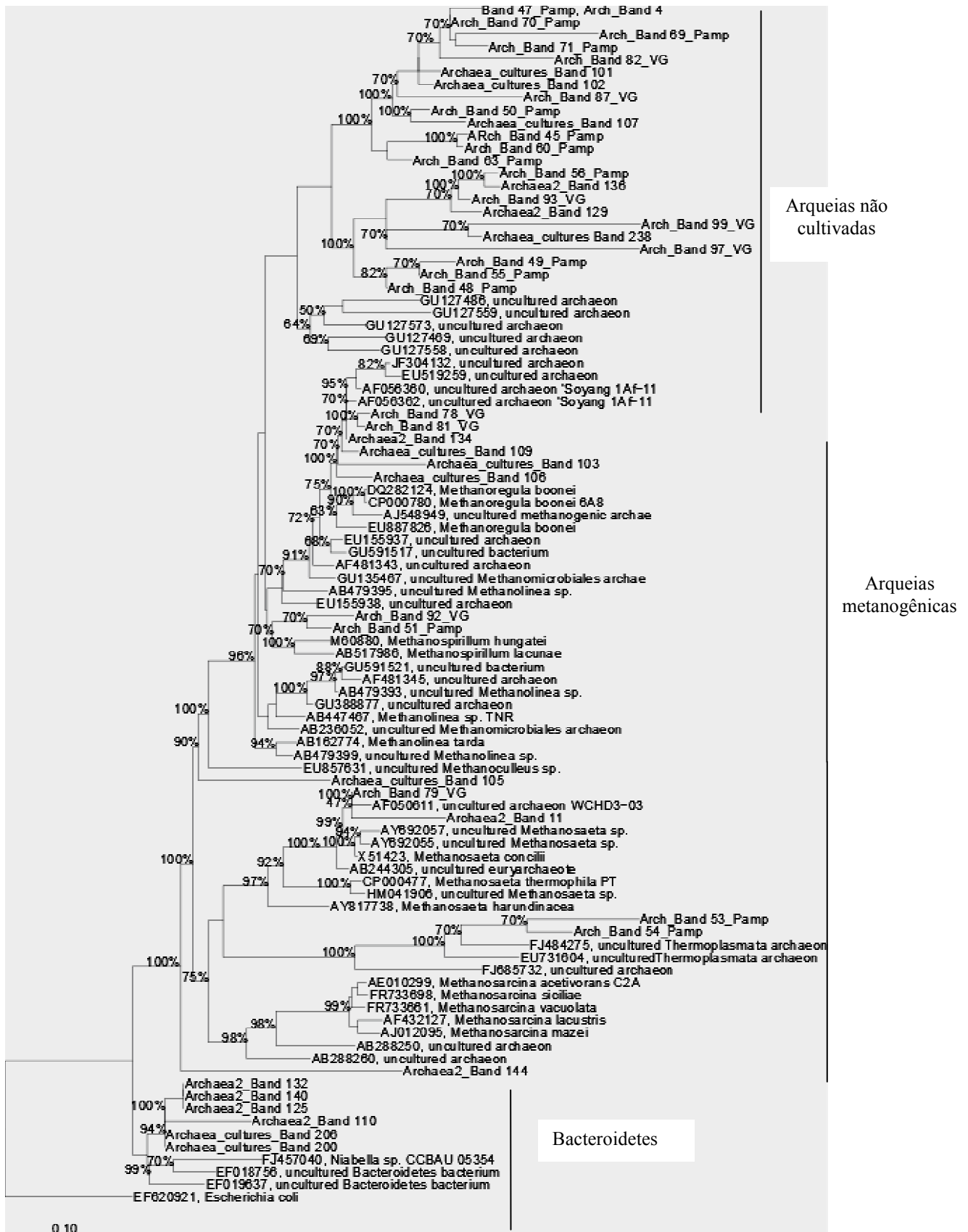


Fig. 6 – Árvore filogenética do gene 16S rRNA obtida de 40 seqüências extraídas do gel de DGGE das figuras 2a, 2b e 3a. A topologia foi testada por análises de *bootstrap*, e valores de *bootstrap* acima de 50% são apresentados.

#### 7.4 Discussão

Nas amostras de campo dos reservatórios da Pampulha e de Volta Grande foram observados os grupos taxonômicos Proteobacteria, Alphaproteobacteria e Bacteroidetes, que são comumente detectados em amostras de ambientes de água doce (Kertters et al. 2006; Berg et al. 2009; Goecke et al. 2013). Contudo, apenas 21% das bandas foram sequenciadas com sucesso. Além disso, a distribuição das bandas foi similar entre os meses e não houve variação temporal significativa da CCB no reservatório da Pampulha e nem em Volta Grande (Fig. 2b).

Para as cepas de *S. brasiliense* (168, 175 e 176) e *Microcystis* sp. (165, 170, 172, 173 e 174) testadas com iniciador universal para bactéria após a filtração das culturas em filtros de diferente porosidade, observamos que Bacteroidetes, Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria (Fig. S1b) foram tanto de vida livre (FL) quanto aderidas (PA). Para nenhum filo, ou subdivisão foram observadas apenas bactérias de vida livre ou aderidas a partículas. As bactérias associadas às culturas das cepas de *Microcystis* sp. e *S. brasiliense* do Brasil formaram três grupos distintos (clusters 1, 4 e 5 da Fig. 5).

Esse resultado contrasta com o descrito por González et al. (2013), que encontraram Beta-, Gammaproteobacteria ou Bacteroidetes dominando os agregados bacterianos, enquanto Alphaproteobacteria e *Actinobacteria* estavam negativamente correlacionados às partículas.

O filo Bacteroidetes, previamente referido como grupo CFB, devido à presença dos gêneros *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, compreende uma parte importante de comunidade microbiana associada a partículas em ambientes de água doce. Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria são subdivisões do filo Proteobacteria, as chamadas bactérias púrpuras, que são muitas vezes os procariotos dominantes em

sistemas aquáticos. Embora possam ser encontradas em diversos tipos de ambientes aquáticos, incluindo na coluna d'água e em sedimentos de ambientes de água doce e marinhos, tanto Gammaproteobacteria quanto Alphaproteobacteria são, geralmente, mais dominantes em sistemas marinhos. Em lagos, os membros de Alphaproteobacteria têm sido encontrados em comunidades de partículas associadas (Yannarell & Kent 2009).

Dziallas & Grossart (2012) testaram as interações entre *M. aeruginosa* e sua comunidade associada e observaram maior variabilidade quando modificaram a temperatura entre as réplicas, em todas as amostras, dessa forma bactérias de vida livre e aderidas diferenciaram-se significativamente umas das outras. Portanto, a temperatura parece ter impacto considerável na CCB. O sequenciamento das bandas de DGGE revelou que Bacteroidetes e Alphaproteobacteria eram ambas de vida livre e aderidas, ao passo que Gammaproteobacteria estavam sempre aderidas e Betaproteobacteria eram principalmente de vida livre. Este resultado vale para todas as três cepas investigadas, em todas as temperaturas.

A presença de arqueias metanogênicas foi detectada nos dois reservatórios estudados (Pampulha e Volta Grande), confirmando os resultados de estudos prévios (Karl et al. 2008; Damm et al. 2010; Grossart et al. 2011), que também revelaram a ocorrência desse grupo em ambientes com oxigênio. Apesar da elevada disponibilidade de matéria orgânica no reservatório da Pampulha, foi possível detectar oxigênio dissolvido na coluna d'água (Tabela S1), inclusive no local onde as coletas foram realizadas (Tabela S1 – profundidade do disco de Secchi é equivalente a 10% da penetração de luz). O reservatório de Volta Grande apresentou elevadas concentrações de oxigênio ao longo de toda a coluna d'água (Tabela S2), durante o período de amostragem.

Alguns autores assumem que a presença desse grupo pode ser causada por agregados anóxicos dentro da coluna d'água (Schulz et al. 2001), ou que microrganismos previamente descritos como anaeróbios podem resistir em condições óxicas e são pelo menos ativos sob condições micro-óxicas, ou ainda são apenas anaeróbios facultativos (Dziallas & Grossart 2012). Porém, no caso do reservatório da Pampulha é também possível que a detecção desse grupo anaeróbio resulte do transporte físico de água e sedimento anóxico (Hofmann et al. 2010) do fundo do reservatório.

No reservatório da Pampulha constatou-se a existência permanente de booms de cianobactérias, confirmada por estudos paralelos durante o mesmo período desta pesquisa (Lopes et al. *in prep.*; Figueredo et al. submetido). É possível a ocorrência de condições anóxicas no meio de uma espuma de cianobactérias. Ploug (2008), por exemplo, encontrou zonas anóxicas nos agregados de cianobactérias em decomposição no mar Báltico. Dziallas & Grossart (2012) consideraram a ficosfera *phycosphere* um micro-habitat único para a comunidade microbiana associada com grandes diferenças na concentração de oxigênio, dependendo do posicionamento das células, quer seja em uma espuma flutuante ou em um agregado, dependendo das condições de luz presentes. Entretanto, neste estudo não foi realizado nenhum teste para confirmar a presença de zonas anóxicas na espuma.

Nossos resultados também evidenciaram a associação entre as cepas *Microcystis* e *Sphaerocavum* e os grupos de anaeróbios obrigatórios (arqueias metanogênicas). As comunidades microbianas, associadas às cepas investigadas *Microcystis* sp., *M. aeruginosa* e *S. brasiliense*, variaram de acordo com a cepa. Para o par de iniciadores para arqueias, houve mais genótipos microbianos evidenciados por várias bandas nas culturas da cepa 175 (*S. brasiliense*) e da cepa 165 (*Microcystis* sp.), ambas do Brasil.



As cepas *M. aeruginosa* (NIES 101), PCC 7806 (não tóxica) e PCC 7806 (tóxica) apresentaram apenas uma banda relativa a arqueias.

As mesmas culturas das cepas *S. brasiliense* e *Microcystis* sp. (175 e 165) que tiveram maior diversidade de bandas foram subsequentemente utilizadas como padrão (Fig. S3) para amostras de campo dos dois reservatórios. Nós observamos que algumas bandas presentes nas culturas das cepas de cianobactérias também estavam presentes nas amostras ambientais (Fig. 4). Um total de 7–10 bandas presentes na cepa 175 (*S. brasiliense*) também foi encontrado em uma amostra ambiental do reservatório da Pampulha (novembro de 2010). A cepa 165 (*Microcystis* sp.) e três amostras do reservatório de Volta Grande (março, junho e setembro de 2011) compartilharam 10–12 bandas relativas a arqueias na mesma posição (Fig. S3). Essas observações indicam que as arqueias encontradas nas culturas de cianobactérias e nas amostras de campo são as mesmas, e desde que as bandas nas mesmas posições correspondem aos mesmos genótipos microbianos, essas associações estão, provavelmente, ocorrendo também no ambiente natural. Assim, as cianobactérias podem, de fato, fornecer um nicho para o crescimento desses anaeróbios (Hardin 1960; Dziallas & Grossart 2012; Eigemann et al. 2013).

A co-ocorrência de elevados números de cianobactérias, algas e arqueias aderidas poderia permitir a transferência direta de H<sub>2</sub> ou acetato, [necessários para metanogênese hidrogenotrófica e acetoclástica (Whitman et al. 1992)] dos autótrofos para as arqueias metanogênicas, dando assim suporte para a produção de metano (Grossart et al. 2011).

Em síntese, nossos resultados evidenciaram que há uma elevada diversidade relacionada à composição microbiana (arqueias e bactérias) nos reservatórios da Pampulha e de Volta Grande, e os principais grupos detectados foram: Proteobacteria,

Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacteroidetes (Bacteria), e diversos *taxa* do filo Euryarchaeota, mais especificamente arqueias metanogênicas. Essas arqueias também ocorreram em algumas culturas associadas às cepas de cianobactérias.

O presente estudo contribuiu para a descrição da comunidade microbiana desses ambientes, sendo, portanto, o primeiro passo não apenas para pesquisas futuras sobre a composição da comunidade microbiana, mas também para o entendimento da natureza das interações bactéria-arqueia/cianobactéria, que têm inúmeras funções ecologicamente relevantes, incluindo a remineralização de nutrientes, o fornecimento de vitaminas e a ciclagem do carbono (Cole 1982).

## 7.5 Agradecimentos

Agradecemos a Solvig Pinnow e Katharina Frindte, pelo excelente suporte técnico; à Ivette Salka, pelo suporte na construção da árvore filogenética e análises estatísticas; a Katrin Attermeyer e Danilo Neves, pelo suporte estatístico e uso do programa R; e à Algirdas Svany, pela concessão das cepas de *M. aeruginosa*. Também agradecemos à Capes (programa PDSE), pela concessão da bolsa à primeira autora, e à FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) e à CEMIG (Companhia Elétrica de Minas Gerais), pelo suporte financeiro dentro do projeto P&D.

## 7.6 Referências

Berg, K. A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J. (2009) High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The ISME Journal* **3**(3):314-325.

Braga, F. M. S. and Gomiero, L.M. *Análise da pesca experimental realizada no reservatório de Volta Grande, rio Grande (MG-SP)*: Boletim do Instituto de Pesca. 24 ed. São Paulo: Instituto de Pesca, 1997. 7p.

Campos, M. C. S. *Pesquisa para o desenvolvimento de ecotecnologias de prevenção e controle de *Limnoperna fortunei*; Estudo de caso: Reservatório de Volta Grande*: Relatório parcial. Belo Horizonte: Cetec, 2003. 48 p.

Carmichael, W. W., Azevedo, S. M., An, J. S., Molica, R. J., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., et al. (2001) Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives* **109**(7):663-668.

CETESB. *Relatório Final do Levantamento Ecológico-Sanitário das Represas do Rio Grande*: Considerações sobre a Piscicultura e a Recreação. São Paulo: Sistemas Furnas-Cemig, 1976. 78 p.

- Cole, J. J. (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**:291-314.
- Conrad, R. (2009) The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* **1**:285-292.
- Damm, E., Helmke, E., Thoms, S., Schauer, U., Nothig, E., Bakker, K., Kiene R. P. (2010) Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean. *Biogeosciences* **7**:1099-1108.
- Dziallas, C. and Grossart, H-P. (2011a) Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environmental Microbiology* **13**(6):1632-1641.
- Dziallas, C. and Grossart, H-P. (2011b) Increasing Oxygen Radicals and Water Temperature Select for Toxic *Microcystis* sp. *PLoS ONE* **6**(9): e25569. doi:10.1371/journal.pone.0025569.
- Dziallas, C. and Grossart, H-P. (2012) Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature. *Marine Biology* **159**(11):2389-2398.
- Eigemann, F., Hilt, S., Salka, I., Grossart, H-P. (2013) Bacterial community composition associated with freshwater algae: species specificity vs. dependency on environmental conditions and source community. *FEMS Microbiology Ecology* **83**(3):650-63.
- Figueredo, C. C. and Giani, A. (2009) Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologia* **39**:264-272.
- Figueredo, C. C., Lopes, A. M. M. B, Lima, P. H. O., Giani, A. Submitted. Increasing phosphorus level by urban influence is the main cause of a persistent cyanobacterial bloom in a tropical ecosystem - the Pampulha reservoir revisited.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Forestier, N., Gillet, F., Aragno, M., et al. (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**(11):634-643.
- Giani, A., Pinto-Coelho, R. M., Oliveira, S. J. M., Pelli, A. (1988) Ciclo sazonal de parâmetros físico-químicos da água e distribuição horizontal de nitrogênio e fósforo no reservatório da Pampulha (Belo Horizonte, MG, Brasil). *Ciência e Cultura* **40**(1):69-77.
- Giani, A. Limnology in Pampulha Reservoir: some general observations with emphasis on the phytoplankton community. In: Pinto-Coelho, R. M. et al. Ecology and Human Impact on Lakes and Reservoirs in Minas Gerais. Belo Horizonte: Segrac, 1994. p. 151-154.
- Giani, A., Bird, D., Prairie, Y., Lawrence, J. (2005) Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**:2100-2109.
- Goecke, F., Thiel, V., Wiese, J., Labes, A., Imhoff, J. F. (2013) Algae as an important environment for bacteria - phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia* **52**(1):14-24.
- González, C., R., Proia, L., Ferrera, I., Gaso, J. M., Sabater, S. (2013) Effects of large river dam regulation on bacterioplankton community structure. *FEMS Microbiology Ecology* **84**:316-331.

- Greco, M. K. B. *Balanço de Massa de Fósforo, Evolução da Eutrofização e o Crescimento de Macrófitas Flutuantes no Reservatório de Volta Grande (MG/SP)*. 2002. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- Grossart, H., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., Brinkhoff, T. (2005) Marine diatom species harbor distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology* **7**:860-873.
- Grossart, H-P and Simon, M. (2007) Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* **47**(3):163-176.
- Grossart, H-P. (2010) Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. Minireview. *Environmental Microbiology Reports* **2**(6):706-714.
- Grossart, H-P., Frindte, K., Dziallas, C., Eckert, W., Tang, K. W. (2011) Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *PNAS Environmental Science* **108**(49):19657-19661.
- Hardin, G. (1960) The competitive exclusion principle. *Science* **131**:1292-1297.
- Hofmann, H., Federwisch, L., Peeters, F. (2010) Wave-induced release of methane: Littoral zones as a source of methane in lakes. *Limnology Oceanography* **55**:1990-2000.
- Karl, D. M., Beversdorf, L., Björkman, K. M., Church, M. J., Martinez, A. and Delong, E. F. (2008) Aerobic production of methane in the sea. *Nature Geoscience* **1**(7):473-478.
- Kerters, K., DeVos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H, Stackebrandt, E. et al. (Comp.). *The Prokaryotes: A Handbook of the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. 3. ed. New York: Springer Verlag, 2006. p. 3-37.
- Lopes, A. M. M. B, Figueredo, C. C., Giani, A. *IN PREP*. Permanent cyanobacteria dominance in a tropical hypereutrophic reservoir: molecular and morphological characterization.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A. et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4):1363-1371.
- McGreggor, G. B. and Fabbro, L. D. (2000) Dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoptokaryota) in Queensland tropical and subtropical reservoirs: Implications for monitoring and management. *Lakes and Reservoirs Research Management* **5**:195-205.
- Muyzer, G., Waal, D. E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3):695-700.
- Paerl, H. W. Interactions with bacteria. In: Carr, N. G.; Whitton, B. A. (Comp.). *The Biology of Cyanobacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982. p. 441-461.
- Ploug, H. (2008) Cyanobacterial surface blooms formed by *Aphanizomenon* sp. and *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea: small-scale fluxes, pH, and oxygen microenvironments. *Limnology Oceanography* **53**(3):914-921.

- R Development core team. (2005) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rashidan, K. K. and Bird, F. D. (2001) Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom. *Microbial Ecology* **41**:97-105.
- Reeburgh, W. S. (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews* **107**(2):486-513.
- Reynolds, C. S. *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. 551 p.
- Rolla, M. E. and Rosa, S. G. (1990) Composição físico-química e biológica do sedimento do reservatório de Volta Grande, Minas Gerais/ São Paulo. *Acta Limnológica Brasileria* **3**:201-218.
- Sant'Anna, C. L. and Azevedo, M. T. P. (2000) Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia* **71**(3):359-385.
- Schulz, M., Faber, E., Hollerbach, A., Schröder, H. G, Güde, H. (2001) The methane cycle in the epilimnion of Lake Constance. *Archiv für Mikrobiologie* **151**:157-176.
- Smith, V. H., Joye, S. B. and Howarth, R. W. (2006) Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography* **51**:351-355.
- Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K., Kimura, M. (2004) DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters* **232**:153-163.
- Wetzel, R. G. *Limnology*. 2. ed. New York: Saunders College Publishing, 1983. 767 p.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L. and Boone, D. R. The methanogenic bacteria. In: Balows, H. G. T. A., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer K. H. *The Prokariotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application*. New York, Springer Verlag: 1992. 719-767p.
- Yannarell, A. C. and Kent, A. D. Bacteria, distribution and community structure. In: LIKENS, Gene E. *Encyclopedia of Inland Waters*. Chicago: Elsevier Science & Technology Books, 2009. v.3. p. 201-210. (Ilustrada).
- Zehnder, A., and P. R. Gorham. (1960) Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. *Canadian Journal of Microbiology* **6**(6):645-660.
- Zhou, J., Bruns, M. A., Tiedje J. M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology* **62**:695-724.



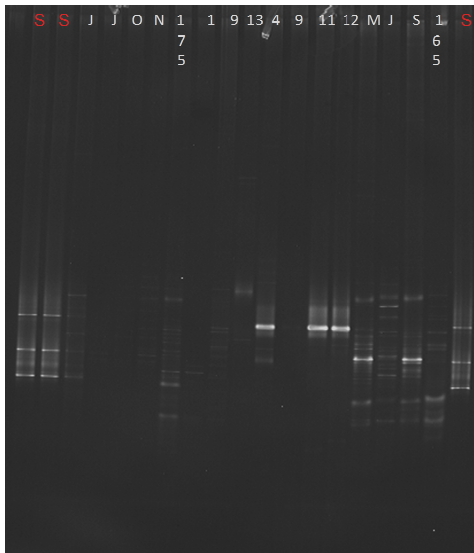


Fig. S3 - Imagem do gel de DGGE do gene 16S rRNA, alvo Archaea, que ocorreram nas culturas das cepas de cianobactérias do Brasil, da Alemanha, do Japão e da Holanda, e em amostras de campo. **Legenda dos poços** da esquerda para direita: S – Standard; S – Standard; J – amostra de campo Pamp./Jun–10/rede; J – Amostra de campo Pamp./Jun–2010– Secchi; O – Amostra de campo Pamp./Oct–2010– Secchi; N – Amostra de campo Pamp./Nov–2010– Secchi; 175 – Cultura *S. brasiliense* /Brasil; 1 – JQ268043/Amostra de campo Methanomicrobiaceae /Lago Bangkok /Alemanha; 9 – JQ7924261/Amostra de campo Methanoregula / Lago Taihu /Alemanha ; 13 – AB 2005/30 0.2 /Amostra de campo Methanospitulum /Lago, Alemanha; 4 – *M. aeruginosa*/ NIES 101/ Japão; 9 – *M. aeruginosa*/ HUB P461 / Alemanha; 11 – *M. aeruginosa* / PCC7806 / não axênica/ rede; 12 – *M. aeruginosa* / PCC7806 / não axênica / rede; M – Amostra de campo VG/mar–2011–Secchi; J – Amostra de campo VG/Jun–2011– Secchi; S – Amostra de campo VG/Set–2011 – Secchi; 165 – cultura *Microcystis* /Brasil; S – Standard.

Tabela S1 - Concentração de oxigênio dissolvido no reservatório da Pampulha, de outubro de 2009 a dezembro de 2010

Prof. (m)	2009		2010												
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
0	11,00	9,99	5,14	6,07	10,49	4,50	3,71	3,49	8,28	4,48	4,85	8,46	4,13	3,93	6,34
0,5	10,90	10,41	5,15	6,12	10,05	4,38	*	2,86	7,92	4,47	4,39	8,43	4,01	3,93	6,26
1	10,19	9,62	4,32	6,09	9,33	4,22	*	1,35	6,96	3,84	4,37	7,83	4,01	3,91	5,91
1,5	9,77	7,56	3,20	6,11	3,78	3,91	*	0,73	5,76	3,35	3,74	7,51	3,93	3,90	5,53
2	4,68	2,80	2,35	5,79	0,30	3,79	*	0,43	5,34	2,19	3,37	7,21	3,75	3,82	4,30
2,5	0,80	0,74	2,87	3,19	0,20	2,74	*	0,37	2,86	0,3	3,29	6,99	3,56	3,84	0,50
3	0,19	0,16	0,44	1,75	0,15	2,53	*	0,36	2,52	0,08	3,16	6,92	1,5	3,85	0,02
3,5	0,11	0,09	0,21	0,70	0,11	1,44	*	0,36	0,95	0,04	1,92	6,9	0,08	0,16	0,06
4	0,08	0,08	0,14	0,35	0,11	0,26	*	0,35	1,47	0,04	0,51	0,25	0,3	0,11	0,05
4,5	0,07	0,06	0,12	0,25	0,11	0,22	*	0,35	1,22	0,04	0,10	0,08	0,06	0,09	0,05
5	0,07	0,07	0,11	0,18	0,11	0,21	*	0,34	1,05	0,03	0,06	0,06	0,05	0,08	0,04
5,5	0,06	0,07	0,11	0,14	0,12	0,20	*	0,33	1,03	0,03	0,06	0,05	0,05	0,07	0,04
6	0,06	0,08	0,11	0,13	0,13	0,19	*	0,32	1,28	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06	0,03
6,5	0,07	0,09	0,11	0,13	0,13	0,19	*	0,32	1,13	0,03	0,05	0,04	0,04	0,06	0,03

\*valor de oxigênio dissolvido não mensurado.

Tabela S2 - Concentração de oxigênio dissolvido no ponto de coleta VG3 do reservatório de Volta Grande em 2011

Prof. (m)	DO (mg/L)											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
0	7,59	7,28	7,53	6,78	6,63	7,17	8,08	8,32	7,94	8,08	7,5	5,66
0,5	7,59	7,28	7,58	6,87	6,69	7,22	8,07	8,45	8,02	8,11	7,74	6,37
1	7,76	7,28	7,62	6,97	6,74	7,33	8,14	8,5	8,13	8,11	7,81	6,99
1,5	7,77	7,23	7,65	6,97	6,78	7,37	8,24	8,5	8,24	8,11	7,8	7,39
2	7,77	7,31	7,65	7,05	6,82	7,4	8,35	8,52	8,28	8,1	7,9	7,76
2,5	7,79	7,33	7,64	7,06	6,85	7,41	8,41	8,55	8,33	8,09	7,97	7,91
3	7,80	7,36	7,61	7,17	6,87	7,45	8,47	8,59	8,37	8,06	7,98	7,98
3,5	7,79	7,38	7,67	7,18	6,89	7,41	8,53	8,61	8,42	8,03	8,01	8,01
4	7,79	7,39	7,52	7,22	6,91	7,39	8,58	8,62	8,44	8,02	8,01	8,04
4,5	7,79	7,39	7,51	7,28	6,92	7,43	8,6	8,58	8,47	7,99	8,06	8,09
5	7,79	7,38	7,49	7,24	6,94	7,43	8,6	8,57	8,5	8	8,04	8,12
5,5	7,78	7,39	7,49	7,25	6,96	7,41	8,64	8,59	8,49	8	8,06	8,18
6	7,79	7,38	7,49	7,22	6,97	7,42	8,68	8,56	8,49	8,01	8,09	8,21
6,5	7,79	7,37	7,48	7,27	6,99	7,41	8,73	8,59	8,47	8,01	8,04	8,23
7	7,72	7,36	7,48	7,26	6,99	7,42	8,74	8,6	8,45	8,01	8	8,25
7,5	7,68	7,36	7,48	7,27	7	7,42	8,74	8,57	8,46	8,01	8	8,26
8	7,64	7,35	7,48	7,26	6,99	7,4	8,75	8,57	8,47	8,01	8,02	8,27
8,5	7,62	7,36	7,48	7,22	7	7,43	8,75	8,56	8,46	8,01	7,96	8,27
9	7,62	7,37	7,47	7,23	7,01	7,43	8,75	8,58	8,46	7,99	7,97	8,23
9,5	7,60	7,37	7,47	7,24	7,01	7,46	8,74	8,59	8,44	8	7,98	8,22
10	7,60	7,34	7,46	7,23	7,08	7,46	8,74	8,61	8,43	7,99	7,99	8,2
11	7,59	7,31	7,42	7,19	6,98	7,48	8,72	8,61	8,42	8	7,96	7,84
12	7,49	7,3	7,4	7,11	6,97	7,47	8,6	8,59	8,34	8	7,91	8,2
13	7,46	7,23	7,38	7,1	6,96	7,46	8,42	8,58	8,28	7,99	7,85	8,19
14	7,24	7,06	7,37	7,05	6,97	7,44	8,34	8,58	8,14	7,98	7,86	8,08
15	7,08	6,91	7,36	6,95	6,99	7,42	8,3	8,56	8,08	7,97	7,86	7,99
16	6,74	6,90	7,33	6,55	7	7,42	8,27	8,52	7,87	7,95	7,8	7,95
17	*	6,87	7,3	6,48	7		8,24	8,53	7,83	7,95	7,74	7,9
18	*	*	*	6,38	6,9	*	*	8,52	*	*	*	7,88
19	*	*	*	5,83	*	*	*	*	*	*	*	*
20	*	*	*	5,62	*	*	*	*	*	*	*	*

\*análise não realizada.



## 8 CONCLUSÃO GERAL

Nos dois ambientes estudados, foram observados dois cenários distintos em relação ao grau de trofia e à composição da comunidade de cianobactérias, sendo o reservatório da Pampulha caracterizado como hipereutrófico, e o reservatório de Volta Grande, como oligotrófico.

A composição do fitoplâncton respondeu a essas características. No reservatório da Pampulha constatamos a prevalência e sucessão sazonal entre dois principais grupos de cianobactérias (Nostocales e Chroococcales), com espécies de ocorrência comum em ambientes aquáticos eutrofizados com a dominância de cianobactérias potencialmente tóxicas (hipótese 1). Em Volta Grande, ambiente pobre em nutrientes, o grupo dominante foi o das picocianobactérias, que embora possuam ocorrência cosmopolita são comumente dominantes em locais oligo a mesotróficos devido às menores exigências nutricionais (hipótese 2).

Além das diferenças na disponibilidade de nutrientes, a sucessão sazonal de cianobactérias também foi atribuída às diferenças de estratificação e desestratificação da coluna d'água, no reservatório da Pampulha.

O uso da técnica de *fingerprinting* (DGGE) mostrou-se satisfatório, por ampliar a descrição da comunidade de cianobactérias, auxiliando na detecção de espécies não observadas na identificação microscópica tradicional, portanto pode-se afirmar que as técnicas foram complementares. Porém, a análise do gene 16S rRNA de cianobactérias também mostrou que muitos gêneros previamente descritos não são filogeneticamente coerentes, o que evidencia a necessidade de revisões taxonômicas (Fiore et al. 2005), reafirmando assim a importância do uso dessas técnicas em conjunto, para melhor descrição da comunidade (Palinska et al.1996). Embora a diversidade morfológica da

comunidade de cianobactérias foi distinta da diversidade molecular, ambas as técnicas foram complementares (hipótese 3).

Para o estudo da composição da comunidade de bactérias e arqueias utilizou-se apenas a técnica de DGGE, pois os grupos não apresentam diferenciação morfológica distinta. Os grupos, porém, possuem um banco de dados muito maior para o gene 16S rRNA. Apenas no programa ARB (do Latin *arbor*, tree) encontram-se 200.000 sequências de bactérias e 400.000 de arqueias (Lwiduig et al. 2004), logo o sequenciamento para posterior identificação taxonômica permitiu conhecer até 100% da comunidade. No caso das cianobactérias, a dificuldade foi o número bem mais reduzido de depósitos de sequências.

A técnica de DGGE demonstrou ter boa resolução para detecção de sequências de mesmo tamanho, porém com diferentes perfis migratórios, conseqüentemente ela permite o entendimento da diversidade genética de populações microbianas desconhecidas, como é o caso dos dois reservatórios estudados.

Com base nos resultados obtidos para os dois reservatórios estudados, Pampulha e Volta Grande, foi possível conhecer melhor a comunidade de cianobactérias dos dois ambientes, observar suas mudanças sazonais e espaciais, seus padrões de ocorrência e dominância, e associá-los a fatores ambientais. Foi também possível aumentar o conhecimento de outros grupos microbianos, como os domínios Bacteria e Archaea, sendo este último um grupo cuja ocorrência se destacou, devido principalmente à presença de arqueias metanogênicas na coluna d'água oxigenada. Os resultados relativos às associações entre cepas de cianobactérias, bactérias e arqueias apontaram para a necessidade de aprofundamento no estudo dessas interações em ambientes de água doce tropicais, onde os estudos sobre o tema são ainda escassos ou quase inexistentes (hipótese 4).

## Referências

Fiore, M. F., Neilan, B. a, Copp, J. N., Rodrigues, J. L. M., Tsai, S. M., Lee, H., Trevors, J. T. (2005) Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. *Water Research* **39**(20):5017-5026.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A. et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4):1363-1371.

Muyzer, G., Waal, D. E. C. and Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3):695-700.

Palinska, K., Liesack, W., Rhiel, E., Krumbein, W. (1996) Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia* like isolates. *Archives of Microbiology* **166**(4):224-233.

## ANEXO

### Sequências parciais do gene 16S rRNA de cianobactérias do reservatório da Pampulha.

>Band\_344

```
GTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGGTCTGACGGTACTTGAGGAAT
CAGCCTCGGCTAACTCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAA
TTAT
TGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCATGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCA
AATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAACTGGCAGACTAGAGATCAGTAGGGGT
AGCAGGAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAACTGGCAG
ACTAGAGATCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGAGTAGAGATTGG
GAACAACATCGGTGGTGAAGCATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAG
AACATCGGTGGCGAAAAGC
```

>Band\_376

```
CAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGCAGCAGCCGCGGTAATACGGG
GGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCT
GCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCG
AGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGGCGGTGGAAAC
TGGCAGACTAGAGAACGGTAGGGGTAGCCCCAATTGAAACCTGGCAGACTAGAGATCAGTA
GGGGTAGCAGGAATT
```

>Band\_341

```
CCAAACTCCACTCATTTACCGCTACACTGGGAATTCCTGCTACCCCTACCGATCTCTAGTCT
GCCAGTTTCCACCGCCTTTAGGTGCTTAAGCAACCTGATTTGACGGCAGACTTGGCTGACCA
CCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCTCCCCCGTATTACCGCGGCT
GCTGGCACGGAGTTAGCCGAGGCTGATTCCTCAAGTACCGTCAGAACTTCTTCCTTGAGAAA
AGAGGTTTACAATCCAAAGACCTTCTCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGGCTTTCGCC
ATTGCGGA
```

>Band\_363

```
TCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCG
GAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCT
TAACGACCTAAAGGCGGTGGAACTGGCAGACTAGAGATCAGTAGGGGTAGCAGGAATTCC
CAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTG
GGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTA
GTC
```

>Band\_379

```
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC
GTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAA
GGCGGTGGAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCCAGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTGA
CACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA
```

>Band\_359

```
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG
CGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCCAAGTCTGCTGTCAAATCAGGTTGCTTAACGACCTAA
AGGCGGTGGAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGCAGGAATCCCAGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTACTGGGCTGTATCTG
ACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTC
```

>Band\_397

TACAACTACCGTTCTCTAGTCTGCCAGTTTCCACCGCGGTTAGGTCTGTTAAGCTACCTGATTT  
GACGGCAGACTTTGGCTGACCACCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTG  
CCTCCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGAGGCTGATTCCTCAAGTACCG  
TCAGAACTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTTTACAATCCAAAGACCTTCCCTCCCTCACGGCGC  
TTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG

>Band\_338

TGGTCCCAAATCCACTCATTTCACGCTACACTGGGAATTCCTGTTGCCCTACCGATCTCT  
AGTTTGGCAGTTTCCACCGCTTTTATGTGGTTAAGCCACCCGATTTGACGGCAGACTTGGCTG  
ACCACCTGCGGA

<Band\_339

CAAATTCCAATGAGGAAAATGCTCCAATGGGAATTCGTGTTACCCCTACCGTTCTCTAGTTT  
GCCAGTTTCCACCGCTTTTATGTGGTTAAGCCACCTGATTTGACGGCAGACTTGGCGGACCA  
CCTGCGG

>Band\_351

GAGGAATTGGTTTTGCCCTACCGCACTCTAGTTCTGTAATTTCCACCGCTTTTATTTGGTTA  
AGCCAAACTCTTTAACAGCAGACTTTCAGTTCCACCTGCAGACCCTTTACGCCAATCATTCC  
GGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTTATT  
CCTCAAGTACCGTCACTTCTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTTTACGACCCAAGAGCCTTCCCT  
CCTCACGCGGTATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGC

>Band\_356

GCCACGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAG  
GTGGAAGTAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGAAACTA  
CAGAACTAGAGTGCAGTGGGAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAAGTACTGAGGGACGAA  
AGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCTGTAGT

>Band\_348

TCCTGATATCTACTCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCTTTTGCCCCTACCGCACTCTAGT  
TCTGTAGTTTCCACCGCTTTTATTTGGTTAAGCCAAACTCTTTAACAGCAGACTTTCAGTTCC  
ACCTGCAGACCCTTTACGCCAATCATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGG  
TGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTTATTCTCAAGTACCGTCACTTCTTCTTCCCTTGAGAA  
AAGAGTTTTACGACCCAAGAGCCTTCCCTCACGCGGTATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCC  
CATTGCGGA

>Band\_398

CCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAA  
AGGGTCTGCAGGTGGAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGC  
GGTGGAAACTACAGAACTAGAGTGCAGTGGGAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGATATCAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACAC  
TGAGGGACAAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAAATA

>Band\_361

CCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGTCTGCAGG  
TGGAAGTAAAGTCTGCTGTTAAAGAGTTTGGCTTAACCAAATAAAAGCGGTGGAAACTAC  
AGAAGTAAAGTGCAGTGGGAAAGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
CAGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGTTTTGCTAGACCGTAACTGACACTGAGGGACGAAA  
GCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGT

>Band\_352

CCAGGAATTCGTTTTGCCCTACCGCACTCTAGTTCTGTAGTTTCCACCGCTTTTATTTGGTTA  
AGCCAAACTCTTTAACAGCAGACTTTCAGTTCCACCTGCAGACCCTTTACGCCAATCATTCC  
GGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATGCTTATT  
CCTCAAGTACCGTCACTTCTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTTTACGACCCAAGAGCCTTCCCT  
CCTCACGCGGTATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG

>Band\_372

ACTGATTACAACGCTACACCAGGAATTCGGTTTGGCCCTACCGCACTCTAGTTCTGTAGTTTC  
CACCGTTTTATTGGTTAAGCCAAACTCTTTAACAGCAGACTTTCAGTTCCACCTGCAGACC  
CTTTACGCCAATCATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGG  
AGTTAGCCGATGCTTATTCTCAAGTACCGTCACTTCTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTTAC  
GACCCAAGAGCCTTCCTCCCTCACGCGGTATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGG

>Band\_373

ATTCACCGCTACACCAGGAATTCCTTTTGGCCCTACCGCACTCTAGTTCTGTAGTTTCCACC  
GCTTTTATTTGGTTAAGCCAAACTCTTTAACAGCAGACTTTCAGTTCCACCTGCAGACCCTTT  
ACGCCAATCATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGT  
TAGCCGATGCTTATTCTCAAGTACCGTCACTTCTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTTACGAC  
CCAAGAGCCTTCCTCCCTCACGCGGTATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGG

>Band\_358

CCACCGGGGTTATGAAGTCCCATTCCGCGCTTGGCCACAGACTTACGGGACCGCCTGCGGA  
CGCTTACGCCAATCATTCCGGATAACGCTTGCATCCTCCGTCTTACCGCGGCTGCTGGCAC  
GGAGTTAGCCGATGCTGATTCTCAGGTACCGTCAGATCTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTT  
ACAACCCACAGGCCTTCGTCCCTCACGCGGTATTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGG

>Band\_402

ACCATTCTCTAGTCTGGCAGTTTCCACCGCTGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTAACGAC  
AGACTTGCAAGGACCGCCTGCGGACGCTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACT  
CCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGAGGCTTATTCTCAAGTACCGTCAGA  
TCTTCTTCCCTTGAGAAAAGAGGTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTC  
GTGAGGCTTTCGCCATTGC

>Band\_401

CCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT  
CCGCAGGTGGTCTTGTAAGTCTGTCTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTACGCGATGGA  
AACTACAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACACTCATGG  
ACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

Sequências parciais do gene 16S rRNA de cianobactérias do reservatório de Volta Grande.

>Band\_278

GGTACTTGATGAATAAGCCACGGCTAATTCGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGG  
CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCTGTT  
AAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTAGGCGGTGGAACTACAAGACTAGAGTGTGGTAGGGG  
CAGAGGGAATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGA  
AGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATT  
AGATA

>Band\_283

GCCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG  
TCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCTGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTAGGCGGTGG  
AACTACAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATG  
GACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

>Band\_74

AATTCCTCTGCCCTACCACACTCTAGTCTTGTAGTTTCCACCGCCTAAATGGAGTTAAGCT  
CCACGCTTTAACGACAGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTACGCCAATAATCCGGA  
TAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATC  
AAGTACCGTCAGATCTTCTTCCCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTC  
ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGG

>Band\_130

TAATTCCTGCGCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTA  
GGCGGTGGAAACTGCAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGA  
CGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTC

>Band\_83

AGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGA  
ATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTA  
ACTCCATTTAGGCGGTGGAAACTACAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCG  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGG  
CCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGA

>Band\_125

AGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTG  
TCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTAGGCGGTGGAAACTACAAGACTAGAGTGTGGTA  
GGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGG  
GATTAGATACCCCTGTAGTCA

>Band\_92

GTAATACGGGAGTGACAGGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTC  
TTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTAGGCGGTGGAAACTACAAGACT  
AGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAA  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGG  
GGAGCGAAAGGATTAGAT

>Band\_27

AGCAGAGCGCCTTACCACCTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCAGCTACACCGGG  
AATTCCCTCTGCCCTACCACACTCTAGTCTTGACGTTTCCATCGCAGAAATGGAGTTAAGCT  
CCACGCTTTGACGACAGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATCCGGA  
TAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATC  
AAGTACCGTCAGATCTTCTTCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCAGAGGCCTTCATCCCTC  
ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATT

>Band\_285

GAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTAT  
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGG  
GCTTAACTCCATTTACGCGATGGAAACTGCAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAAT  
TCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTG  
CTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

>Band\_65

AATTCCTGCGCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTA  
GGCGGTGGAAACTGCAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGA  
CGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

>Band\_276

TACAACGCTACACCGGGAATTCCCTCTGCCCTACCACACTCAAGTCTTGACGTTTCCACCGC  
CGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTAAACGACAGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTA  
CGCCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATT  
AGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGATCTTCTTCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCC  
AGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGG

>Band\_231

CACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT  
ATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCTTGCAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACT

CCATTTTCAGCGATGGAAACTGCAAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTG  
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCA  
TAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

Band\_213

CGCCTTACCCTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCCT  
CTGCCCCTACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCTTAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTT  
TAACGACAGACTTGCAAGGCCGCTGCGGACGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTT  
GCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCTCAAGTACC  
GTCAGATCTTCTCCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGC  
GTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGC

>Band\_230

ACTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCCTCTGCCCCTAC  
CACACTCTAGCCTTGCAGTTTCCATCGCTGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTAAACGACAG  
ACTTGCAAGGCCGCTGCGGACGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCCC  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCTCAAGTACCGTCAGATCTT  
CTTCTTGAGAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGT  
CAGGCTTTCGCCATTG

>Band\_223

GCAGAGCGCCTTACCCTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGA  
ATTCCTCTGCCCCTACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCAGAAATGGAGTTAAGCTC  
CACGCTTTGACGACAGACTTAAAAGACCGCCTGCGGACGCTTACGCCCAATAATTCCGGAT  
AACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATC  
AAGTACCGTCAGATCTTCTCCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTC  
ACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATT

>Band\_237

TGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCCTCTGCCCCTACCA  
CACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCAGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTGACGACAGAC  
TTAAAAGACCGCCTGCGGACGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCCCGT  
ATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGATCTT  
TCTCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGT  
AGGCTTTCGCCATTGCG

>Band\_214

CCACTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCCTCTGCCCCT  
ACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCAGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTGACGAC  
AGACTTACAAGGCCGCTGCGGACGCTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTC  
CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGAT  
CTTCTTCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCC  
GTCAGGCTTTCGCCATTGCG

>Band\_232

ATTTACCGCTACACCGGGAATTCCCTCTGCCCCTACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATC  
GCAGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTGACGACAGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTT  
TACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAA  
TTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGATCTTCTCCTTGATAAAAGAGGTTTACAGC  
CCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGG

>Band\_66

CCAGCAGCCGCGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGT  
CCGAGGCGGTCTTGTAAAGTCTGTCGTCAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTCTGCGATGGA  
AACTGCAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGG  
ACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGAT

>Band\_224



CCACTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTCTGCCCCCT  
ACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCTGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTGACGAC  
AGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTC  
CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGAT  
CTTCTTCCTTGATAAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCC  
GTCAGGCTTTCGCCATTGC

>Band\_228

GAAGATCTGACGGTACTTGATGAATAAGCCACGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
ACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGCA  
AGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTACGCGATGGAACTGCAAGACTAGAGT  
GTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACA  
CCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGC  
GAAAGGATTA

>Band\_279

GCCACGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAA  
CTCCATTTACGCGATGGAACTGCAAGACTAGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCGGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGC  
CATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

>Band\_218

CCACTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTCTGCCCCCT  
ACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCTGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTAACGAC  
AGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTC  
CCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGAT  
CTTCTTCCTTGATAAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCC  
GTCAGGCTTTCGCCATTGCG

>Band\_207

CACTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTCTGCCCCCTA  
CCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCTTAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTAACGACAG  
ACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCCC  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGATCT  
TCTTCCTTGATAAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGT  
CAGGCTTTCGCCATTGC

>Band\_226

TGGCCAGCAGAGCGCCTTACCACCTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACA  
CCGGGAATTCCTCTGCCCCCTACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCCTAAATGGAGTT  
AAGCTCCACGCTTTAACGACAGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATT  
CCGGATAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTA  
TTCATCAAGTACCGTCAGATCTTCTTCCTTGATAAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCAT  
CCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATT

>Band\_210

GCCTTACCACCTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTC  
TGCCCCCTACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCTTAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTT  
AACGACAGACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTG  
CCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCG  
TCAGATCTTCTTCCTTGATAAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCG  
TTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATT

>Band\_211

CCACTGGTGTCTTCCCGATATCTACGCATTTACCGCTACACCGGGAATTCCTCTGCCCCCT  
ACCACACTCTAGTCTTGCAGTTTCCATCGCTTAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTAACGACA  
GACTTACAAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCC  
CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCATCAAGTACCGTCAGATC

TTCTTCCTTGATAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCG  
TCAGGCTTTCGCCATT

>Band\_73

CAAGTCTTGCAGTTTCCACCGCCGAAATGGAGTTAAGCTCCACGCTTTAACGACAGACTTAC  
AAGACCGCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCCCGTATTA  
CCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCTTATTCTCAAGTACCGTCAGATCTTCTTCT  
TGAGAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCT  
TTCGCCATTGCG

>Band\_91

AATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG  
GTAAAGCGTCCGCAGGCGGTTCTGTAAGTCTGCCGTTAAAGCGTGGAGCTCAACTCCATTT  
GGCGGTGGAACTGCAGGACTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGA  
CGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATA

>Band\_76

CCGGGAAATTCCTCTGCCCTACCACACTCAAGTCTGCAGTTTCCACCGCCGAAATGGAG  
TTGAGCTCCACGCTTTAACGGCAGACTTACAGAACC GCCTGCGGACGCTTTACGCCAATAA  
TTCCGATAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGTGGCT  
TATTCTCAAGTACCGTCAGATCTTCTTCTTCTGAGAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGGCCT  
CATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGC

>Band\_281

GTACTTGACGGAATAAGCCACGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGG  
CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGTCTGTAAAGTCTGCCGTT  
AAAGCGTGGAGCTTA ACTCCATTTCCGGCGGTGGAACTGCAAGACTTGAGTGTGGTAGGGG  
CAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGA  
AGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATT  
AGATA

>Band\_304

GCCACGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCCTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAA  
CTCCATTTACGCGATGGAACTGCAAGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGG  
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGC  
CATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTA

>Band\_90

CGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGCGGCCCTGTAA  
GTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTGAGCGATGGAACTACAGGGCTTGAGTG  
TGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGCTCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCG  
AAAGGGATTAGATA

>Band\_75

TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA  
AAGCGTCCGCAGGCGGCCCTGTAAGTCTGTCGTTAAAGCGTGGAGCTTAACTCCATTTGAGC  
GATGGAACTACAGGGCTTGAGTGTGGTAGGGGCAGAGGGAATCCCGGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGATATCGGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGCTCTGCTGGGCCATAACTGACGC  
TCATGGACGAAAGCCAGGGGAGCGAAAGGGATTAGAT

>Band\_280

CTACACGGGAATTCGCTCTGCCCTACCACACTCAAGACTTGCAGTTTCCATCGCTGAAAT  
GGAGTTAAGCTCCACGCTTTAACGACAGACTTACAGGGCCGCCTGCGGACGCTTTACGCCCA  
ATAATTCCGGATAACGCTTGCCACTCCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAATTAGCCGT  
GGCTTATTCTCAAGTACCGTCAGATCTTCTTCTTCTGAGAAAAGAGGTTTACAGCCCAGAGG  
CCTTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG

Sequências parciais do gene 16S rRNA de bactérias e arqueias dos reservatório da Pampulha, Volta Grande e de culturas.

**Pampulha**

>Band\_47

CCAGCTACGGACCCTTTAAGCCCAGTAAAAGCGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGC  
GGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCAGTTGTTTACTGCGGACAGCC  
AGCCTGTGCTGGCACTCGGGGTTTCCTTATCACGGTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCT  
GCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGCGGGGCGCGGC

>Band\_70

CACCTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACC  
AGTTGTTTACTGTTGGACAGCCCGCCTGTGCTGGCACTCGGGGTTTCCTTATCACGGTTGC  
CCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGG  
GCGCGGGGCGCGGCGGGC

>Band\_69

GTATTACCATCCCCGGCTGGCACCGGTCTTGCTTGGCCCTTTCTTCCGCTGCTTTACCCCGT  
AGGACAGCCGGCGTCTGCGGGCACTCGGGGTTTCCTTATCACGCGTTGCCCGCATTGTAAAG  
TTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGCGGGGCGC

>Band\_71

CTTTAAGCCCAGTAATAGCGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCC  
GGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCAGTTTTTTTACTGTTGGACAGCCCGCCTGTGCGGGCA  
CTCGGGGTTTCCTTATCACGGTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAG  
GGCGGGC

>Band\_50

GCTACGGACCCTTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGC  
GGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCAGTTTTTTACTGTTGGACAGCCCGAA  
TTTGCTGGCACTCGGGGTTCCCTTATCACGATTTCCCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCTGCTG  
CGCCCCGTAG

>Band\_45

CTACGGACGCTTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCG  
GCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTCCACCTGCTTTTTTACACAGATTAACAGCCCGAAT  
TTACGGGCACTCGGGGTTCCCTTATCACGATTTCTCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCTGCTGC  
GCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGCGGGGCGCCCCGCGGGC

>Band\_60

AACAATCCAGCTACGGACGCTTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTAT  
TACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTCCACCTGCTTTTTTACACAGATTA  
CAGCCCGAATTTACGGGCACTCGGGGTTCCCTTATCACGATTTCTCGCATTGTAAAGTTTTCG  
CGCCTGCTGCGCCCCGTAG

>Band\_63

GCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCT  
TCACCTGTTATTTAAACAGATGGACAGCCCGATTTTACGGGCACTCGGAGTTCCCTTATCAC  
GGTTTCCCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGG  
GACGGGCGCGGGGCGCGGCGGGC

>Band\_56

ACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCA  
CCAGTTGTTTACTGTTGGACAGCCACCTTTGGTGGCACTCGGGGTTTCCTTATCACGGTT  
GCCCGCATTGTAAAGTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGAC  
GGGCG

>Band\_49

GGGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTT  
TCTTCACCTGTGTTTTAAGCAGATGGACAGCCCGATTTAACGGGCACTCGGAGTTCCTTATC  
ACGGTTTTCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTA

>Band\_55

AACAAACCAGCTACGAACGCTTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTA  
TTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCTGTTATTTACACAGATGG  
ACAGCCCGATTTAACGGGCACTCGGAGTTCCTTATCACGGTTTTCCCGCATTGTAAAGTTTTC  
GCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGC

>Band\_48

CTACGAACGCTTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCG  
GCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCAGTTATTTACACTGATGGACAGCCCGATT  
TTACGGGCACTCGGAGTTCCTTATCACGGTTTTCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGC  
GCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGC

>Band\_51

TGAACGCCCATCGGTTGAGCCGGTGGATTTCCCAAGGGACTTAACAATCCAGCTACGGACGC  
TTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCG  
GTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCTGTTATTTACACAGATGGACAGCCCGATTTTACGGGCAC  
TCGGGGTTCCCTATCACGGTTTTCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGG  
GC

>Band\_53

CGGGCCGCTGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCACTTACCCAGCCCTTACTCTACTAGCT  
ATTTAAACTAGCAAACAGCATGCACTAAGTGCATGCACTTGAATCCCCCTGTCGCGCTTTC  
GCGCATTGCAAATTTTTTCGCGCGTGCTGCGCCCCGTAGGGGGGGGGGGGGCGGCGGGACGG  
GCGCGGGGCGC

>Band\_54

AGATTTACCGGGCCGGCTACGGACGCTTTAGACCCAATAATAACGATCACCCTCGGGCCGC  
TGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCACTTGGCCAGCCCTTACTCTACTAGCTATTTAGACT  
AGCAAACAGCATGCACTAAGTGCATGCACTTGAATCCCCCTGTCGCGCTTTCGCGCATTGC  
GAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGC

**Volta Grande**

>Band\_82

ACGGCCACAACCTCGAACCGCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTC  
TTCACCAGTTGTTTTAACTGATGGACAGCCCCCTGTGATGGCACTCGGAATTCCTTATCAAG  
CTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTCCCGCCTGCAGCGCCCCGTAGAGC

>Band\_87

TAGAGCATATCGCTCCGGATGTTAATCCCAGTAAACTGCTGACCACTCTAGCCGCCGGTA  
TTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGGCCTTTCTTCACCAGTTATTTACACTGATGG  
ACAGCCCGACTGTGCTGGCACTCGGGGTTTCCTTATCACGGTTTTCCCGCATTGTAAAGTTTTC  
GCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGC

>Band\_93

GGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTC  
TTCACCAGTTGTTTACACTGGCGGACAGCCAGCCTGTGCTGGCACTCGGGGTTCCCTTATCAC  
GGTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGG  
GACGGGCGC

>Band\_99

CGCCCCGTACGGCGGGCGGGGGTTTTAAACACAGGCGCGGGGGGGCGGCGGGCGAGCCCGC  
GTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCAGCTCTTTGCACTGA  
TGGACAGCCAGTATTGTCTGGCACTCGGGGTTTCCTTATCACGGTTGCCCGCATGGTAAAGT  
TTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGCGGCGGGACGGGCGC

>Band\_97

GGAGCTTTGCTCCTGTAAGAGGGCCGTAAGCAGCTCCGGTCGGCGGACGGTCTTGCCCGGCC  
CTTTCTTCACCTGTTATTTACACTGATGGACAGCCCGATTTTGCTGGCACTCGGGGTTCCCTT  
ATCACGGTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGGC  
GGCGGGAC

>Band\_92

AGCCGCGGTATTACCGCGGGCGGTGGGACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCTGTTATT  
TACACTGGTGGACAGCCCGCTTACTGGCACTCGGGGTTCCCTATCACGGTTGCCCGCAT  
TGTAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTA

>Band\_79

AGAGACTTATCCGGCCGGCTACAGACCCTTTAGACCCAATAATAACGGTTACCACTCGAGCC  
GCCGGTGTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTGCTATGCAATGCTTTTTAG  
GCATCACGACAGCCAGATTTGTAACCTGGCACTCGAGGTCCCCTTATCGCTG

>Band\_78

AAAGACTTAACAGACCAGCTACGAACGCTTTAAGCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGC  
CGCCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCTGTTATTTAA  
ACTGATGGACAGCCCGATTTTACGGGCACTCGGAGTTCCTTATCACGGTTTCCCGCATTGTA  
AAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTA

>Band\_81

CTTAACAGACCAGCTACGAACGCTTTAAGCTCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCGCCGG  
TATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTCACCTGTTATTTAAACAGAT  
GGACAGCCCGATTTTACGGGCACTCGGAGTTCCTTATCACGGTTTCCCGCATTGTAAGTTT  
TCGCGCCTGCTGCGC

### **Culturas**

>Band\_101

CGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTT  
CTTACCAGTGGTTTACTGATGGACAGCCGAATGTTCTGGCACTCGGGGTTTCCCTTATCA  
CGGTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAG

>Band\_102

GGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTT  
TTCACCAGTGGTTTACTGATGGACAGCCAGAATGTGCTGGCACTCGGGGTTTCCCTTATCAC  
GGTTGCCCGCATTGTAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTA

>Band\_107

GGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTT  
TTCACCAGTTTTTTACTGATGGACAGCCCGCATTGTCTGGCACTCGGGGTTTCCCTTATCAC  
GGTTTCCCGCATTGGAAAGTTTTTCCCGCCTGGTG

>Band\_136

AGCCGCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTACCAGTTGTT  
TACACTGGTGGACAGCCATCTGTGGTGGCACTCGGGGTTTCCCTTATCACGGTTGCCCGCAT  
GTAAAGTTTTCCCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGC

>Band\_238

CGGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTT  
CTTACCAGCTCTTTGCACTGATGGACAGCCCGTATTGTCTGGCACTCGGGGTTTCCCTTATCA  
CGGTTGCCCGCATGGTAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGG

>Band\_103

GGCCACCACTCGAGCCGCCGGTATTACCGCGGGCGGTGGCACCAGGTCTTGCCCGGCCCTTT  
TTCACCAGTTTTTTAAACCGATGGAAAGCCCGAATTTACAGGCAGTCAGAGTTGCCTTGTC  
CGGTTGCCCGCATTGAAAAGATTTCTCGCC

>Band\_109

AGACTTAACAAACCAGCTACGAACGCTTTAAGCCCAGTAATAGTGGCCACCACTCGAGCCG  
CCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTACCGGTTATTTAAAC  
CGATGGACAGCCGATTTAACGGGCACTCAGAGTTCCCTTGTCACGGTTTCCCGCATTGCAA  
AGTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAG

>Band\_106

GGCCACCACTCGAGCCGCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTC  
TCCAGCAGTGTTTTAAACTGGTGAACAGCCCGAATTTACGGGCACTCGGAGTTCCCTTGTC  
CGTTTTCCCGCATTGCAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAGG

>Band\_105

TAATAGCGGCCACCACTCGAGCCGCGGTGTTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGG  
CCCTTTCTCCACATGTGTTTTAAACTGGTGAACAGCCTACATTTGTGGCACTCGGGGTTGCC  
TTGTCACGGTTGCCCGCATTGGAGAGTTTTTTTCGCTGCTGCGCCCCGTAG

>Band\_134

CCGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTACCTGTTATTTA  
AACAGATGGACAGCCCGATTTACGGGCACTCGGAGTTCCCTTATCACGGTTTCCCGCATTG  
TAAAGTTTTTCGCGCCTGCTGCGCCCCGTAG

>Band\_129

CGCCGGTATTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTTCTTACCAGTTGTTTAC  
ACTGGTGGACAGCCACCATGTGTTGGCACTCGGGGTTCCCTTATCACGGTTGCCCGCATTGT  
AAAGTTTTCCCGCCTGCTGCGCCCCGTAGGGC

>Band\_144

TTACCGCGGCGGCTGGCACCGGTCTTGCCCGGCCCTTGCTAACCCCGCTTTTTAAGCGGTTG  
AACACACCCCTATATGAGGATCACTCGATGTTCCCTATCGCACTGCCTGCATTGTATATT  
TTCCCGCCTGCTGCCCCCCGTAG

>Band\_132

GAGTTAGCCGGTGCTTATTCATCTGGTACCGTCAAGTGACGAAGAATCGCCTTTTTTCGTCCC  
AGATAAAAGAAGTTTACAATCCAGAGGACCTTAATCCTTACGCGGCATGGCTGGTTCAGAC  
TTGCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCGCCCCGTAGGGCG

>Band\_140

ACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCATCTGGTACCGTCAAGTGACGAAGAATCGCCTTTTTTCGT  
CCCAGATAAAAGAAGTTTACAATCCAGAGGACCTTAATCCTTACGCGGCATGGCTGGTTCA  
GACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCGCCCCGTAGGGCG

>Band\_125

ACGAAGAATCGCCTTTTTTCGTCCCAGATAAAAGAAGTTTACAATCCAGAGGACCTTAATCC  
TTCACGCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCGCCCC  
GTAGGGC

>Band\_110

TTAGCCGGTGCTTATTCATCTGGTACCGTCAAGTGACTAAGAATAGCCTTTTTTCGTCCCAGA  
TAAAAGAAGTTTACAATCCAGAGGACCTTAATCCTTACGCGGCATGGCTGGTTCAGACTTG  
CGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCGCCCCGTAGGGCGGGCGGGGCGGCGGGA

>Band 206

CACGGAGTTAGCCGGTGCTTATTCATCTGGTACCGTCAAGTGACGAAGAATCGCCTTTTTTC  
GTCCCAGATAAAAGAAGTTTACAATCCAGAGGACCTTAATCCTTACGCGGCATGGCTGGTT  
CAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCGCCCCGTAG

>Band 200

GTTAGCCGGTGCTTATTCATCTGGTACCGTCAAGTGACGAAGAATCGCCTTTTTTCGTCCCAG  
ATAAAAGAAGTTTACAATCCAGAGGACCTTAATCCTTACGCGGCATGGCTGGTTCAGACTT  
GCGTCCATTGACCAATATTCCTTACTGCTGCGCCCCGTAG