

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE HIDROBIOLOGIA

ELOISA HUMMER

**QUAL TÉCNICA DE ANÁLISE DA COMUNIDADE DE FITOPLÂNCTON
(MICROSCOPIA "CLÁSSICA" OU METABARCODING DO 16S/18S) REFLETE
MELHOR AS VARIAÇÕES AMBIENTAIS DE UM RESERVATÓRIO MULTIUSO?**

SÃO CARLOS -SP
2025

Eloisa Hummer

Qual técnica de análise da comunidade de fitoplanctônica (Microscopia “clássica” ou Metabarcoding do 16S/18S) reflete melhor as variações ambientais de um reservatório multiuso?

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Hugo Sarmento

São Carlos - SP
2025

À minha família, que me deu todas as possibilidades de vida possíveis e me apoiou em minha escolha de ser quem sou, sempre me lembrando de que poderei reencontrar o caminho de casa, quando necessário.

AGRADECIMENTOS

A finalização de um ciclo para o reinício de outro é sempre um pouco assustadora. Não sabemos o que vamos encontrar e precisamos sempre de um pouco de sorte e coragem. Sorte para que não haja grandes desafios, mas, caso eles apareçam, coragem para enfrentá-los. Nesse ciclo da vida, percebi que não precisamos somente de sorte e coragem, mas também de companheirismo, o que, por sorte da vida, encontrei. Assim, início minha lista de agradecimentos, que, por muita sorte, é longa.

Sou especialmente grata às duas pessoas que a graduação me possibilitou conhecer e ter como amigas: Mariana Tardio Depintor, a quem tenho presente ao meu lado nas mais diversas faces da vida; e Julia Ghidelli, que, pelo andar da vida, acabei perdendo laços, mas que se mantém presente a seu modo.

Aos meus companheiros de iniciação científica, Daniel Guido e Israel Cassiano, que me receberam e, por compartilharmos do mesmo neurônio, vivemos coisas incríveis ao solucionar grandes sagas. Todos os momentos compartilhados moldaram minha experiência de forma positiva, e espero carregar sempre um pouco de nossa ousadia, curiosidade e lealdade.

À Paula Huber e Clara Arboleda-Baena, que, de todos os suportes que me deram, o mais importante foi mostrarem, no dia a dia, que é possível ser pessoas reais e, ainda assim, ser gigantes.

À minha psicóloga, que me ajudou a entender quem sou e de onde vim. O “para onde vou” acredito estar construindo no dia a dia, pouco a pouco, para não correr o risco de me perder ou me enganar. Mas, Ana, você me ajudou a entender o quanto sou digna.

Aos meus amigos de laboratório, que ao ultrapassar a barreira se tornaram amigos de vida, Rafael Araújo, Edna Calpa, Larissa Broggio, Lucas Teixeira, Julia Cossari e Eduardo. Obrigada pelos momentos de trabalho, seja em campo, laboratório ou com os dados e aos momentos de descontração compartilhados na salinha e para além dela no crochê, jogos de tabuleiro e uma equipe de natação amadora.

Um agradecimento especial a todas as pessoas que em algum momento participaram do Observatório Microbiano do Reservatório do Broa (BroaMO) seja em campo, laboratório ou no processamento de dados. Em conjunto tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio à realização desta pesquisa de Iniciação Científica (processo nº 2023/13394-9).

E, por fim, ao Professor Hugo Sarmiento, que por sua tamanha grandeza faz de todas as palavras pequenas demais. Posso dizer que a experiência de ser sua orientanda com certeza remodelou positivamente minha experiência como estudante e profissional. Aprendi para além da orientação nos momentos de conversas e distrações no dia a dia.

RESUMO

O fitoplâncton, composto por organismos microscópicos fotossintéticos procariontes e eucariontes, desempenha papéis fundamentais nos ciclos biogeoquímicos e é base das teias tróficas em ecossistemas aquáticos. Além disso, por responder às mudanças ambientais, atuam como indicadores da qualidade da água. Estudos comparativos mostraram que as análises de comunidades de fitoplâncton através da observação de caracteres morfológicos em microscópio óptico invertido (método “clássico”), ou metabarcoding através do sequenciamento de amplicons de 18S (que captura a fração eucarionte) e 16S (que captura procariontes como cianobactérias, mas também cloroplastos de eucariontes autotróficos), podem ser utilizados no monitoramento de ecossistemas aquáticos. No entanto, métodos diferentes podem descrever o ambiente de formas diferentes, e determinar qual é o mais adequado para o monitoramento do ambiente aquático permanece um desafio. Neste estudo, foram utilizados dados obtidos por microscopia e sequenciamento de amplicons de 16S e 18S de 60 amostras coletadas mensalmente pelo Observatório Microbiano do Reservatório do Broa/Lobo (BroaMO). A dinâmica na composição da comunidade foi estudada e relacionada com as variáveis ambientais através de análise multivariada. Os três métodos foram comparados para verificar qual prediz melhor a dinâmica do ambiente aquático e a qualidade da água. A hipótese central é que os métodos fornecem informações distintas quanto à composição e abundância das espécies. Embora o método molecular forneça um maior nível de detalhamento em relação à abundância e à dinâmica das comunidades, a microscopia se sobressai na descrição do ambiente e na explicação das variações ambientais. Portanto, conclui-se que cada abordagem retrata o ambiente de forma distinta dentro de suas limitações e que a combinação entre métodos tradicionais e moleculares pode aprimorar a análise da comunidade com uma visão mais abrangente e precisa de sua dinâmica e respostas às variações ambientais.

Palavras chaves: amplicons, metabarcoding, microscopia, monitoramento ambiental, águas continentais, qualidade da água, bioindicadores.

ABSTRACT

Phytoplankton, composed of photosynthetic prokaryotic and eukaryotic microorganisms, play fundamental roles in biogeochemical cycles and form the base of aquatic food webs. Because phytoplankton responds rapidly to environmental shifts, they serve as effective indicators of water quality. Comparative studies have shown that phytoplankton community analyses based on morphological identification under an inverted optical microscope (the “classical” method) or on metabarcoding of 18S amplicons (targeting eukaryotes) and 16S amplicons (targeting prokaryotes such as cyanobacteria, but also chloroplasts of autotrophic eukaryotes) can both be applied for aquatic ecosystem monitoring. However, different methods likely depict the environment in distinct ways, and determining which approach is most suitable for assessing aquatic environmental dynamics remains a challenge. In this study, microscopy and sequencing data were obtained from 60 samples collected monthly by the Broa/Lobo Reservoir Microbial Observatory (BroaMO). Community composition dynamics were examined and related to environmental variables using multivariate analyses. The three methods were compared to evaluate which one best captures the dynamics of the aquatic environment and water quality. The central hypothesis is that each method provides different insights into species composition and abundance. Although molecular approaches offer higher resolution regarding community abundance patterns and temporal dynamics, microscopy proved more effective in describing environmental conditions and explaining environmental variability. Thus, we conclude that each approach portrays the environment differently within its methodological limitations, and that integrating traditional and molecular methods can enhance community analyses by providing a broader and more accurate understanding of phytoplankton dynamics and their responses to environmental change.

Keywords: amplicon sequencing, metabarcoding, microscopy, environmental monitoring, freshwater systems, water quality, bioindicators.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. HIPÓTESE | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1. GERAL | 13 |
| 2.2. ESPECÍFICOS | 13 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 3.1. LOCAL DE ESTUDO | 13 |
| 3.2. AMOSTRAGEM E MEDIDAS EM CAMPO | 14 |
| 3.3. ANÁLISES EM LABORATÓRIO | 15 |
| 3.4.1. PROCESSAMENTO METABARCODING | 16 |
| 3.4.2. AMPLICONS DO 16S | 16 |
| 3.4.3. AMPLICONS DO 18S | 17 |
| 4. RESULTADOS | 17 |
| 4.1. PARÂMETROS | 17 |
| 4.2. ABUNDÂNCIA RELATIVA | 18 |
| 4.3. GÊNEROS EXCLUSIVOS-COMPARTILHADOS DETECTADOS NAS ABORDAGENS DE SEQUENCIAMENTO E MICROSCOPIA | 20 |
| 4.4. ÍNDICES DE RIQUEZA, DIVERSIDADE E EQUITATIVIDADE | 22 |
| 4.5. ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA BASEADA EM DISTÂNCIA (dbRDA) | 23 |
| 4.6. INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS PELOS DIFERENTES MÉTODOS | 25 |
| 4.7. PROPORÇÃO ACUMULADA DA VARIÂNCIA EXPLICADA PELOS EIXOS NA ANÁLISE dbRDA | 26 |
| 5. DISCUSSÃO | 27 |
| 6. CONCLUSÃO | 30 |
| 7. REFERÊNCIAS | 31 |

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

dbRDA - Análise De Redundância Baseada Em Distância

DOC - *Dissolved Organic Carbon* (Carbono Orgânico Dissolvido)

IZM - *Photosynthetically Active Radiation at the surface* (Irradiância no Fundo da Zona de Mistura)

OSS - *Organic Suspended Solids* (sólidos orgânicos em suspensão)

OD - *Dissolved oxygen* (oxigênio dissolvido)

TP - *Total phosphorus* (fósforo total)

VIF - Fator de Inflação da Variância

1. INTRODUÇÃO

Presente em praticamente todos os ambientes aquáticos, o fitoplâncton constitui a base da cadeia alimentar, garantindo o fluxo de energia, a circulação da matéria e os ciclos biogeoquímicos. Caracterizados por um curto ciclo de vida e elevada taxa reprodutiva, as comunidades de fitoplâncton são reguladas tanto por fatores abióticos como interações bióticas, os quais interferem na composição, diversidade, abundância e biomassa local (Reynolds, 2006; Li *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2022).

Devido a sua sensibilidade às variáveis ambientais, o fitoplâncton pode ser utilizado como parâmetro para análise da qualidade da água, sendo indicador das condições ecológicas, físicas e químicas ou do estado trófico, uma vez que sua dinâmica é regulada por tais processos (Reynolds, 2006; Wetzel, 2001).

Os reservatórios de água doce, além de fornecerem água para geração de energia, possuem múltiplos usos direcionados para o consumo humano, pesca, irrigação, e, muitas vezes, são áreas com espaços de lazer e turismo (Znachor *et al.*, 2020; Tundisi; Tundisi., 2013), tornando-se locais expostos a perturbações antrópicas. Portanto, o monitoramento da qualidade da água é de suma importância para viabilizar os seus diferentes usos.

O estudo do fitoplâncton fornece informações sobre o ecossistema e sua dinâmica, sendo um dos principais agentes que afetam a qualidade da água, a saúde do ecossistêmica e a saúde humana (Pomati *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2021). A formação de florações ou *blooms* (proliferação rápida e descontrolada do fitoplâncton devido à entrada de nutrientes em excesso no sistema), geralmente associado ao processo de eutrofização, pode levar à depleção do oxigênio, alteração de teias alimentares, redução da diversidade de espécies e a mortalidade de peixes e outros organismos aquáticos (Smith; Schindler, 2009; Chen *et al.*, 2015; Huisman *et al.*, 2018). Além disso, há a possibilidade da contaminação da água, pois algumas cianobactérias sintetizam toxinas que causam doenças hepáticas, digestivas e neurológicas (Huisman *et al.*, 2018). Assim, a identificação dos organismos que compõem a comunidade fitoplanctônica e das suas relações com os fatores ambientais é fundamental e necessária para o monitoramento e manutenção da qualidade da água (Crossetti *et al.*, 2008; Draredja *et al.*, 2019; Shevchenko *et al.*, 2022).

Diferentes abordagens têm sido aplicadas no estudo do fitoplâncton no ambiente aquático. A análise da clorofila *a* possibilita a quantificação da biomassa, sendo uma das variáveis mais frequentemente utilizadas em programas de monitoramento ambiental (Pinto *et al.*, 2001). Esse método é indicado para acompanhar as alterações da biomassa do fitoplâncton frente às condições ambientais variadas (Kruk *et al.*, 2017), mas não permite a identificação da composição das espécies, suas características ecológicas e potencial de toxicidade, que fornecem informações essenciais sobre o estado ecológico do ecossistema (Hillebrand *et al.*, 1999; Parésys *et al.*, 2005). A microscopia óptica permite uma abordagem quantitativa e qualitativa, pois é realizada a identificação e o reconhecimento de aspectos morfológicos de cada espécie ou grupo (Soares *et al.*, 2011). Há ainda a possibilidade de reconhecer períodos adversos, visto que o fitoplâncton tem plasticidade fenotípica alterando e adaptando a sua morfologia, fisiologia e comportamento como resposta às condições ambientais estressantes (Morabito *et al.*, 2007; Anneville *et al.*, 2018; Kwon *et al.*, 2022) que são visíveis neste tipo de análise.

Porém, a análise do fitoplâncton através da microscopia tem algumas limitações, como a dificuldade na identificação de espécies muito pequenas, a dificuldade de identificar o picofitoplâncton <2 μm (Rutten *et al.*, 2005; Brewin *et al.*, 2014) e a diferenciação de espécies crípticas (Liu *et al.*, 2020). Além disso, as análises são demoradas e dependem muito da expertise do operador (cada vez mais escassos) na identificação correta das espécies (Maki *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020).

A abordagem molecular, como o metabarcoding, envolve o sequenciamento de uma pequena região do DNA taxonomicamente informativa (amplicons) que é amplificada, sequenciada e identificada. Esta abordagem difere de acordo com o tipo organismos a serem estudados, sendo utilizadas regiões hipervariáveis do gene 18S rRNA para o estudo de organismos eucariontes, e o gene 16S rRNA para organismos procariontes, mas também cloroplastos de eucariontes autotróficos (Pierella-Karlusich *et al.*, 2023).

A utilização de técnicas de metabarcoding em estudos de monitoramento ambiental, chamada de monitoramento 2.0, vem sendo adotada cada vez mais em vários países (Liu *et al.*, 2020; Brown *et al.*, 2021; Schallenberg *et al.*, 2021;). Entre suas vantagens desse método são o nível de detalhe taxonômico obtido, com a capacidade de reconhecer variantes de uma mesma espécie, subespécies e a

diferenciação de espécies crípticas, sem a necessidade de um exímio conhecimento taxonômico, a possibilidade de escalar o procedimento para uma grande quantidade de amostras e baixar o custo, e a rapidez na análise (John *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2014; Bukin *et al.*, 2023).

No entanto, também existem limitações nas técnicas moleculares, sendo a principal a falta de sequências com anotação correta nos bancos de dados (Xiao *et al.*, 2014), sobretudo quando as sequências têm como origem a água doce (Eiler *et al.*, 2013), o que impossibilita a identificação de algumas espécies, independentemente da abundância. Além disso, o número de cópias da região amplificada varia, podendo causar a superestimação de alguns grupos de organismos, como os dinoflagelados (Maki *et al.*, 2017; Pierella-Karlusich *et al.*, 2023). Outra limitação está relacionada ao conhecimento de diferentes domínios da árvore da vida, como o caso do fitoplâncton, que contém espécies eucariontes, mas também cianobactérias (procariontes), sendo necessário utilizar diferentes marcadores moleculares, o que aumenta consideravelmente os custos.

Apesar de estudos anteriores terem comparado a eficiência dessas diferentes técnicas na detecção de espécies, ainda não foi avaliado como cada uma delas pode oferecer visões ecológicas distintas e informar sobre a integridade do ecossistema (Eiler *et al.* 2013; Xiao *et al.*, 2014; Bazin *et al.*, 2014; Obertegger *et al.*, 2020; Malashenkow *et al.*, 2021; Hanžek *et al.*, 2023).

Considerando que os métodos descrevem o fitoplâncton de formas distintas, cada um com suas vantagens e limitações, este estudo se propôs a investigar qual abordagem reflete melhor as variações ambientais no biomonitoramento de ambientes aquáticos. Com o objetivo da investigação sendo comparar os métodos e avaliar sua capacidade de relacionar os dados fitoplanctônicos com parâmetros ambientais, superando a limitação de estudos anteriores que se restringem apenas à comparação da diversidade e composição das comunidades pelos diferentes métodos, sem relacionar os dados obtidos com os parâmetros ambientais.

1.1. HIPÓTESE

Cada método irá descrever a comunidade fitoplanctônica de forma distinta em termos de composição, abundância e diversidade dos gêneros. Com isso supõe-se que a proporção de variância nos parâmetros ambientais explicada pelas técnicas não será equivalente e a percepção das respostas da comunidade de fitoplâncton às variações se modificará conforme a técnica utilizada, gerando interpretações distintas sobre a dinâmica ecológica.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Determinar qual técnica de análise da dinâmica da comunidade de fitoplâncton (microscopia “clássica”, ou metabarcoding do 16S para captura de cianobactérias e cloroplastos e 18S para captura eucariotos) reflete melhor as variações ambientais de um reservatório multiuso, com intuito de verificar qual pode ser melhor aplicado ao monitoramento.

2.2. ESPECÍFICOS

- a.** Avaliar a diversidade e abundância das espécies utilizando diferentes técnicas.
- b.** Avaliar qual a proporção de variância nos parâmetros ambientais explicada pelas diferentes técnicas
- c.** Identificar mudanças na percepção das respostas da comunidade de fitoplâncton às variações ambientais, quando avaliado por técnicas diferentes de microscopia e molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE ESTUDO

O reservatório do Lobo está localizado no município de Itirapina no Estado de São Paulo com uma área superficial total de 6,8 km² (Tundisi; Matsumura-Tundisi, 2013) (Figura 1). A represa foi construída em 1936 com o objetivo de funcionar como reservatório de Usina Hidrelétrica Carlos Botelho. No entanto, com a construção de grandes complexos hidrelétricos, os reservatórios pequenos como Represa Lobo perderam tal função, e atualmente, se tornou um espaço multiuso com áreas residenciais, recreativas e campo de pesquisa. Como objeto de pesquisa, foi e continua sendo fonte de diversos dados para os mais variados temas, abrigando uma variedade de campos para coleta de dados (Chalar, Tundisi, 2001; Mansano *et al.*, 2014; Pompei *et al.*, 2020) e sendo um local de referência. No presente momento, é mantido um Observatório Microbiano (BroaMO) pelo Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos do Departamento de Hidrobiologia (DHb). Os dados utilizados nesta pesquisa são oriundos das coletas e processamentos realizados pelo Observatório BroaMO.

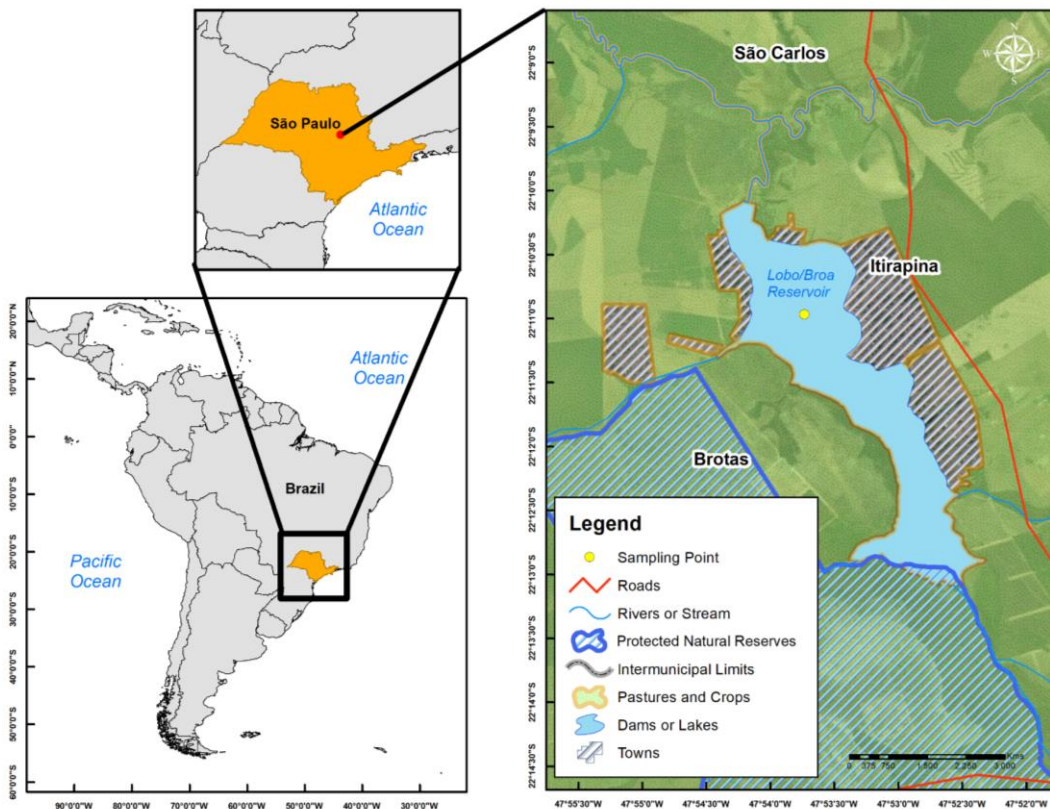


Fig. 1. Localização do Reservatório do Lobo e ponto de amostragem.

3.2. AMOSTRAGEM E MEDIDAS EM CAMPO

A amostragem foi realizada mensalmente, em um período de 5 anos (de março/2018 a março/2023) totalizando 60 amostras. Os parâmetros limnológicos foram coletados diretamente na superfície da represa com auxílio da sonda multiparamétrica HORIBA modelo U-50. Foram coletados 20 litros de água para posterior análises realizadas em laboratório. Os dados meteorológicos foram obtidos através do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO), referentes ao período e à localização da amostragem.

3.3. ANÁLISES EM LABORATÓRIO

Para a análise da fração orgânica dos sólidos totais em suspensão (OSS), foi utilizado filtro GF-3 (poro 0.6 μm , 47 mm de diâmetro, Macherey-Nagel) calcinados em forno mufla a 450°C por 4 horas, processo realizado para eliminar a matéria orgânica presente no filtro evitando interferência no resultado final. Após o processo, os filtros foram pesados (P0) e identificados previamente à coleta. Para realização da filtração foram utilizados 500 ml de amostra e, posteriormente, o filtro foi armazenado em papel alumínio e congelado em freezer -20°C. Com os filtros previamente secos e pesados (P1) foram colocados em forno mufla a 500 °C por 3 horas para a combustão da matéria orgânica. Em seguida, foram novamente pesados (P2). O valor do sólido orgânico em suspensão foi obtido pela diferença entre P1 e P2, correspondente à massa da matéria orgânica queimada.

A irradiância fotossinteticamente ativa na superfície (I_0) foi estimada a partir da aplicação da lei de Beer-Lambert, utilizando-se a profundidade de transparência da água obtida pelo disco de Secchi. O coeficiente de atenuação difusa da luz (K_d) foi calculado pela relação $K_d = 1,7/\text{secchi}$, sendo então utilizado para estimar a intensidade luminosa na profundidade da zona de mistura (Z_m). A irradiância de cada profundidade foi calculada pela equação $I_z = I_0 \cdot e^{-K_d \cdot z}$, onde I_z representa a irradiância a uma profundidade z . Dessa forma, a irradiância no fundo da zona de mistura (I_{zm}) foi obtida considerando-se $z = Z_m$, expressa em $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Os dados referentes ao pH foram coletados utilizando pHmetro Analion modelo PM 608.

As amostras para microscopia foram coletadas, filtradas em funil com malha de 250 μm acoplada, fixada em solução de Lugol, e armazenadas para quantificação e

identificação com microscópio óptico com contagem e identificação dos organismos (Utermöhl, 1958).

Para análise de fósforo total (TP), amostras de água bruta foram armazenadas no freezer a -20°C até posterior análise realizada com a digestão da amostra e lidas em um sistema de cromatografia de íons Dionex ICS-1100 (Thermo Fisher).

Para análise de carbono orgânico dissolvido (DOC), uma alíquota de 60 ml era armazenada em frasco âmbar e fixada com 10 µL de ácido fosfórico, sendo mantida a 4°C até posterior análise no analisador Shimadzu TOC-VCPH.

Para análises moleculares, foram filtrados 150 ml de água em filtro policarbonato (poro 0,22 µm, diâmetro 47mm, GVS). A extração do DNA foi realizada utilizando Kit Qiagen® DNeasy PowerWater. O material foi amplificado nas regiões V3-V4 do gene 16S NGS 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) e 785R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) (Klindworth A et al. 2013) e o gene 16S rRNA para eucariontes TAREukFWD1 (5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3') e TAREukREV3 (TTTCGTTCTTGATYRA 5'-CA-3') (Stoeck *et al.*, 2010).

3.4. PROCESSAMENTO DOS DADOS MOLECULAR

3.4.1. PROCESSAMENTO METABARCODING

Os dados de metabarcoding foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq e processados usando o pipeline DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) para verificar qualidade, remoção de quimeras e atribuição taxonomia no software R (R core Team, 2024).

3.4.2. AMPLICONS DO 16S

Após o processamento realizado com DADA2 (Callahan *et al.*, 2016), a tabela resultante foi utilizada para realizar a atribuição taxonômica utilizando a ferramenta BLAST. Como base de dados foi utilizado o Phytoref (Decelle *et al.*, 2015) para identificação dos organismos eucariontes autotróficos a partir dos cloroplastos. E para identificação de cianobactérias foi utilizada a base de dados SILVA (Quast *et al.*, 2013). Em conjunto foi utilizado a base de dados Phytool V2 (Canino *et al.*, 2021) para identificação de ambos os grupos. Ao final, os resultados foram combinados para ter maior abrangência de informações com exclusão de identificações iguais para não ter duplicatas e manutenção dos grupos diferentes para ter complementação dos dados.

Em todo o processo de atribuições foi mantido somente as ASV com similaridade >97%.

3.4.3. AMPLICONS DO 18S

Para os dados de 18S, a atribuição taxonômica das ASV foi realizada usando a base de dados PR² (Guillou *et al.*, 2013), com a função DADA2 (Callahan *et al.*, 2016), novamente foi mantida somente ASV com similaridade >97%.

3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2022). Como definição os resultados estatisticamente significativos foram considerados somente os com valores de p inferior a 0,05.

Para avaliar diferenças na riqueza, equitatividade e índices de diversidade de Shannon e Simpson para cada método, foi aplicado o teste de Friedman. Quando observadas diferenças significativas, foram realizadas comparações par a par por meio do teste de Wilcoxon como análise pós-hoc.

A análise de z-score foi realizada para avaliar o comportamento relativo das variáveis entre as amostras. Após a padronização, os valores positivos de z-score indicam observações acima da média da variável, enquanto valores negativos representam observações abaixo da média.

As análises de Redundância Baseada em Distância (dbRDA - *Distance-based Redundancy Analysis*) foram executadas com o pacote Vegan (Oksanen *et al.*, 2022) utilizando função *capscale*, distância de bray-curtis, e variáveis padronizadas com a função *decostand* por *standardize*, Fator de Inflação da Variância (*vif.cca*) para verificar a colinearidade das variáveis ambientais com critério de VIF < 10, as variáveis colineares foram retiradas anterior ao início da execução do projeto.

Todas as análises foram feitas a nível de gênero para padronização.

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS

A Tabela 1 descreve os resultados dos parâmetros ambientais registrados mensalmente durante as saídas de campo realizadas no reservatório do Broa/Lobo ao longo do período 2018 a 2025, fornecendo uma visão geral das condições físicas e químicas do ambiente.

Tabela 01: Média, desvio padrão, mínimo e máximo dos valores dos parâmetros ambientais mensurados.

| Parameters | Mean | SD | Min | Max |
|---|--------|--------|--------|------|
| Dissolved Organic Carbon (mg/L) | 5.52 | 5.92 | 2.13 | 37.6 |
| Dissolved Oxygen (mg/L) | 9.29 | 3.31 | 4.68 | 21.1 |
| Organic Suspended Solids (mg/L) | 6.09 | 4.56 | 0.8 | 27.2 |
| pH | 6.70 | 0.57 | 5.27 | 7.9 |
| cvdfdrewPhotosynthetically Active Radiation at the surface ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 488.26 | 388.11 | 128.71 | 1602 |
| Total phosphorus (mg/L) | 33.41 | 11.27 | 15.17 | 73.5 |
| Water Temperature ($^{\circ}\text{C}$) | 24.27 | 3.01 | 18.78 | 28.9 |

4.2. ABUNDÂNCIA RELATIVA

Para entender a dinâmica da comunidade fitoplanctônica e visualizar como os diferentes métodos a descrevem foram feitos gráficos de densidade utilizando a abundância relativa para cada um dos métodos (Fig 2).

Nos dados de 16S, notamos a dominância de picocianobactérias, especialmente *Cyanobium*, com dominância total e picos recorrentes de abundância.

No 18S, com ausência de cianobactérias, observamos dominância do gênero *Cryptomonas*, que no 16S tem menor expressão, ao mesmo tempo que temos uma maior diversidade de grupos e uma distribuição mais equilibrada entre diferentes taxa de eucariotos, como *Aulacoseira*, *Dictyosphaerium* e *Mallomonas*. Além disso, notamos uma superestimação para o grupo dos Dinoflagelados (*Gymnodinium*, *Ceratium* e *Peridinium*) que não é vista na microscopia.

Na microscopia, que capta tanto eucariontes quanto procariontes, observa-se a dominância do gênero *Dolichospermum* (*Aphanizomenonaceae*) que também é

captada pelo 16S, sendo uma das mais dominantes. E uma interação entre os outros grupos mais sutis, tendo manchas de aparecimento, no início, de *Aphanocapsa*, *Botryococcus* e *Microcystis* com a última se mantendo até o final de modo descontínuo e picos de ocorrência do gênero *Raphidiopsis* em dois momentos distintos de ocorrência.

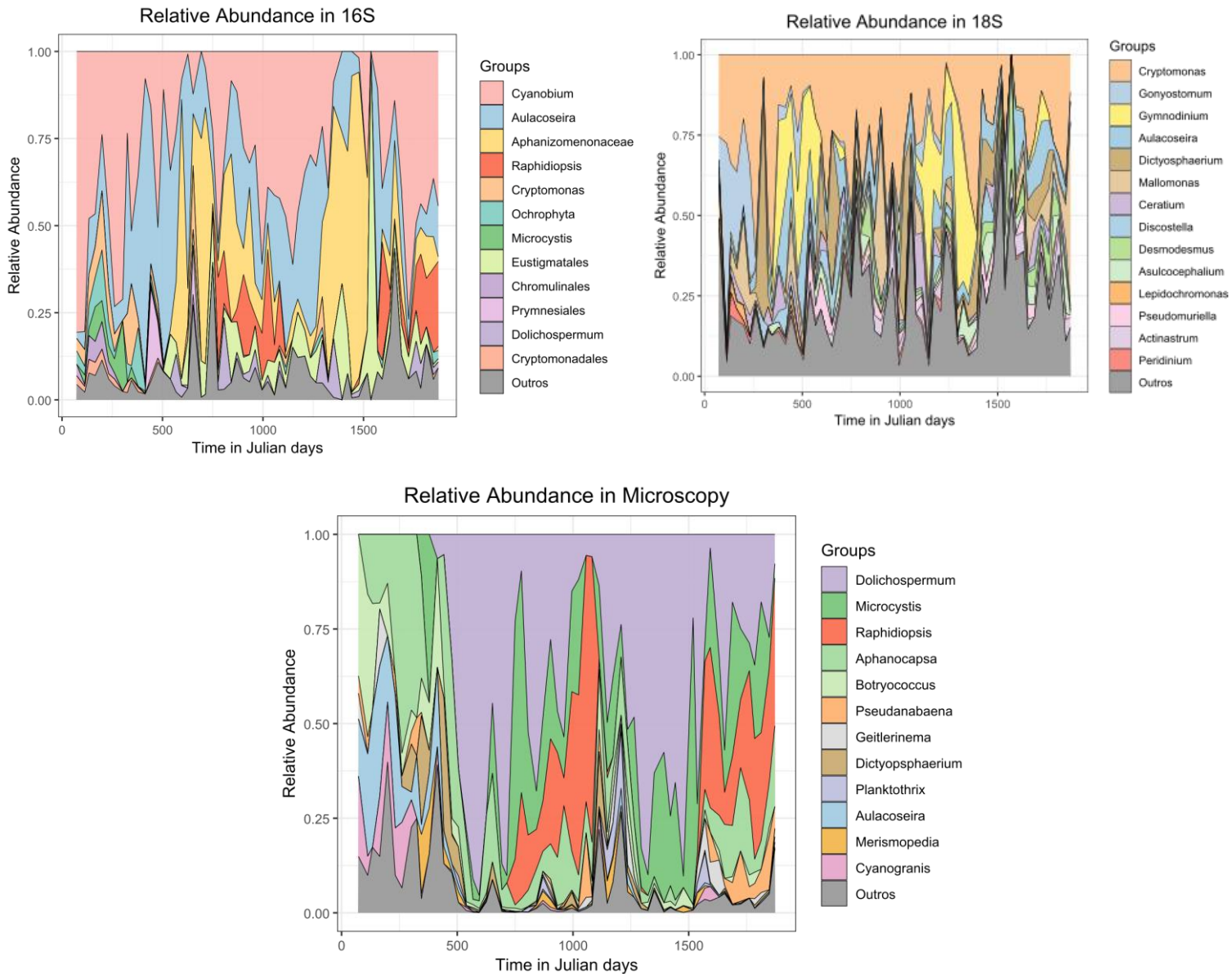


Fig 2. Abundância dos principais gêneros identificados ao longo do tempo para os métodos de 16S, 18S e microscopia, respectivamente. Os grupos iguais presentes em cada um dos gráficos possuem as mesmas cores e diferentes cores distintas.

4.3. GÊNEROS EXCLUSIVOS-COMPARTILHADOS DETECTADOS NAS ABORDAGENS DE SEQUENCIAMENTO E MICROSCOPIA

O diagrama de Venn (Fig. 3A) evidencia diferenças marcantes na detecção de gêneros de fitoplâncton entre os três métodos avaliados (16S, 18S e microscopia). Observou-se um conjunto reduzido de táxons compartilhados pelos três métodos, indicando baixa sobreposição entre as abordagens. A maior interseção ocorreu entre a microscopia e o marcador 18S com 20 gêneros compartilhados, sugerindo maior concordância entre essas técnicas na identificação de grupos eucarióticos. Em contraste, o 16S apresentou um conjunto substancial de gêneros exclusivos, refletindo sua sensibilidade para detectar cianobactérias não observáveis pela microscopia. Essas diferenças evidenciam como cada método captura porções distintas da comunidade fitoplanctônica.

O heatmap (Fig. 3B) evidencia diferenças claras no padrão de abundância relativa dos gêneros entre os métodos. O 18S apresentou maior variação nos valores padronizados (z-score), com destaque para picos positivos marcantes em gêneros com *Ceratium*, *Gymnodinium* e *Peridinium*, refletindo a tendência já observada de superestimação de dinoflagelados nessa abordagem. Em contraste, o 16S mostrou um padrão mais homogêneo, com poucas oscilações extremas, indicando predominância de grupos com abundâncias mais estáveis ao longo das amostras. Na microscopia, observou-se maior intensidade relativa dos gêneros *Planktothrix*, *Microcystis* e *Raphidiopsis*, que apresentaram valores positivos consistentes enquanto a maioria dos demais gêneros exibiu valores negativos ou próximos da média.

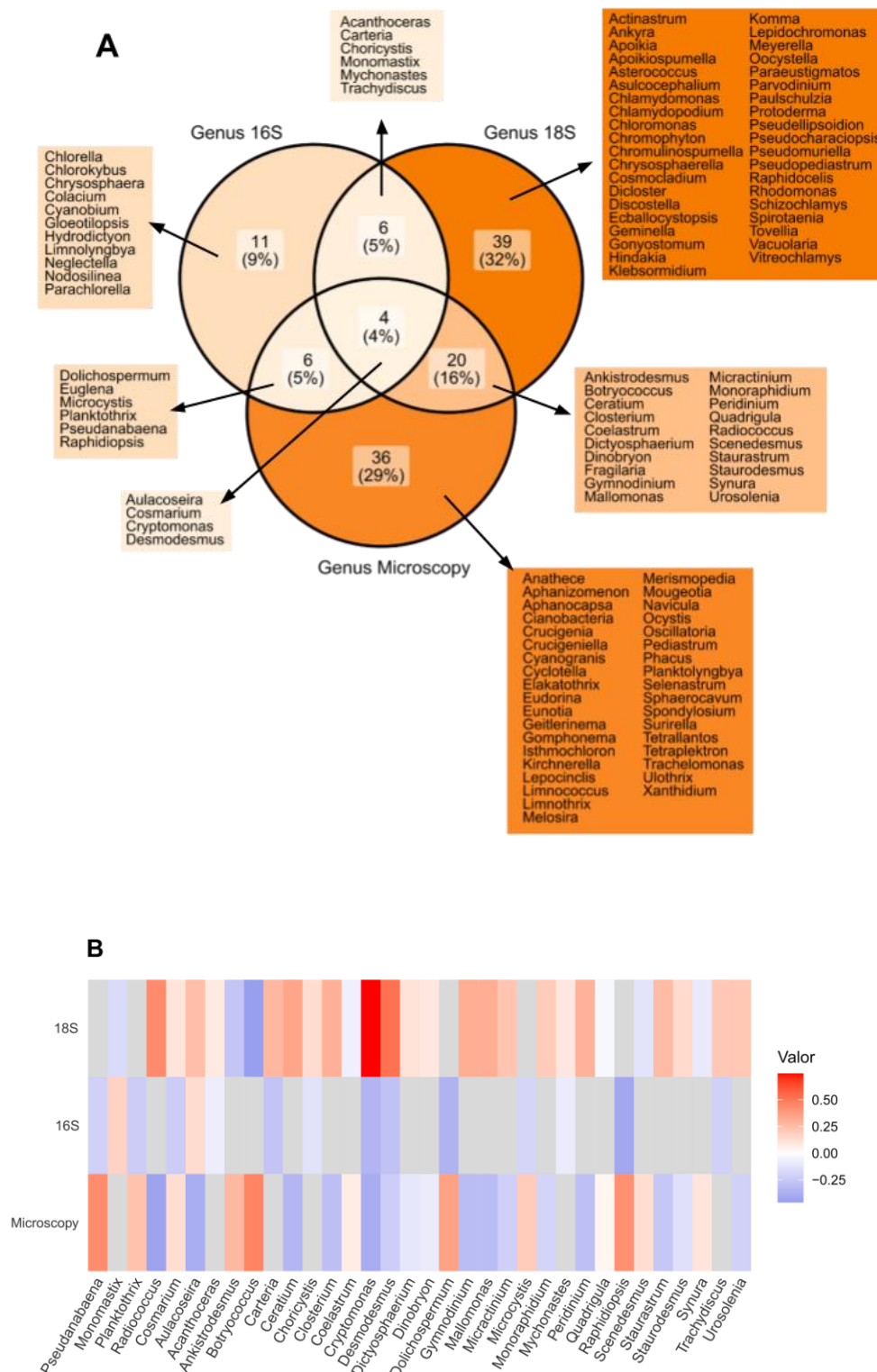


Fig 3. (A) Diagrama de Venn mostrando o número de gêneros compartilhados e exclusivos detectados pelos métodos 16S, 18S e microscopia. (B) Heatmap baseado em valores padronizados (z-score) representando a abundância relativa dos gêneros identificados por cada método, com cores variando de valores abaixo da média (azul) a acima da média (vermelho)

4.3. ÍNDICES DE RIQUEZA, DIVERSIDADE E EQUITATIVIDADE

A riqueza, uniformidade e índices de diversidade apresentaram diferenças significativas entre os métodos (Fig. 2). A riqueza de táxons foi significativamente maior nas amostras processadas por 18S, seguida por microscopia, enquanto o 16S apresentou os menores valores. Indicando que o marcador 18S é capaz de detectar um número mais amplo de táxons, refletindo em maior sensibilidade na identificação de organismos, mesmo que identifique somente eucariotos. Em relação à evenness, os métodos 16S e 18S apresentaram valores mais elevados e estatisticamente semelhantes, indicando comunidades mais equilibradas em termos de abundância dos táxons detectados, enquanto a microscopia mostrou menor uniformidade, sugerindo que, nas análises morfológicas, a comunidade é dominada por poucos táxons abundantes. Os índices de diversidade de Shannon e Simpson apresentaram padrões de 18S exibindo as maiores médias, seguindo por 16S e, por último, microscopia.

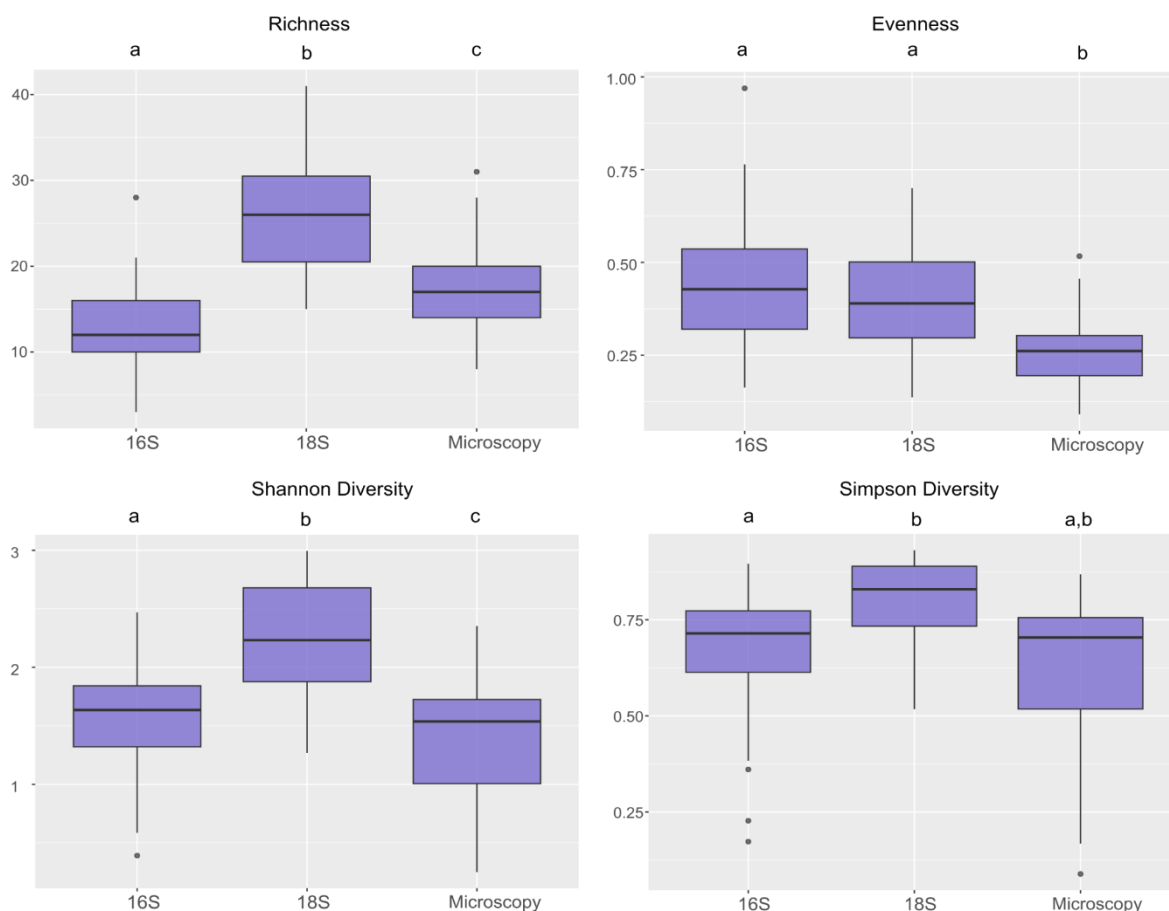
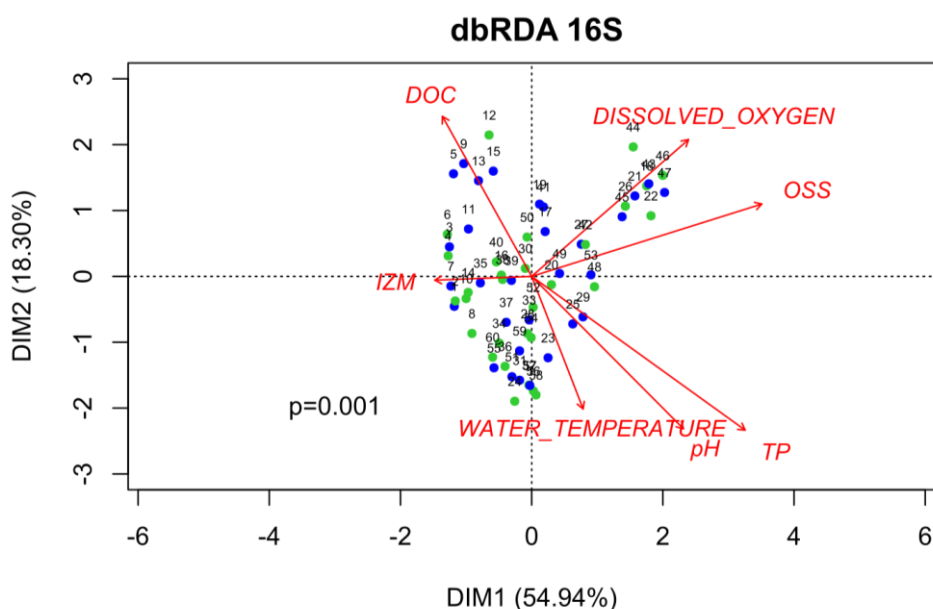


Fig 4. Cálculo de riqueza, equitatividade e índices de diversidade de Shannon e Simpson para cada um dos métodos. As letras indicam significância estatística ($p < 0.05$).

4.5. ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA BASEADA EM DISTÂNCIA (dbRDA)

As análises de dbRDA indicaram efeito significativo das variáveis ambientais sobre a estrutura das comunidades fitoplanctônicas em todos os métodos avaliados ($p < 0.001$). As variáveis ambientais não colineares selecionadas foram as mesmas para os três métodos, sendo elas: DOC, Izm, OD, OSS, pH, temperatura da água e TP, sendo que há diferenças em suas ordenações além da distribuição das amostras e explicabilidade dos eixos.

No 16S, os dois primeiros eixos explicaram 70,3% da variação total, com destaque para oxigênio dissolvido, DOC, OSS, TP e pH como variáveis mais correlacionadas com a ordenação. Para o 18S, os dois primeiros eixos explicaram 60,6% da variação, e as variáveis mais associadas à estrutura comunitária são IZM e TP em posições opostas comparadas ao 18S. Na microscopia, os eixos explicam 83,8% da variação total, com IZM e TP se sobressaindo, apresentando maior influência. Além disso, nos três métodos não é identificado uma tendência de divisão entre os períodos de chuva e seca, demonstrando ausência de sazonalidade no ambiente.



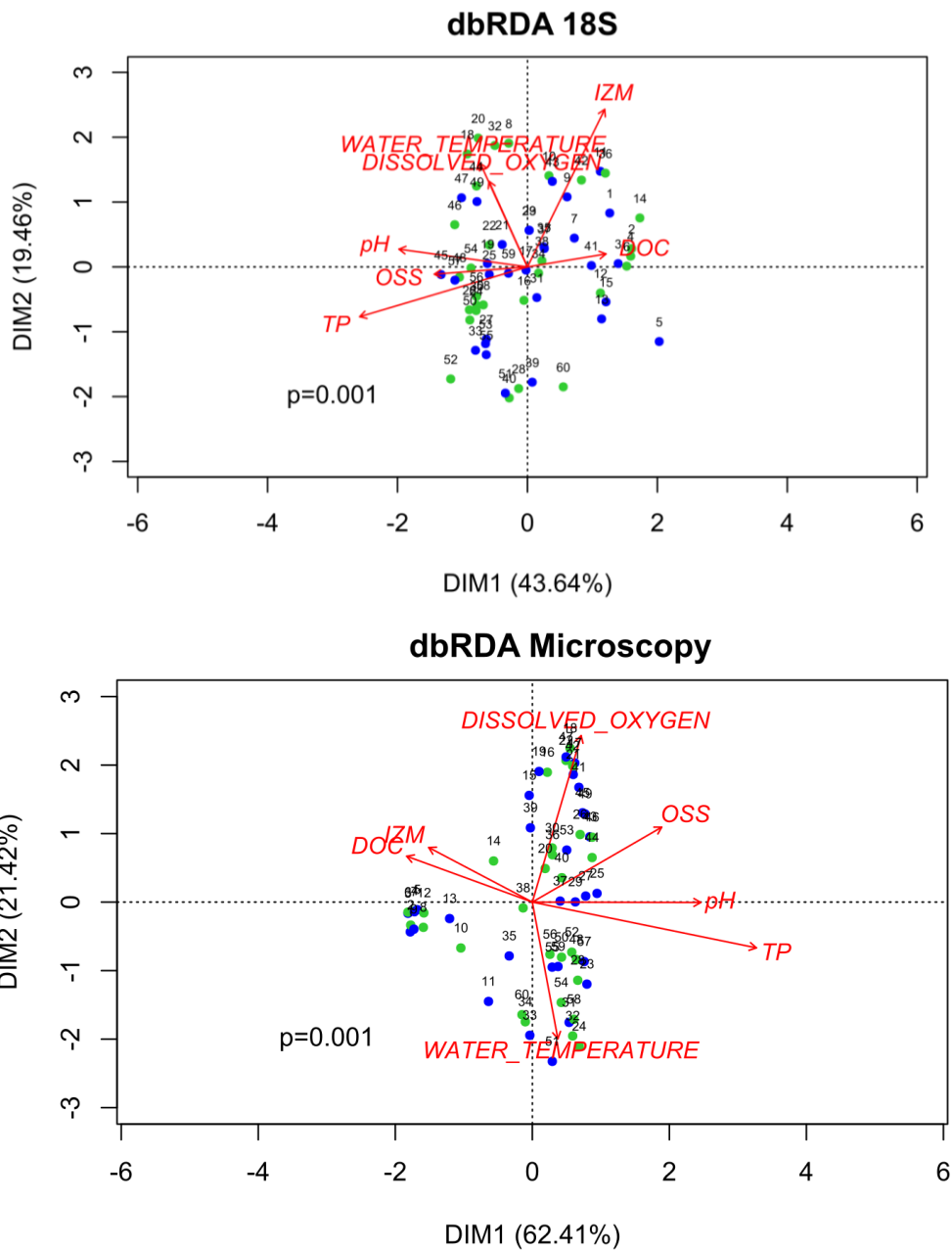


Fig 5. Análise de Redundância Baseada em Distância (dbRDA) para o nível taxonômico de gênero mostrando a relação entre variáveis ambientais e a estrutura da comunidade biológica. Os eixos representam as componentes principais da dbRDA, explicando a variação dos dados em função das variáveis ambientais. As setas indicam a direção e magnitude da influência das variáveis ambientais na distribuição das amostras. As análises foram realizadas para três métodos distintos: 16S, 18S e microscopia, respectivamente. A cor azul indica os momentos de chuva e verde seca.

4.6. INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS AMBIENTAIS PELOS DIFERENTES MÉTODOS

Os valores estatísticos F contribuem para a explicação da influência das variáveis na comunidade ilustrando a importância de cada variável na estruturação da comunidade permitindo identificar quais seriam relevantes moldando a composição e distribuição dos grupos. Ao compararmos os diferentes métodos notamos uma irregularidade nas variáveis ambientais que os influenciam. Observamos um aumento no número de variáveis explicativas na direção de 18S, 16S e microscopia com aumento também nos valores estatísticos F (fig. 6), que pode indicar maior força e detalhamento das variáveis ambientais seguindo a mesma ordem (18S, 16S e microscopia). Diminuindo a influência de fatores estocásticos e interações biológicas.

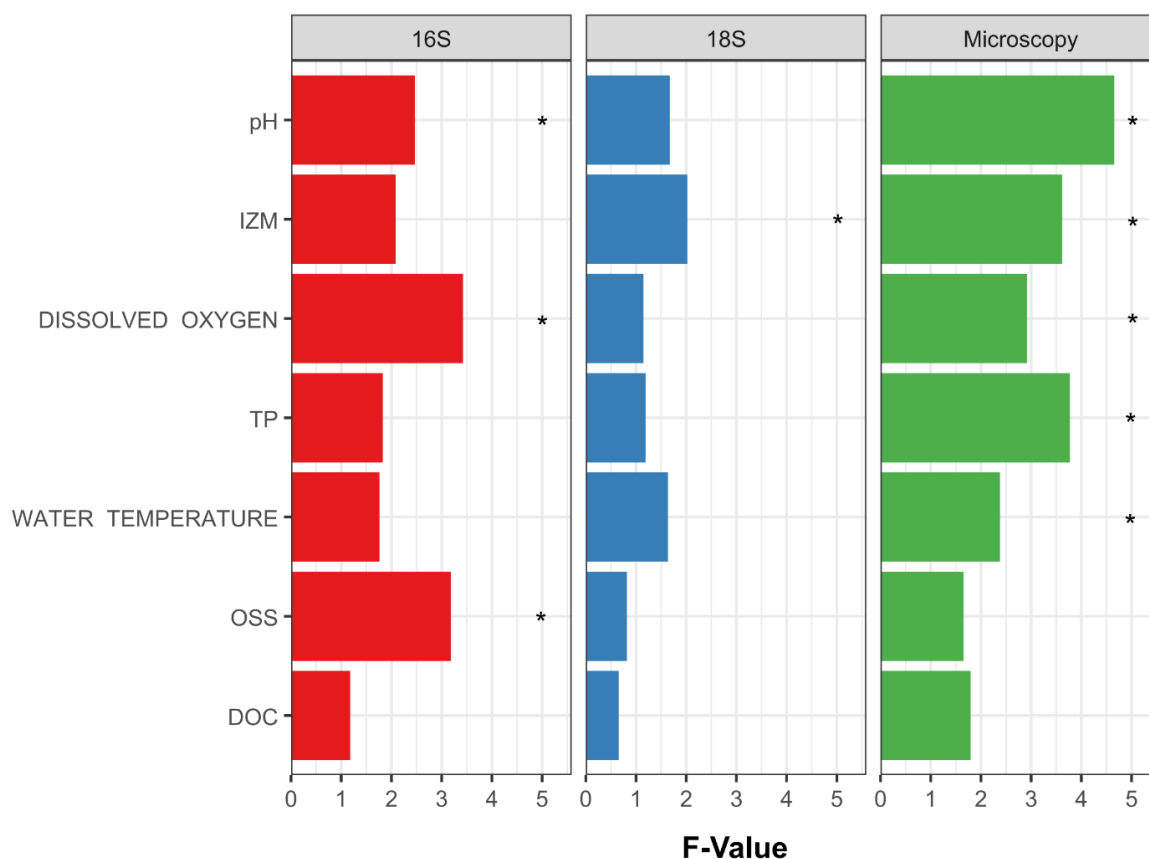


Fig 6. Valores do estatístico F para as variáveis ambientais analisadas dos três métodos distintos (16S, 18S e microscopia). Os gráficos mostram a influência das variáveis a nível de gênero. Valores de F mais altos indicam maior influência da variável na estruturação dos dados. Em vermelho é indicado o método de 16S, azul 18S e verde microscopia. Os asteriscos (*) indicam as variáveis estatisticamente significativas dentro de cada método.

4.7 PROPORÇÃO ACUMULADA DA VARIÂNCIA EXPLICADA PELOS EIXOS NA ANÁLISE dbRDA

A proporção acumulada da variância explicada pelos eixos resultantes da dbRDA indica que os métodos se diferenciam no detalhamento do ambiente, se fazendo necessário um maior número de eixos para o entendimento da comunidade e sua estrutura. A microscopia apresentou maior proporção de variância explicada pelos primeiros eixos, seguido de 16S e 18S. Nos três cenários, os dois primeiros eixos são responsáveis por mais de 60% da variação total, indicando que a maioria das respostas da comunidade fitoplanctônica às variáveis ambientais é capturada nos eixos principais. Porém, o método que fornece sempre o maior detalhamento é a microscopia (fig 7).

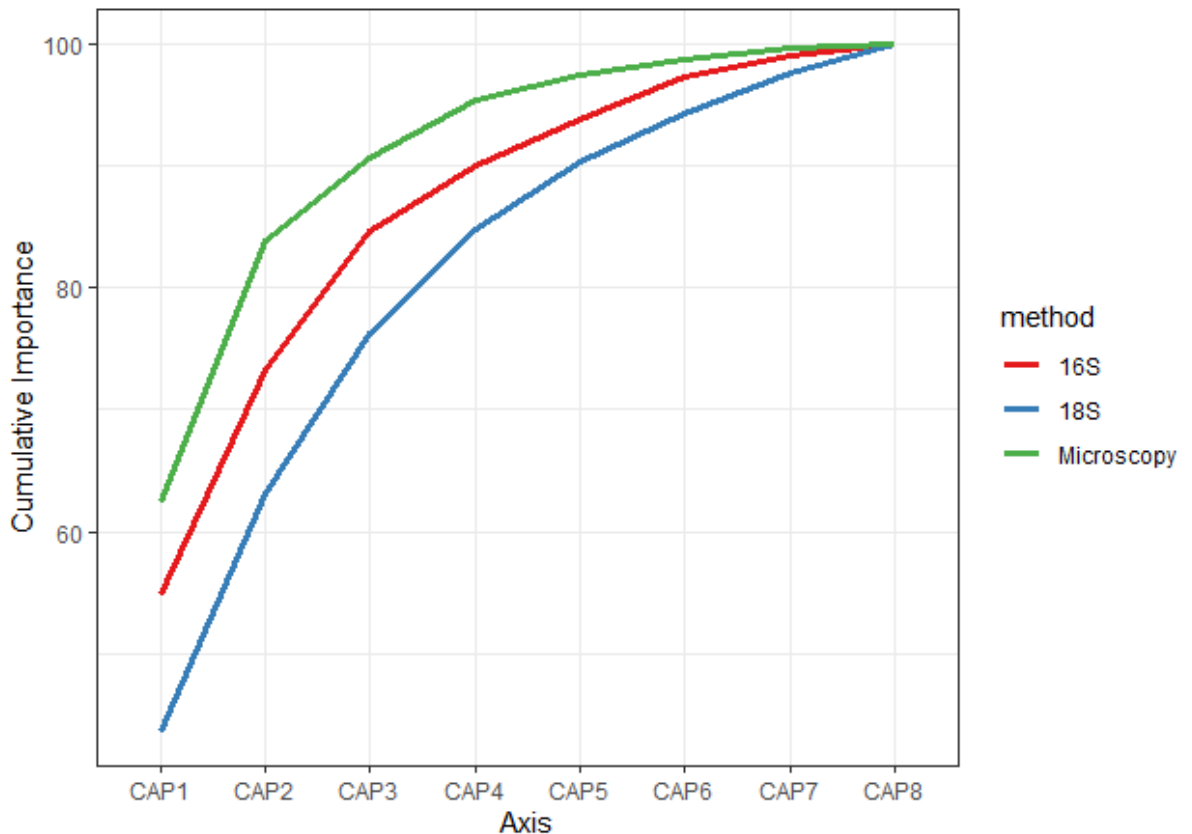


Fig 7. Proporção acumulada da variância explicada pelos eixos da dbRDA. Os gráficos mostram a variância explicada à nível de gênero, o eixo X representa os eixos da dbRDA (CAP1, CAP2, etc.), e o eixo Y representa a importância cumulativa da variância explicada. Em vermelho é indicado o método de 16S, em azul 18S e em verde microscopia.

5. DISCUSSÃO

As diferenças observadas entre os métodos refletem tanto suas limitações técnicas quanto o tipo de informação ecológica que cada abordagem é capaz de fornecer. Na dinâmica da comunidade (Fig. 2) utilizando o método de 16S, observamos as flutuações de cianobactérias e picocianobactérias exibindo um padrão dinâmico com alternância de dominância, ausência de ciclos previsíveis e expondo a capacidade de antecipação de períodos de florações, facilitando o monitoramento de *blooms* (Fig. 2). Por outro lado, são encontradas limitações na aplicação do método 16S relacionada à disponibilidade e à qualidade das bases de dados de referência para o 16S plastidial (das microalgas). A maioria dessas bases foram desenvolvidas voltadas para ambientes marinhos e de regiões temperadas do hemisfério norte, com pouca representatividade de ecossistemas de água doce tropicais (Decelle *et al.*, 2015; Canino *et al.*, 2021; Ramakodi, 2022; Gelis *et al.*, 2024). Essa lacuna limita a identificação taxonômica de muitos grupos, limita o monitoramento do ambiente ocultando grupos abundantes que ofereçam risco à qualidade da água.

Quanto ao método de 18S, a discrepância na quantificação dos gêneros *Gymnodinium*, *Ceratium* e *Peridinium* (Fig. 3B), pertencentes ao grupo dos dinoflagelados, ocorre devido ao grande tamanho do genoma do grupo. Essa característica amplifica o número de leituras nos métodos moleculares resultando na superestimação do grupo (Santoferrara *et al.*, 2020). Conseqüentemente, há um viés na quantificação, gerando erros na descrição da comunidade fitoplanctônica local. Ademais, a superestimação de dinoflagelados pode levar a um erro no entendimento do local, dando a falsa impressão de ocorrência de uma floração que não está acontecendo. Esse erro de percepção pode induzir conclusões incorretas sobre a qualidade da água, já que florações reais podem alterar sabor e odor da água, causar depleção de oxigênio, e, quando não controlada, impacta negativamente a dinâmica de outro fitoplâncton (Wiese *et al.*, 2010; Ewerts *et al.*, 2018; Amorim, *et al.*, 2021).

A microscopia expõe uma limitação na identificação de picocianobactérias, que tendo um tamanho em torno de 0,2 a 2,0 μm , são imperceptíveis e indiferenciáveis em microscopia invertida (Rutten *et al.*, 2005; Brewin *et al.*, 2014). Essa limitação interfere diretamente no monitoramento e garantia da qualidade da água, uma vez que se perde uma parte importante da comunidade, que é muito relevante principalmente em ambientes tropicais (Sarmiento, 2012).

Por outro lado, a microscopia obteve um bom resultado na identificação de grupos de cianobactérias que oferecem risco ao ambiente, uma vez que se sobressai na identificação e quantificação dos grupos *Planktothrix* (Kurmayer *et al.*, 2005), *Microcystis* (Dawson, 1998; Rastogi *et al.*, 2014) e *Raphidiopsis* (Wu *et al.*, 2022) frente ao molecular do 16S (Fig. 3B).

Através dos índices de riqueza, diversidade e equitabilidade (Fig. 4) corroboramos o maior poder de resolução dos métodos moleculares, detectando tanto os organismos dominantes quanto raros. Enquanto a microscopia mantém a tendência de subestimar a presença de táxons menos abundantes ou de difícil identificação e diferenciação morfológica em microscopia (Simunovic *et al.*, 2023; Mikhailov *et al.*, 2025). De modo geral, os resultados mostram que as estimativas de diversidade variam conforme o método utilizado, com os marcadores moleculares revelando uma estrutura comunitária mais diversa e equilibrada, enquanto a microscopia enfatiza grupos morfológicamente dominantes, dando luz a um ambiente mais homogêneo e estável.

A análise multivariada (Fig. 5), evidencia que há variações na estrutura da comunidade conforme o método utilizado. Apesar das variáveis selecionadas serem as mesmas, a ordenação e importância em conjunto com a distribuição da comunidade são diferentes.

A única convergência encontrada é a ausência de um padrão na distribuição das amostras na análise, o que demonstra a ausência de sazonalidade no ambiente. Essa é uma característica comumente observada nos trópicos, que diferente de regiões temperadas não são demarcadas por sazonalidade, mas provavelmente por ciclos plurianuais de longo prazo (Rugema *et al.*, 2019).

As diferenças observadas nos valores estatísticos F (Fig. 6) entre os métodos indicam que a força e o número de variáveis ambientais associadas à comunidade variam conforme a abordagem. Essa variação reflete as particularidades de como cada método retrata o ambiente e capta diferentes níveis de resposta ecológica. No 16S, há influência significativa das variáveis pH, oxigênio dissolvido (OD) e sólidos orgânicos em suspensão (OSS), indicando que a comunidade microbiana detectada por essa abordagem responde fortemente a gradiente físico-químicos que influenciam no metabolismo e fotossíntese. A associação com o OD e OSS sugere uma comunidade dominada por cianobactérias e outros organismos fotossintéticos

adaptados a ambiente com flutuações na disponibilidade de luz e nutrientes (Paruch *et al.*, 2020; Barjau-Aguilar *et al.*, 2025).

No 18S, a resposta é mais ampla, com demasiada importância da irradiância no fundo da zona de mistura (I_{ZM}), sugerindo uma comunidade eucariótica mais heterogênea. Essa diversidade de respostas pode estar associada à presença de organismos além de autotróficos, os mixotróficos, em que a abundância é dependente de um complexo de fatores e pressões ambientais que são generalizados pela irradiação local (Dobbertin da Costa *et al.*, 2024)

Na microscopia, temos os maiores valores de F e a maior quantidade de significâncias. Sendo o método mais representativo das condições ambientais predominantes, As variáveis como pH, irradiância no fundo da zona de mistura, oxigênio dissolvido e fósforo total se destacaram, refletindo uma resposta da comunidade ao gradiente físico-químico e a disponibilidade de nutrientes no ambiente que são importantes modeladoras da composição fitoplanctônica.

Na variância explicada pelos eixos (Fig. 7), em ambos os métodos moleculares há necessidade de um maior número de eixos para representar adequadamente o ambiente, refletindo maior resolução taxonômica e sensibilidade desses métodos, capazes de detectar grupos raros ou menos abundantes (Simunovic *et al.*, 2023; Mikhailov *et al.*, 2025) (Fig. 2; Fig. 3B) como respostas às condições ambientais sutis. Embora haja uma distribuição mais gradual da variância com a necessidade de maior número de eixos para se ter maior detalhamento, pode haver um excesso de informação, tornando a interpretação altamente complexa devido à alta dimensionalidade. Por outro lado, na microscopia observamos a variância acumulada rapidamente explicada (Fig. 7), sugerindo que ainda é o método mais eficaz em representar os principais gradientes ambientais que estruturam a comunidade, principalmente quando somamos aos resultados obtidos na influência das variáveis ambientais (Fig. 6). No entanto, a grande explicabilidade encontrada no método em um menor número de eixos ao mesmo tempo que facilita a interpretação e entendimento do ambiente, pode levar a simplificação demasiada de informação e gerar superficialidade na análise.

6. CONCLUSÃO

De modo geral, os resultados demonstram que há uma diferença na forma como cada método percebe e reflete as variações ambientais. A comparação entre microscopia, 16S e 18S revela que cada abordagem fornece uma perspectiva distinta, porém complementar, sobre composição, diversidade e a organização das comunidades no ambiente de água doce tropical.

Os métodos moleculares demonstraram maior capacidade de resolução taxonômica, detectando organismos raros e grupos subestimados pela microscopia. Tal sensibilidade ampliada permitiu captar respostas ecológicas associadas a gradientes físico-químicos sutis, refletindo uma estrutura comunitária mais diversa, complexa e ecologicamente responsiva. No entanto, as lacunas relacionadas à base de dados, e o viés de superestimação de dinoflagelados no 18S, mostram que interpretações devem ser feitas com precaução.

A microscopia, ainda se destaca na robustez e confiabilidade para grupos morfológicamente característicos, como cianobactérias. E, apesar de subestimar a diversidade, ela capturou com maior clareza os principais gradientes que estruturam a comunidade, entregando uma percepção mais sintética do ambiente que, embora menos detalhada, mantém forte aplicabilidade para o monitoramento.

Por fim, os resultados confirmaram que a combinação entre métodos tradicionais e moleculares pode aprimorar consideravelmente a análise da comunidade fitoplanctônica, fornecendo uma visão mais abrangente e precisa de sua dinâmica e das respostas às variações ambientais.

7. REFERÊNCIAS

AMORIM, C. A.; MOURA, A. N. Ecological impacts of freshwater algal blooms on water quality, plankton biodiversity, structure, and ecosystem functioning. *Science of The Total Environment*, v. 758, p. 143605, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143605>

ANNEVILLE, O. et al. Plasticity in phytoplankton annual periodicity: An adaptation to long-term environmental changes. *Hydrobiologia*, v. 824, n. 1, p. 121-141, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3412-z>

BARJAU-AGUILAR, M. et al. Diversity and structure of the prokaryotic community in tropical monomictic reservoir. *Microbial Ecology*, v. 88, p. 12, 2025. <https://doi.org/10.1007/s00248-025-02508-1>

BAZIN, P. et al. Phytoplankton diversity and community composition along the estuarine gradient of a temperate macrotidal ecosystem. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, p. e94110, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094110>

BREWING, R. J. W. et al. Comparison of two methods to derive the size-structure of natural populations of phytoplankton. *Deep Sea Research Part I*, v. 85, p. 72-79, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2013.11.007>

BROWN, Phil D., et al. "DNA Metabarcoding of the Phytoplankton of Great Salt Lake's Gilbert Bay: Spatiotemporal Assemblage Changes and Comparisons to Microscopy". *Journal of Great Lakes Research*, v. 48, n. 1, 2022, p. 110–24. DOI.org (Crossref),

BUKIN, Y. S. et al. The effect of metabarcoding 18S rRNA region choice on diversity of microeukaryotes including phytoplankton. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, p. 229, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03678-1>

CALLAHAN, B. J. et al. Bioconductor workflow for microbiome data analysis: From raw reads to community analyses. *F1000Research*, v. 5, p. 1492, 2016. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2>

CALLAHAN, B.; MCMURDIE, P.; ROSEN, M. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, v. 13, p. 581–583, 2016. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

CANINO, A. et al. Phytool, a ShinyApp to homogenise taxonomy of freshwater microalgae from DNA barcodes and microscopic observations. *Metabarcoding and Metagenomics*, v. 5, p. e74096, 2021. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.74096>

CHALAR, G.; TUNDISI, J. G. Phosphorus fractions and fluxes in the water column and sediments of a tropical reservoir (Lobo-Broa - SP). *International Review*

of *Hydrobiology*, v. 86, n. 2, p. 183–194, 2001. <https://doi.org/10.1002/1522-2632>

CHEN, M. et al. The dynamics of temperature and light on the growth of phytoplankton. *Journal of Theoretical Biology*, v. 385, p. 8–19, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.07.039>

CROSSETTI, L. O.; BICUDO, C. E. M. Phytoplankton as a monitoring tool in a tropical urban shallow reservoir (Garças Pond). *Hydrobiologia*, v. 610, n. 1, p. 161–173, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9431-z>

DAWSON, R. M. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, v. 36, n. 7, p. 953–962, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00102-5)

DECELLE, J. et al. PhytoREF: A reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular Ecology Resources*, v. 15, p. 1435–1445, 2015. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12401>

DOBBERTIN DA COSTA, M. et al. Temporal and spatial variability of constitutive mixotroph abundance and proportion. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 100, n. 3, p. fae015, 2024. <https://doi.org/10.1093/femsec/fae015>

DRAREDJA, M. A. et al. Seasonal variations of phytoplankton community in a meso-oligotrophic protected lagoon. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 191, p. 603, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7708-5>.

EILER, A. et al. Unveiling distribution patterns of freshwater phytoplankton by a next generation sequencing based approach. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. e53516, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053516>.

EWERTS, H. et al. The identification of organic substances associated with freshwater *Ceratium hirundinella* cells. *Fundamental and Applied Limnology*, v. 192, n. 1, p. 15–21, 2018. <https://doi.org/10.1127/fal/2018/1169>.

GONG, D.; GUO, Z.; WEI, W.; BI, J.; WANG, Z.; JI, X. Phytoplankton Community Structure and Its Relationship with Environmental Factors in Nanhai Lake. *Diversity*, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 927, 2022.

GUILLOU, L. et al. The Protist Ribosomal Reference Database (PR2). *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D597–604, 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1160>

HANŽEK, N. et al. Comparative identification of phytoplankton functional groups using microscopy and eDNA metabarcoding. *Hydrobiologia*, v. 851, n. 4, p. 1015–1034, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10750-023-05344-x>

HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, v. 35, n. 2, p. 403–424, 1999.

<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>

HUISMAN, J. et al. Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, p. 471–483, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>

JOHN, U. et al. Formal revision of the *Alexandrium tamarensis* species complex taxonomy. *Protist*, v. 165, n. 6, p. 779–804, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.10.001>.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S rRNA gene PCR primers for diversity studies. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, p. e1, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

KRUK, C. et al. Classification of Reynolds phytoplankton functional groups using individual traits and machine learning techniques. *Freshwater Biology*, v. 62, n. 10, p. 1681–1692, 2017. <https://doi.org/10.1111/fwb.12968>

KURMAYER, R. et al. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria. *Microbiology*, v. 151, p. 1525–1533, 2005. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27779-0>.

KURNIAWAN, Kurniawan, et al. “Utilizing environmental DNA metabarcoding and local ecological knowledge for fish biodiversity assessment in Rivers of Java, Indonesia”. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, n. 426, 2025, p. 17

KWON, E. Y. et al. Nutrient uptake plasticity in phytoplankton sustains future ocean net primary production. *Science Advances*, v. 8, n. 51, p. eadd2475, 2022. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add2475>

LI, Y. et al. Diverse drivers of phytoplankton dynamics in different phyla across the annual cycle. *Journal of Freshwater Ecology*, v. 36, n. 1, p. 13–29, 2021. <https://doi.org/10.1080/02705060.2020.1868586>

Liu, Shuya, et al. “Metabarcoding Analysis of Harmful Algal Species in Jiaozhou Bay”. *Harmful Algae*, v. 92, 2020, p. 101772. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101772>.

MÄKI, A. et al. Sample preservation, DNA or RNA extraction and data analysis for high-throughput phytoplankton sequencing. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1848, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01848>

MALASHENKOV, D. V. et al. Comparative analysis of freshwater phytoplankton communities using morphological and molecular approaches. *Scientific Reports*, v. 11, p. 16130, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95223-z>

MANSANO, A. S. et al. The importance of protozoan bacterivory in a subtropical environment. *Brazilian Journal of Biology*, v. 74, p. 569–578, 2014.

<https://doi.org/10.1590/bjb.2014.0081>

MIKHAILOV, I. S. et al. Comparison of relative and absolute abundance and biomass of freshwater phytoplankton taxa using metabarcoding and microscopy. *Ecology and Evolution*, v. 15, n. 3, p. e70856, 2025.

<https://doi.org/10.1002/ece3.70856>

MORABITO, G. et al. Seasonal morphological plasticity of phytoplankton in Lago Maggiore. *Hydrobiologia*, v. 578, n. 1, p. 47–57, 2007.

<https://doi.org/10.1007/s10750-006-0432-5>.

NICOLOSI GELIS, M. M. et al. Assessing the relevance of DNA metabarcoding for lake phytoplankton monitoring. *Science of The Total Environment*, v. 914, p. 169774, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169774>

OBERTEGGER, U. et al. Do inferences about freshwater phytoplankton communities change when based on microscopy or HTS data? *Freshwater Biology*, v. 66, n. 4, p. 640–655, 2021. <https://doi.org/10.1111/fwb.13667>

OKSANEN, J. et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-4, 2022. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

PARÉSYS, G. et al. Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton by trichromatic fluorescence excitation. *Water Research*, v. 39, n. 5, p. 911–921, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.005>

PARUCH, L. et al. Seasonal dynamics of lotic bacterial communities assessed by 16S rRNA sequencing. *Scientific Reports*, v. 10, p. 16399, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73293-9>

PIRELLA KARLUSICH, J. J. et al. A robust approach to estimate relative phytoplankton cell abundances from metagenomes. *Molecular Ecology Resources*, v. 23, n. 1, p. 16–40, 2023. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13592>.

PINTO, A. M. F. et al. Chlorophyll-a determination via continuous measurement of plankton fluorescence. *Water Research*, v. 35, n. 16, p. 3977–3981, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00102-6)

POMATI, F. et al. An automated platform for phytoplankton ecology and aquatic ecosystem monitoring. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 22, p. 9658–9665, 2011. <https://doi.org/10.1021/es201934n>

POMPEI, C. M. E. et al. Impact of meteorological variables on water quality parameters in a reservoir. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 17, n. 3, p. 1387–1396, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02552-8>

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation, 2022. <https://www.R-project.org/>

RAMAKODI, M. P. Influence of 16S rRNA reference databases in amplicon-based environmental microbiome research. *Biotechnology Letters*, v. 44, p. 523–533, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10529-022-03233-2>

RASTOGI, R. P. et al. The cyanotoxin-microcystins: Current overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 13, n. 2, p. 215–249, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9334-6>

REYNOLDS, C. S. The Ecology of Phytoplankton. Cambridge University Press, 2006. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145>

RUGEMA, E. et al. Long-term change of phytoplankton in Lake Kivu. *Freshwater Biology*, v. 64, n. 11, p. 1940–1955, 2019. <https://doi.org/10.1111/fwb.13383>

RUTTEN, T. P. A. et al. Phytoplankton monitoring by high-performance flow cytometry. *Cytometry Part A*, v. 64A, n. 1, p. 16–26, 2005. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20106>

SANTOFERRARA, L. et al. Perspectives from ten years of protist studies by high-throughput metabarcoding. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 612–622, 2020. <https://doi.org/10.1111/jeu.12813>

SARMENTO, Hugo. “New Paradigms in Tropical Limnology: The Importance of the Microbial Food Web”. *Hydrobiologia*, v. 686, n. 1, 2012, p. 1–14

SCHALLENBER, Lena A, et al. “Spatial Abundance and Distribution of Picocyanobacterial Communities in Two Contrasting Lakes Revealed Using Environmental DNA Metabarcoding”. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 97, n. 7, junho de 2021, p. 75.

SHEVCHENKO, O. G. et al. Monitoring of phytoplankton and hydrochemical parameters of coastal waters. *Russian Journal of Marine Biology*, v. 48, n. 1, p. 39–47, 2022. <https://doi.org/10.1134/S1063074022010102>

ŠIMUNOVIĆ, M. et al. Phytoplankton diversity of a natural karst lake combining morphological and molecular approaches. *Water*, v. 15, n. 7, p. 1379, 2023. <https://doi.org/10.3390/w15071379>

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: Where do we go from here? *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 4, p. 201–207, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.11.009>

SOARES, M. C. S. et al. Light microscopy in aquatic ecology: Methods for

plankton community studies. In: CHIARINI-GARCIA, H.; MELO, R. C. N. (orgs.). *Light Microscopy*. Humana Press, p. 215–227, 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_13

STOECK, T. et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community. *Molecular Ecology*, v. 19, p. 21–31, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. The ecology of UHE Carlos Botelho (Lobo-Broa Reservoir). *Freshwater Reviews*, v. 6, n. 2, p. 75–91, 2013. <https://doi.org/10.1608/FRJ-6.2.727>

UTERMÖHL, H. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Limnologie*, v. 9, n. 1, p. 1–38, 1958.

WETZEL, R. G. *Wetzel's Limnology: Lake and River Ecosystems*. 4. ed. Academic Press, 2024.

WIESE, M. et al. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs*, v. 8, n. 7, p. 2185–2211, 2010. <https://doi.org/10.3390/md8072185>

WU, Z. et al. Overview of the distribution and adaptation of *Raphidiopsis raciborskii*. *Journal of Oceanology and Limnology*, v. 40, n. 5, p. 1774–1791, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00343-022-2003-7>

XIAO, X. et al. Use of high throughput sequencing and light microscopy shows contrasting results. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. e106510, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106510>

ZNACHOR, P. et al. Changing environmental conditions underpin long-term patterns of phytoplankton. *Science of The Total Environment*, v. 710, p. 135626, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135626>