

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre

**Dinâmica temporal das cianobactérias em um reservatório urbano
hipereutrófico: uma abordagem morfológica e molecular**

Naíla Barbosa da Costa

Belo Horizonte

2015

Naíla Barbosa da Costa

Dinâmica temporal das cianobactérias em um reservatório urbano hipereutrófico: uma abordagem morfológica e molecular

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Giani

Belo Horizonte

2015

“Água, *s.f.*

Da água é uma espécie de remanescente quem já incorreu

ou incorre em concha

Pessoas que ouvem com a boca no chão seus

rumores dormidos pertencem das águas

Se diz no início eram somente elas

Depois é que veio o murmúrio dos corgos pra dar

testemunho do nome de Deus”

Manoel de Barros (1916 – 2014)

“[...] Entendo bem o sotaque das águas

Dou respeito às coisas desimportantes

e aos seres desimportantes.

Prezo insetos mais que aviões [...]

Eu fui aparelhado para gostar de passarinhos

Tenho abundância de ser feliz por isso

Meu quintal é maior do que o mundo

Sou um apanhador de desperdícios”

O apanhador de desperdícios, Manoel de Barros

Agradecimentos

Agradeço à professora Alessandra Giani pela orientação deste projeto de mestrado e por ter me acompanhado desde 2010, ainda na iniciação científica, até aqui, sempre com paciência e dedicação.

Aos professores membros da banca por terem prontamente aceitado contribuir na etapa final da defesa da dissertação.

À equipe do Laboratório de Hidráulica do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG, em especial os professores Nilo Nascimento e Talita Silva e ao técnico Rodrigo Toscano pela colaboração no estudo do reservatório da Pampulha, desde a coleta até as análises de laboratório.

À professora Santuza Teixeira (Dept. de Bioquímica e Imunologia, UFMG), por ter disponibilizado o sequenciador e o computador com o programa para análises dos fragmentos intergênicos pelo ARISA. Ao MSc. Juliano Leal, técnico do Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) e à MSc. Camila Ornelas (Life Technologies) pela imprescindível ajuda para correr as amostras e posterior análise dos resultados.

À MSc. Marcele Laux pelas análises de bioinformática e ao professor José Miguel Ortega (Dept. de Bioquímica e Imunologia, UFMG) por nos orientar nesse processo.

Ao Pedro Lima e à Priscila Viana que fizeram as contagens e cálculo do biovolume das amostras de fitoplâncton do reservatório da Pampulha, enquanto alunos de iniciação científica do professor Cleber Figueredo, ao qual também deixo meu agradecimento por disponibilizar tais dados.

A toda a equipe do Laboratório de Ficologia, Alessandra, André, Arthur, Cleber, Daniel, Elenice, Fabiano, Gabriela, Gustavo, Marcele, Marcella, Priscila, Rodrigo, Simone, Valquíria, pelo apoio, paciência e pela convivência nestes últimos anos.

Aos professores e funcionários da pós-graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, sem os quais eu também não seria capaz de concluir o mestrado.

Aos meus amigos de graduação que permanecem presentes, aos amigos de Sete Lagoas que jamais serão esquecidos, aos novos amigos feitos em Belo Horizonte e aos novíssimos feitos durante o mestrado, meu especial agradecimento por terem me aturado nestes últimos dois anos de muito trabalho. Às meninas da Hi5, em especial, por me mostrarem um lado lindo de viver em BH.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo incondicional apoio e ao Johnn pela paciência eterna e revisão do texto.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de dois anos de mestrado. Ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento dos projetos do laboratório.

Sumário

Sumário	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Lista de abreviaturas e siglas	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS.....	17
ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO.....	21
OBJETIVOS	21
Capítulo 1: A dinâmica das cianobactérias no reservatório da Pampulha de 2010 a 2012.....	22
1.1 INTRODUÇÃO	22
1.2 METODOLOGIA	24
1.2.1 Coleta das amostras	24
1.2.2 Cálculo da resistência térmica da água.....	25
1.2.3 Identificação e quantificação da comunidade fitoplanctônica	26
1.2.4 Extração de DNA	26
1.2.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	26
1.2.6 Análise Automatizada do Espaçador Intergênico Ribossomal (ARISA).....	27
1.2.7 Análises estatísticas: PCA, NMDS, ANOSIM.....	27
1.3 RESULTADOS.....	28
1.3.1 Variáveis ambientais	28
1.3.2 Caracterização morfológica e molecular e a dinâmica de sucessão das cianobactérias.....	30
1.4 DISCUSSÃO	34
1.5 REFERÊNCIAS.....	40
Capítulo 2: Diversidade genética de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Nostocales, Cyanobacteria) em dois períodos de floração no reservatório da Pampulha.....	45
2.1 INTRODUÇÃO	45
2.2 METODOLOGIA	49
2.2.1 Coleta das amostras	49
2.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e <i>nested</i> -PCR.....	49
2.2.3 Clonagem e Análise de Restrição do DNA Amplificado.....	50
2.2.4 Processamento e análise das sequências de DNA	51
2.2.5 Sequenciamento de Nova Geração (Illumina) e análise das sequências	51
2.3 RESULTADOS.....	52
2.3.1 Genótipos detectados pela análise de restrição do DNA amplificado.....	52

2.3.2 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e mutações <i>indel</i> detectados por NGS.....	54
2.4 DISCUSSÃO	56
2.5 REFERÊNCIAS.....	59
CONCLUSÕES GERAIS	64
ANEXOS	65

Resumo

As cianobactérias se destacam dentro do fitoplâncton como um grupo de organismos favorecido por condições de eutrofização do sistema aquático. Devido à produção de toxinas por diversas espécies de cianobactérias, sua proliferação altera a qualidade dos recursos hídricos, frequentemente inviabilizando o uso ou consumo humano. Além disso, promove mudanças nas diversas interações ecológicas existentes dentro de um ecossistema aquático e, por isso, sua prevenção e controle são de extrema relevância.

O reservatório da Pampulha, conhecido como lagoa da Pampulha e localizado na cidade de Belo Horizonte (MG), é um pequeno reservatório urbano, que vem sofrendo um longo processo de eutrofização em função do recebimento contínuo de esgotos doméstico e industrial. O grande aporte de nutrientes no reservatório tem favorecido o aparecimento de florações de cianobactérias ao longo do ano, tornando necessários estudos que visem a acompanhar a dinâmica dessas comunidades.

Este trabalho teve por objetivo: (1) avaliar a dinâmica da comunidade de cianobactérias no reservatório da Pampulha ao longo de três anos, visando a detectar os fatores que favorecem as espécies dominantes e sua alternância e (2) estudar a diversidade intraespecífica de uma das espécies formadoras de floração, *Cylindrospermopsis raciborskii*, em dois períodos distintos, uma vez que a existência de variabilidade genética poderia favorecer sua dominância.

Para atender ao objetivo 1, foram feitas amostragens mensais no decorrer dos anos de 2010 a 2012 no reservatório da Pampulha, avaliando características físicas e químicas da água, bem como a comunidade de cianobactérias, por meio da abordagem morfológica e molecular. Foram feitas contagens das comunidades de todas as amostras utilizando a técnica de Utermöhl (1958) e, posteriormente, a Análise Automatizada do Espaçador Intergênico Ribossomal (ARISA) foi realizada para treze amostras mais representativas do período estudado. Ambas as abordagens detectaram três florações distintas em diferentes momentos: uma provocada por *C. raciborskii* (Nostocales) predominantemente no período chuvoso, outra provocada pelas Chroococcales *Microcystis aeruginosa* e *Sphaerocavum brasiliense* ao final do período seco e a floração de *Planktothrix isoethrix* (Oscillatoriales) no final de 2012, cujo aparecimento modificou o padrão de alternância entre Nostocales e Chroococcales no reservatório. O Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) e a Análise de Similaridade (ANOSIM) resultaram numa clara separação entre o período chuvoso e seco para as 36 amostras de fitoplâncton, sugerindo que as mudanças nos parâmetros ambientais entre as estações possam resultar em modificações na composição da comunidade de cianobactérias. A Análise dos Componentes Principais (PCA) revelou forte correlação entre a biomassa de *C. raciborskii* e o aumento da temperatura, resistência da água, concentração de nitrito e precipitação total. As espécies de Chroococcales, pelo contrário, parecem ser desfavorecidas em períodos de estratificação, enquanto a dominância de Oscillatoriales

apresentou correlação positiva com concentrações de fósforo total e amônia. A abordagem molecular por meio do ARISA permitiu maior robustez ao estudo, uma vez que se mostrou mais eficiente do que a análise microscópica na diferenciação de espécies proximamente relacionadas. A precisão e rapidez do ARISA são fatores que contribuem para sugerir esse método como uma boa opção para estudos de monitoramento ambiental.

A fim de atender ao objetivo 2, duas amostras de períodos de floração no reservatório foram escolhidas, na primeira *C. raciborskii* representava praticamente 100% do biovolume total e na segunda existia em codominância com Chroococcales. A variabilidade genética do espaçador transcrito intergênico (ITS), entre o 16S rRNA e o 23S rRNA, nas populações de *C. raciborskii* foi estudada por meio da análise de restrição do DNA amplificado e por meio do Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Ambas as abordagens demonstraram haver maior variabilidade no período da floração monoespecífica de *C. raciborskii*, sugerindo que a pressão por competição com outra espécie leve à redução da diversidade dentro da população. A existência dessa variabilidade é um forte indício de que ecotipos diferentes da espécie coexistam durante o período de floração e favoreçam sua persistência no ambiente. Mais polimorfismos no fragmento ITS 16S-23S foram encontrados por meio do NGS que por meio da análise de restrição do DNA amplificado, demonstrando a maior robustez do NGS e das análises de bioinformática que lhe prosseguiram. Estudos subsequentes serão feitos a fim de obter as proporções das variantes genotípicas encontradas em cada amostra de NGS e de avaliar a relação filogenética existente entre elas.

O presente trabalho contribuiu para o melhor entendimento da dinâmica das cianobactérias dominantes no reservatório da Pampulha, bem como de alguns fatores ecológicos (variáveis ambientais) e genéticos (variabilidade intraespecífica) que possam favorecer ou influenciar suas florações em diferentes condições. Além disso, este trabalho exemplifica a importância do uso de técnicas moleculares no estudo de comunidades naturais de microrganismos.

Palavras-chave: cianobactérias, *Cylindrospermopsis raciborskii*, diversidade, ITS 16S-23S rRNA, ARISA, NGS.

Abstract

Cyanobacteria are an important phytoplankton group that is favored in conditions of water eutrophication. Given their potential toxicity, blooms of cyanobacteria not only contaminate the water, but they also turn it unsuitable for human consumption. Additionally, their presence alters many ecological interactions in the aquatic ecosystem, thus making its prevention and control extremely relevant.

Pampulha reservoir, known as Pampulha lake, is a small urban reservoir located in Belo Horizonte city (MG, Brazil) that has undergone a long process of eutrophication due to the continuous input of industrial and domestic sewage. The high nutrient supply in the reservoir has favored the occurrence of cyanobacterial blooms along the year and for this reason studies on the dynamics of these communities become essential.

The objectives of this study were: (1) to evaluate the dynamics of the cyanobacterial community in the Pampulha reservoir during three years, aiming to detect factors influencing the proliferation of dominant species and their alternate occurrence and (2) to study the intraspecific diversity of the bloom forming species *Cylindrospermopsis raciborskii* in two different periods, since its genetic variability could favor its dominance.

In order to achieve objective 1, monthly samplings were performed from 2010 to 2012 in Pampulha reservoir, water physical and chemical characteristics were measured and the cyanobacterial community was accessed through morphological and molecular approaches. Microscopic identification and counting of all samples by the Utermöhl (1958) technique were performed and, additionally, the Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) was performed on thirteen most representative samples. Both approaches were able to detect three different blooms: one promoted by *C. raciborskii* (Nostocales) predominantly in the rainy season, another by the Chroococcales *Microcystis aeruginosa* and *Sphaerocavum brasiliense* at the end of the dry season and a bloom of *Planktothrix isoethrix* (Oscillatoriales) at the end of 2012, changing the alternating pattern between Nostocales and Chroococcales in the reservoir. The Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) and the Analysis of Similarity (ANOSIM) revealed a clear division between rainy and dry periods in the 36 phytoplankton samples, suggesting that changes in the environmental parameters between seasons may modify the cyanobacterial community composition. The Principal Component Analysis (PCA) showed strong correlation between *C. raciborskii* biomass and increased temperature, water resistance, nitrite concentration and total precipitation. The Chroococcales species, on the other side, were unsuccessful in periods of water stratification while the dominance of Oscillatoriales was positively correlated to total phosphorus and ammonia concentration. The molecular approach through ARISA allowed a more robust study of the cyanobacterial community, since it was more efficient than microscopy to differentiate close

related species. The rapidity and precision of ARISA suggest its use as a potential method for environmental monitoring studies.

Aiming to achieve objective 2, two samples of bloom periods in the reservoir were chosen: in the first *C. raciborskii* represented almost 100% of the total phytoplanktonic biomass and in the second it was codominant with Chroococcales. The genetic variability of the intergenic transcribed spacer (ITS) between the 16S rRNA and the 23S rRNA in *C. raciborskii* populations was studied through restriction analyses of the amplified DNA and Next Generation Sequencing (NGS) analysis. Both approaches revealed a larger variability during the monospecific bloom of *C. raciborskii*, suggesting that a selective pressure resulting from the interspecific competition leads to a reduced diversity within the population. The detection of intraspecific variability in nature is an evidence that different ecotypes of the species coexist during the bloom and may contribute to its stability in the environment. More polymorphisms in the ITS 16S-23S fragment were detected through NGS than through restriction analyses of the amplified DNA, revealing better accuracy of the NGS and the subsequent bioinformatics analyses. Further studies will be done aiming to detect the percentage of genetic variants present in each NGS sample and to evaluate the phylogenetic relationships between them.

The present work has contributed to a better understanding on the dynamics of the dominant cyanobacteria in Pampulha reservoir and on the ecological and genetic factors that can influence or favor their blooms under different conditions. This work also exemplifies the importance of the molecular approach while studying environmental microbial communities.

Key-words: cyanobacteria, *Cylindrospermopsis raciborskii*, diversity, ITS 16S-23S rRNA, ARISA, NGS.

Lista de abreviaturas e siglas

- A – adenina (base nitrogenada)
- ANOSIM – *Analysis of Similarity*
- ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*
- ARISA – *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*
- C – citosina (base nitrogenada)
- cm – centímetro(s)
- DESA – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- dNTP – *Deoxynucleotide triphosphate*
- EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
- ETAf – Estação de Tratamento de Águas Fluviais
- FLASH – *Fast Length Adjustment of SHort reads*
- g – grama(s)
- G – guanina (base nucleotídica)
- HaeIII – *Haemophilus aegyptius* estirpe III
- HCl – Cloreto de Hidrogênio
- ICB – Instituto de Ciências Biológicas
- INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
- ITS – *Internal Transcribed Spacer*
- ITS-L – *Internal Transcribed Spacer - Large*
- ITS-S – *Internal Transcribed Spacer - Small*
- K – Potássio
- KCl – Cloreto de Potássio
- LPS – Lipopolissacarídeo
- m – metro(s)
- mg – miligrama(s)
- min – minuto(s)
- mL – mililitro(s)
- mm – milímetro(s)
- mM – milimolar
- MG – Minas Gerais
- MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
- µm – micrômetro(s)
- µS – micro-Siemens (medida de condutividade)

NAGE – Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

nm – nanômetro(s)

NMDS – *Non-Metric Multidimensional Scaling*

ng – nanograma(s)

NGS – *Next Generation Sequencing*

pb – pares de base

PCA – *Principal Component Analysis*

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

R – adenina ou guanina (bases nucleotídicas)

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorfism*

RISA – *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*

RNA – *Ribonucleic Acid*

rRNA – *Ribosomal Ribonucleic Acid*

s – segundo(s)

S – Sul

T – timina (base nucleotídica)

tRNA – *Transporter Ribonucleic Acid*

tRNA^{Ile} – RNA transportador do aminoácido Isoleucina

tRNA^{Ala} – RNA transportador do aminoácido Alanina

TaqI – *Thermus aquaticus* estirpe I

TES – Tris/EDTA/Sacarose

TE – Tris/EDTA

U – unidade(s)

uf – unidades de fluorescência

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV – Ultra-violeta

W – Oeste

w/v – *weight/volume*

Y – citosina ou timina (bases nitrogenadas)

INTRODUÇÃO GERAL

O reservatório da Pampulha (Belo Horizonte, MG), conhecido como lagoa da Pampulha (19°55'09" S e 43°55'47" W), é um pequeno reservatório tropical, com área de aproximadamente 2,4 km² e profundidade média de 5 m. Foi criado a partir do represamento do ribeirão Pampulha, iniciado em 1936 pelo prefeito Otacílio Negrão de Lima, e inaugurado em 1943 pelo então prefeito de Belo Horizonte Juscelino Kubitschek. O objetivo inicial de sua construção foi prevenir inundações na região em contorno e contribuir com o abastecimento de água da cidade, além de fins de recreação (Resck et al., 2007; Friese et al., 2010). No entanto, a partir da década de 1970 começou a ser observado um forte processo de assoreamento e eutrofização das suas águas em decorrência da entrada contínua de esgotos doméstico e industrial (Giani et al., 1988; Pinto-Coelho, 1998). Como consequência, a proliferação excessiva de cianobactérias começou a ser registrada nas últimas duas décadas (Giani, 1994; Goodwin, 1997; Figueredo & Giani, 2001; Lopes, 2013).

O crescimento em massa das cianobactérias, fenômeno conhecido como floração, além de estar ligado ao aumento da eutrofização, é ainda favorecido por condições de tempo estáveis, com alta intensidade luminosa e temperaturas elevadas (Rapala et al., 1997), frequentemente encontradas em regiões tropicais. No reservatório da Pampulha, as florações de cianobactérias tornaram-se tão comuns que o mesmo perdeu, desde a década de 1970, sua função de abastecimento público, permanecendo somente como atrativo histórico, turístico e paisagístico, além de amenizador de inundações.

Em virtude da importância do reservatório da Pampulha para a cidade, medidas de intervenção para controle de qualidade da água já foram tomadas, como a construção de uma Estação de Tratamento de Águas Fluviais (ETA F Pampulha) em 2003, que trata a água de seus dois principais afluentes, além de trabalhos de desassoreamento em diferentes épocas. Entretanto, tais providências ainda não se mostraram suficientes para garantir a revitalização do reservatório e o controle das permanentes florações de cianobactérias (Coutinho, 2007; Lopes, 2013), que, por isso, são o objeto de estudo do presente trabalho.

As cianobactérias são organismos procariontes fotossintetizantes pertencentes ao filo monofilético Cyanobacteria, dentro do domínio Bacteria. Apesar de existirem outras bactérias fototróficas, as cianobactérias são os únicos procariontes que realizam fotossíntese oxigênica, tendo desempenhado importante papel na história evolutiva e geológica do planeta (Schirmer et al., 2013).

São elas também o principal componente de diversos ecossistemas aquáticos e terrestres, podendo ser encontradas em virtualmente todos os tipos de habitats (Janse et al., 2003). A flexibilidade em seu estilo de vida é sustentada por sua alta diversidade morfológica, com formas de vida unicelular ou filamentosa, ocorrendo individualmente ou agrupadas em colônias, e sua

autossuficiência em termos fisiológicos, capazes de realizar, além da fotossíntese, a fixação de nitrogênio, por exemplo (Larsson et al., 2011).

A presença de pigmentos fotossintéticos acessórios, como a ficocianina, é uma das características fisiológicas que permitem o sucesso evolutivo das cianobactérias no ambiente aquático. As ficocianinas são encontradas exclusivamente em cianobactérias (Bryant, 1982) e captam energia na faixa do vermelho no espectro de luz visível. O comprimento de onda da faixa do vermelho é capaz de penetrar até o fundo da coluna d'água, não se extinguindo em baixas profundidades (Paerl, 1988) e, dessa forma, as ficocianinas são importantes elementos da antena coletora de luz, que transporta energia da excitação luminosa ao centro de reação fotossintética (Glazer, 1989).

A capacidade de fixar nitrogênio atmosférico é outra vantagem competitiva das cianobactérias em ambientes com fontes limitadas desse elemento. A maioria das espécies fixadoras de nitrogênio molecular (N_2) apresenta células modificadas, chamadas heterócitos, que se diferem das células vegetativas por apresentarem paredes espessas, onde é criado um ambiente anóxico a fim de permitir o funcionamento das nitrogenases, enzimas responsáveis pela fixação biológica do N_2 e inativas na presença de oxigênio (Berman-Frank et al., 2003). Há registro de ambientes onde a fixação de nitrogênio promovida pelas cianobactérias seja responsável por mais da metade da entrada anual deste nutriente no corpo d'água (McCarthy, 1980).

A capacidade de modificar sua flutuabilidade graças à presença de vesículas de gás chamadas de aerótopos é mais uma vantagem observada em alguns gêneros de cianobactérias planctônicas. Graças ao balanço entre a produção de aerótopos e o acúmulo de carboidratos densos, produzidos por fotossíntese, algumas cianobactérias são capazes de migrar verticalmente na coluna d'água e, assim, garantir o acesso a nutrientes que costumam se acumular nas camadas mais profundas e, além disso, proteger-se contra condições de alta radiação na superfície (Walsby et al., 2006).

Florações de cianobactérias geram extensas alterações no ecossistema aquático, desde a diminuição na transparência da água até alterações na cadeia trófica. Muitas espécies de cianobactérias produzem toxinas, chamadas cianotoxinas, capazes de comprometer a saúde humana e dos animais que eventualmente entram em contato com a água contaminada (Roset et al., 2001). De acordo com Pearson (1990), as cianotoxinas podem ser divididas em três grandes categorias: as hepatotoxinas e neurotoxinas, produzidas por linhagens específicas de cianobactérias, e as dermatotoxinas, representadas pelos lipopolissacarídeos (LPS), que são produzidos por todas as cianobactérias, uma vez que compõem sua membrana celular (Rzymiski & Poniedziątek, 2012). Dado o potencial tóxico das cianobactérias e todas as alterações no equilíbrio ecossistêmico que sua

proliferação pode causar, torna-se importante o combate à eutrofização como medida de controle das florações.

Estudos de diversidade das comunidades de cianobactérias são importantes do ponto de vista da caracterização do ambiente a fim de alertar potenciais riscos de floração ou, quando isso já é uma realidade, atentar sobre a gravidade do impacto provocado pela eutrofização e levantar possíveis medidas de controle. Duas abordagens diferentes, porém complementares, podem ser utilizadas para acessar a diversidade das comunidades de cianobactérias: uma morfológica, baseada em características estruturais celulares observadas por microscopia e outra molecular, baseada em características genéticas variáveis para diferentes espécies dentro de um ou vários *loci*.

A diferenciação de espécies com base em critérios morfológicos é a prática mais tradicionalmente utilizada, contudo, não necessariamente reflete entidades evolutiva e ecologicamente coerentes, particularmente quando se trata de microrganismos (Nübel et al., 1999). A identificação com base em técnicas de microscopia óptica comum nem sempre é segura, porque nem todas as características taxonômicas são distinguíveis no microscópio óptico (Willame et al., 2006). Além disso, as características morfológicas e morfométricas das cianobactérias em geral refletem as condições fisiológicas de seu crescimento (Anagnostidis & Komárek, 1988), o que pode trazer dúvidas quanto à correta identificação.

Diante das limitações encontradas na caracterização morfológica das cianobactérias, torna-se necessário o emprego de técnicas que complementem essa abordagem para um melhor entendimento da sua diversidade e do seu papel na manutenção do ecossistema (Muyzer, 1999). Considerando a rápida mudança evolutiva dentro de linhagens de organismos com ciclo de vida curto, como as cianobactérias, estudos de biologia molecular são uma alternativa complementar aos estudos morfológicos. O uso de técnicas moleculares no estudo de comunidades de cianobactérias tem sido bem sucedido e tem se mostrado capaz de superar algumas das limitações da abordagem morfológica (Coman et al., 2011).

Para todos os níveis taxonômicos acima de espécie, a análise dos genes de codificação da pequena subunidade do RNA ribossomal (16S rRNA) mostrou bons resultados em estudos de classificação filogenética de cianobactérias (Wilmotte, 1994). Observa-se um grande avanço no entendimento das relações evolutivas entre micro-organismos desde o início da utilização do gene 16S rRNA em estudos filogenéticos, cujo pioneiro foi o microbiologista Carl Woese (Woese et al., 1990). Essa abordagem tornou-se tão amplamente utilizada que dados da sequência do gene 16S rRNA são incluídos como base para a definição taxonômica de grupos microbiológicos nos volumes mais atuais do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Boyer et al., 2001). O estudo do DNA 16S rRNA não é capaz, entretanto, de resolver plenamente relações intraespecíficas ou entre espécies do mesmo gênero (Fox, 1992).

Barry et al. (1991) estão entre os primeiros a propor a região intergênica ITS 16S-23S rRNA como alvo de métodos para identificação de eubactérias, argumentando que esse fragmento, estando sob mínima pressão seletiva, varia de maneira mais ampla que sequências dentro de genes com importância funcionais. Essa região intergênica separa as sequências dos genes das subunidades 16S e 23S do *operon* do rRNA e é sugerida como apropriada para níveis mais sutis de diferenciação entre espécies (Boyer et al., 2001). Por se tratar de uma região menos conservada no genoma, é, assim, mais provável de estarem localizadas nela alterações evolutivas recentes.

A região ITS 16S-23S rRNA de cianobactérias é variável tanto em composição quanto no comprimento dos pares de base, existindo três configurações até então registradas: sequências ITS com ambos os genes do tRNA^{Ile} e tRNA^{Ala}, com apenas o gene tRNA^{Ile}, ou sequências ITS sem a presença de regiões codificadoras de RNA transportadores (Iteman et al., 2000; Boyer et al., 2001). Devido à existência de múltiplas cópias dos genes codificadores do rRNA 16S e 23S no genoma das cianobactérias (Nichols et al., 1982), uma mesma espécie de cianobactéria pode conter mais de um tipo de ITS 16S-23S (Lu et al., 1997; Neilan et al., 1997; Iteman et al., 2000). Isto foi observado principalmente entre as espécies filamentosas heterocitadas (Iteman et al., 2000).

O uso da região ITS 16S-23S em estudos de filogenia e evolução molecular é uma poderosa ferramenta, apesar dos possíveis problemas decorridos da existência de suas múltiplas cópias não idênticas no mesmo genoma, como ressaltado por Boyer et al. (2001). Trabalhos recentes sobre biodiversidade de cianobactérias têm sido publicados utilizando-se a região ITS 16S-23S, seja para detecção de diferenças entre espécies com melhor precisão (Cai et al., 2010; Wood et al., 2011) seja em estudos de variações intraespecíficas (Briand et al., 2009; Bozarth et al., 2010, Melendrez et al. 2011).

Sendo o reservatório da Pampulha um ambiente altamente impactado, mas de importância histórica e turística, a caracterização da comunidade de cianobactérias no nível morfológico e molecular, somado ao estudo das espécies dominantes são passos importantes para identificação das potenciais causas do sucesso desses organismos no ambiente e posterior elaboração de medidas intervencionistas de controle ou combate das florações.

REFERÊNCIAS

- Anagnostidis K. & Komárek J. (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie*, **50-53**:327-472
- Barry T., Collieran G., Glennon M., Dunican L. K., Gannon F. (1991) The 16s / 23s Ribosomal Spacer Region as a target for DNA probes to identify Eubacteria. *PCR Met. App.*, **1**:51-56
- Berman-Frank I., Lundgren P., Falkowski P. (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.*, **154**:157-164
- 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. *Mol. Biol. Evol.*, **18**:1057-1069
- Bozarth C. S., Schwartz A. D., Shepardson J. W., Colwell F. S., Dreher T. W. (2010) Population turnover in a *Microcystis* bloom results in predominantly nontoxic variants late in the season. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**:5207-5213
- Briand E., Escoffier N., Straub C., Sabart M., Quiblier C., Humbert J.F. (2009) Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) population. *The ISME Journal*, **3**:419-429
- Bryant D. A. (1982) Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **128**:835-844
- Cai H., Wang K., Huang S., Jiao N., Chen F. (2010) Distinct patterns of picocyanobacterial communities in winter and summer in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**:2955–2960
- Coman C., Bica A., Druga B., Barbu-Tudoran L., Dragos N. (2011) Methodological constraints in the molecular biodiversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, **99**:271-281
- Coutinho W. (2007) 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. Dissertação de Mestrado - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 104 p.
- Figueredo C. C. & Giani A. (2001) Seasonal variation in the diversity and species richness of the phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, **445**:165-174
- Fox G. E., Wisotzkey J. D., Jurtshuk Jr. P. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**:166-170

- Friese K., Schmidt G., de Lena J. C., Nalini Jr. H. A., Zachmann D. W. (2010) Anthropogenic influence on the degradation of an urban lake – The Pampulha reservoir in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Limnologia*, **40**:14-125
- 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). *Cienc. Cult.*, **40**: 69-77
- Giani A. (1994) 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. pp. 151-154
- Glazer A. N. (1989) Light guides: direct energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.*, **264**:1-4
- Goodwin K. L. (1997) Dinâmica das populações de Cyanobacteria no Reservatório da Pampulha (MG) em duas escalas temporais (sazonais e diurna). Dissertação de mestrado. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Iteman I., Rippka R., Marsac N. T., Herdman M. (2000). Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA – 23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, **146**:1275-1286
- Janse I., Meima M., Kardinaal W. E. A., Janse I., Meima M., Kardinaal W. E. A., Zwart G. (2003) High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:6634-6643
- Larsson J., Nylander J. A., Bergman B. (2011) Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evol. Biol.*, **11**:187
- Lopes A. M. M. B. (2013) Composição da comunidade de cianobactérias e outros grupos microbianos em dois reservatórios tropicais. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 133 p.
- Lu W., Evans H. E., McColl M., Saunders, V. A. (1997) Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.*, **153**:141-149
- McCarthy J. J. (1980) Nitrogen. *In*: Morris, I. (ed.) The Physiological Ecology of Phytoplankton. Blackwell, Oxford. pp. 191-233
- Melendrez M. C., Lange R. K., Cohan F. M., Ward D. M. (2011) Influence of molecular resolution on sequence-based discovery of ecological diversity among *Synechococcus* populations in an alkaline siliceous hot spring microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**:1359-1367

- Muyzer G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**:317-322
- Neilan B. A., Stuart J. L., Goodman A. E., Cox P. T., Hawkins P. R. (1997) Specific amplification and restriction polymorphisms of the cyanobacterial rRNA operon spacer region. *Syst. Appl. Microbiol.*, **20**:612-621
- Nichols J. M., Foulds I. J., Crouch D. H., Carr N. G. (1982) The diversity of cyanobacterial genomes with respect to ribosomal RNA cistrons. *J. Gen. Microbiol.*, **128**:2739-2746
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Kühl M., Muyzer G. (1999) Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:422-430
- Paerl H. W. (1988) Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnol. Oceanogr.*, **33**:823-847
- Pearson M. J. (1990) Toxic blue- green algae. Report of the National Rivers Authority, Water Quality Series 2. UK. 127 p.
- 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 Biol.* **40**:159-173
- Rapala J., Sivonen K., Lyra C., Niemelä S. I. (1997) Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**:2206-2212
- Resck R. P., Neto J. F. B., Pinto-Coelho R. M. (2007) Nova batimetria e avaliação de parâmetros morfométricos da Lagoa da Pampulha (Belo Horizonte, Brasil). *Geografias* **3**:17-23
- Roset J., Aguayo S., Muñoz M. J. (2001) Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol.*, **18**:65-71
- Rzymiski P. & Poniedziałek B. (2012) Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (Cyanobacteria). *Post. Dermatol. Alergol.*, **29**:47-50
- Schirmer B. E., de Vos J. M., Antonelli A., Bagheri H. C. (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**:1791-1796
- Walsby A. E., Schanz F., Schmid M., Walsby A. E. (2006) The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytol.*, **169**:109-122
- Willame R., Boutte C., Grubisic S., Wilmotte A., Komárek J., Hoffmann L. (2006) Morphological and molecular characterization of planktonic Cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J. Phycol.*, **42**:1312-1332

- Wilmotte A. (1994) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, p. 1-25. *In* Bryant D. A. (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L. (1990) Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**:4576-4579
- Wood S. A, Kuhajek J. M., Winton, M., Phillips N. R. (2011) Species composition and cyanotoxin production in periphyton mats from three lakes of varying trophic status. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **79**:312-326

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho é composto de dois capítulos, ambos enfocando as cianobactérias do reservatório da Pampulha, mas com abordagens, hipóteses, objetivos e metodologia diferentes.

O primeiro capítulo apresenta o estudo da dinâmica da comunidade de cianobactérias no reservatório da Pampulha no triênio de 2010 a 2012 e levanta a hipótese de que as alterações sazonais na espécie dominante estão correlacionadas aos efeitos da alternância entre estação seca e chuvosa.

O segundo capítulo avalia a diversidade genética do fragmento ITS 16S-23S de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) em dois períodos de floração desta espécie no reservatório da Pampulha. Foi testada a hipótese de que existem diferentes variantes genotípicas de *C. raciborskii* durante os períodos de floração e de que a proporção desses genótipos de *C. raciborskii* muda conforme o período estudado.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a caracterização da diversidade de cianobactérias do reservatório da Pampulha no nível interespecífico, para toda a comunidade, e no nível intraespecífico, para uma das espécies formadoras de floração.

Os objetivos específicos são:

1- estudar a comunidade de cianobactérias do reservatório da Pampulha no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012, por meio de técnicas de microscopia (identificação e contagem) e molecular (ARISA);

2- detectar padrões de sucessão sazonal das espécies no reservatório e relacionar essas tendências a características físicas e químicas da água que sofreram variações dentro do período estudado;

3- comparar os resultados obtidos pelas abordagens molecular e morfológica escolhidas para caracterização da comunidade de cianobactérias;

4- avaliar a variabilidade genética de *Cylindrospermopsis raciborskii*, em amostras em que essa espécie apresentou floração, por meio de duas técnicas moleculares distintas: a análise de restrição do DNA amplificado e o sequenciamento de nova geração;

5- comparar a diversidade intraespecífica de *C. raciborskii* nos dois períodos estudados, caracterizados por uma proporção distinta da espécie, em relação à biomassa fitoplanctônica total;

6- comparar as duas abordagens escolhidas para detecção de variações intraespecíficas.

Os objetivos específicos 1 a 3 são contemplados no capítulo 1 enquanto o capítulo 2 engloba os objetivos 4 a 6.

Capítulo 1: A dinâmica das cianobactérias no reservatório da Pampulha de 2010 a 2012

1.1 INTRODUÇÃO

O reservatório da Pampulha é um pequeno reservatório urbano raso (2,4 km², 5 m de profundidade média e 16 m de profundidade máxima), que vem sofrendo processo de eutrofização de suas águas em decorrência da descarga contínua de esgotos doméstico e industrial, com consequente aparecimento de florações de cianobactérias ao longo do ano (Lopes, 2013).

O clima da região é marcado pela alternância entre uma estação chuvosa de temperaturas mais elevadas entre novembro e março e uma estação seca de temperaturas mais baixas, que predominam entre maio e julho (Pinto-Coelho, 1998). Conforme dados do INMET (Instituto de Meteorologia), na região de Belo Horizonte (MG), nos anos de 2010 a 2012, a temperatura máxima média na estação chuvosa foi de 28 °C e precipitação mensal média de 283 mm, já na estação seca a temperatura mínima média foi de 17 °C e precipitação mensal média de 45 mm.

Figueredo & Giani (2001), num estudo sobre variações sazonais na comunidade fitoplanctônica do reservatório da Pampulha no período de fevereiro de 1996 a janeiro de 1997, registraram florações de *Microcystis viridis* durante a estação seca, quando essa cianobactéria chegou a representar 93% da biomassa fitoplanctônica total, provocando uma drástica queda na riqueza de espécies do ambiente. Com o aumento das chuvas (outubro/novembro de 1997), sua densidade populacional diminuiu e a riqueza aumentou novamente. Até o final da década de 1990, as florações de cianobactérias obedeciam a uma periodicidade e eram registradas, sobretudo, no período da seca, sendo a chuva identificada como um agente de diluição da comunidade fitoplanctônica e promotor de maior diversidade (Figueredo & Giani, 2001).

Quase dez anos depois, entre outubro de 2009 e dezembro de 2010, Lopes (2013), estudando o mesmo ponto do reservatório da Pampulha, já observou a dominância permanente de cianobactérias ao longo do ano. A espécie *M. viridis*, observada em 1996-97 por Figueredo & Giani (2001), foi substituída por outras espécies, também da ordem Chroococcales, durante a floração no período da seca: *Sphaerocavum brasilense* e diferentes espécies de *Microcystis*. Na estação chuvosa, por sua vez, *Cylindrospermopsis raciborskii* apresentou os valores mais elevados de densidade populacionais dentro do fitoplâncton.

O gênero *Microcystis* inclui espécies, como *Microcystis aeruginosa*, que estão dentre as principais cianobactérias causadoras de florações tóxicas em ecossistemas eutrofizados ao redor do mundo (Humbert et al., 2013). O gênero se insere na ordem Chroococcales, que inclui cianobactérias de forma cocoide, não filamentosas, não heterocitadas e, consequentemente, sem a capacidade de fixar de nitrogênio, unicelulares ou formadoras de colônias organizadas de forma

regular e com caráter taxonômico (Komárek & Agnostidis, 1998). O gênero *Sphaerocavum* foi proposto por Azevedo & Sant'Anna (2003) para descrever espécies não tóxicas de Chroococcales, bastante semelhantes às *Microcystis*, encontradas em ambientes eutróficos no Brasil e no Uruguai. *S. brasiliense* se diferencia das espécies de *Microcystis* por possuir colônias ocas devido à divisão celular em dois planos, enquanto *Microcystis* apresenta colônias compactas e mais planos de divisão celular (Azevedo & Sant'Anna, 2003).

A outra espécie presente em altas densidades no reservatório da Pampulha, *C. raciborskii*, pertencente à ordem Nostocales, é também potencialmente tóxica e tem chamado atenção nas últimas décadas por sua capacidade invasora, especialmente em regiões temperadas, onde sua expansão é associada às mudanças climáticas globais (Sinha et al., 2012). Dentre as características de *C. raciborskii* que lhe conferem sucesso competitivo em diferentes tipos de ambientes destacam-se o controle da flutuabilidade devido à presença de aerótopos, tolerância ao sombreamento, elevada afinidade por fósforo e capacidade de estocá-lo, produção de heterócito, por meio do qual fixa nitrogênio, e de acinetos, formas de resistência e dispersão da espécie (Padisák, 1997).

Mudanças sazonais relacionadas à alternância entre a estação seca e chuvosa podem afetar a composição da comunidade de cianobactérias (Gomes et al., 2012) e isso parece acontecer também no reservatório da Pampulha (Figueredo & Giani, 2001; Lopes, 2013). Essas alterações ambientais podem gerar mudanças no estado fisiológico das células que se repercutem em modificações fenotípicas, dificultando a identificação por microscopia. Dessa forma, é aconselhado que estudos de diversidade de micro-organismos combinem a abordagem morfológica à molecular (Taton et al., 2003; Taton et al., 2006; Heath et al., 2010).

Estudos sobre diversidade molecular de micro-organismos em geral envolvem a sequência codificadora da subunidade pequena do RNA ribossomal (16S rRNA), uma sequência bem conservada no genoma de cianobactérias que tem se mostrado eficaz em estudos filogenéticos, sendo útil à classificação taxonômica até o nível de gênero (Willame et al., 2006). Já estudos englobando a sequência ITS 16S-23S são capazes de identificar diferenças inter e intraespecíficas, uma vez que esse fragmento corresponde a uma região intergênica não conservada, estando por isso mais sujeito a mudanças e apresentando variações tanto quanto à composição quanto ao comprimento (Boyer et al., 2001).

Fisher & Triplett (1999) propuseram um método de análise de diversidade baseado no ITS 16S-23S e sugeriram sua aplicação para comunidades bacterianas de ambientes aquáticos. A técnica, denominada ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), é uma versão automatizada do RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*). Os autores defendem o ARISA como uma técnica menos laboriosa e de melhor resolução que o RISA, exigindo menores quantidades do produto de PCR, menos tempo e cuidados para sua elaboração. Ambas as técnicas

se baseiam na existência de diferentes comprimentos do fragmento de ITS em espécies distintas, mesmo que proximamente relacionadas. Tanto no RISA quanto no ARISA, os produtos da amplificação da região ITS 16S-23S das espécies integrantes do ambiente são separados por tamanho e, dessa forma, a quantidade de fragmentos de diferentes comprimentos serve como estimativa de riqueza da comunidade. Porém, enquanto no RISA a separação dos fragmentos amplificados é feita por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com prata, o ARISA utiliza iniciadores marcados com fluorescência na reação de PCR, e a separação é feita por eletroforese capilar num equipamento de sequenciamento, capaz de detectar a fluorescência e o tamanho dos fragmentos (Fisher & Triplett, 1999).

Devido à sua praticidade e relativo baixo custo, o ARISA tem se tornado uma técnica cada vez mais difundida, sendo usado não só em trabalhos com ecossistemas aquáticos, como proposto por Fisher & Triplett (1999), mas também na caracterização de biofilmes microbianos (Wood et al., 2011; Al-Najjar et al., 2014), micro-organismos de solos de ambientes extremos (Wood et al., 2008; Van Dorst et al., 2014) ou mesmo da microbiota associada ao rúmen de animais (Jami et al., 2014; Saro et al., 2014).

Até o presente momento, existe apenas um trabalho sobre a diversidade molecular de cianobactérias no reservatório da Pampulha (Lopes, 2013), de duração de um ano. A autora baseou-se em análises do gene 16S rRNA, que foram incapazes, por exemplo, de distinguir claramente *S. brasiliense* das espécies de *Microcystis*. O presente trabalho propõe o estudo da comunidade de cianobactérias no reservatório da Pampulha ao longo de três anos (2010-2012), utilizando-se da identificação morfológica e contagem pela técnica de microscopia e do ARISA como técnica de biologia molecular para análise do ITS 16S-23S. É levantada a hipótese de que existem variações sazonais na composição de espécies de cianobactérias do reservatório e que estas se encontram correlacionadas a condições ambientais variáveis entre as estações seca e chuvosa, baseando-se na premissa de que a precipitação é um fenômeno que afeta sazonalmente a estrutura do ecossistema. Além disso, hipotetiza-se que o ARISA é um bom método para detecção dessas variações, uma vez que é capaz identificar diferenças entre espécies sejam elas distante ou proximamente relacionadas.

1.2 METODOLOGIA

1.2.1 Coleta das amostras

As coletas foram realizadas mensalmente, num período de três anos (de janeiro de 2010 a dezembro de 2012), no reservatório da Pampulha, localizado no município de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, Brasil. De janeiro de 2010 a setembro de 2012 as coletas foram feitas no ponto de coordenadas 19°51'26'' S 43°58'43'' W. A partir de agosto de 2012, por motivos logísticos, o ponto de coleta foi ligeiramente alterado, para as coordenadas 19°51'09'' S e

43°58'47'' W. Estudos anteriores provaram a equivalência da composição de espécies fitoplanctônicas e de fatores abióticos dos dois pontos utilizados no presente trabalho (Giani et al., 1988; Silva, 2014, *comunic. pess.*). Ambos os pontos representam bem as características limnológicas médias do reservatório, estando suficientemente afastados das margens, na região limnética, com uma profundidade máxima de aproximadamente 8 metros (Giani, 1994; Giani et al., 1988; Pinto-Coelho, 1998; Figueredo & Giani, 2001).

Foram medidos *in situ* os perfis de temperatura, condutividade, pH e oxigênio dissolvido, num intervalo de 0,5 em 0,5 m, por intermédio de uma sonda multi-parâmetros (YSI 556).

Com auxílio de uma garrafa de Van Dorn, foram coletadas amostras de água na profundidade do disco de Secchi, que corresponde a 10% da radiação incidente na superfície da água.

Uma sub-amostra da água coletada foi acondicionada em frascos de vidro de 100 mL e fixada com 1% de lugol para contagem e estimativa do biovolume das espécies que compõem a comunidade fitoplanctônica. Outra parte foi filtrada, com auxílio de uma bomba a vácuo, em filtros de fibra de vidro de poro 0,7 µm (GF1, Macherey - Nagel). Os filtros foram armazenados a -20 °C para posterior extração do DNA genômico. Filtros de fibra de vidro, em duplicata, foram também preparados para análise de clorofila-a, sendo mantidos na ausência de luz a -20°C. O filtrado foi recolhido para análise de nutrientes dissolvidos (nitrito, nitrato, amônia e fósforo solúvel reativo) e outra amostra de água não filtrada foi recolhida para análise de nutrientes totais (nitrogênio e fósforo totais). As concentrações de nutrientes dissolvidos e totais foram determinadas utilizando técnicas colorimétricas padrão (APHA, 1998). A concentração de clorofila-a foi determinada por medida em espectrofotômetro após extração em etanol 90% quente (Nusch, 1980).

Os dados físicos, químicos e biológicos (clorofila-a e fitoplâncton) foram fornecidos pelo banco de dados das equipes do Laboratório de Ficologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e do Laboratório de Hidráulica do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os dados meteorológicos de precipitação e temperatura do ar foram obtidos a partir da estação 83587 do INMET.

1.2.2 Cálculo da resistência térmica da água

O cálculo da resistência térmica da água, que é uma medida de estratificação da coluna d'água, foi feito considerando-se os valores de temperatura na superfície e no fundo. Estas medidas foram transformadas em valores de densidade da água e o cálculo da resistência térmica foi feito conforme a seguinte equação (Wetzel & Likens, 2000):

$$\text{Resist.} = ((\text{dens2} - \text{dens1}) \times 10^6) / 8$$

Onde:

Resist. = resistência térmica da água em g/cm^3

dens2 = densidade da água (g/cm^3) o fundo da coluna d'água

dens1 = densidade da água (g/cm^3) na superfície da coluna d'água

1.2.3 Identificação e quantificação da comunidade fitoplanctônica

A contagem do fitoplâncton foi realizada em um microscópio óptico invertido (Zeiss Axio Observer D1), segundo o método de Utermöhl (Utermöhl, 1958). O biovolume total de cada espécie foi calculado multiplicando-se o número de células contadas pelo volume celular médio de cada espécie, obtido utilizando-se modelos geométricos (Rott, 1981).

1.2.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído segundo o método descrito em Kurmayer et al. (2003), com algumas modificações. A lise celular foi promovida utilizando-se tampão TES (sacarose 25% w/v, Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, pH=8,0) e lisozima (50 mg/mL), em conjunto à proteinase K (10 mg/mL) para a degradação das proteínas celulares. Fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1v/v) e clorofórmio:álcool isoamil (24:1 v/v) foram utilizados para precipitar as proteínas e isolar o DNA junto à fase aquosa sobrenadante. O DNA foi precipitado em etanol 100% e 70% consecutivamente. Por fim, o DNA foi seco e ressuscitado em TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8,0). A quantificação do DNA genômico foi feita por espectrofotômetro de microvolume (Thermo Fisher Nanodrop 1000) a 260 nm e 280 nm, correspondentes ao comprimento de onda para leitura de DNA e proteínas, respectivamente, e cuja razão representa uma medida de qualidade do DNA extraído. A qualidade do DNA genômico foi também avaliada em gel de agarose 1% (w/v) corado em brometo de etídio.

1.2.5 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O conjunto de iniciadores CY-ARISA-F (5'-FAM- GYC AYR CCC GAA GTC RTT AC-3'; Wood et al., 2008) e 23S30R (5'-CTT CGC TCT GTG TGC CTA GGT-3'; Taton et al., 2003) foi utilizado para amplificação da sequência intergênica (ITS) localizada entre as regiões 16S e 23S do DNA ribossomal. Cada reação de PCR foi preparada para o volume final de 20 μL contendo as seguintes concentrações finais de cada reagente: tampão Standard Taq (New England Biolabs) (Tris-HCl 10mM, KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM), MgCl_2 (0,750 mM), Albumina de Soro Bovino (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), dNTP (0,25 mM), iniciador *forward* (150 nM), iniciador *reverse* (150 nM), Taq DNA polimerase (New England Biolabs) (0,025 U/ μL) e DNA genômico diluído (0,5 ng/ μL). As condições de amplificação no termociclador foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min e 35

ciclos de 94°C por 45 s (desnaturação), 57 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 1 min (extensão), após o último ciclo foi programada uma extensão de 7 min a 72 °C.

1.2.6 Análise Automatizada do Espaçador Intergênico Ribossomal (ARISA)

Os produtos de PCR foram diluídos em água ultrapura na proporção de 1:100 (para amplicons das culturas de cianobactérias) ou 1:50 (para amplicons de amostras ambientais) e, desta diluição, 1 µL foi usado para cada reação de ARISA, juntamente a 8,9 µL de formamida e 0,1 µL de LIZ600. As análises foram feitas no sequenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) do Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do ICB-UFMG.

As 13 amostras ambientais que melhor representaram as mudanças na comunidade de cianobactérias do reservatório ao longo do período estudado foram escolhidas para o ARISA. Elas foram nomeadas, nesta ordem, de Pamp1 até Pamp13: janeiro/2010, março/2010, junho/2010, setembro/2010, janeiro/2011, março/2011, junho/2011, setembro/2011, outubro/2011, fevereiro/2012, abril/2012, junho/2012, outubro/2012.

Para identificação das espécies por meio do perfil de ARISA comparativo, foram selecionadas cepas das espécies de cianobactérias mais abundantes no reservatório. As cepas utilizadas, todas pertencentes ao Banco de Algas e Cianobactérias do Laboratório de Ficologia (ICB-UFMG), são listadas na tabela abaixo.

Tabela 1. Cepas selecionadas para auxílio na identificação de espécies nos perfis de ARISA.

Cepa	Espécie	Local de isolamento	Data de isolamento
37	<i>C. raciborskii</i>	Lagoa Santa, MG	2003
181	<i>C. raciborskii</i>	Reservatório da Pampulha, MG	19/04/2013
26	<i>M. aeruginosa</i>	Reservatório de Furnas, MG	15/08/2006
177	<i>S. brasiliense</i>	Reservatório da Pampulha, MG	30/01/2012
P1	<i>P. isothrix</i>	Reservatório da Pampulha, MG	12/04/2013
P11	<i>A. platensis</i>	Reservatório da Pampulha, MG	19/04/2013

O programa GeneMapper (Applied Biosystems) foi utilizado para análise dos perfis de ARISA, com identificação do comprimento em pares de base e intensidade em unidades de fluorescência dos picos representando cada fragmento ITS 16S-23S rRNA.

1.2.7 Análises estatísticas: PCA, NMDS, ANOSIM

A fim de verificar as principais tendências entre variáveis ambientais e o fitoplâncton ao longo do período estudado, uma Análise dos Componentes Principais (PCA) foi feita a partir das variáveis abióticas e o biovolume das principais espécies presentes no reservatório. A análise de

PCA foi feita utilizando-se a função *prcomp* e os gráficos do pacote *ggplot2* (Wickham, 2009) no ambiente estatístico R (R Core Team, 2014).

Os picos obtidos nos perfis de ARISA, que indicam a presença de comprimentos do fragmento ITS distintos e, conseqüentemente, a presença de diferentes espécies, foram transformados em dados de presença e ausência. Foram considerados resíduos da análise os picos com intensidade inferior a 300 unidades de fluorescência e picos menores que 250 pb também foram desconsiderados por serem pequenos demais para representarem fragmentos ITS. Fragmentos que se diferenciaram por 2 pb de comprimento ou menos foram considerados picos da mesma espécie. Espécies que apresentam dois ou mais fragmentos ITS com comprimentos diferentes, como é o caso, por exemplo, de *C. raciborskii* (Iteman et al., 2000; Gugger et al., 2005), foram contabilizadas na matriz apenas pelo fragmento de menor comprimento (ITS-S). A matriz de presença e ausência dos fragmentos foi então utilizada para a análise de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) e a Análise de Similaridade (ANOSIM) das amostras. Os dados de biovolume dos três anos estudados foram também utilizados, em valores absolutos, para as mesmas análises. Para tal, foi incluído o biovolume de todas as espécies identificadas por microscopia óptica no período estudado. As espécies *Sphaerocavum brasiliense* e *Microcystis aeruginosa* foram representadas conjuntamente no biovolume, em virtude da dificuldade de diferenciá-las quando presentes em forma de células isoladas ou colônias jovens. As análises de NMDS e ANOSIM foram feitas utilizando-se o pacote VEGAN (Oksanen et al., 2013) no ambiente estatístico R (R Core Team, 2014).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Variáveis ambientais

Os valores de precipitação mensais e de temperatura (fig. 1) apontam para uma clara divisão entre duas estações ao longo do ano: uma estação chuvosa com temperaturas médias mais elevadas, de outubro a abril, e outra estação seca com temperaturas médias mais baixas, de maio a setembro. No período estudado, os meses de outubro/2011 e outubro/2012, que se caracterizam mais precisamente como um período de transição entre as duas estações, ainda apresentaram fortes características de seca devido à grande estiagem nos meses que lhes precederam e por isso foram incluídos como estação seca, ao contrário de outubro/2010, que já pode ser incluído como período chuvoso.

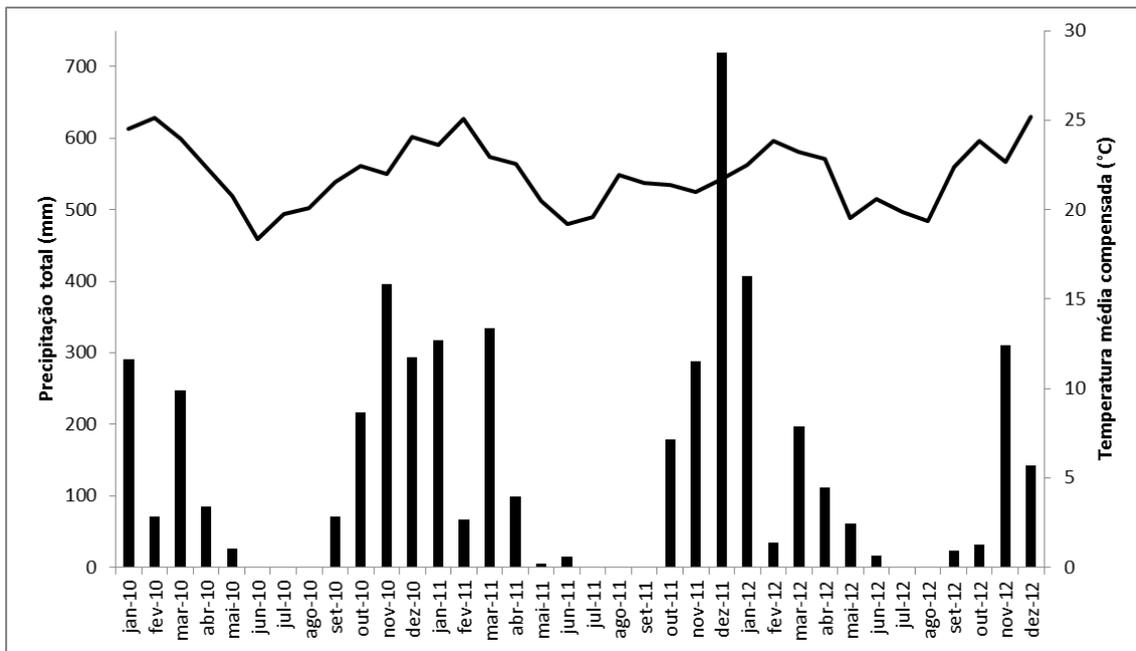


Figura 1. Precipitação total mensal (mm) e temperatura média compensada ao longo dos anos de 2010, 2011 e 2012, no município de Belo Horizonte (MG). Dados fornecidos pelo INMET.

A tabela 2 resume os parâmetros físicos e químicos dos treze pontos escolhidos para a análise de ARISA, divididos entre período chuvoso (jan/10 e mar/10; jan/11 e mar/11; fev/12 e abr/12) e seco (jun/10 e set/10; jun/11, set/11 e out/11; jun/12 e out/12). As diferenças significativas encontradas a partir desses dados para as variáveis que melhor descrevem as duas estações respaldam a escolha adequada dos pontos quanto aos parâmetros abióticos.

Tabela 2. Estatística descritiva e teste de Kruskal-Wallis dos principais parâmetros físicos e químicos medidos nas estações chuvosa e seca para amostras dentro do período de 2010 a 2012 no reservatório da Pampulha.

	Estação chuvosa		Estação seca		Estatística	
	Média	Erro padrão	Média	Erro padrão	Kruskal-Wallis χ^2	P-valor
Precipitação mensal (mm)	222,90	49,94	19,76	9,57	8,1858	0,004*
Temperatura do ar (°C)	23,62	0,26	20,92	0,67	5,8980	0,015*
Secchi (cm)	30	3,33	28,75	3,13	0,0224	0,88
pH	8,43	0,36	8,82	0,38	0,0333	0,85
Temperatura da água (°C)	26,63	0,35	21,79	0,40	8,3077	0,003*
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	222,33	13,65	339,40	11,05	7,5000	0,006*
OD (mg/L)	6,85	1,23	6,19	0,92	1,2000	0,27
Resistência (g/cm^3)	90,04	13,38	35,65	11,40	5,7692	0,01*
Fósforo solúvel ($\mu\text{g}/\text{L}$)	17,25	5,03	68,64	47,96	0,1654	0,68
Fósforo total ($\mu\text{g}/\text{L}$)	184,70	22,58	307,24	37,53	4,8235	0,028*
Amônia ($\mu\text{g}/\text{L}$)	1304,68	180,93	5463,58	927,52	8,1053	0,004*
Nitrito ($\mu\text{g}/\text{L}$)	26,36	7,24	5,96	1,15	5,6591	0,017*
Nitrato ($\mu\text{g}/\text{L}$)	162,17	39,28	188,45	163,02	2,9179	0,09

A figura 2 mostra o resultado da PCA para os parâmetros estudados, tendo o primeiro eixo a explicação de 57,57% da variação total e o segundo eixo 15,83%. É possível notar a clara separação entre os pontos das amostras de chuva e de seca, sendo o período de chuva correspondente aos valores de maior temperatura, maior resistência da água, concentração de nitrito e dominância de *C. raciborskii*. O período de seca corresponde à estação em que houve maiores concentrações de fósforo total e amônia, maior abundância de *P. isothrix* e *A. platensis* (Oscillatoriales) ou de *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* (Chroococcales) (fig. 2).

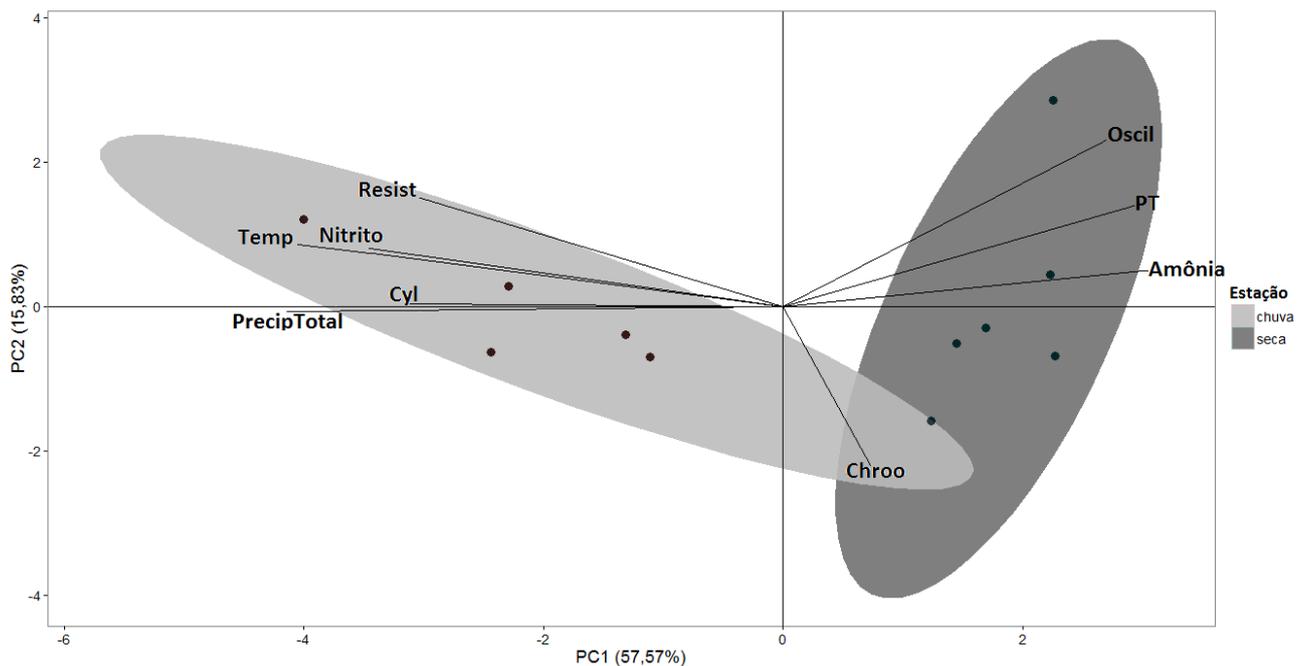


Figura 2. Disposição das variáveis e das amostras, divididas entre estação seca e chuvosa, nos dois principais eixos de variação do conjunto de dados estudado. O comprimento de cada reta é proporcional à contribuição da variável para a variação observada no eixo. Chroo = soma do biovolume de *M. aeruginosa* e *S. brasiliense*; Condu = condutividade; Cyl = biovolume de *C. raciborskii*; Oscil = soma dos biovolumes de *P. isothrix* e *A. platensis*, PT= Fósforo Total, PrecipTotal = precipitação total mensal, Temp = temperatura da água, Resist = resistência da água.

1.3.2 Caracterização morfológica e molecular e a dinâmica de sucessão das cianobactérias

Os gráficos 3A, 3B e 3C mostram a contribuição das principais espécies de cianobactérias ao biovolume total deste filo ao longo dos anos de 2010, 2011 e 2012, respectivamente. O resultado para presença destas espécies detectadas pelo ARISA nas treze amostras selecionadas (Pamp1-Pamp13) também pode ser observado no eixo secundário dos gráficos da figura 3. Para facilitar a comparação, os três gráficos encontram-se na mesma escala, sendo que no eixo secundário os

principais valores são 0 e 1, indicando respectivamente a ausência ou presença do pico correspondente à espécie em questão. A tabela abaixo revela o comprimento do fragmento ITS utilizado para detecção de cada espécie na amostra ambiental por meio do ARISA.

Tabela 3. Espécies detectadas pelo ARISA e respectivos comprimentos dos picos utilizados para sua identificação.

Espécie identificada pelo ARISA	Comprimento ITS 16S-23S
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	376 pb ± 2
<i>Arthrospira platensis</i>	491 pb ± 2
<i>Planktothrix isothrix</i>	502 pb ± 2
ARISA-pico-N-id1	513 pb ± 2
<i>Microcystis aeruginosa</i>	524 pb ± 2
<i>Sphaerocavum brasiliense</i>	527 pb ± 2
ARISA-pico-N-id2	591 pb ± 2

É possível observar uma alternância das cianobactérias dominantes ao longo de cada ano, conforme as estações seca e chuvosa se alternam. Em 2010, houve floração de *C. raciborskii* no período chuvoso e de Chroococcales no final período seco, início das chuvas. Em 2011, a floração de *C. raciborskii* se repetiu no período chuvoso, havendo um aparecimento repentino das Chroococcales no mês de março e a volta da dominância completa por *C. raciborskii* em abril. Em 2011, as Chroococcales foram dominantes por um período mais longo durante a estação seca até o início das chuvas (junho a setembro), porém, o aparecimento de *P. isothrix* provocou alterações nos últimos meses do ano na tendência observada anteriormente. Houve um pico de *P. isothrix* no mês de outubro/2011, considerado como período de transição da estação seca para a chuvosa e, após esse evento, a floração de Chroococcales retornou em novembro, mês em que *C. raciborskii* já voltava a provocar florações em 2010. O ano de 2012 já não seguiu o mesmo padrão que os anteriores, revelando uma codominância entre *C. raciborskii* e Chroococcales, ambas com elevada biomassa principalmente no final do período chuvoso, e o reaparecimento de *P. isothrix* a partir de maio, no início da estação seca. De maio a julho de 2012 *P. isothrix* e *C. raciborskii* exibem codominância em setembro/2012, final da estação seca, as Chroococcales reaparecem, mas a partir de outubro *P. isothrix* torna-se expressivamente a espécie dominante no ambiente até o mês de dezembro/2012, já no período chuvoso.

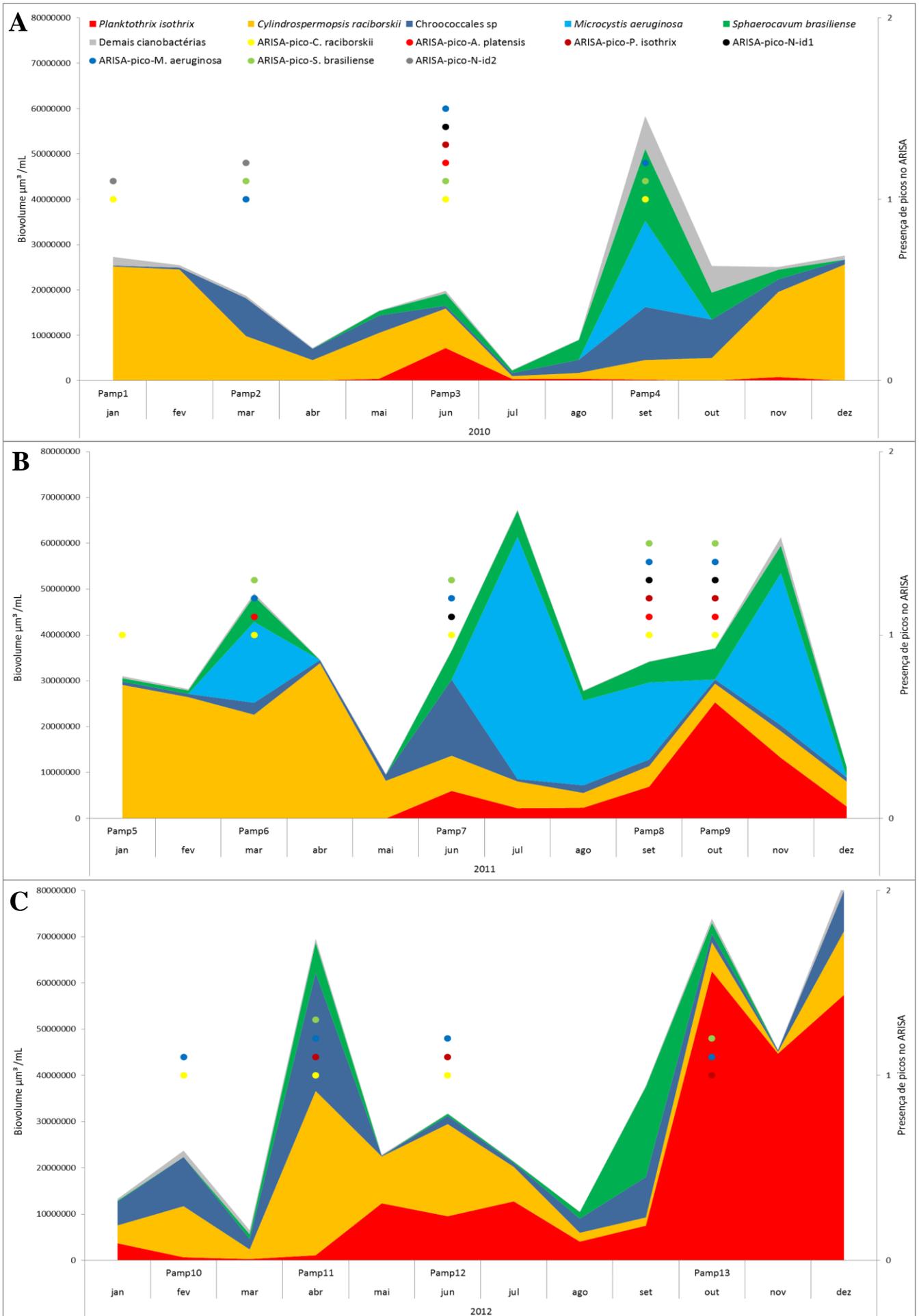


Figura 3. Eixo principal: biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$) das principais cianobactérias no reservatório da Pampulha ao longo dos anos de 2010 (A), 2011 (B) e 2012 (C). No eixo secundário, o valor 1 representa a presença de picos das espécies detectadas por ARISA nas amostras Pamp1-Pamp13. N-id1 e N-id2 representam picos de espécies não identificadas. Os gráficos foram construídos sem sobreposição e na mesma escala para melhor visualização.

O resultado da NMDS para os dados de contagem do fitoplâncton (fig. 4A) reforça a evidência de que as tendências observadas nos anos de 2010 e 2011 não se repetiram em 2012, uma vez que pode ser vista uma clara sobreposição dos pontos que representam os dois primeiros anos enquanto o ano de 2012 se destaca dos demais. Essa diferença na distribuição das espécies entre os três anos, contudo, não chegou a ser significativa conforme a análise de ANOSIM ($R = 0,076$; $P = 0,055$).

Quando se consideram as estações seca e chuvosa, a separação entre os dados de contagem (fig. 4B) é significativa segundo a ANOSIM ($R = 0,122$; $P = 0,016$). Essa separação reforça os resultados já observados para as variáveis ambientais, que também confirmaram a existência de diferenças significativas entre as estações. O fitoplâncton mostra-se, dessa forma, sensível às variações abióticas ocorridas durante a alternância de estações.

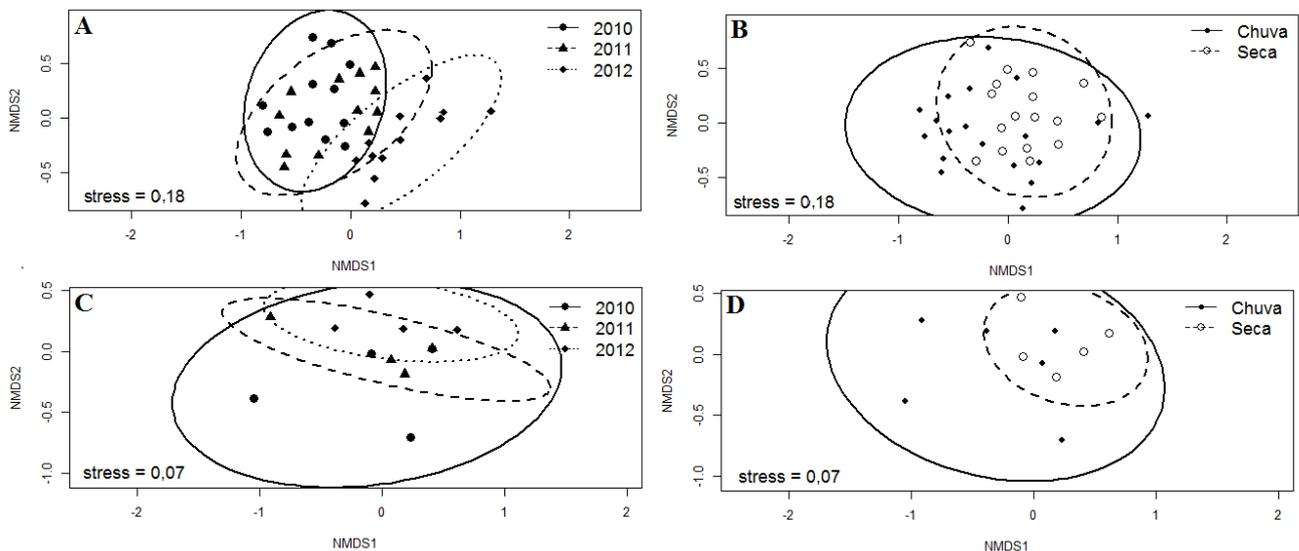


Figura 4. Distribuição em NMDS dos dados de contagem fitoplanctônica de todos os meses de 2010 a 2012 (gráficos A e B) e dos pontos analisados por ARISA (Pamp1-Pamp13) (gráficos C e D). As elipses circulam os dados considerando um intervalo de 95% de confiança dos grupos de amostras separados por ano (gráficos A e C) ou por estação (gráficos B e D).

As análises de ARISA confirmaram, nas 13 amostras selecionadas (Pamp1-Pamp13), o mesmo padrão de espécies dominantes observado na contagem por microscopia óptica (fig. 3),

mostrando-se uma técnica adequada ao estudo de comunidades de cianobactérias em ambientes eutróficos.

Quando separada por ano, a distribuição dos pontos na NMDS feita a partir da análise do ARISA (fig. 4C) exibe alguma similaridade com o observado nas contagens, porém, devido ao menor número de amostras e conseqüentemente um desvio padrão mais alto, a sobreposição entre os anos de 2010 e 2011 é menos evidente, bem como a separação do ano de 2012 com relação aos dois anteriores. A ANOSIM não gerou resultados significativos para separação entres esses anos ($R = 0,092$; $P = 0,174$), indicando que há mais variação dentro de cada ano do que entre eles. Possivelmente este resultado é reflexo da escolha proposital das amostras mais representativas de cada período de mudança da estação do ano. Por motivos logísticos, poucas amostras foram escolhidas e sendo elas bastantes distintas entre si mesmo dentro do mesmo ano, o resultado da análise estatística é menos robusto.

A separação entre as estações seca e chuvosa, apesar do baixo número de amostras, foi evidente para as amostras analisadas pelo ARISA tanto na distribuição dos pontos gerada pelo NMDS (fig. 4D) quanto pelo teste de ANOSIM ($R = 0,192$; $P = 0,046$). Este resultado comprova novamente a existência de uma resposta da comunidade de cianobactérias às alterações abióticas ocorridas durante a alternância de estações seca e chuvosa, no período de 2010 a 2012, no reservatório da Pampulha.

1.4 DISCUSSÃO

Alterações sazonais nos fatores abióticos que acompanham a mudança das estações, ainda que menos definidas em regiões tropicais, têm efeitos significativos sobre a comunidade biótica (Figueredo & Giani, 2001; Gomes et al., 2011; Lopes, 2013). Mesmo a temperatura, condição que não sofre muita oscilação nos ecossistemas tropicais quando comparada às regiões temperadas, sofreu variação significativa entre a estação chuvosa e seca no período estudado no reservatório da Pampulha (tabela 2). Ela foi um dos parâmetros que, conforme a PCA (fig. 2), apresentou correlação positiva com a dominância de *C. raciborskii* no reservatório durante a estação chuvosa dos anos de 2010 a 2012.

Além da temperatura e precipitação total, a resistência da água exibiu correlação positiva com a dominância de *C. raciborskii*. No período chuvoso, a turbulência provocada pelas precipitações constantes não foi suficiente para desestabilizar a coluna d'água, que permaneceu estratificada (tabela 2). A maior resistência da coluna d'água está associada às temperaturas mais elevadas observadas nessa época do ano e à maior estabilidade térmica (O'Reilly et al., 2003). Já no período seco, quando as temperaturas são mais baixas, a estabilidade é alterada e ocorre a mistura das águas do epilímnio e hipolímnio, que são, respectivamente, a camada mais superficial, de maior

temperatura, e a camada mais inferior, de temperatura mais baixa, em um corpo d'água quando estratificado.

Espécies capazes de controlar sua flutuabilidade são positivamente selecionadas durante o período de estratificação térmica, uma vez que são capazes de acessar o hipolímnio, região onde se concentra a maior quantidade de nutrientes em função da maior densidade da água (Wagner & Adrian, 2009). Todas as principais espécies que compõem a comunidade de cianobactérias do reservatório da Pampulha (fig. 3) são produtoras de aerótopos e, conseqüentemente, capazes de migrar na coluna d'água ao fazer um balanço entre a quantidade de aerótopos e carboidratos densos acumulados durante o dia por meio da fotossíntese (Walsby et al., 2006). Assim, teoricamente, tanto *C. raciborskii*, *P. isothrix* ou *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* poderiam provocar florações no período de estratificação térmica. Contudo, as chuvas também provocaram a diluição dos nutrientes dissolvidos na água e *C. raciborskii* demonstrou-se a espécie que melhor se adaptou a essas condições.

O fósforo total e amônia foram nutrientes que demonstraram queda significativa durante período chuvoso (tabela 2) e estudos anteriores provaram que *C. raciborskii* é capaz contornar esses efeitos ao estocar fósforo e utilizar amônia como forma de absorção de nitrogênio (Padisák, 1997). No período estudado, entretanto, o nitrito apresentou maiores concentrações durante a floração de *C. raciborskii*, correlacionando-se positivamente com o biovolume da espécie, e a concentração de nitrato, apesar de não ter sofrido variação entre as estações, esteve sempre alta (tabela 2). Dessa forma, havia nitrogênio inorgânico dissolvido em suas três formas (amônia, nitrito e nitrato), sendo o fósforo o nutriente limitante cuja diluição possivelmente favoreceu a floração de *C. raciborskii* no período chuvoso.

Bonilla et al. (2012), realizaram um amplo estudo comparativo da distribuição de *Planktothrix agardhii* e *C. raciborskii* em 940 amostras provindas de 28 lagos mesotróficos ou eutróficos, em diferentes regiões climáticas dos hemisférios norte e sul terrestres. Realizaram, ainda, experimentos laboratoriais avaliando as respostas fisiológicas e morfológicas de isolados das duas espécies a diferentes condições de temperatura e disponibilidade de luz. Os autores concluíram que *P. agardhii* destaca-se como melhor competidor em ambientes com maiores concentrações de fósforo total, o mesmo observado no presente trabalho para a espécie do mesmo gênero, *P. isothrix* (fig. 2). Ainda segundo Bonilla et al. (2012), *P. agardhii* sofre alterações abruptas de dominante (> 50% do biovolume total) para um componente raro no fitoplâncton (< 10% do biovolume total) e seu biovolume máximo supera o máximo observado nas florações de *C. raciborskii*, como foi percebido no presente trabalho para *P. isothrix*. No reservatório da Pampulha, antes do aparecimento da floração de *P. isothrix*, as espécies *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* eram as dominantes no período da seca e início das chuvas, sendo favorecidas pela mistura da coluna d'água

e alta disponibilidade de nutrientes e, no período chuvoso, *C. raciborskii* era favorecida pelas altas temperaturas e maior competitividade diante da diluição na concentração de fósforo total.

Apesar da forte correlação entre o biovolume de *P. isothrix* e as condições da estação seca detectada na PCA, apenas nos últimos meses do estudo, a partir de outubro/2012, essa espécie apresentou floração aparentemente estável. Antes disso, em outubro/2011, *P. isothrix* teve uma floração incipiente, que logo foi substituída pelas já dominantes Chroococcales, representadas principalmente por *M. aeruginosa* e *S. brasiliense*.

Reynolds et al. (2002), em uma ampla revisão da literatura, procurou classificar diferentes espécies fitoplanctônicas conforme sua preferência de habitat, tolerância e sensibilidade e incluiu no grupo denominado “M” os gêneros *Microcystis* e *Sphaerocavum*, considerados pelos autores como diferentes ecotipos do mesmo conjunto de espécies. O grupo M é formado por espécies coloniais tolerantes à alta radiação solar, típicas de pequenos lagos de baixa latitude, não estratificados e com elevada disponibilidade de fósforo e nitrogênio. As florações de *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* observadas no reservatório da Pampulha coincidem com o período de menor estratificação e maior disponibilidade de nutrientes, assim como previsto por Reynolds et al. (2002).

Os três principais gêneros encontrados no reservatório da Pampulha, correspondentes às cianobactérias filamentosas *Cylindrospermopsis* e *Planktothrix*, além das coloniais *Microcystis* e *Sphaerocavum*, estão entre os organismos formadores de floração mais bem sucedidos em ecossistemas rasos ao redor do mundo (Reynolds et al., 2002; Paerl et al., 2011; Tomioka et al., 2011; Bonilla et al., 2012).

Cylindrospermopsis (Nostocales), em especial *C. raciborskii*, vêm se tornando cada vez mais comum em florações de ambientes tropicais e também em lagos subtropicais e temperados (Briand et al., 2004; Bonilla et al., 2012). São produtoras de dois tipos importantes de toxinas, as cilindrospermopsinas e as saxitonas (Chorus & Bartram, 1999), e, por isso, sua expansão é motivo de alerta. São tolerantes ao sombreamento, capazes de sobreviver em baixas concentrações de nutrientes (Padisák, 1997; Reynolds et al., 2002) e favorecidas por condições de temperaturas elevadas (Mehnert et al., 2010).

Planktothrix (Oscillatoriales) inclui espécies resilientes, tolerantes ao sombreamento, produtoras de microcistina e saxitoxina, incapazes de fixar nitrogênio e estão entre as maiores formadoras de florações em lagos temperados, capazes de tolerar baixas temperaturas (abaixo de 15 °C) e baixas condições de luminosidade (Scheffer et al., 1997; Reynolds et al., 2002; Bonilla et al., 2012).

Microcystis (Chroococcales) é um dos principais gêneros causadores de florações tóxicas no mundo (Humbert et al., 2013). Inclui espécies não fixadoras de nitrogênio, produtoras de microcistina e formadoras de colônias que lhes conferem tolerância ao excesso de radiação solar

(Reynolds et al., 2002). Além do gênero *Microcystis*, no Brasil são registradas florações de *Sphaerocavum*, gênero aparentemente não tóxico ou pouco tóxico de Chroococcales, beneficiado das mesmas condições que *Microcystis*, sendo também formador de colônia e tolerante à alta insolação (Sant'Anna et al., 2004; Reynolds et al. 2002).

Todas as principais espécies formadoras de floração no reservatório da Pampulha puderam ser detectadas tanto pelo método de identificação microscópica quanto por meio do ARISA, que se utiliza da variação no comprimento do fragmento ITS 16S-23S rRNA para diferenciar espécies. Lopes (2013) não foi capaz de distinguir *S. brasiliense* de *M. aeruginosa* utilizando sequências do gene 16S rRNA, uma vez que as espécies são proximamente relacionadas e, até o momento, não existem depósitos no GenBank do NCBI de sequências 16S rRNA referentes a *S. brasiliense*. A separação dessas espécies pelo comprimento do fragmento ITS 16S-23S rRNA evidencia a eficácia do ARISA, método independente do sequenciamento e da posterior conferência da sequência por alinhamento num banco de dados que pode estar ainda incompleto para algumas espécies. Desde que existam cepas devidamente identificadas, pode-se utilizar seu DNA amplificado da região ITS 16S-23S rRNA para calibração do método e posterior identificação das espécies através da comparação do comprimento da sequência, uma vez que organismos da mesma espécie possuem fragmentos ITS de comprimentos idênticos (Jensen et al., 1993).

O ARISA, em determinadas amostras, foi mais eficaz que o método de microscopia para distinguir *S. brasiliense* de *M. aeruginosa*, uma vez que a diferenciação morfológica entre ambas nem sempre é fácil e requer que as colônias estejam intactas e preferencialmente em estágios tardios do desenvolvimento (Sant'Anna et al., 2004). Dessa forma, o ARISA é uma ferramenta potencial para detecção da gravidade de uma floração provocada por Chroococcales: se apenas *S. brasiliense* está presente, não há riscos de floração tóxica (Azevedo & Sant'Anna, 2003); ao contrário, diante da presença de espécies de *Microcystis*, maiores cuidados devem ser tomados e análises de detecção de toxinas são recomendadas, uma vez que a produção da microcistina pode apresentar variações mesmo dentro da mesma espécie ou cepa (Pimentel & Giani, 2014).

O ARISA também se demonstrou um método mais sensível para detecção de *Arthrospira platensis*, uma espécie morfológicamente semelhante à *P. isothrix*, mas que se diferencia por apresentar tricomas curvos, enquanto esta possui filamentos retos. Reynolds et al. (2002) classificaram os gêneros *Arthrospira* e *Planktothrix* em grupos próximos pela preferência de habitat e tolerância, ambos identificados como gêneros de ambientes não estratificados e capazes de tolerar condições de deficiência luminosa. De fato, *A. platensis* foi detectada pelo ARISA na maioria das amostras de 2010 e 2011 em que *P. isothrix* foi também identificada e em períodos de ausência de estratificação térmica. Em 2012, *P. isothrix* já aparece com maior biomassa, sem a presença concomitante de *A. platensis*, possivelmente por tê-la superado competitivamente.

A capacidade do ARISA de detectar com precisão organismos em menor proporção no biovolume na comunidade total reflete a elevada sensibilidade da PCR de identificar o DNA dessas espécies conjuntamente ao DNA daquelas mais abundantes. A análise, nesse caso, foi capaz de superar uma das “armadilhas” da reação da polimerase em cadeia, que é a amplificação diferencial do DNA (Wintzingerode et al., 1997). Ao mesmo tempo, o ARISA demonstra sua precisão ao ser capaz de discernir espécies proximamente relacionadas e com DNA em diferentes quantidades no produto de PCR, mesmo utilizando-se um volume muito pequeno desse produto. Essa característica do ARISA destaca-o como potencial método preventivo na detecção de futuras florações. A identificação de *M. aeruginosa* e *S. brasiliense* em junho/2010, de *C. raciborskii* em setembro/2010 e de *P. isothrix* em abril/2011 são exemplos de momentos em que as espécies estavam ainda em baixa densidade populacional até que, dentro de três, dois e seis meses, respectivamente, florações foram observadas. Num ambiente continuamente acompanhado em que é possível também detectar e conter as causas das florações, o ARISA funcionaria como um bom método de monitoramento, sendo mais rápido e sensível que a análise de microscopia, além de permitir a análise de várias amostras ao mesmo tempo e ter elevada reprodutibilidade (Fisher & Triplett, 1999).

Comparando-se com o observado na contagem, o ARISA apresentou pequenas falhas na detecção de espécies em três amostras: março/2010, em que o pico de *C. raciborskii* apresentou intensidade de apenas 219 unidades de fluorescência (uf), estando, assim, abaixo do limiar considerado para análise (300 uf); junho/2011, quando o pico de *P. isothrix* apresentou intensidade de 259 uf; outubro/2012, quando o pico de *C. raciborskii* teve intensidade abaixo de 150 uf. Nas primeiras amostras (março/2010 e junho/2011), o problema pode estar associado a excesso de ruídos durante a corrida da amostra, que podem ter atrapalhado a leitura correta da intensidade do pico, levando a uma subestimativa (Fisher & Triplett, 1999). Na amostra de outubro/2012, o erro pode ter ocorrido durante a PCR, já que a proporção de *P. isothrix* era muito maior que a de *C. raciborskii* e falhas de amplificação preferencial podem ocorrer nesse caso (Wintzingerode et al., 1997). Apesar disso, o ARISA ainda pode ser considerado um bom método para monitoramento de comunidades de cianobactérias, pois, mesmo havendo falhas, elas não se repetiram nas amostras subsequentes, podendo ser um problema mais associado à qualidade e estado de conservação da amostra do que ao método em si (Wintzingerode et al., 1997).

O ARISA permitiu a detecção de tendências sazonais pela análise de NMDS (fig. 4D, $R = 0,192$; $P = 0,046$ ANOSIM), ainda que menos evidentes do que a NMDS a partir das contagens por microscopia (fig. 4B, $R = 0,122$; $P = 0,016$ ANOSIM), que dispôs de um número maior de amostras. As diferenças abióticas entre período chuvoso e seco refletiram-se em diferenças na comunidade de cianobactérias, as quais, apesar de provocarem florações permanentes no reservatório da Pampulha, alternam-se em termos de composição e abundância relativa conforme as

diferentes capacidades adaptativas das espécies discutidas anteriormente e revisadas por Reynolds et al. (2002).

As tendências encontradas na alteração da comunidade fitoplanctônica confirmam estudos anteriores feitos no reservatório da Pampulha. Figueredo & Giani (2001) observaram maior concentração de fósforo solúvel ao final da estação seca, período que coincidiu com a dominância de Chroococcales, que provocou a única floração observada ao longo do ano de 1996. Lopes (2013) já registrou dominância de *C. raciborskii* na estação chuvosa do final do ano de 2009 e início de 2010, quando as maiores temperaturas foram observadas, havendo estratificação da coluna d'água. No final do período seco, em setembro e outubro de 2010, as Chroococcales foram mais abundantes e provocaram florações que se correlacionaram fortemente com a concentração total de fósforo. O que este estudo traz de novo, além da detecção de *S. brasiliense* pelo método de biologia molecular, é o registro do aparecimento de *P. isothrix* e das suas florações em 2011 e no ano seguinte. Em junho/2010, assim como registrado por Lopes (2013), houve apenas um aparecimento isolado da espécie, detectado tanto por microscopia quanto pelo ARISA no presente trabalho. Em 2011, a espécie reapareceu no mesmo mês e permaneceu com baixa abundância relativa até outubro, quando representava mais de 50% do biovolume total de cianobactérias, mas voltando a baixos valores relativos nos próximos meses. Já em 2012, *P. isothrix* foi registrada em todos os meses, especialmente de outubro a dezembro, quando provocou uma floração mais intensa que a de *C. raciborskii* no mesmo período (novembro e dezembro) em 2010 ou que a floração atípica de Chroococcales em novembro/2011.

A dominância de *P. isothrix* parece causar, a partir do final de 2012, uma mudança no padrão de alternância na composição da comunidade de cianobactérias já evidenciado por Lopes (2013), de *C. raciborskii* no período chuvoso e Chroococcales no final da seca. Contudo, uma vez que apenas ao final do período estudado a espécie começou a formar florações permanentes, não se pode afirmar que a composição de espécies do ano de 2012 se distingue estatisticamente daquela observada nos anos anteriores nem considerando os dados de contagem (fig. 4A; $R = 0,076$; $P = 0,055$ ANOSIM), tampouco os perfis de ARISA (fig. 4C; $R = 0,092$; $P = 0,174$ ANOSIM).

Este trabalho permite concluir que, apesar de serem observadas florações de cianobactérias na lagoa da Pampulha ao longo de todo o ano, a composição da comunidade varia, sendo afetada pelas alterações sofridas pelos parâmetros abióticos, devido à mudança entre estação seca e chuvosa na região. Além disso, o ARISA se mostrou uma técnica sensível e eficaz para detecção dessas alterações sazonais na comunidade de cianobactérias, sendo sugerido como um potencial método de monitoramento das cianobactérias em ambientes aquáticos.

1.5 REFERÊNCIAS

- Al-Najjar M. A. A., Ramette A., Kühl M., Hamza W., Klatt J. M., Polerecky, L. (2014) Spatial patterns and links between microbial community composition and function in cyanobacterial mats. *Front. Microbiol.*, **5**:406
- APHA (American Public Health Association) (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association Publications, Washington DC.
- Azevedo M. T. P. & Sant'Anna C. L. (2003) *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algol. Stud.*, **109**:79-92
- Bonilla S., Aubriot L., Soares M. C. S., González-Piana M., Fabre A., Huszar V. L. M., Lüring M., Antoniades D., Padisák J., Kruk, C. (2012) What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.*, **79**:594-607
- 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. *Mol. Biol. Evol.*, **18**:1057-1069
- Briand J. F., Leboulanger C., Humbert J. F., Bernard C., Dufour P. (2004) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? *J. Phycol.*, **40**:231-238
- Chorus I. & Bartram J. (1999) Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. Chapman & Hall, London.
- Figueredo C. C. & Giani A. (2001) Seasonal variation in the diversity and species richness of the phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, **445**:165-174
- Fisher M. M. & Triplett E. W. (1999) Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:4630-4636
- 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). *Cienc. Cul.*, **40**:69-77.

- Giani A. (1994) 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. pp. 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. *Environ. Monit. Assess.*, **184**:4635-4645
- Gugger M., Molica R., Berre B., Bernard C., Humbert J., Dufour P. (2005) Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (Cyanobacteria) isolated from four Continents. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**:1097-110
- Heath M. W., Wood S. A., Ryan, K. G. (2010) Polyphasic assessment of fresh-water benthic mat-forming cyanobacteria isolated from New Zealand. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **73**:95-109
- Humbert J. F., Barbe V., Latifi A., Gugger M., Calteau A., Coursin T., Lajus A., Castelli V., Oztas S., Samson G., Longin C., Medigue C., de Marsac, N. T. (2013) A tribute to disorder in the genome of the bloom-forming freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *PLoS One*, **8**:e70747.
- Iteman I., Rippka R., Marsac N. T., Herdman M. (2000) Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA – 23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, **146**:1275-1286
- Jami E., Shterzer N., Mizrahi I. (2014) Evaluation of Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis for bacterial fingerprinting of rumen microbiome compared to pyrosequencing technology. *Pathogens*, **3**:109-120
- Jensen M. A., Webster J. A., Straus N. (1993) Rapid identification of bacteria on the basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 945-952
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1998) Cyanoprokaryota I. Teil Chroococcales. *In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H., Mollenhauer D. (Eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa. G. Fischer, Verlag Jena.*
- Kurmayer R., Christiansen G., Chorus, I. (2003) The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:787-795.

- Lopes A. M. M. B. (2013) Composição da comunidade de cianobactérias e outros grupos microbianos em dois reservatórios tropicais. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 133 p.
- Mehnert G., Leunert F., Cirés S., Jöhnk K. D., Rucker J., Nixdorf B., Wiedner C. (2010) Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *J. Plankton Res.*, **32**:1009-1021
- Nusch E. A. (1980). Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergeb. Limnol.*, **14**:14-36.
- Oksanen J. F., Blanchet G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., O'Hara R. B., Simpson G. L., Solymos P., Stevens M. H. H., Wagner H. (2013) Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- O'Reilly C. M., Alin S. R., Plisnier P. D., Cohen A. S., McKee B. A. (2003) Climate change decreases aquatic ecosystem productivity of Lake Tanganyika, Africa. *Nature*, **424**:766-768
- Padisák J. (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.*, **107**:563-593
- Paerl H. W., Hall N. S., Calandrino E. S. (2011) Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci. Total Environ.*, **409**:1739-1745
- Pimentel J. S. M. & Giani A. (2014) Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**:5836-5843
- 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 Biol.*, **40**:159-173.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reynolds C. S., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L., Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.*, **24**:417-428
- Rott E. (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.*, **43**:34-62
- Sant'Anna C. L., Azevedo M. T. D. P., Senna P. A. C., Komárek J., Komárková J. (2004) Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Rev. Bras. Bot.*, **27**:213-227

- Saro C., Ranilla M. J., Cifuentes A., Carro M. D. (2014) Technical note: comparison of Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, **92**:1083-1088
- Scheffer M., Rinaldi S., Mur L. R. (1994) On the dominance of filamentous blue-green algae in shallow lakes. *Ecology*, **78**:272-282
- Sinha R., Pearson L. A., Davis T. W., Burford M. A., Orr P. T., Neilan B. A. (2012) Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones e Is climate change responsible? *Water Research*, **46**:1408-1419
- Taton A., Grubisic S., Brambilla E., de Wit R., Wilmotte A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:5157-5169
- Taton A., Grubisic S., Ertz D., Hodgson D. A., Piccardi R., Biondi N., Tredici M. R., Mainini M., Losi D., Marinelli F., Wilmotte A. (2006). Polyphasic study of antarctic cyanobacterial strains. *J. Phycol.*, **42**:1257-1270
- Tomioka N., Imai A., Komatsu K. (2011) Effect of light availability on *Microcystis aeruginosa* blooms in shallow hypereutrophic Lake Kasumigaura. *J. Plankton Res.*, **33**:1263-1273
- Utermöhl H. (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, **9**:1-38
- Van Dorst J., Bissett A., Palmer A. S., Brown M., Snape I., Stark J. S., Raymond B., McKinlay J., Ji M., Winsley T., Ferrari B. C. (2014). Community fingerprinting in a sequencing world. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **89**:316-330
- Wagner C. & Adrian R. (2009) Cyanobacteria dominance: quantifying the effects of climate change. *Limnol. Oceanogr.*, **54**:2460-2468
- Walsby A. E., Schanz F., Schmid M., Walsby A. E. (2006) The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytol.*, **169**:109-122
- Wetzel R. G. & Likens G. E. (2000) *Limnological Analysis*. Springer Science, New York. 425 p.
- Wickham, H. (2009) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer, New York.

- Willame R., Boutte C., Grubisic S., Wilmotte A., Komárek J., Hoffmann L. (2006) Morphological and molecular characterization of planktonic Cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J. Phycol.*, **42**:1312-1332
- Wintzingerode F. V., Göbel U. B., Stackebrandt E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**:213-229
- Wood S. A., Rueckert A., Cowan D. A., Cary C. (2008) Sources of edaphic cyanobacterial diversity in the Dry Valleys of Eastern Antarctica. *The ISME Journal*, **2**:308-320
- Wood S. A., Kuhajek J. M., Winton, M., Phillips N. R. (2011). Species composition and cyanotoxin production in periphyton mats from three lakes of varying trophic status. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **79**:312-326

Capítulo 2: Diversidade genética de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) em dois períodos de floração no reservatório da Pampulha

2.1 INTRODUÇÃO

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya e Subba Raju é uma cianobactéria potencialmente tóxica que tem chamado atenção nas últimas décadas por sua capacidade como espécie invasora, especialmente em regiões temperadas, onde sua expansão vem sendo associada às mudanças climáticas globais, embora muitas incertezas ainda existam sobre o assunto (Sinha et al., 2012). Padisák (1997) realizou uma ampla revisão acerca da distribuição mundial de *C. raciborskii* e das características que lhe permitem o sucesso competitivo em diferentes tipos de ambientes. Dentre elas são citados o controle da flutuabilidade; a tolerância ao sombreamento; elevada afinidade pelo fósforo e capacidade de estocar este nutriente; afinidade ao amônio, utilizado como fonte de nitrogênio; capacidade de fixar N₂; resistência à predação pelo zooplâncton devido à sua impalatabilidade e toxicidade; e capacidade de produção de acinetos, formas de resistência e dispersão da espécie. Todas essas características são fatores que contribuem para a flexibilidade fisiológica de *C. raciborskii*, conferindo-lhe resistência a mudanças ambientais e permitindo que a espécie se destaque diante de competidores.

Bouvy et al. (2000), num estudo englobando 39 reservatórios no semi-árido da região nordeste do Brasil, registraram elevada biomassa de *Cylindrospermopsis* em 70% das amostras, representadas pelos reservatórios com as mais elevadas temperaturas e pH, além das menores concentrações de amônia. A raridade de outros grupos fitoplantônicos diante da dominância de *Cylindrospermopsis* é levantada pelos autores como a característica biológica mais significativa desses reservatórios.

Bittencourt-Oliveira et al. (2012), ao estudar a dinâmica sazonal das cianobactérias num reservatório eutrófico do semi-árido brasileiro, registrou dominância de *C. raciborskii* especialmente na estação seca, quando eram observadas temperaturas mais elevadas e maior estabilidade da coluna d'água. Os autores defendem que o sucesso ecológico da espécie esteja relacionado, dentre outros fatores, à sua capacidade de migração na coluna d'água, uma vez que a observaram tanto na superfície quanto em maiores profundidades ao longo do dia, especialmente durante o período de estratificação. Após a seca, a redução na biomassa de *C. raciborskii* tornou possível o aparecimento de outras espécies nesse reservatório, aumentando assim a riqueza do ambiente. Essa evidência indica o seu forte potencial competitivo e aponta para possíveis efeitos negativos da sua presença ao desenvolvimento de outras espécies.

Figueredo et al. (2007), num estudo experimental utilizando espécimes isolados da Lagoa Santa (Lagoa Santa, MG), uma lagoa natural, rasa e mesotrófica, defendem a hipótese de que a

dominância de *C. raciborskii* pode ser mais facilmente explicada pela existência de relações antagonistas diretas com os demais componentes do fitoplâncton. Efeitos inibitórios na atividade fotossintética de outras espécies foram observados quando cultivadas no exsudato de *C. raciborskii*, evidenciando seu potencial alelopático, possível mecanismo responsável pela manutenção das suas florações estáveis e permanentes na Lagoa Santa. Figueredo & Giani (2009) observaram que a dominância persistente de *C. raciborskii* na Lagoa Santa, já relatada por pelo menos quatro anos, não apresentou qualquer forte correlação com as variáveis físicas e químicas da água, medidas mensalmente durante um período de estudo de um ano.

Além do potencial invasor e da forte competitividade de *C. raciborskii* no ambiente, que conjuntamente aumentam a probabilidade de que florações da espécie sejam cada vez mais comuns, existe o risco de que florações tóxicas aconteçam. Dentre as toxinas produzidas por *C. raciborskii* destacam-se a cilindrospermopsina, ainda não encontrada nas Américas ou África (Saker et al., 2003), com linhagens produtoras isoladas na Austrália e Ásia (Saker et al., 1999), e a saxitoxina, sobre a qual existem menos registros, sendo o Brasil o único local onde se encontraram linhagens produtoras até o momento (Lagos et al., 1999; Bouvy et al., 2003; Costa et al., 2006).

Apesar da ausência de registros da produção de cilindrospermopsina em linhagens de *C. raciborskii* isoladas de ambientes no Brasil, Hoff-Risseti et al. (2013) evidenciaram, em cepas provindas de reservatórios brasileiros, não só a presença de genes envolvidos na síntese de saxitoxina, mas também parte do *cluster* responsável pela síntese de cilindrospermopsina. Segundo Hoff-Risseti et al. (2013), esses fragmentos de genes essenciais à produção de cilindrospermopsina podem ser remanescentes ou um ancestral intermediário de genes funcionais.

Mesmo existindo linhagens potencialmente tóxicas, nem sempre elas estão expressando os genes responsáveis pela síntese de toxinas no ambiente. A diferença no grau de expressão desses genes se dá no nível de cada cepa individual, não tendo sido detectada, até o momento, qualquer relação entre a síntese de toxinas e variações morfológicas ou filogenéticas (Chonudomkul et al., 2004; Stucken et al., 2008).

Sinha et al. (2014) realizaram um estudo comparativo do genoma de duas cepas australianas de *C. raciborskii*, sendo uma produtora de cilindrospermopsina e outra não. Uma vez que nenhum gene ou *cluster* gênico codificado em alguma região distal do genoma apresentou-se positivamente correlacionado à expressão da toxicidade, concluiu-se que o principal fator para essa característica é simplesmente a presença do *cluster* gênico da cilindrospermopsina. O fato de não haver mais diferenças genéticas significativas entre a cepa tóxica e a não tóxica descarta a hipótese de que elas tenham passado por processos evolutivos distintos. No entanto, diferenças adicionais entre as cepas foram encontradas e demonstraram estar associadas a genes de adaptação e resposta ao estresse, levando os autores a sugerir que a produção de cilindrospermopsina possa ter alguma relação com

esses processos fisiológicos. Os genomas estudados foram considerados diferentes ecotipos de *C. raciborskii*, isto é, organismos que apesar de provirem de ambientes geograficamente similares apresentam sutis diferenças, resultantes de pressões adaptativas distintas.

Estudos recentes têm observado a existência de populações de *C. raciborskii* em ambientes naturais compostas por diferentes variantes, cuja distinção pode ser detectada no nível genético (Wu et al., 2010). Piccini et al. (2011) propuseram que a variabilidade fenotípica e genética de *C. raciborskii* estaria associada à existência de diferentes ecotipos, selecionados de acordo com condições ambientais locais.

No presente trabalho, foi estudada a variabilidade de linhagens de *C. raciborskii* presentes no reservatório da Pampulha levando-se em conta a composição do fragmento ITS 16S-23S. Amostras de dois períodos distintos foram estudadas: um primeiro momento, em que *C. raciborskii* representava praticamente 100% da biomassa total, e um segundo, em que foi registrada codominância entre espécies de Chroococcales e *C. raciborskii*.

A primeira hipótese levantada é de que existiriam diferentes variantes genotípicas de *C. raciborskii* durante os períodos de floração no reservatório da Pampulha e a proporção desses genótipos estaria variando conforme o período estudado. A segunda hipótese a ser testada é de que, no período em que há codominância com outros grupos de cianobactérias, existiria um número menor de genótipos, dada a maior pressão seletiva quando há espécies competidoras no ambiente.

O estudo da diversidade genética de *C. raciborskii* no reservatório da Pampulha trará contribuições para o entendimento da dinâmica dessa espécie, que, por se tratar de uma espécie invasora potencialmente tóxica, pode trazer problemas de saúde pública. Poderá também contribuir com os estudos que visam a compreender melhor sua dinâmica evolutiva em nível de macrorregião, tendo em vista as características genéticas particulares desta espécie nos diversos continentes.

O fragmento ITS 16S-23S, que corresponde à sequência intergênica existente entre os genes do rRNA 16S e 23S, foi acessado neste trabalho por meio de duas técnicas diferentes: (1) análise de restrição do fragmento amplificado e posterior sequenciamento dos diferentes padrões de restrição detectados e (2) sequenciamento de nova geração, conhecido pela sigla em inglês NGS (*Next Generation Sequencing*). O fragmento ITS 16S-23S foi escolhido por representar uma região não conservada do genoma, sem caráter funcional e, por isso, mais sujeita a mudanças evolutivas recentes (Boyer et al., 2001).

A análise de restrição do DNA ribossomal amplificado é uma ferramenta comumente utilizada em estudos de diversidade baseados no polimorfismo do DNA (Deng et al., 2008). Clones contendo plasmídeos, cujos insertos são fragmentos amplificados da região gênica 16S rRNA dos organismos em estudo, têm o inserto reamplificado por PCR e esses amplicons são tratados com enzimas de restrição, sendo os fragmentos resultantes da digestão enzimática posteriormente

separados por eletroforese (Sklarz et al., 2009). Os perfis de restrição são então utilizados para agrupar elementos da comunidade em diferentes grupos genotípicos, que podem ainda ser utilizados no cálculo de índices de diversidade. Segundo Moyer et al. (1996) as variações na posição dos sítios de restrição para diferentes organismos tornam o método apropriado tanto para diferenciação da sequência do gene 16S rRNA quanto para reconstruções filogenéticas.

Neste trabalho, o mesmo método de análise de restrição do DNA amplificado foi utilizado, contudo, a sequência alvo não foi o DNA ribossomal 16S, mas sim a sequência intergênica entre esse gene e o DNA ribossomal 23S, uma vez que a sequência 16S é muito conservada para detecção de diferenças intraespecíficas (Fox et al., 1992). Scheldeman et al. (1999), buscando detectar diferenças entre linhagens de *Arthrospira* de quatro continentes, também utilizaram a técnica de análise de restrição do DNA amplificado da região ITS e, adicionalmente, analisaram a região gênica 16S do rRNA. Eles concluíram que somente é possível distinguir as variedades da espécie focando-se no fragmento ITS, sendo a região 16S rRNA marcadamente conservada.

O sequenciamento de nova geração tem se mostrado uma técnica promissora no estudo da diversidade de microrganismos em ambientes naturais, sem necessidade de isolamento ou cultivo, permitindo análises robustas ao utilizar amplicons de domínios variáveis no genoma (Bokulich et al., 2012). A tecnologia do sequenciamento de nova geração Illumina, utilizada neste estudo, baseia-se na técnica de *bridge* PCR, também conhecida por *cluster* PCR, na qual os iniciadores estão fixos em um substrato sólido de tal forma que os fragmentos resultantes da amplificação das moléculas do DNA permanecem imobilizados e agrupados. Após a geração dos agrupamentos (*clusters*), inicia-se a etapa do sequenciamento de arranjos cíclicos, que consiste na extensão por um único nucleotídeo marcado, seguida de captura de imagens e clivagem do terminador reversível e da marcação de fluorescência desse nucleotídeo, para posterior inserção de um novo, iniciando outro ciclo de extensão (Shendure & Ji, 2008). Os fragmentos amplificados por meio do NGS, chamados de *reads*, são gerados com comprimentos curtos pela abordagem Illumina e consequentemente precisam ser tratados com ferramentas de bioinformática para posterior análise dos dados.

Trabalhos recentes têm mostrado o potencial do uso do NGS em estudos de comunidades fitoplanctônicas tanto em ambiente marinho (Coelho et al., 2013) quanto em água doce (Eiler et al., 2013). Coelho et al. (2013) destacam como o advento das tecnologias de NGS têm revolucionado o campo da microbiologia e ficologia marinha, permitindo amplo estudo de alta qualidade das comunidades biológicas sem necessidade de isolamento e cultivo, superando a barreira imposta por organismos até hoje não cultiváveis. Eiler et al. (2013) sugerem a abordagem do NGS como uma importante ferramenta no monitoramento do fitoplâncton, já que o método permite o estudo simultâneo das cianobactérias e da maioria dos plastídeos dos eucariotos de forma reprodutível e eficiente.

As sequências ITS 16S-23S das populações de *C. raciborskii* do reservatório da Pampulha, amplificadas pela técnica de NGS do Illumina, foram alinhadas a uma sequência de referência da espécie e analisadas por métodos de bioinformática com o objetivo de encontrar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e mutações por inserção ou deleção (*indel*) de nucleotídeos, a fim de se obter uma medida da variabilidade genética dentro dessas populações naturais.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Coleta das amostras

Dois amostras do período estudado no capítulo 1 foram escolhidas para análises da diversidade de linhagens de *C. raciborskii* no reservatório da Pampulha: janeiro/2011 (P1) e abril/2012 (P3). Foram utilizados os mesmos procedimentos de coleta, contagem e identificação de espécies de cianobactérias e extração de DNA total citados no capítulo 1 (ver itens 1.2.1, 1.2.3 e 1.2.4).

2.2.2 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e *nested*-PCR

Para a reação de PCR foram selecionados iniciadores específicos para a espécie *C. raciborskii*. Como o interesse era detectar diferentes linhagens dentro da espécie, foi importante a seleção de iniciadores espécie-específicos que amplificassem regiões variáveis dentro do genoma. Para isso, utilizou-se o iniciador *forward* 62F (5'-CGA ACG GGA TGC TTA GGC ATC-3'; Wu et al., 2010) e o iniciador *reverse* 23S30R (5'-CTT CGC TCT GTG TGC CTA GGT-3'; Taton et al., 2003), que, em conjunto, amplificam a região 16S e ITS de *C. raciborskii*.

Cada reação de PCR foi preparada para o volume de 20 µL contendo as seguintes concentrações finais de cada reagente: tampão DreamTaq (Thermo Scientific), MgCl₂ (0,625 mM), Albumina de Soro Bovino (4 µg/µL), dNTP (0,25 mM), iniciador *forward* (250 nM), iniciador *reverse* (250 nM), DreamTaq DNA polimerase (Thermo Scientific) (0,025 U/µL) e DNA genômico diluído (0,5 ng/µL). As condições de amplificação no termociclador foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min e 30 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturação), 63 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 2 min (extensão), após o último ciclo, foi programada uma extensão de 5 min a 72 °C.

Uma vez que o iniciador específico para *C. raciborskii* anela-se numa região conservada para a espécie localizada no início do gene 16S do RNA ribossomal (Wu et al., 2010) e a região de interesse para estudo de diversidade intraespecífica é unicamente a sequência intergênica (ITS), foi realizada uma *nested*-PCR a partir do produto da primeira PCR. Utilizou-se o iniciador *forward* 322F (5'-TGT ACA CAC CGC CCG TC-3'; Iteman et al., 2000) e o mesmo iniciador *reverse* da primeira reação, 23S30R (Taton et al., 2003), ambos na mesma concentração que na reação anterior, bem como os demais reagentes. As condições de amplificação no termociclador foram:

desnaturação inicial a 95 °C por 5 min e 30 ciclos de 95°C por 30 s (desnaturação), 63 °C por 30 s (anelamento) e 72 °C por 2 min (extensão); após o último ciclo, foi programada uma extensão de 5 min a 72 °C.

2.2.3 Clonagem e Análise de Restrição do DNA Amplificado

Como a reação de amplificação dos fragmentos ITS gera dois produtos de tamanhos distintos (ITS-L e ITS-S), a banda correspondente ao ITS-L foi cortada após separação em gel de agarose 2% (w/v) e purificada com fenol e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). A escolha do fragmento ITS-L se deu em função de ele, por ser maior, apresentar mais informações genéticas e possivelmente mais pontos de mutação, além do fato de ser o fragmento mais estudado por também estar presente em outras espécies (Iteman et al., 2000).

Os produtos da *nested*-PCR foram ligados em vetores pJET 1.2/blunt (Thermo Scientific) e estes inseridos em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem TOP10 (Invitrogen), por meio da transformação por choque térmico. Apenas células contendo plasmídeos com o inserto são capazes de crescer no meio contendo antibiótico (ampicilina, 50 µg/mL), uma vez que o vetor contém o gene de resistência da ampicilina e o vetor não transformado contém um gene letal ativo, que é inativado no momento da ligação do inserto. Assim, células sem vetores não crescem no meio com antibiótico por não terem o gene de resistência, e células contendo vetores não ligados ao fragmento de interesse não crescem por terem um gene letal em atividade.

Células transformadas com vetores contendo inserto foram selecionadas para amplificação do inserto por PCR, utilizando-se os mesmos iniciadores que geraram o fragmento ITS-L. Os produtos de PCR eram tratados com enzimas de restrição e verificados em gel de agarose 2% (w/v). Neste trabalho foram usadas duas enzimas, *TaqI* e *BsuRI* (*HaeIII*) (Thermo Scientific), numa mistura contendo os 0.04 u/µL da enzima e o respectivo tampão de cada enzima: Buffer Tango 1X (33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio, 66 mM acetato de potássio, 0,1 mg/mL Albumina do Soro Bovino) e Buffer R 1X (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.10 mg/mL Albumina de Soro Bovino). Os clones com diferentes perfis de Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFPL), verificados nos géis de agarose, foram considerados genótipos diferentes e selecionados para posterior sequenciamento de Sanger (Macrogen Inc., Korea).

Para verificar a suficiência amostral dos clones selecionados para caracterização dos genótipos da população por RFLP, foram feitas curvas de rarefação e o cálculo do estimador de riqueza assintótico Chao 1, utilizando-se o programa EstimateS 9.0 (Colwell, 2013).

2.2.4 Processamento e análise das sequências de DNA

As sequências *forward* e *reverse* dos fragmentos ITS com diferentes perfis de RFLP foram reunidas em *contigs* utilizando os programas Gap4 e Pregap4 (Bonfield et al., 1995), as extremidades das sequências foram aparadas excluindo-se as pontas contendo bases de baixa qualidade de leitura. A sequência consenso resultante foi submetida ao BLAST no NCBI e as informações das sequências que produziram melhor pareamento foram anotadas.

As sequências consenso foram alinhadas pelo método de Clustal W no programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013) e uma árvore filogenética foi construída pelo princípio de máxima parcimônia, com 1000 replicações pelo método de reamostragem de *Bootstrapping*.

2.2.5 Sequenciamento de Nova Geração (Illumina) e análise das sequências

Os mesmos iniciadores 62F (Wu et al., 2010) e 23S30R (Taton et al., 2003) foram utilizados para produzir amostras de sequenciamento de nova geração (MiSeq, Illumina). A corrida foi do tipo *paired-end* 2 x 250 bp, com bibliotecas construídas com Nextera XT. A amostra P1 resultou em 120 mil *reads* e a P3 em 360 mil *reads*. As amostras foram tratadas com métodos de bioinformática para procura de variantes genotípicas dentro dos *reads* obtidos.

Antes de passarem por um processo de limpeza (*trimming*), os *reads*, que são originalmente gerados com comprimentos pequenos, foram tratados com o FLASH (*Fast Length Adjustment of SHort reads*) programa desenvolvido por Magoč & Salzberg (2011) que permite alongar *paired-end reads* por meio de sobreposição e fusão dos pares de *reads*.

Para excluir sequências de baixa qualidade, os *reads* produzidos foram filtrados utilizando-se o Trimmomatic (Bolger et al., 2014) e, posteriormente, alinhados contra um genoma de referência utilizando-se o Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012). Os *reads* resultantes tinham em média 325 pb na amostra P1 e 315 pb na amostra P3. A qualidade média por *read* para as duas amostras (P1 e P3), após a limpeza com o Trimmomatic, foi de $Q = 38$, na escala PHRED de pontuação, que varia de 0 a 41. O valor de PHRED está relacionado à probabilidade p de que a base correspondente esteja incorretamente identificada na sequência, conforme a seguinte equação: $p = 10^{-(Q/10)}$. Dessa forma, quanto maior o valor de PHRED (Q) menor o p e melhor a qualidade da sequência (Ewing & Green, 1998).

O genoma de referência escolhido corresponde ao único genoma completo da espécie depositado no banco de dados GenBank do NCBI, identificado como *Cylindrospemopsis raciborskii* CS-505 (taxonomy ID 533240). Para detecção das variantes genotípicas nas sequências já alinhadas contra o genoma de referência foi utilizado o programa MUMmer (Kurtz et al., 2004). O MUMmer foi o primeiro sistema criado capaz de realizar comparações de genomas em larga escala, então na versão 1.0 (Delcher et al. 1999). O programa tem sido utilizado para comparação

genômica em estudos de diversas áreas, como genética humana (Venter et al., 2001), parasitologia (Carlton et al., 2002) e microbiologia de alimentos (Zhao et al., 2013).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Genótipos detectados pela análise de restrição do DNA amplificado

A figura 1 apresenta as curvas de rarefação para os diferentes genótipos acumulados conforme clones eram amostrados e o DNA da sequência ITS clonada era tratado com enzima de restrição, detectando-se polimorfismos do tipo RFLP. Ao todo, 49 clones foram amostrados em janeiro/2011 e sete genótipos diferentes foram encontrados, enquanto na amostra de abril/2012 foram amostrados 38 clones e três genótipos diferentes detectados, sendo que estes estavam presentes também na primeira amostra. É possível afirmar que a suficiência amostral foi alcançada nos dois períodos estudados, pois o intervalo de confiança do estimador assintótico encontra-se, ao final das curvas, com o valor médio de riqueza estimada por aleatorização.

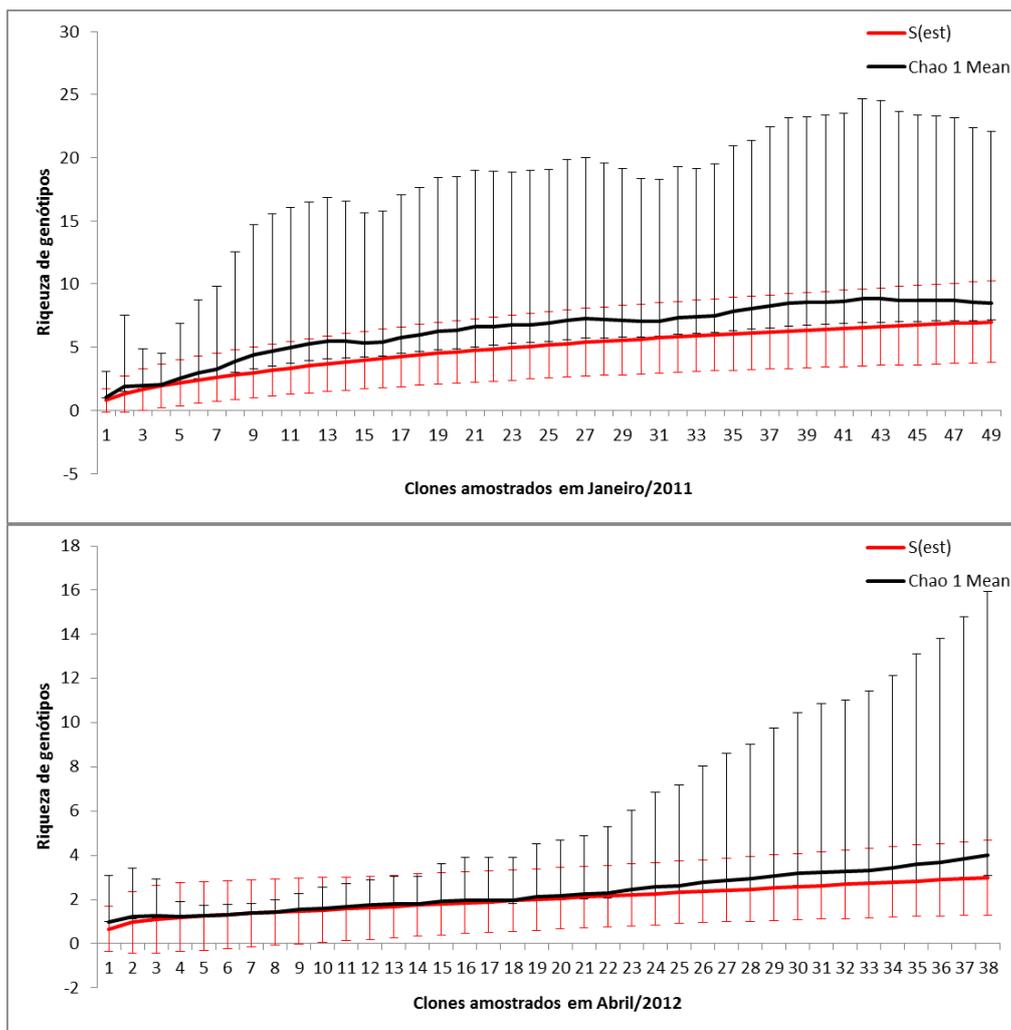


Figura 1. Curvas de rarefação dos diferentes genótipos obtidos pela análise de restrição do DNA amplificado. Em vermelho, a curva de rarefação estimada por reamostragem a partir dos dados de

riqueza e abundância final. Em preto, a curva dos valores do estimador de riqueza Chao1 para cada valor de riqueza estimada por aleatorização. As barras representam os intervalos de confiança.

Os diferentes genótipos, identificados de A a G, podem ser verificados na figura 2, que traz o perfil de RFLP de alguns dos clones amostrados. Nem todos os clones estudados estão na figura 2, apenas aqueles que primeiro foram amostrados e apresentaram diferentes padrões de RFLP. A amostra de abril/2012, por exemplo, apresentou três genótipos que já estavam presentes em janeiro/2011 e, por isso, há poucos clones identificados como provindos dela, embora 38 clones tenham sido amostrados no total. O genótipo com maior abundância (A) foi o mesmo em ambas as amostras de janeiro/2011 e abril/2012, sendo isso um forte indício de que esse seja o genótipo de *C. raciborskii* mais adaptado às condições do reservatório da Pampulha.

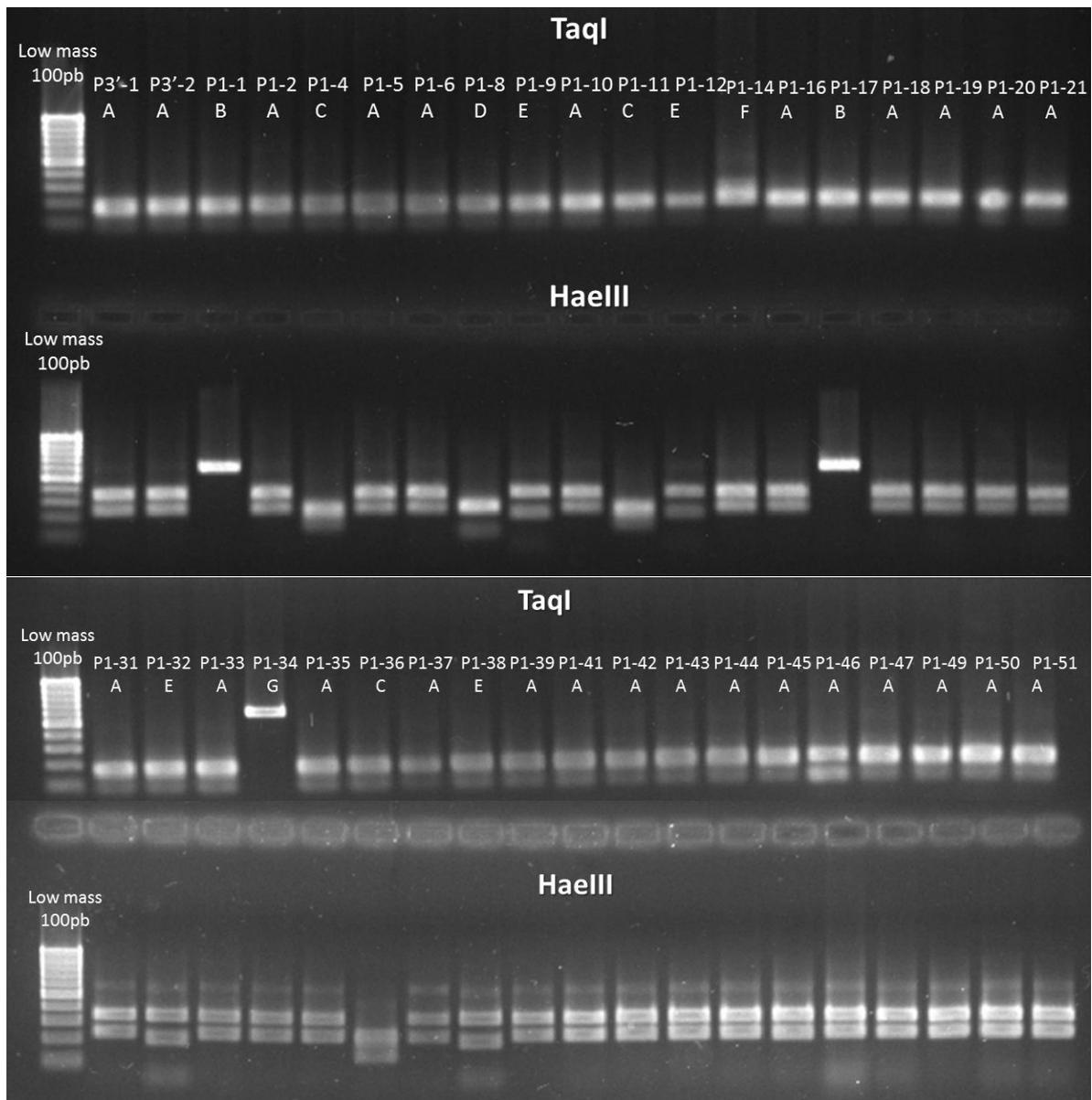


Figura 2. Perfis de comprimento do fragmento de restrição gerados nas amostras de janeiro/2011 (P1) e abril/2012 (P3). Diferentes genótipos estão representados por letras distintas, de A-G. As

canaletas superiores e inferiores apresentam as mesmas amostras, na mesma ordem, com os perfis de restrição para as enzimas *TaqI* (canaletas superiores) e *HaeIII* (canaletas inferiores). *Obs.:* apenas os primeiros clones amostrados que produziram diferentes genótipos estão aqui representados.

A figura 3 apresenta a árvore filogenética produzida a partir das sequências dos diferentes clones isolados das amostras de janeiro/2011 (P1) e abril/2012 (P3).

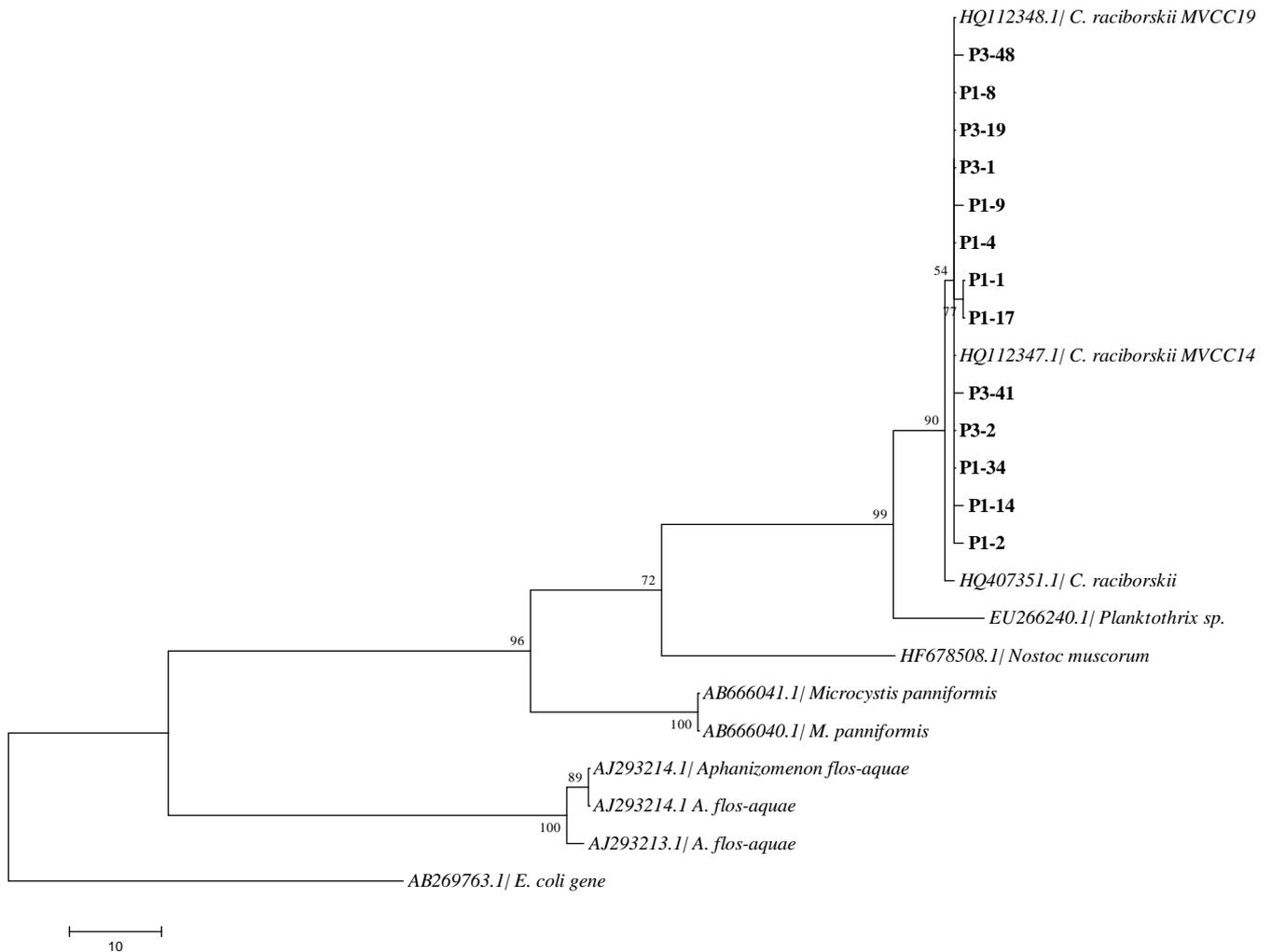


Figura 3. Árvore filogenética gerada a partir das sequências ITS que produziram diferentes padrões de comprimento do fragmento de restrição. Nos nós de cada clado, são mostrados os valores de *bootstrapping*, valores abaixo de 50% foram omitidos. As sequências geradas neste trabalho encontram-se em negrito e sequências retiradas do GenBank (NCBI) estão em itálico.

2.3.2 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) e mutações *indel* detectados por NGS

A tabela 1 mostra a relação dos SNPs e mutações por inserção ou deleção (*indel*) detectados nos *reads* produzidos pelo sequenciamento do ITS no Illumina, quando analisados contra o genoma de referência da *C. raciborskii* CS-505. Vale lembrar que o fragmento ITS-L encontra-se duplicado no genoma de *C. raciborskii* e, além disso, existe o ITS-S, que corresponde ao ITS-L com algumas deleções. Os fragmentos identificados na tabela 1 como ITS-L correspondem aos fragmentos com

as identificações taxonômicas do NCBI de NZ_ACYA01000056.1 e NZ_ACYA01000016.1. Ao contrário do ITS-S, esses dois fragmentos ITS-L são idênticos, por isso, não foram diferenciados na tabela. A sequência do GenBank do NCBI com identificação NZ_ACYA01000026.1 corresponde ao fragmento ITS-S.

Tabela 1. Mutações identificadas nos fragmentos ITS-L e ITS-S de *C. raciborskii* das amostras do reservatório da Pampulha de janeiro/2011 (P1) e abril/2012 (P3). A posição é identificada considerando o comprimento total da sequência do gene 16S rRNA mais o fragmento ITS, no sentido 5' → 3', que têm juntos cerca de 1800 pares de base.

Fragmento	Tipo de mutação	Posição da mutação	Amostra
ITS-L	Transição	1743	P3 somente
ITS-L	Transição	1706	P1 somente
ITS-L	Transversão	1418	P1 somente
ITS-L	Transição	1458	P1 e P3
ITS-L	Transversão	1459	P1 e P3
ITS-L	Transição	1463	P1 e P3
ITS-L	Transição	1498	P1 somente
ITS-L	Transversão	1513	P1 somente
ITS-L	<i>Indel</i>	1541	P1 somente
ITS-L	<i>Indel</i>	1542	P3 somente
ITS-L	Transição	1606	P3 somente
ITS-L	<i>Indel</i>	1619	P1 e P3
ITS-L	Transição	1696	P1 e P3
ITS-L	Transição	1702	P1 e P3
ITS-L	Transversão	1703	P1 e P3
ITS-L	<i>Indel</i>	1736	P1 somente
ITS-L	Transversão	1770	P3 somente
ITS-S	Transição	1744	P1 somente
ITS-S	Transversão	1458	P1 somente
ITS-S	Transição	1462	P1 somente
ITS-S	Transição	1505	P1 somente
ITS-S	<i>Indel</i>	1509	P1 somente

No total, foram identificados 17 polimorfismos de nucleotídeo único mais mutações do tipo *indel* no fragmento ITS-L e cinco no fragmento ITS-S. Nesse último, as mutações estavam presentes somente na amostra de janeiro/2011 (P1), sendo três mutações do tipo transição (troca de uma base purina por outra purina ou de uma pirimidina para outra pirimidina), uma do tipo transversão (troca de uma base purina por pirimidina ou vice-versa) e uma *indel* (inserção ou deleção). Dentre as mutações observadas no fragmento ITS-L, sete estão presentes em *reads* das amostras de P1 e P3, correspondendo a quatro mutações do tipo transição, duas do tipo transversão

e uma *indel*; seis estão apenas na P1 (sendo duas transições, duas transversões e duas *indel*) e quatro somente na P3 (duas transições, uma transversão e uma *indel*).

A análise dos SNPs e mutações *indel* por meio do sequenciamento de nova geração mostrou-se mais robusta do que a análise dos polimorfismos por comprimento do fragmento de restrição, uma vez que foi possível acessar mais pontos de variação do ITS 16S-23S e, inclusive, mutações presentes exclusivamente na amostra de abril de 2012. Apesar disso, a tendência geral obtida por ambos os métodos foi a mesma: maior variabilidade genética na amostra em que *C. raciborskii* representa praticamente 100% da comunidade fitoplanctônica. Esse resultado reforça a hipótese de que, na ausência de competidores, há um relaxamento seletivo e maior diversidade genética dentro da população.

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, tanto por meio da análise de restrição do DNA amplificado, quanto pelo sequenciamento de nova geração, sobre variações no fragmento ITS 16S-23S de populações de *C. raciborskii* do reservatório da Pampulha mostraram haver variabilidade genética dentro delas, o que tem sido chamado de microdiversidade, uma vez que se trata da diversidade numa escala menor: dentro de um grupo de indivíduos da mesma espécie (Schloter et al., 2000).

Esse resultado está em concordância com trabalhos anteriores, que também identificaram diferentes ecotipos de *C. raciborskii* em populações ou em isolados de ambientes geograficamente próximos (Wu et al., 2010; Piccini et al., 2011). Por meio de uma abordagem independente do isolamento e cultivo, Wu et al. (2010) encontraram uma certa diversidade de linhagens de *C. raciborskii* em reservatórios das ilhas de Kinmen e Taiwan. Os autores identificaram uma variante proximamente relacionada à linhagem europeia da espécie, que chegou a ter densidade tão alta quanto a de linhagens do Taiwan, entre as quais, por sua vez, foram detectadas sete variantes genotípicas. Piccini et al. (2011) compararam, por meio de uma abordagem polifásica, duas cepas de *C. raciborskii* isoladas de lagos do Uruguai e concluíram que, apesar dos isolados serem agrupados dentro da mesma linhagem biogeográfica da espécie, havia diferenças genéticas, fisiológicas e morfológicas, sugerindo que as cepas representavam diferentes ecotipos da espécie. Segundo os autores, a existência de diferentes ecotipos de *C. raciborskii* pode ser um dos motivos que permite a atual expansão da espécie nas regiões temperadas.

Trabalhos realizados com outras espécies de cianobactérias também encontraram microdiversidade em florações monoespecíficas (Wilson et al., 2005; Briand et al., 2009; Melendrez et al., 2011), mas nenhum deles chegou a comparar eventuais alterações da variabilidade genética da espécie formadora da floração em amostras que apresentavam variação quanto a sua abundância relativa. É possível que a presença de mais de uma espécie na floração em que foi observada

codominância de *C. raciborskii* e Chroococcales (amostra P3) tenha promovido a seleção negativa de genótipos menos competitivos de *C. raciborskii*, o que gerou a menor variabilidade encontrada neste período em ambos os métodos utilizados neste trabalho. Pela análise de restrição do DNA amplificado da região ITS-L, foram detectados quatro genótipos a menos na amostra P3 quando comparada à P1 (amostra em que apenas *C. raciborskii* estava presente). A procura por pontos de mutação de nucleotídeo único e mutações *indel* utilizando a abordagem do NGS revelou que os *reads* da amostra P3 possuem duas mutações a menos no fragmento ITS-L e nenhuma no ITS-S, enquanto os *reads* da P1 apresentaram quatro mutações SNP e uma *indel* neste último.

Os genótipos encontrados pela análise de restrição produziram apenas dois grupos distintos, conforme a árvore filogenética gerada por máxima parcimônia, com os genótipos P1-7 e P1-11, que não produziram cortes pela enzima *Hae*III (fig. 2), destacando-se dos demais com um suporte de *bootstrapping* de 77% (fig. 3). O BLAST para as sequências ITS-L de todos os genótipos isolados do reservatório da Pampulha (vide anexo) revelou melhores alinhamentos com as sequências das cepas MCVV14 e MCVV19, ambas isoladas do Uruguai e estudadas no trabalho de Piccini et al. (2011) (números de acesso no GenBank do NCBI HQ112347.1 e HQ112348.1, respectivamente) e também com a sequência da cepa Sidi (número de acesso HQ407351.1) isolada na Tunísia (Moreira et al., 2011). A análise filogenética mostrou que os clones estão mais próximos das sequências de linhagens da América, do que da sequência da cepa africana.

Moreira et al. (2011), utilizando-se de diferentes marcadores genéticos, estudaram a relação entre linhagens de todas regiões do planeta em que *C. raciborskii* é encontrada e as agruparam em três grupos com forte suporte filogenético: o grupo de linhagens da Europa (I), de linhagens da Ásia/Austrália (II) e da América/África (III). Ainda segundo os mesmos autores, o grupo I é mais próximo do II que do III. Um estudo anterior já havia provado a separação de três grandes grupos biogeográficos das linhagens de *C. raciborskii*, também separando as linhagens das Américas, da Europa e da Austrália (Neilan et al., 2003). Moreira et al. (2011) adicionaram em seu estudo linhagens da África e da Ásia e, como foi também observado no presente trabalho, mostraram que sequências da América são próximas de sequências da África, onde se acredita que a espécie tenha se originado. Em função da mais alta diversidade de *Cylindrospermopsis* no continente africano, ele é também sugerido como o centro primário de evolução e dispersão da espécie (Padisák, 1997).

Apesar de a análise filogenética ter gerado apenas dois grupos distintos, os diferentes genótipos identificados conforme perfis de restrição variáveis são um indício de variabilidade genética existente e não devem ser desconsiderados quando se estudam populações de uma única espécie, pois indicam a presença de um tipo de polimorfismo: o polimorfismo por comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (Coman et al., 2011). A análise feita no presente trabalho a partir do sequenciamento de nova geração objetivou, por sua vez, encontrar polimorfismos de nucleotídeo

único ou do tipo *indel* na região ITS 16S-23S de *C. raciborskii*, amplificada a partir das mesmas amostras. Uma vez que o NGS permite acesso a, virtualmente, todas as sequências das variantes genotípicas presentes na amostra e, por serem as análises de bioinformática robustas o suficiente para lidar com um grande número de dados e discernir onde estão estes pontos de variação (Bokulich et al., 2012), é esperado que seja encontrado um número maior de variações genotípicas, como foi observado neste trabalho.

As análises de bioinformática permitiram identificar, além da posição, o tipo da mutação encontrada nos *reads* produzidos pelo NGS. As mutações do tipo transição são mais fáceis de ocorrer e, conseqüentemente, são observadas em geral com mais frequência do que as mutações do tipo transversão, sendo a sua estimativa um importante fator para a compreensão da evolução biológica recente de espécies (Purvis & Bromhm, 1997). A amostra de janeiro/2011 (P1), quando *C. raciborskii* provocou floração monoespecífica, não só teve o maior número de mutações exclusivas para o fragmento ITS-S e ITS-L, como também apresentou uma mutação do tipo transversão a mais no ITS-L do que o observado para a amostra de abril/2012 (P3), quando *C. raciborskii* competia com Chroococcales. Essa observação mostra que, além de haver mais mutações, existe um indício de que essas sejam também mais antigas nas linhagens que compõe a população *C. raciborskii* na amostra P1. Contudo, uma vez que a diferença na proporção de mutações do tipo transição e transversão não foi tão abrupta entre as amostras estudadas, são necessários estudos complementares baseados em análises filogenéticas para concluir quanto ao real distanciamento evolutivo dessas linhagens com relação ao fragmento ITS 16S-23S.

Polimorfismos do tipo *indel* são diferentes dos polimorfismos de nucleotídeo único, uma vez que não geram substituição da base original, mas se caracterizam pela inserção ou deleção de um único nucleotídeo comparando-se com a sequência original (Rodriguez-Murillo & Turner, 2013). Em regiões codificadoras, mutações do tipo *indel* acarretam em mudanças na ORF (*Open Reading Frame*), alterando a fase de leitura do mRNA e, conseqüentemente, gerando mutações funcionais (Trautmann et al., 2012). Em regiões não codificadoras, como a estudada, esse tipo de mutação não repercute em maiores alterações, sendo apenas indício de diferenciação genética entre organismos. A amostra de janeiro/2011 (P1) apresentou uma mutação do tipo *indel* no ITS-L 16S-23S a mais que a amostra de abril/2012 (P3), indicando novamente haver maior variabilidade no período de dominância completa de *C. raciborskii*.

Os resultados deste trabalho sugerem haver uma composição diferencial das populações de *C. raciborskii* em períodos com diferentes pressões competitivas. Futuros estudos devem ser realizados, a fim de se obter mais dados sobre as proporções das variantes genotípicas encontradas em cada amostra de NGS, bem como sobre a relação filogenética entre elas. Assim, será possível elucidar o quão distintas são essas variantes genotípicas do ponto de vista evolutivo, trazendo

informações importantes para o estudo das populações de *C. raciborskii* no reservatório da Pampulha e sobre suas variações sob diferentes pressões seletivas.

2.5 REFERÊNCIAS

- Bittencourt-Oliveira M. C., Dias S. N., Moura A. N., Cordeiro-Araújo M. K., Dantas E. W. (2012) Seasonal dynamics of cyanobacteria in a eutrophic reservoir (Arcoverde) in a semi-arid region of Brazil. *Braz. J. Biol.*, **72**: 533-544
- Bokulich N. A., Joseph C. M. L., Allen G., Benson A. K., Mills D. A. (2012) Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PloS One*, **7**:e36357
- Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**:2114-2120
- Bonfield J. K., Smith K. F., Staden R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.*, **23**:4992-4999
- Bouvy M., Falcão D., Marinho M., Pagano M., Moura A. (2000) Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat. Microb. Ecol.*, **23**:13-27
- Bouvy M., Nascimento S. M., Molica R. J. R., Ferreira A., Huszar V., Azevedo S. M. F. O. (2003) Limnological features in Tapacura reservoir (northeast Brazil) during a severe drought. *Hydrobiologia*, **493**:115-130
- 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. *Mol. Biol. Evol.*, **18**:1057-1069
- Briand E., Escoffier N., Straub C., Sabart M., Quiblier C., Humbert J. F. (2009) Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *The ISME Journal*, **3**:419-429
- Carlton J. M., Angiuoli S. V, Suh B. B., Kooij T. W., Pertea M., Silva J. C., Ermolaeva M. D., Allen J. E., Selengut J. D., Koo H. L., Peterson J. D., Pop M., Kosack D. S., Shumway M. F., Bidwell S. L., [...] Carucci D. J. (2002) Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, **419**:512-519
- Chonudomkul D., Yongmanitchai W., Theeragool G., Kawachi M., Kasai F., Kaya K., Watanabe M. M. (2004) Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **48**:345-355
- Coelho S. M., Simon N., Ahmed S., Cock J. M., Partensky F. (2013) Ecological and evolutionary genomics of marine photosynthetic organisms. *Mol. Ecol.*, **22**:867-907

- Colwell, R. K. (2013) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9. URL <purl.oclc.org/estimates>
- Coman C., Bica A., Drugă B., Barbu-Tudoran L., Dragoş N. (2011) Methodological constraints in the molecular biodiversity study of a thermomineral spring cyanobacterial mat: a case study. *Antonie van Leeuwenhoek*, **99**:271-281
- Costa I. A. S., Azevedo S. M. F. O., Senna P. A. C., Bernardo R. R., Costa S. M., Chellappa N. T. (2006) Occurrence of toxin-producing Cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Braz. J. Biol.*, **66**:211-219
- Delcher A. L., Kasif S., Fleischmann R. D., Peterson J., White O., Salzberg S. L. (1999) Alignment of whole genomes. *Nucleic Acids Res.*, **27**:2369-2376
- Deng W., Xi D., Mao H., Wanapat M. (2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Mol. Biol. Rep.*, **35**:265-274
- Eiler A., Drakare S., Bertilsson S., Pernthaler J., Peura S., Rofner C., Simek K., Yang Y., Znachor P., Lindström E. S. (2013). Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. *PLoS ONE*, **8**:1-10
- Ewing B. & Green P. (2005) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, **8**:175-185
- Figueredo C. C., Giani A., Bird D. F. (2007) Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *J. Phycol.*, **43**:256-265
- Figueredo C. C. & Giani A. (2009) Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologica*, **39**:264-272
- Fox G. E., Wisotzkey J. D., Jurtshuk P. Jr. (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**:166-170
- Hoff-Rissetti C., Dörr F. A., Schaker P. D. C., Pinto E., Werner V. R., Fiore, M. F. (2013) *Cylindrospermopsis* and saxitoxin synthetase genes in *Cylindrospermopsis raciborskii* strains from Brazilian freshwater. *PloS One*, **8**:e74238
- Iteman I., Rippka R., Marsac N. T., Herdman M. (2000) Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA – 23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*, **146**:1275-1286
- Kurtz S., Phillippy A., Delcher A. L., Smoot M., Shumway, M., Antonescu C., Salzberg S. L. (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.*, **5**:R12

- Lagos N., Onodera H., Zagatto P. A., Andrinolo D., Azevedo S. M. F. Q., Oshima Y., (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon*, **37**:1359-1373
- Langmead B. & Salzberg S. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, **9**:357-359
- Magoč T. & Salzberg S. L. (2011) FLASH: Fast Length Adjustment of Short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, **27**:2957-2963
- Melendrez M. C., Lange R. K., Cohan F. M., Ward D. M. (2011) Influence of molecular resolution on sequence-based discovery of ecological diversity among *Synechococcus* populations in an alkaline siliceous hot spring microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**:1359-1367
- Moreira C., Fathalli A., Vasconcelos V., Antunes A. (2011) Genetic diversity and structure of the invasive toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Curr. Microbiol.*, **62**:1590-1595
- Moyer C. L., Tiedje J. M., Dobbs F. C., Karl D. M. (1996) A computer-simulated Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:2501-2507
- Neilan B. A., Saker M. L., Fastner J., Törökne A., Burns B. P. (2003) Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.*, **12**:133-140
- Padisák J. (1997) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.*, **107**(suppl.):563-593
- Piccini C., Aubriot L., Fabre A., Amaral V., González-Piana M., Giani A., Figueredo C. C., Vidal L., Kruk C., Bonilla S. (2011) Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, **10**:644-653
- Purvis A., Bromham L. (1997) Estimating the transition/transversion ratio from independent pairwise comparisons with an assumed phylogeny. *J. Mol. Evol.*, **44**:112-119
- Rodriguez-Murillo L. & Salem R. M. (2013) Insertion/Deletion Polymorphism. In *Encyclopedia of Behavioral Medicine*, Gellman M. D. & Turner, J. R. (eds). Springer, New York. 1076 p.
- Saker M. L., Thomas A. D., Norton J. H. (1999) Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an Outback Region of North Queensland. *Environ.Toxicol.*, **14**:179-182

- Saker M. L., Nogueira I. C. G., Vasconcelos V. M., Neilan B. A., Eaglesham G. K., Pereira P. (2003) First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **55**:243-250
- Scheldeman P., Baurain D., Bouhy R., Scott M., Mühling 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 spacer. *FEMS Microbiol. Let.*, **172**:213-222
- Schlöter M., Leubhn M., Heulin T., Hartmann A. (2000) Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**:647-660
- Shendure J. & Ji H. (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.*, **26**:1135-1145
- Sinha R., Pearson L. A., Davis T. W., Burford M. A., Orr P. T., Neilan B. A. (2012) Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones is climate change responsible? *Water Research*, **46**:1408-1419
- Sinha R., Pearson L. A., Davis T. W., Muenchhoff J., Pratama R., Jex A., Burford M. A., Neilan B. A. (2014) Comparative genomics of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains with differential toxicities. *BMC Genomics*, **15**:83
- Sklarz M. Y., Angel R., Gillor O., Soares M. I. M. (2009) Evaluating Amplified rDNA Restriction Analysis assay for id of bacterial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, **96**:659-664
- Stucken K., Murillo A. A., Soto-Liebe K., Fuentes-Valdés J. J., Méndez M. A., Vásquez M. (2009) Toxicity phenotype does not correlate with phylogeny of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *Syst. App. Microbiol.*, **32**:37-48
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2011) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30**:2725-2729
- Taton A., Grubisic S., Brambilla E., de Wit R., Wilmotte A. (2003) Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:5157-5169
- Trautmann D., Voß B., Wilde A., Al-Babili S., Hess W. R. (2012) Microevolution in cyanobacteria: re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.*, **19**:1-14
- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith O. H., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A., Gocayne J. D., Amanatides P., Ballew R. M., Huson D. H., Wortman J. R., [...] Zhu, X. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science*, **291**:1304-1351
- Wilson A. E., Sarnelle O., Neilan B. A., Salmon T. P., Gehringer M. M., Hay M. E. (2005) Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**:6126-6133

- Wu J. H., Hsu M. H., Hung C. H., Tseng I. C., Lin T. F. (2010) Development of a hierarchical oligonucleotide primer extension assay for the qualitative and quantitative analysis of *Cylindrospermopsis raciborskii* subspecies in freshwater. *Microbes Environ.*, **25**:103-110
- Zhao G., Yao Y., Wang C., Hou L., Cao X. (2013) Comparative genomic analysis of *Aspergillus oryzae* strains 3.042 and RIB40 for soy sauce fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, **164**:148-154

CONCLUSÕES GERAIS

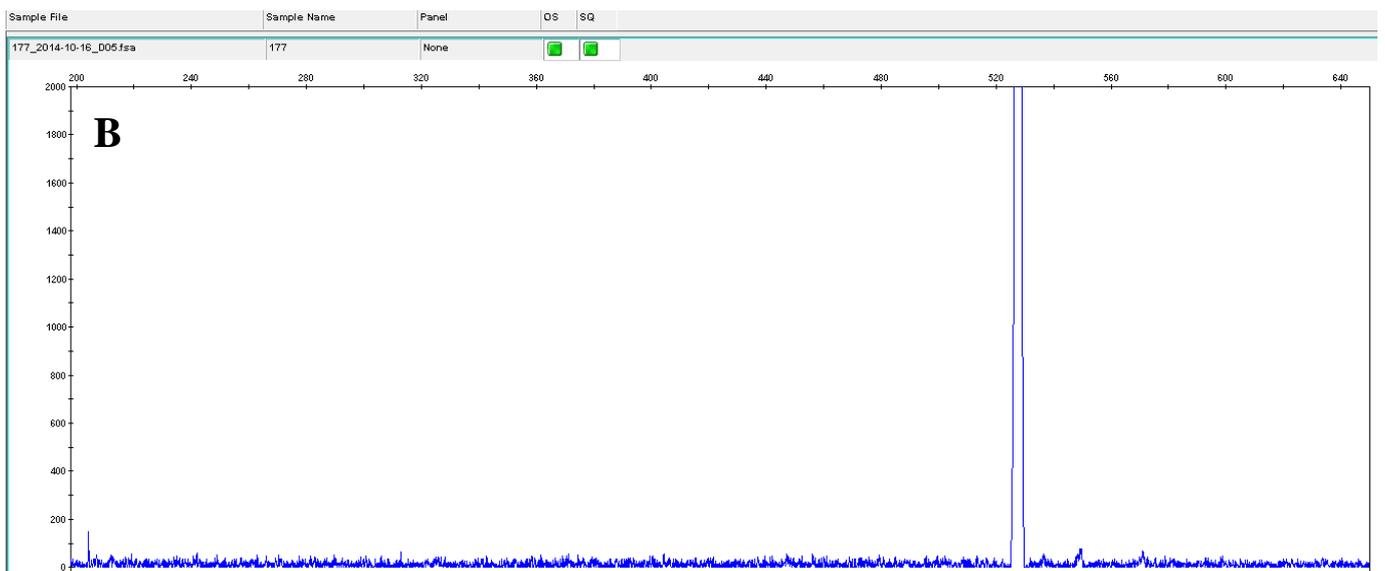
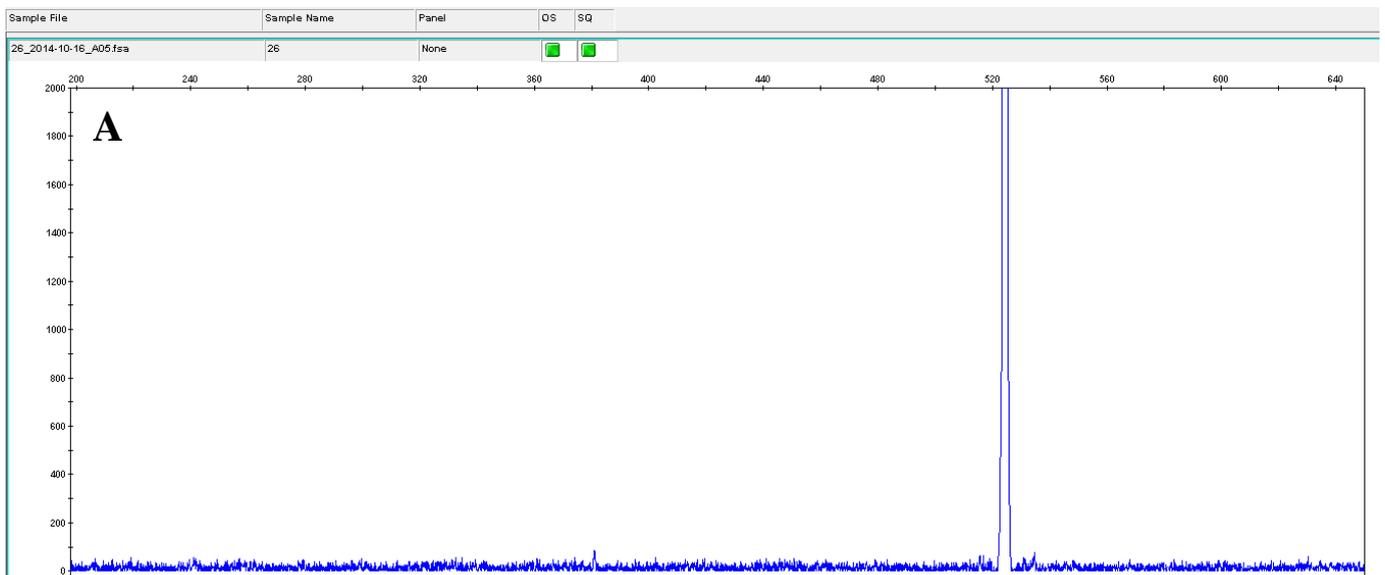
O presente estudo auxiliou na compreensão de como o atual estado trófico do reservatório da Pampulha tem contribuído para a constante dominância de cianobactérias neste ambiente. A detecção da variabilidade intraespecífica dentro de populações de uma das espécies formadoras de floração reforça a flexibilidade desses organismos no ambiente e ajuda a explicar o constante reaparecimento da espécie todo ano.

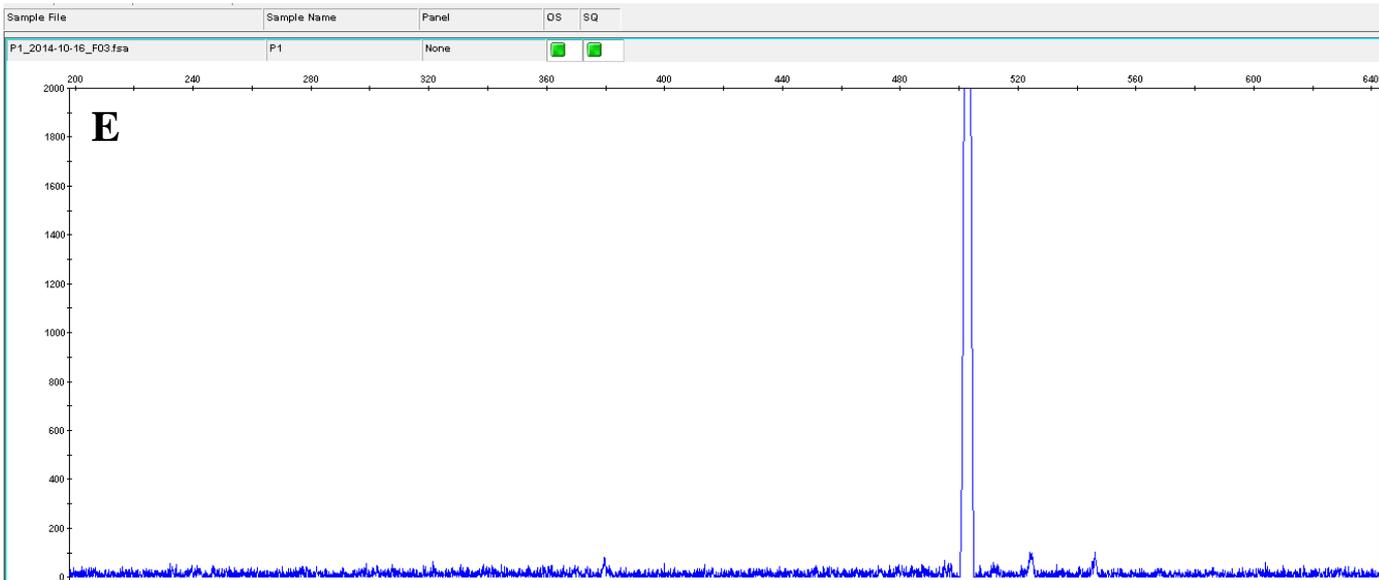
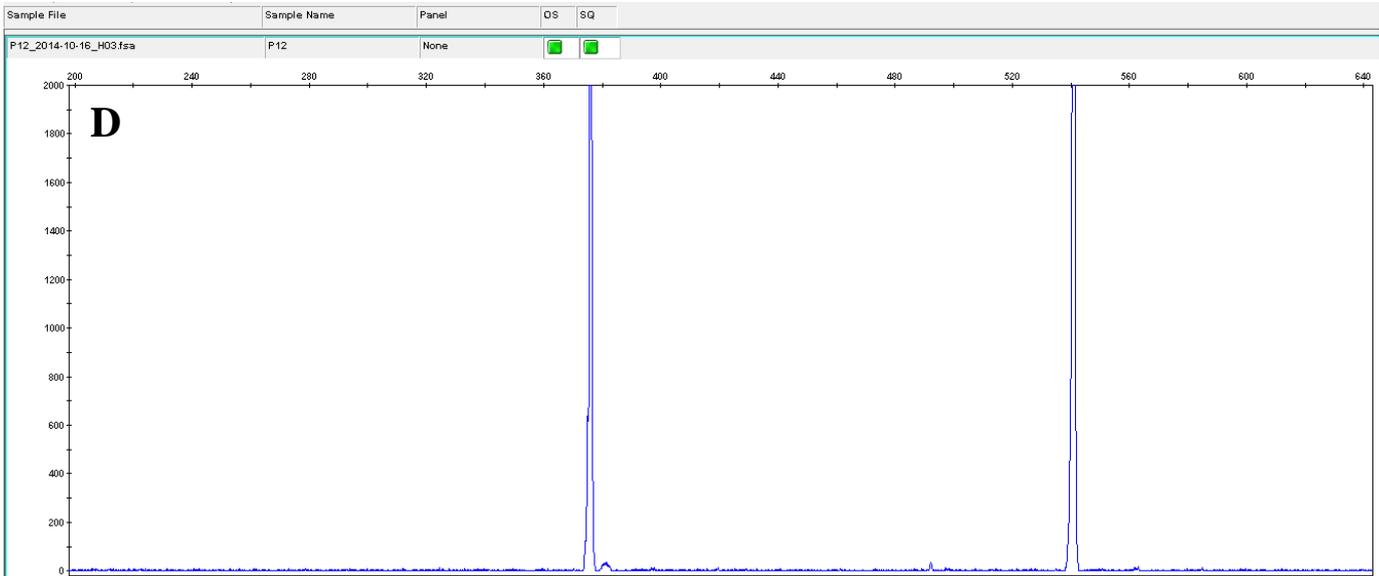
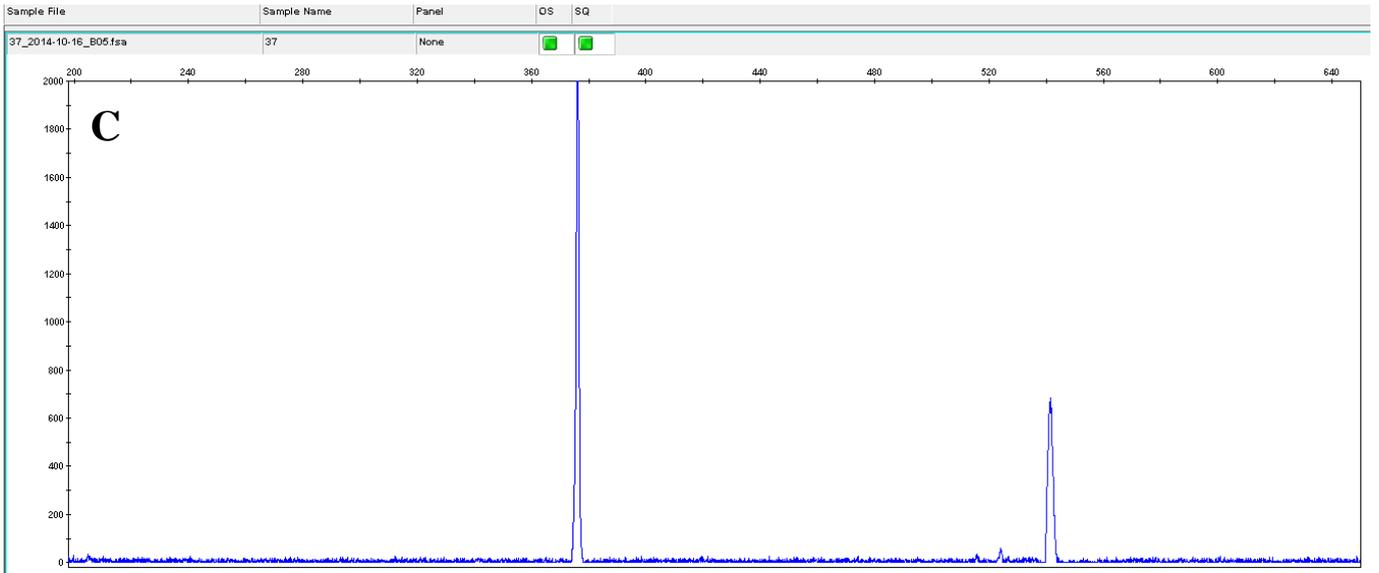
No capítulo 1, ao abordar a dinâmica das cianobactérias num período de três anos consecutivos, foram detectadas mudanças sazonais na composição da comunidade, que mostrou uma alternância entre *Cylindrospermopsis raciborskii* no período chuvoso e duas espécies de Chroococcales, *Microcystis aeruginosa* e *Sphaerocavum brasiliense*, no período da seca. No último ano do estudo, *Planktothrix isothrix* provocou florações até maiores que as já observadas para *C. raciborskii*, no início do período chuvoso. Condições ambientais que variaram conforme a mudança das estações mostraram-se fortemente correlacionadas à dominância das principais espécies a cada período. A abordagem de biologia molecular utilizada no capítulo 1 para estudo das comunidades de cianobactérias, denominada ARISA, mostrou-se altamente eficaz na diferenciação de espécies proximamente relacionadas e é sugerida como potencial método de monitoramento ambiental, em função da sua precisão e rapidez.

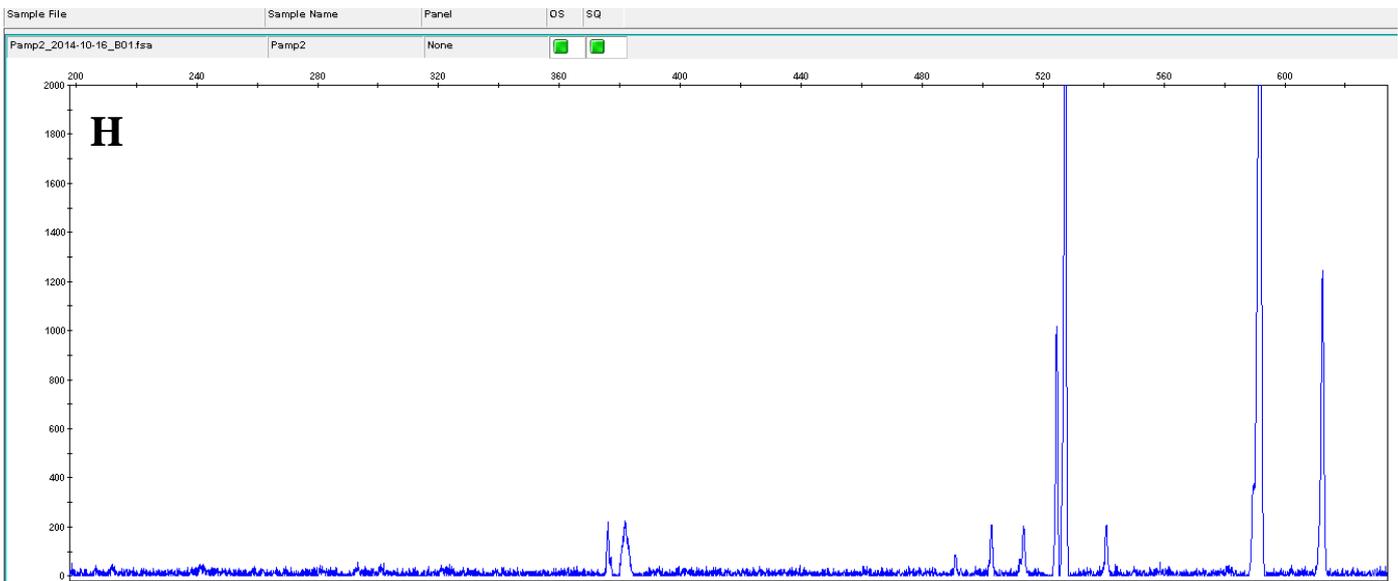
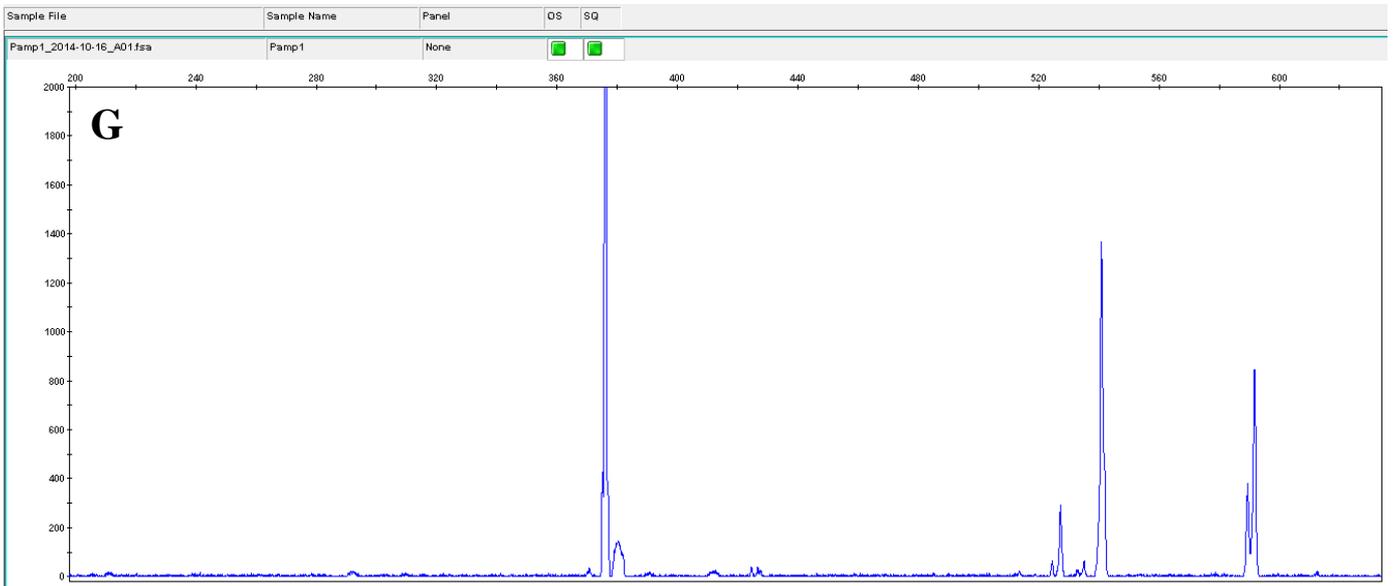
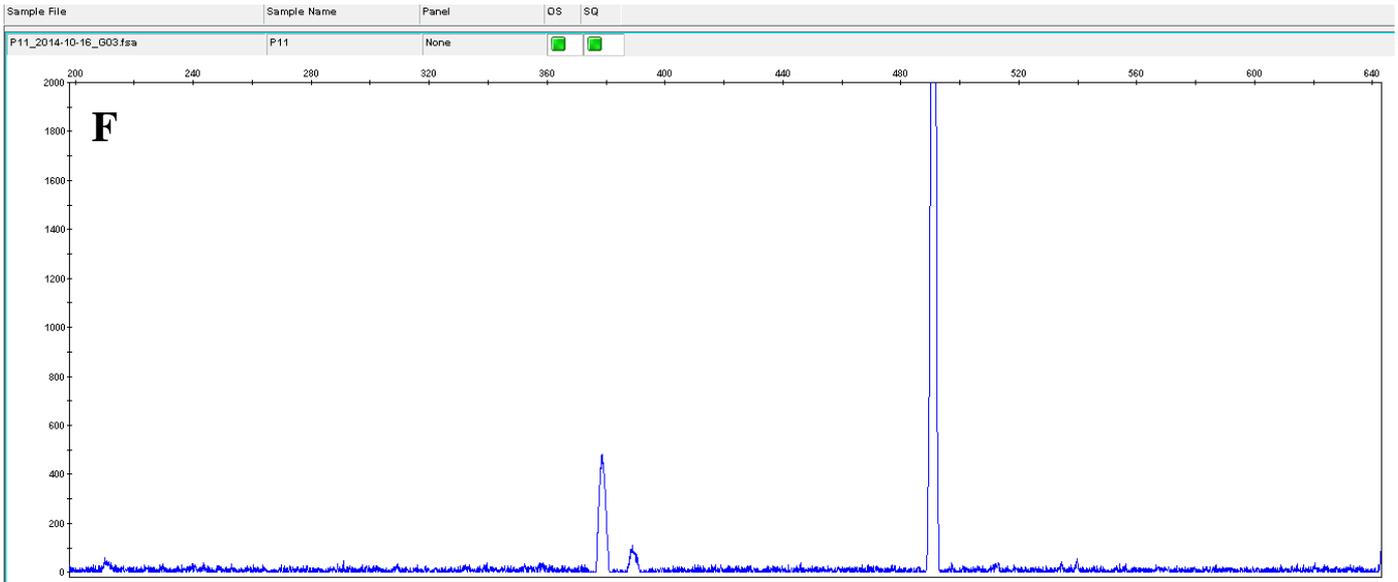
No capítulo 2, as duas abordagens utilizadas no estudo da região ITS 16S-23S de *C. raciborskii*, a espécie formadora de florações predominantemente no período chuvoso, foram capazes de detectar variações intraespecíficas em suas populações em diferentes momentos. A variabilidade genética intrapopulacional foi maior no período em que a pressão competitiva era mais branda, possivelmente por haver floração apenas de *C. raciborskii*, ao contrário do outro período estudado, em que havia codominância entre *C. raciborskii* e Chroococcales. As análises baseadas no sequenciamento de nova geração (NGS) detectaram mais variações do que as análises baseadas em técnicas moleculares tradicionais, demonstrando a maior abrangência e acurácia das técnicas de NGS e das análises de bioinformática, feitas posteriormente. Estudos futuros serão realizados para verificar as proporções das variantes genotípicas, a partir das amostras de NGS, e para entender a relação filogenética delas, a fim de que se possam detectar quantos ecotipos diferentes existem em cada amostra e qual a proximidade evolutiva deles.

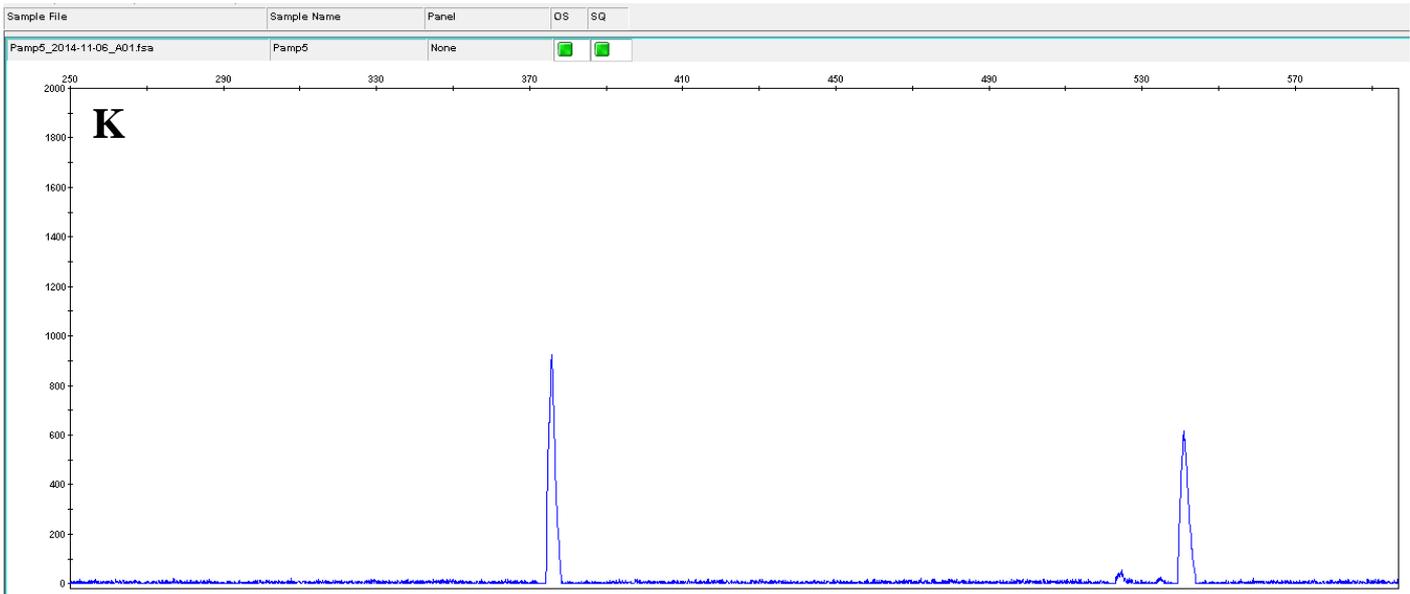
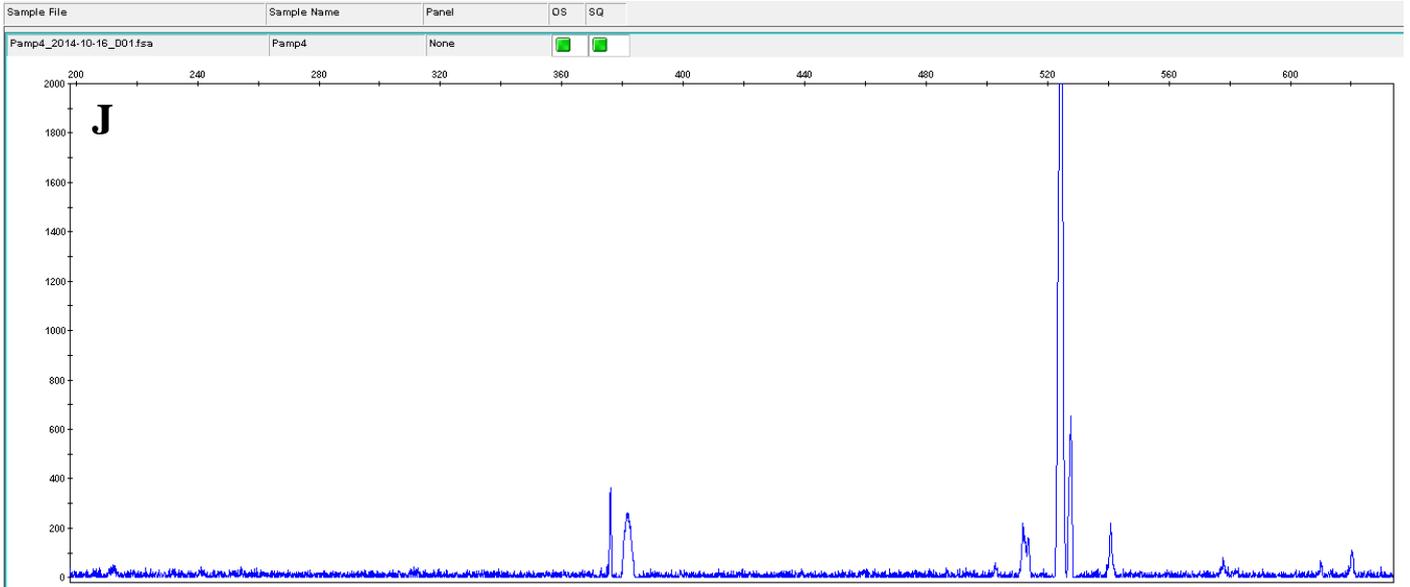
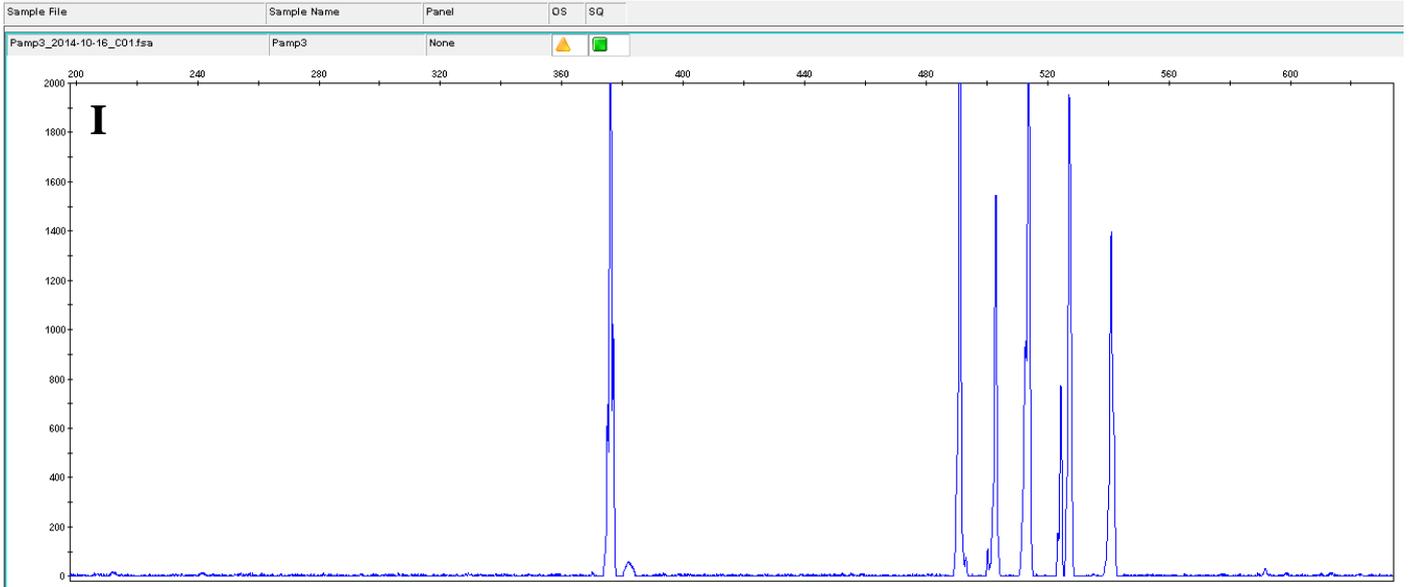
ANEXOS

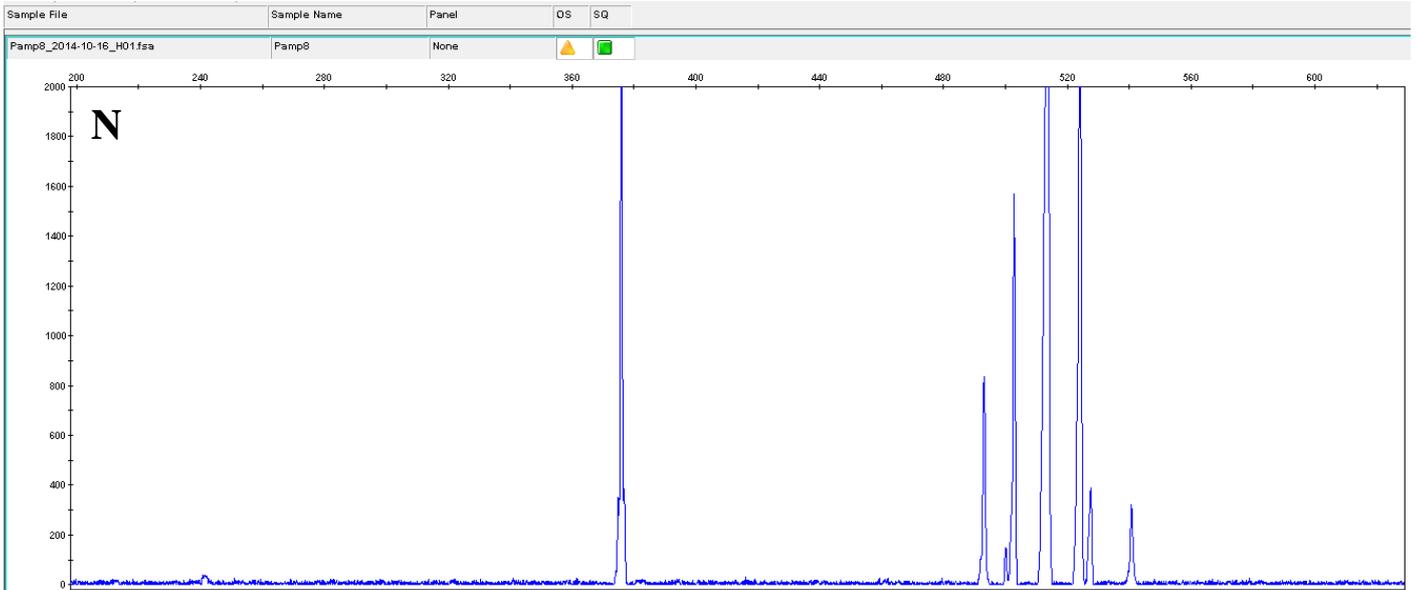
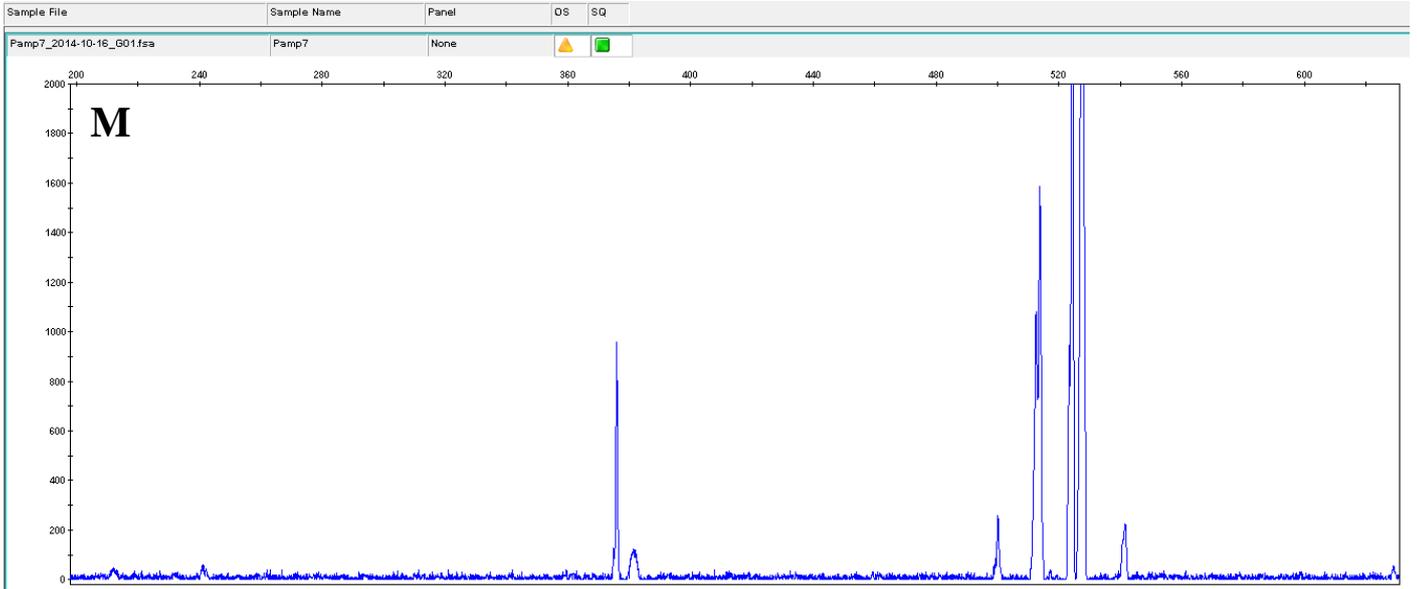
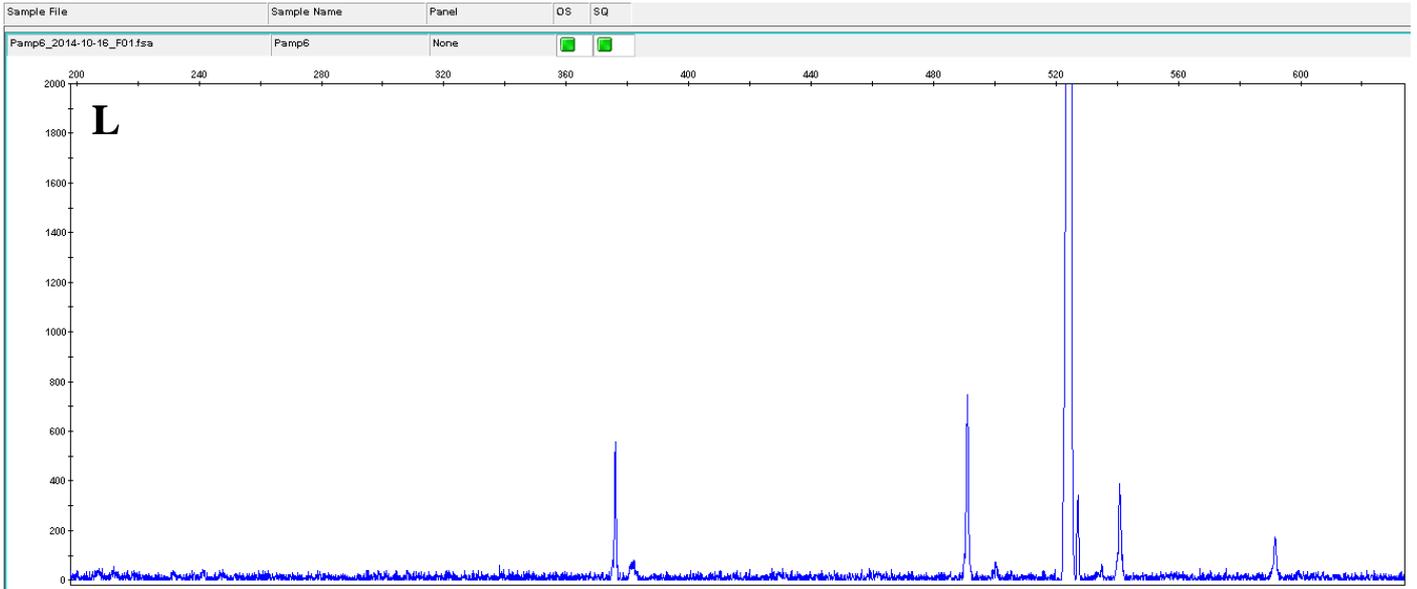
1. Perfis de ARISA dos fragmentos ITS 16S-23S das cepas *Microcystis aeruginosa* (cepa 26, perfil A), *Sphaerocavum brasiliense* (cepa 177, perfil B), *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa 37, perfil C e cepa 188, perfil D), *Planktothrix isothrix* (cepa P1, perfil E), *Arthrospira platensis* (cepa P11, perfil F) e das amostras ambientais Pamp1 a Pamp13 (perfis G a S) do reservatório da Pampulha. A escala do eixo x vai de 200 a 640 pb, com marcações a cada intervalo de 20 pb, numeradas a cada 40 pb. A escala do eixo y vai de 0 a 2000 unidades de fluorescência (uf), com marcações a cada intervalo de 100 uf, numeradas a cada 200 uf.

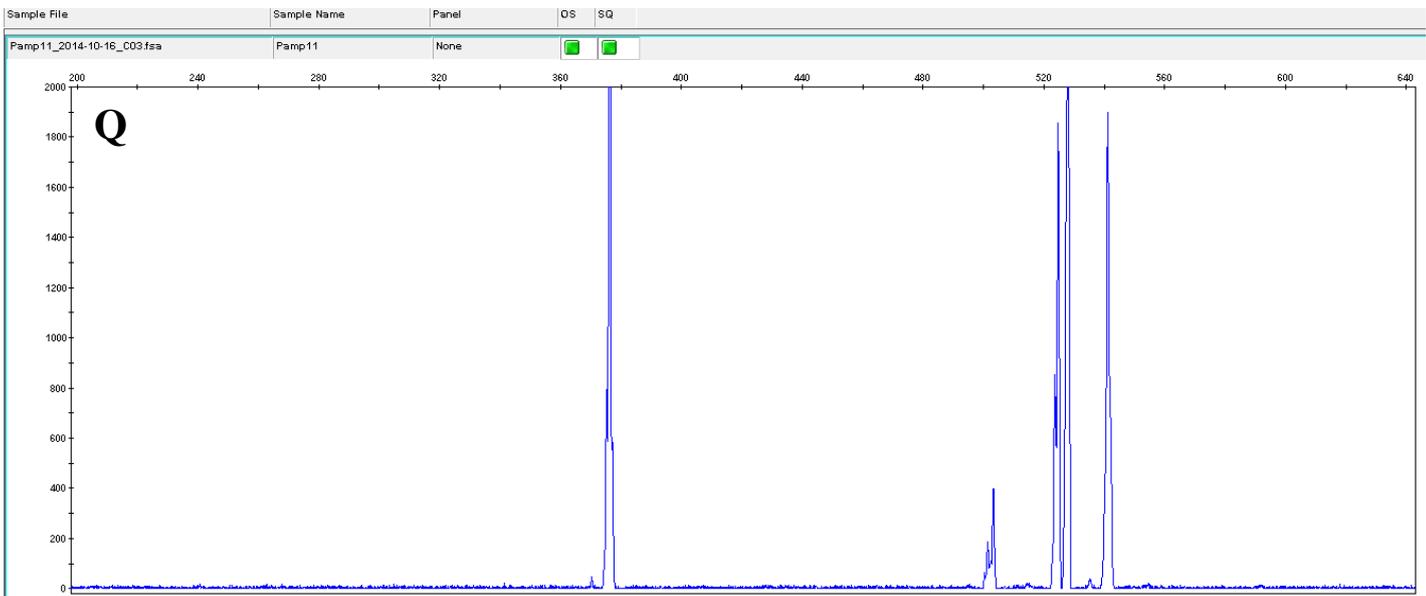
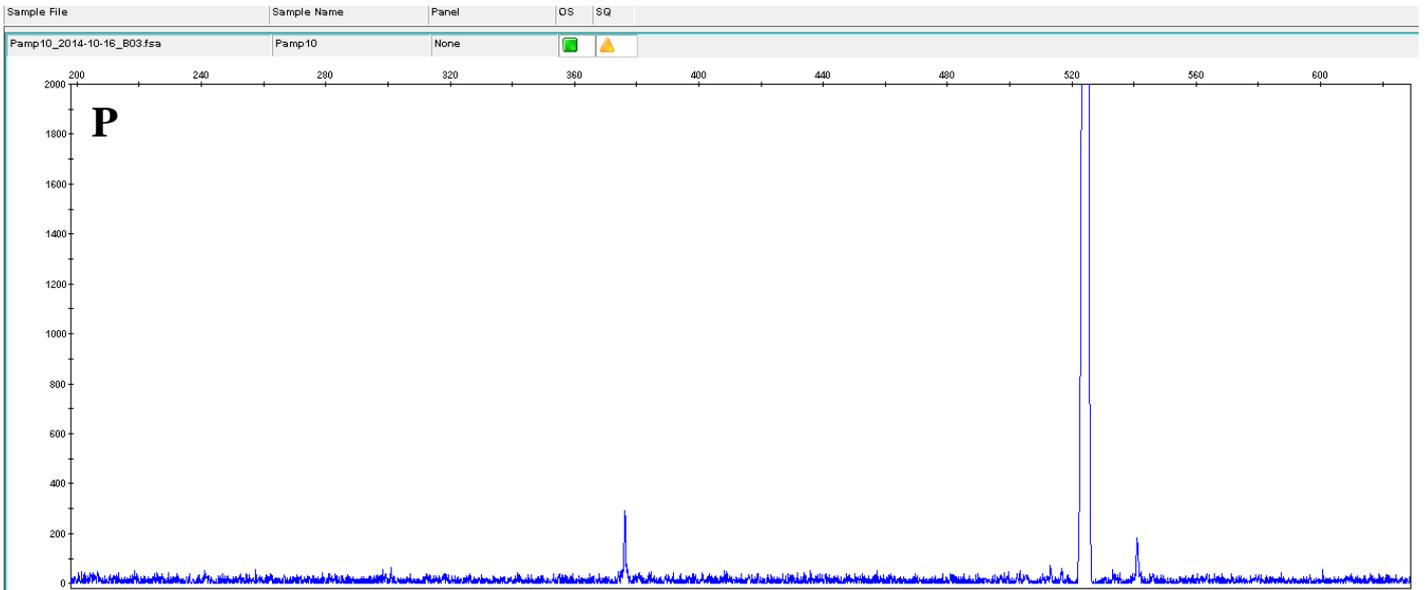
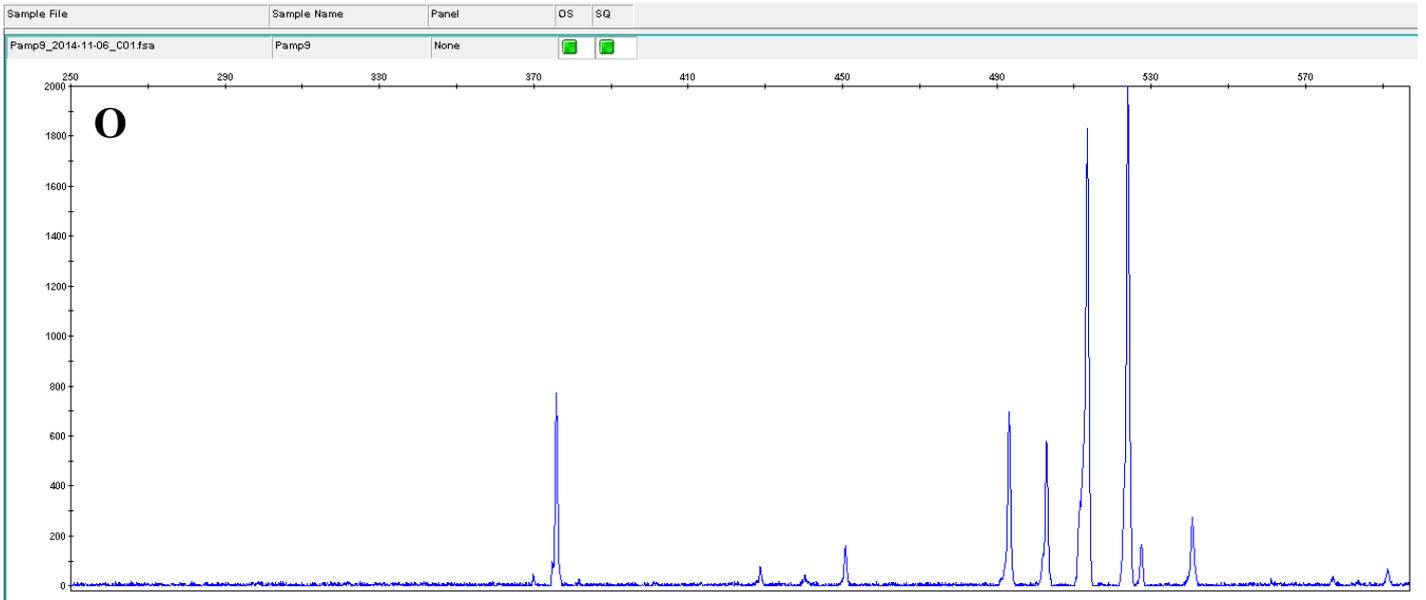


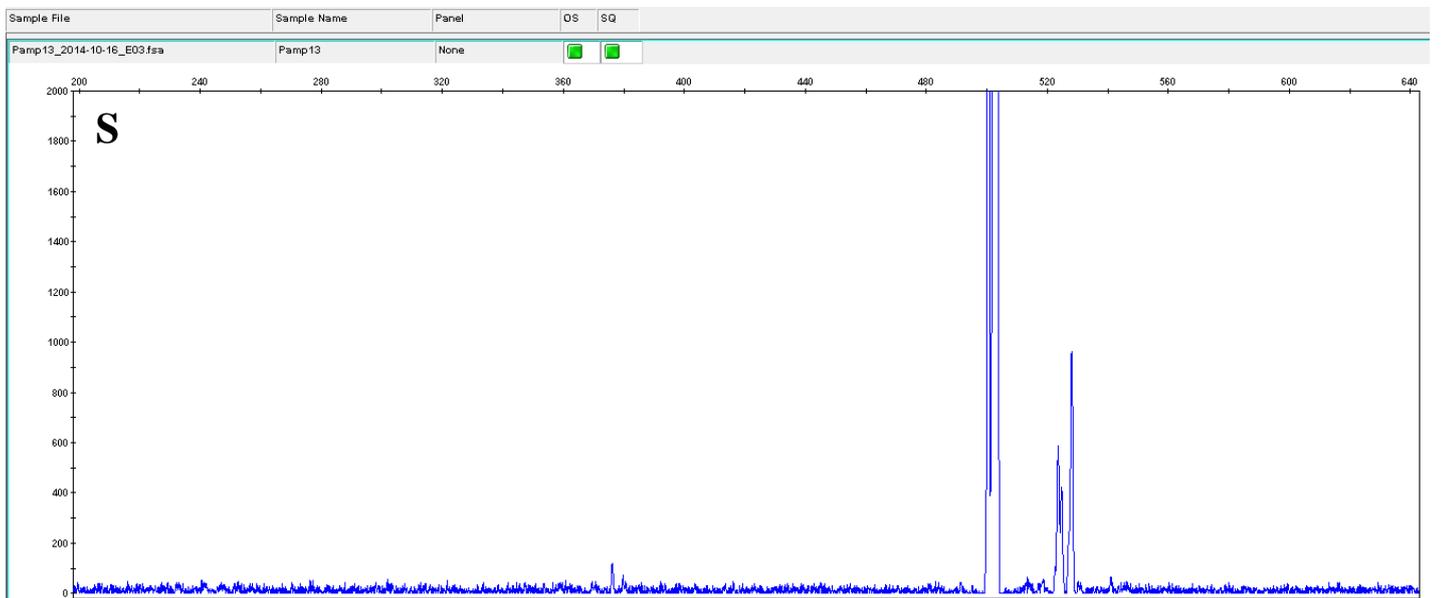
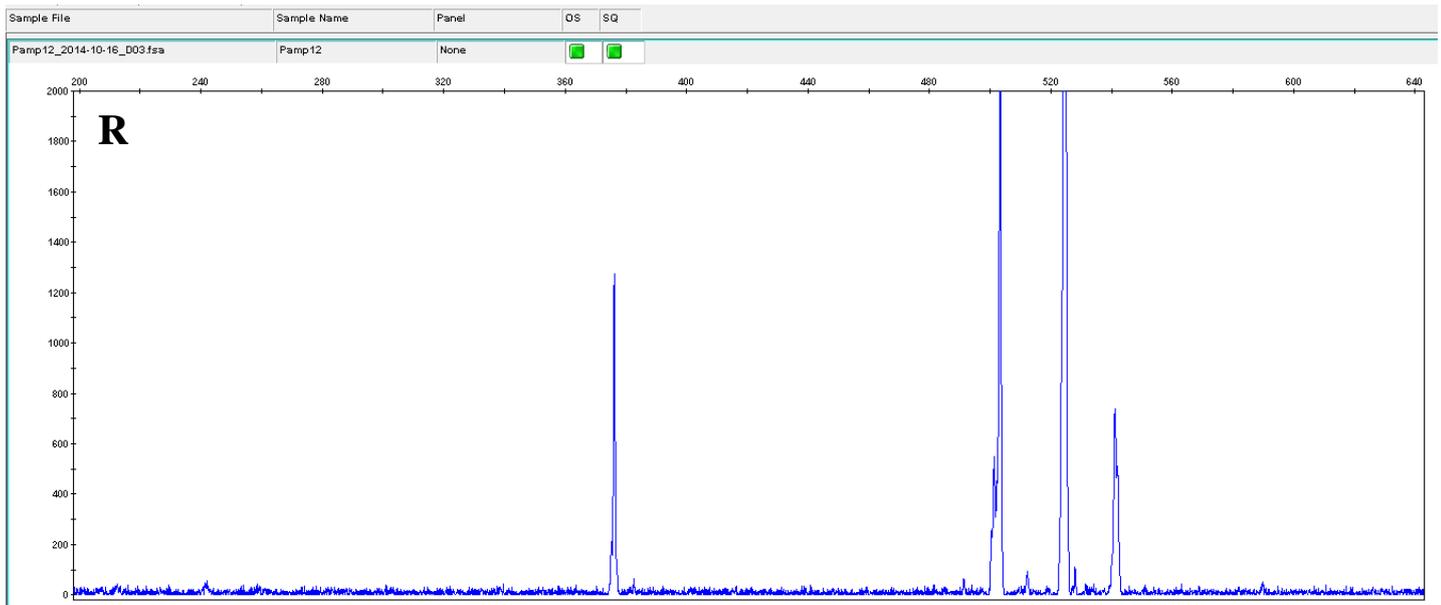












2. Sequências parciais do fragmento ITS-L 16S-23S de *Cylindrospermopsis raciborskii* isoladas do reservatório da Pampulha em janeiro/2011 (amostras iniciadas com P1) e abril/2012 (amostras iniciadas com P3):

>P1-1

```

ACCATGGAAGTTGGTCACGCCC GAAGTCATTACCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGG
ACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTT
TTAGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCT
AGGTCGGTGACGCGAGATTGTGAAGTCTTCAAAC TAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGCT
CAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCTCACCTG
ATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGC
TAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCAG
AACCTTGAAA ACTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCATG
GTGGATA

```

>P1-2

CACCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAG
 GACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCT
 TTAGGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTC
 TAGGTCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGC
 TCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGGGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCT
 GATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCG
 CTAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCA
 GAACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCAT
 GGTGGATAC

>P1-4

ACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAG
 GACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGCAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCCGGATCACCTCCT
 TTTAGGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTC
 TAGGTCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGC
 TCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGGGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCT
 GATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCG
 CTAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAGGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCC
 AGAACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTGTCAAGCTAATAAGGGCTCAT
 GGTGGATACC

>P1-8

CACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGGATGCCTAAGGT
 AGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTC
 CTTTTAGGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTAC
 TCTAGGTTCGGTGACGTGAGATTGTGAGGCCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTA
 GCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGGGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCAC
 CTGATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTC
 CGCTAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGC
 CAGAACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAAGAGTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCT
 CATGGTGGATA

>P1-9

CCCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGGATGCCTAAGGTAGG
 ACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTT
 TTAGGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCT
 AGGTCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGCT
 CAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGGGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTG
 ATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGAATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGC
 TAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGACGATGAACCAGCCAG
 AACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAAGAGTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCCCAT
 GGTG

>P1-14

CCCATGGAAGTTGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGGATGCCTAAGGTAGGA
 CTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTT
 TAGGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCTA
 GGTTCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGCTC
 AGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGGGGTCCCTGGTTTGGAGTCCAGGATGGCCACCTGA
 TGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCT
 AACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCAGA

ACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTTGGTCAAGCCTAATAACGGGCTCATGGGTGGAT

>P1-17

ACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCC TTTTAGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACT CTAGGTCGGTGACGCGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAG CTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCTCACC TGATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCC GCTAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCC AGAACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCATGGTGA

>P1-34

CGCCACCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCT CCTTTTAGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCTAGGTCGGTGACGTGGGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATT AGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCCA CCTGATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGT CCGCTAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAG CCAGAACCTTGAAAACCTACATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCATGGTGGATACCTA

>P3-1

ACCATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCTAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTT TAGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCT AGGTCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGCT CAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTG ATGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGC TAACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCAG AACCTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCATG GTGGATA

>P3-2

ATGGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACT GGTGACTGGGGTGAAGCCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTT TAGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAGGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCTAGG TCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGCTCAG GTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTAATG GGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTAA CCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCAGAAC CTTGAAAACCTGCATATAGAAAGATAAGAGTAAAGAGTAAGTTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCATGGT GGATA

>P3-19

GGAAGTTGGTCACGCCCCGAAGTCGTTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGACTGG TACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGG GAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCTAGGTC GGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAACCTAATATTTGGTTCGCGAGAGGGCTATTAGCTCAGGT GGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCACCTGATGGG

GGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTAACC
TCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAA *GACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCAGAACC
TTGAAAACCTGCATATAGAAAAGATAAGAGTAAGTGGCCAAGCTAATAAGGGCTCATGGTGGATAC

>P3-41

GGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTA
GGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCTAGG
TCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAAC TAATATTTGGTTTCGCGAGAGGGCTATTAGCTCAG
GTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCCACCTGATG
GGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAACCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTAA
CCTCCACATTGGGTATC

>P3-48

ACCATGGAAGTTGTCACGCCCGAAGTCATTACCCCAACCGAAAGGAGGGGGATGCCTAAGGTAGGA
CTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTT
TAGGGAGACCTACCCATTGAAGAATCGAAAGCGGAAAGCGAATAGAGAATCAAATGGTCTACTCTA
GGTCGGTGACGTGAGATTGTGAAGTCTTTCAAAC TAATATTTGGTTTCGCGAGAGGGCCATTAGCTC
AGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCCACCTGA
TGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCT
AACCTCCACATTGGGTATCTTCAGCAACTAGGAAAGACCTAGACTGCTGGTGATGAACCAGCCAGA
ACCTTGAAAACCTGCATGTAGAAAAGATAAGAGTAAGAGTAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTCATGG
TG