

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidade de Cyanobacteria em lagoas salinas do pantanal da  
Nhecolândia (MS, Brasil), avaliada por meio da caracterização morfológica e  
molecular**

**Naíla Barbosa da Costa**

**Belo Horizonte, fevereiro de 2013**

**Naíla Barbosa da Costa**

**Diversidade de Cyanobacteria em lagoas salinas do pantanal da  
Nhecolândia (MS, Brasil), avaliada por meio da caracterização morfológica e  
molecular**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Minas Gerais para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

Orientadora: Profa. Alessandra Giani  
Co-orientadora: Dra. Maria Kolman

**Belo Horizonte, fevereiro de 2013**

*Alles ist aus dem Wasser entsprungen,*

*Alles wird durch das Wasser erhalten*

“Tudo surgiu da água  
Tudo é mantido pela água”

(Goethe)

“As águas são a epifania da Natureza [...]

Acho que as águas iniciam os pássaros

Acho que as águas iniciam as árvores e os peixes

E acho que as águas iniciam os homens

Nos iniciam.

E nos alimentam e nos dessedentam

Louvo esta fonte de todos os seres, de todas as  
plantas, de todas as pedras.

Louvo as natências do homem do Pantanal.

Todos somos devedores destas águas.

Somos todos começos de brejos e de rãs.

E a fala dos nossos vaqueiros carrega murmúrios  
destas águas.

Parece que a fala de nossos vaqueiros tem consoantes  
líquidas

E carrega de umidez as suas palavras

Penso que os homens deste lugar  
são a continuação destas águas.”

(Trechos do poema “Águas” de Manoel de Barros)

## **Agradecimentos**

Agradeço à professora Alessandra Giani pela orientação constante durante este trabalho, desde as extrações de DNA e início da contagem do fitoplâncton, a cada amplificação de PCR bem ou mal sucedida até a fase de escrita da monografia.

À Dra. Maria Kolman pela co-orientação no projeto, pela ajuda a cada etapa na biologia molecular, principalmente na clonagem e por todos os conselhos infalíveis.

A toda a equipe da EMBRAPA Pantanal, especialmente à Dra. Márcia Divina de Oliveira e ao técnico Josias, pelo planejamento das coletas e apoio durante sua realização.

Ao professor Álvaro Cantini por ter cedido as células de *Escherichia coli* para realização da técnica de clonagem.

À Msc. Deborah Kufner pela realização das coletas no Pantanal, pelo apoio na identificação das espécies mais intrigantes de fitoplâncton e pela ajuda na medida das células para o biovolume.

À Msc. Ana Maria Moreira por me passar a técnica do tão temido DGGE e pelas valorosas dicas.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG, em especial à Msc. Graziella Patrício e aos técnicos Vítor e Renata, por terem disponibilizado o laboratório para a análise de DGGE e por terem me acompanhado.

A toda a equipe do Laboratório de Ficologia, Alessandra, Ana Maria, Arthur, Cleber, Daniel Pereira, Daniel Trindade, Deborah, Elenice, Eva, Fernanda, João, Jociene, Juliana, Luiza, Marcele, Maria, Pedro, Priscila, Simone, Solange e Valquíria, pelo apoio e convivência diária, pelos momentos de descontração e discussões relevantes. Em especial à Valquíria pela ajuda nas etapas iniciais de biologia molecular, ao Pedro pela ajuda imprescindível nas contagens, ao Daniel Trindade pelas fotos das cianobactérias, à Elenice por manter a organização do laboratório e por ser sempre nossa segunda mãe, ao Cleber e à Juliana por todos os conselhos e todas as discussões. Reconheço que são poucos os privilegiados de ter o apoio de uma equipe de profissionais tão competentes e que ainda nos completam como uma família.

À Msc. Camila Campos por ter prontamente disponibilizado sua dissertação de mestrado, que muito ajudou principalmente na parte metodológica do trabalho.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas pelo ensinamento construído durante esses quatro anos e meio de graduação.

Aos meus amigos de Sete Lagoas, Laís, Henrique, Tomás, Ana, Raíssa, Talita, Marcelo, Ivam, Alan, Gustavo, Renato, Roger, Luiz, Philippe, Felipe Ascensão, Juliana,

Bruna, Nathália, Jéssica, Simone, cada um em seu canto do mundo, sempre me mostrando o verdadeiro significado da palavra amizade.

Aos meus amigos da graduação, por cada instante vivido junto em sala de aula, que deixará lembranças e um aperto no peito por ter ficado no passado e também por cada instante vivido fora da sala de aula, que deixará a esperança de que sempre se repita. Acho que nunca aprendi tanto com um grupo de pessoas tão excêntricas! Vocês realmente superaram minhas expectativas para a graduação. Agradeço em especial à Camila, pela eterna companhia desde a matrícula até o TCC, pelas experiências trocadas, pelo aprendizado compartilhado. Ao Cássio, Cecília, Ítalo, Ludmila, Ludmilla, Paloma, Sasha, Thaís, Thomaz e Yuri pela amizade que tem superado as salas de aula, pelos conselhos, companheirismo e por ouvirem sempre meus desabafos! E aos integrantes do grupo Evolução em Foco, pelas discussões, pelo aprendizado e pela oportunidade de descobrir o quanto somos capazes de fazer a diferença.

A todos aqueles que moraram comigo nas diferentes casas em que passei, por terem me ensinado a dividir e compartilhar, a respeitar e ser respeitada. Agradeço em especial aos inesquecíveis companheiros da ICH e às meninas da HF, Lívia, Maíra, Sophia e Werônica, por terem acompanhado minhas últimas batalhas e vibrado a cada conquista. A minha casa é onde eu estiver com vocês.

Agradeço também aos vizinhos que tive a sorte de conhecer neste tempo, por toda a ajuda e pelos preciosos momentos juntos, especialmente ao Christiano, Luís Filipe, William, Isabela, Carla, Thaís, Lorena, Gabi, Bárbara, Patrick, Sílvio e Sadallo.

A toda minha família, em especial à minha mãe, por ter criado meu alicerce e ser minha principal referência e ao meu pai por ter me passado o gosto pela ciência. Aos meus irmãos, primos, avós e tios, pelo apoio incondicional mesmo sabendo que eu não voltaria para casa ao final de semana para poder me dedicar mais aos estudos ou ao laboratório...

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## Sumário

Resumo.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras .....	x
Listas de tabelas .....	xii
1. Introdução .....	13
2. Objetivos.....	19
3. Metodologia .....	19
3.1 Local de estudo .....	19
3.2 Período de coleta.....	20
3.3 Coleta das amostras .....	20
3.4 Identificação e quantificação da comunidade fitoplanctônica.....	21
3.5 Extração do DNA genômico.....	22
3.6 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) da região 16S rRNA .....	22
3.7 Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturação – DGGE.....	24
3.8 Preparação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> .....	25
3.9 Ligação do inserto no vetor e transformação das células .....	26
3.10 PCR a partir das colônias de clones .....	27
3.11 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA ....	28
4. Resultados.....	29
4.1 Caracterização dos períodos de chuva-seca .....	29
4.2 Comunidade fitoplanctônica .....	31
4.3 Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturação – DGGE.....	35
4.4 Clonagem.....	36
4.5 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA .....	37
4.6 Riqueza e índices de diversidade de Shannon-Wiener.....	39
5. Discussão .....	41
6. Conclusões .....	49
7. Referências.....	50

## Resumo

A Nhecolândia é uma das oito sub-regiões do Pantanal brasileiro, caracterizada pela riqueza de lagoas rasas classificadas como baías, salitradas ou salinas. Estas últimas apresentam as condições mais extremas, como elevada condutividade e pH alcalino. Sendo ambientes extremamente seletivos e ainda pouco estudados quanto à diversidade de fitoplâncton, justifica-se a importância de trabalhos que visem à sua caracterização tanto por meio da taxonomia morfológica tradicional quanto por meio de técnicas moleculares. O presente trabalho é uma caracterização da comunidade de cianobactérias de amostras coletadas em três salinas da Nhecolândia: Salinas da Reserva, do Meio e da Invernada, no final da cheia, outubro/2011 e início da seca, abril/2012. A contagem das amostras foi feita em microscópio óptico e as análises mostraram que as cianobactérias são os organismos mais representativos da comunidade fitoplancônica das salinas, cujo biovolume foi superior a 70% do fitoplâncton total em 5 das 6 amostras estudadas. Na seca (abr/2012), especialmente, houve dominância de uma única espécie de cianobactéria que representava mais de 90% do biovolume total em todas as salinas. Na salina da reserva, a espécie dominante na seca foi *Arthrospira platensis*, enquanto *Anabaenopsis elenkinii* foi a dominante nas demais salinas nessa mesma época. No período do final da cheia, outubro/2011, *A. elenkinii* também dominou nas salinas da reserva e do meio. As análises moleculares basearam-se na amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA da comunidade de cianobactérias. Duas metodologias foram utilizadas: o perfil das sequências num Gel de Eletroforese com Gradiente de Desnaturação (DGGE) e a diversidade de genótipos gerados pela Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) a partir de clones das sequências. A diversidade genotípica, calculada pelo índice de Shannon-Wiener, foi em geral maior que a diversidade morfológica. A diversidade molecular durante a seca foi menor, denunciando as condições mais seletivas do ambiente nesse período. A técnica de DGGE mostrou-se útil para uma rápida visualização comparativa do perfil das comunidades nas duas estações e apresentou valores mais elevados da riqueza de sequências em algumas das amostras. O uso das diversas técnicas mostrou-se complementar, reforçando a importância de se utilizar uma técnica em adição à outra para evitar a descrição incorreta de comunidades naturais.

Palavras-chave: Pantanal, lagoas salinas, biodiversidade, cianobactérias, DGGE, ARDRA.

**Lista de abreviaturas**

ARDRA – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (do inglês *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

BSA – Albumina de Soro Bovino (do inglês *Bovine Serum Albumine*)

*Bst*UI – *Bacillus stearothermophilus* estirpe UI

*Bsu*RI – *Bacillus subtilis* estirpe RI

Ca – Elemento cálcio

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

DGGE – Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturação (do inglês *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

*eco471R* – Gene codificador da enzima de restrição *Eco471*

EDTA – Ácido Etilenediamina Tetracético (do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

H<sup>+</sup> – Íons hidrogênio 1+

*Hae*III – *Haemophilus aegyptius* estirpe III

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

KCl – Cloreto de potássio

LB – Meio Luria-Bertani

Mg – Elemento magnésio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

MS – Estado brasileiro do Mato Grosso do Sul

*Msp*I – *Moraxella* sp estirpe I

Na<sup>+</sup> – Íons sódio 1+

NaCl – Cloreto de sódio

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)

pH – potencial Hidrogeniônico

ppt – partes por trilhão

PSI – Fotossistema I (do inglês *Photosystem I*)

PSII – Fotossistema II (do inglês *Photosystem II*)

*Pst*I – *Providencia stuartii* estirpe I

RFLP – Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

rpm – rotações por minuto

rRNA – RNA ribossomal

S – Siemens (medida de condutividade)

SDS –Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SOC – Caldo microbiológico cuja sigla provém do nome em inglês *Super Optimal broth with Catabolite repression*

TES – Sal Tris EDTA (do inglês *Tris EDTA Salt*)

TE – Tris EDTA

TAE – Tris Acetato EDTA

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UPGMA – Agrupamento Pareado Não-ponderado baseado na Média Aritmética (do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*)

UV – Ultravioleta

## Lista de figuras

Figura 1. O Pantanal brasileiro e a Nhecolândia (Barbiero et al., 2008).....	13
Figura 2. Vista aérea gerada pelo programa Google Earth com a identificação das lagoas salinas amostradas no presente trabalho. ....	20
Figura 3. Vetor pJET 1.2/blunt utilizado na ligação dos fragmentos 16S rRNA amplificados. ....	26
Figura 4. Precipitação registrada pela estação Meteorológica de Corumbá (MS) no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012 (INMET). ....	30
Figura 5. Precipitação registrada pela estação Meteorológica de Corumbá (MS) no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2012 (INMET). ....	30
Figura 6. Estrutura da comunidade fitoplanctônica, em porcentagem de células dos grupos mais representativos, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.....	32
Figura 7. Estrutura da comunidade fitoplanctônica, em porcentagem de biovolume dos grupos mais representativos, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.....	32
Figura 8. Estrutura da comunidade de Cyanobacteria, em porcentagem de células de cada espécie, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.....	33
Figura 9. Estrutura da comunidade de Cyanobacteria, em porcentagem de biovolume de cada espécie, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.....	33
Figura 10. Análise de agrupamento UPGMA baseada na similaridade da composição da comunidade de cianobactérias identificadas morfológicamente nas amostras estudadas, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.....	34
Figura 11. Perfil de DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA amplificados por PCR da comunidade de cianobactérias dos ambientes estudados, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.....	35
Figura 12. Análise de agrupamento UPGMA baseada na similaridade do perfil de DGGE de cada ambiente estudado, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13) nos períodos de outubro de 2011 e abril de 2012.....	36

Figura 13. Relação do número de genótipos acumulados por clone para cada uma das amostras, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012. ....	37
Figura 14. Distribuição dos genótipos dentro da comunidade de Cyanobacteria. ....	38
Figura 15. Análise de agrupamento UPGMA baseada na similaridade da distribuição dos genótipos de cianobactérias nas salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012. ....	39
Figura 16. Indivíduo de <i>Anabaenopsis elenkinii</i> (salina do meio de abril de 2012). Escala equivalente a 10 $\mu\text{m}$ . ....	41
Figura 17. Indivíduo de <i>Arthrospira platensis</i> (salina da reserva de abril de 2012). Escala equivalente a 10 $\mu\text{m}$ . ....	43

**Litas de tabelas**

Tabela 1. Iniciadores utilizados na amplificação da região 16S rRNA do DNA de Cyanobacteria.....	23
Tabela 2. Meios de cultura utilizados na preparação de células competentes de <i>E. coli</i> TOP10. ....	25
Tabela 3. Riqueza em número de espécies, genótipos ou bandas no perfil de DGGE das amostras estudadas para a comunidade fitoplanctônica e de Cyanobacteria. ....	40
Tabela 4. Índice de Shannon-Wiener para a comunidade de cianobactérias das amostras estudadas com base na diversidade de espécies morfológicamente identificada (biovolume) e dos genótipos encontrados. ....	40



As salinas são lagoas permanentes de água alcalina, localizadas em pequenas depressões, circulares, ovaladas ou oitavadas (Fernandes, 2007). São quase sempre isoladas das cheias por cordilheiras, que consistem em estreitas faixas de solo ligeiramente mais elevadas que o terreno local e com vegetação típica de cerrado (Furquim et al., 2010).

Estudos geoquímicos recentes abrangendo as águas superficiais e de subsuperfície da sub-região da Nhecolândia têm proposto uma origem recente no tempo geológico à alta concentração de sais das lagoas salinas (Barbiero et al., 2002; Furquim et al., 2010) ao contrário das antigas explicações paleoecológicas que atribuem a presença de sais a fenômenos antigos, em especial a alternância de fases de clima árido e úmido durante o Pleistoceno (Ab'Saber, 1998). Barbiero et al. (2002) propõe que a existência de um horizonte impermeável no subsolo que envolve as salinas promove a concentração de sais ao impedir o fluxo de água entre o corpo d'água e o lençol freático na estação seca, retendo assim a água na lagoa, a qual sofre um intenso processo evaporativo que supera a precipitação pluviométrica nessa época do ano, tornando a água altamente concentrada em solutos. Os autores sugerem que os processos responsáveis pela maioria das mudanças na composição química das lagoas salinas decorrem da precipitação de alguns elementos (em especial Ca e Mg) conforme a água se torna mais salina e isso possivelmente explica a alta alcalinidade desses ambientes.

Além do pH elevado ( $> 8$ ) as lagoas salinas possuem outras características que as tornam um ambiente considerado de condições extremas, como a elevada condutividade ( $> 2000 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), decorrente da alta concentração de cloreto de sódio ( $> 2 \text{ g L}^{-1}$ ), e a presença de amônia em sua forma não ionizável, justificando a ausência de plantas aquáticas e peixes bem como a pouca diversidade do zooplâncton (Mourão et al., 1988; Medina-Júnior & Rietzler, 2005).

Apesar de serem ambientes com diversos fatores limitantes ao crescimento de organismos, algumas espécies de cianobactérias sobrevivem bem às condições extremas apresentadas nas lagoas salinas e muitas vezes apresentam dominância monoespecífica dentro da comunidade fitoplânctônica. O gênero *Anabaenopsis* (Woloszýnska) Miller tem sido registrado como o mais comum nas salinas do Pantanal (Malone et al., 2007; Santos & Sant'Anna, 2010) principalmente durante a estação seca e tem sido sugerido como possível indicador de lagoas salinas na sub-região da Nhecolândia (Santos & Sant'Anna, 2010).

Dentro do fitoplâncton, as cianobactérias consistem num grupo de microrganismos procariotos foto-autotróficos, sendo importantes em muitos ambientes em termos de

biomassa e podendo influenciar assim o funcionamento de diversos ecossistemas aquáticos (Reynolds, 1984).

As cianobactérias são os primeiros organismos vivos dos quais se tem registro fóssil no planeta (Armstrong & Brasier, 2005) e são geralmente os primeiros organismos clorofilados a colonizar solos e rochas nus por apresentarem inúmeras adaptações, como pigmentos que absorvem luz UV, que aumentam o seu *fitness* em ambientes terrestres expostos (Whitton, 1992). O habitat proeminente desses microrganismos são os ecossistemas aquáticos marinhos ou continentais, onde também apresentam elevada versatilidade. Elas são capazes de crescer em água salgada, salobra ou doce, em fontes termais ou frias e em ambientes onde nenhuma microalga conseguiria sobreviver (Mur et al., 1999). Segundo Mur et al. (1999) um número considerável de espécies de cianobactérias de água doce é capaz de resistir a altas concentrações de cloreto de sódio e verifica-se que vários isolados de ambientes litorâneos mais toleram a presença do sal do que o requerem sua sobrevivência, isto é, são halotolerantes e não halofílicos.

As cianobactérias claramente desenvolveram mecanismos de adaptação a flutuações e à ampla gama de variação da salinidade externa. Em uma revisão da literatura, Klähn & Hagemann (2010) descrevem que a biossíntese e acumulação de certos solutos compatíveis em cianobactérias resulta em uma característica tolerância à salinidade. O conceito de solutos compatíveis foi introduzido por Brown (1976), cuja definição consiste em um grupo funcional de compostos orgânicos sem carga e de baixo peso molecular, que não provocam distúrbios no metabolismo celular (e por isso chamados de compatíveis) em altas concentrações molares, necessários para equilibrar condições osmóticas. Segundo Klähn & Hagemann (2010) as cianobactérias aclimatam a condições de elevada salinidade por meio da extrusão ativa de íons junto à simultânea acumulação de solutos compatíveis, necessários para o balanço osmótico e para a proteção direta ou indireta de macromoléculas.

Apesar da importância deste grupo e do ambiente de estudo, existem poucos trabalhos envolvendo a diversidade do fitoplâncton em lagoas salinas do pantanal brasileiro. São conhecidos apenas três estudos com referência à composição da comunidade de cianobactérias em salinas (Malone et al., 2007; Santos, 2008; Santos & Sant'Anna, 2010) e nenhum envolvendo análises moleculares de diversidade.

Qualquer estudo de quantificação da diversidade deve fornecer uma metodologia de agrupamento de elementos individuais em um dado nível de organização conforme um

critério arbitrário que permita a diferenciação desses elementos entre classes que não se sobrepõem (Kolasa & Biedadka, 1984).

A diferenciação de espécies com base em critérios morfológicos é a prática mais comumente utilizada, contudo ela não necessariamente reflete entidades evolutiva e ecologicamente coerentes, particularmente quando se trata de microrganismos (Nübel et al., 1999). Além disso, a identificação com base em técnicas de microscopia óptica comum nem sempre é segura, primeiramente porque nem todas as características taxonômicas são distinguíveis no microscópio óptico (Willame et al., 2006) e também porque as características morfológicas e morfométricas das cianobactérias em geral refletem as condições fisiológicas de seu crescimento (Anagnostidis & Komárek, 1998), o que pode trazer dúvidas quanto à correta identificação. Indivíduos com a mesma composição genética podem parecer bastante diferentes em condições fisiológicas variadas como resultado de uma expressão gênica diferencial (Castenholz & Norris, 2005). Outra complicação refere-se à identificação de espécies picofitoplanctônicas (organismos de 0,2-2  $\mu\text{m}$ ), cujo tamanho reduzido e morfologia simples das células muitas vezes fazem-nas passar despercebidas ao microscópio óptico, embora sejam reconhecidas como fonte de produtividade primária potencialmente significativa em alguns ambientes marinhos e de água doce (Mur et al., 1999).

Diante de todas as dificuldades e limitações encontradas na caracterização morfológica das cianobactérias, torna-se necessário o emprego de técnicas que complementem esta 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 e nos quais se desconhece a reprodução assexuada, estudos de biologia molecular são uma alternativa complementar aos estudos morfológicos que nem sempre conduzem a uma identificação filogeneticamente coerente. O uso de técnicas moleculares no estudo de comunidades de cianobactérias tem sido bem sucedido e tem se mostrado capaz de superar as 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) tem se demonstrado a abordagem mais promissora em estudos de classificação filogenética de cianobactérias (Wilmotte, 1994).

Os primeiros estudos de caracterização de amostras ambientais utilizando o rRNA tiveram como alvo as sequências codificadores da subunidade 5S do RNA ribossomal. Os

genes 5S rRNA eram diretamente extraídos de amostras mistas e moléculas correspondentes a membros diferentes da comunidade eram separadas por eletroforese. Uma análise comparativa das sequências permitia inferências filogenéticas. Estes estudos pioneiros produziram resultados interessantes, contudo a informação contida nos aproximadamente 120 nucleotídeos do gene 5S rRNA é relativamente pequena e a necessidade de uma separação eletroforética das diferentes moléculas limitava essa técnica a ambientes menos complexos (Amann et al., 1995). Fez-se necessidade do uso de moléculas maiores do rRNA para estudos de ecologia de microrganismos.

O gene 16S rRNA possui em média 1500 nucleotídeos e quando completamente ou quase completamente analisado (pelo menos 1000 nucleotídeos) contém informação suficiente para uma análise filogenética confiável (Amann et al., 1995).

A maioria das abordagens filogenéticas tem utilizado o gene 16S rRNA e por isso existe uma ampla gama de sequências conhecidas desta região. A sua ubiquidade, seu alto conteúdo informativo e a natureza conservativa fazem do gene 16S rRNA a molécula mais apropriada para o estudo de relações filogenéticas distantes (Lane et al., 1985), ele não é capaz, contudo, de resolver plenamente relações intraespecíficas ou entre espécies muito próximas.

Dentro do filo Cyanobacteria os estudos envolvendo o 16S rRNA iniciaram-se em 1975, quando Doolittle et al. (1975) utilizaram-se do padrão de oligômeros gerados a partir do tratamento do 16S rRNA com a enzima T1 ribonuclease para caracterizar e estimar a posição filogenética da cianobactéria *Anacystis nidulans* (hoje *Microcystis aeruginosa*) dentro da linhagem dos procariotos. Desde então, muitos outros trabalhos foram realizados com o 16S rRNA abrangendo diferentes técnicas.

Baseando-se em sequências publicadas do gene 16S rRNA, Nübel et al. (1997) desenvolveram iniciadores de PCR específicos para cianobactérias, os quais, uma vez utilizados em combinação com análises de DGGE (Gel de Eletroforese com Gradiente de Desnaturação), uma técnica de separação de moléculas de DNA dependente da sequência (Muyzer et al, 1993), provaram-se úteis à visualização da diversidade de genes 16S rRNA em comunidades de cianobactérias provindas de amostras ambientais.

A análise de DGGE consiste numa técnica de impressão digital genética (*genetic fingerprinting*) do perfil de comunidades microbiológicas por meio da qual é possível estudar a diversidade de microrganismos em ambientes naturais e monitorar o comportamento das comunidades ao longo do tempo. Uma das grandes vantagens da

utilização do DGGE é a viabilidade da análise simultânea de múltiplas amostras, o que permite o monitoramento da complexa dinâmica à qual as comunidades microbianas possivelmente estão submetidas diante de flutuações diárias e sazonais ou após uma perturbação ambiental (Muyzer, 1999).

A Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) é uma ferramenta comumente utilizada em estudos de diversidade que dependem do polimorfismo de DNA (Deng et al., 2008). Clones contendo fragmentos amplificados da região gênica 16S rRNA são amplificados por PCR e estes amplicons tratados com enzimas de restrição, sendo os fragmentos resultantes dessa digestão posteriormente separados por eletroforese (Skalarz et al., 2009). Os perfis resultantes 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. Moyer et al. (1996) realizaram um estudo a respeito da aplicabilidade do ARDRA na identificação de unidades taxonômicas operacionais baseada nos perfis de fragmentos de restrição gerados. Mais de 100 sequências do gene 16S rRNA de bactérias foram estudadas utilizando-se uma análise de RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) simulada em computador a partir dos sítios de restrição de 10 enzimas conhecidas. As enzimas *Bst*UI, *Msp*I e *Hae*III produziram os melhores resultados nesta análise devido à sua habilidade de diferenciar clones proximalmente relacionados. Moyer et al. (1996) compararam árvores filogenéticas baseadas em sequências do gene 16S rRNA com as análises filogenéticas produzidas a partir dos perfis de ARDRA gerados para o mesmo gene e concluíram que utilizando as dez enzimas de restrição obtém-se uma acurácia de 76 a 100% na inferência das relações filogenéticas. Skalarz et al. (2009), contudo, criticam este resultado, afirmando que na época havia apenas uma estreita gama de sequências disponíveis, enquanto hoje os bancos de dados são muito mais ricos e as questões envolvendo a confiabilidade dos perfis de ARDRA para a identificação dos clones bem como para reconstruções filogenéticas devem ser reavaliadas. Em seu trabalho, Skalarz et al. (2009) concluem que os dendrogramas produzidos a partir da análise de ARDRA podem não refletir uma verdadeira árvore filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA, mas a

técnica se demonstrou uma ferramenta apropriada para diferenciação de gêneros dos clones produzidos a partir de amostras ambientais.

## **2. Objetivos**

- Caracterizar a comunidade de cianobactérias de três lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia (MS) em termos de diversidade e riqueza de espécies no final da estação chuvosa de 2011 e início da seca de 2012 utilizando-se do método tradicional de identificação morfológica por microscopia óptica.

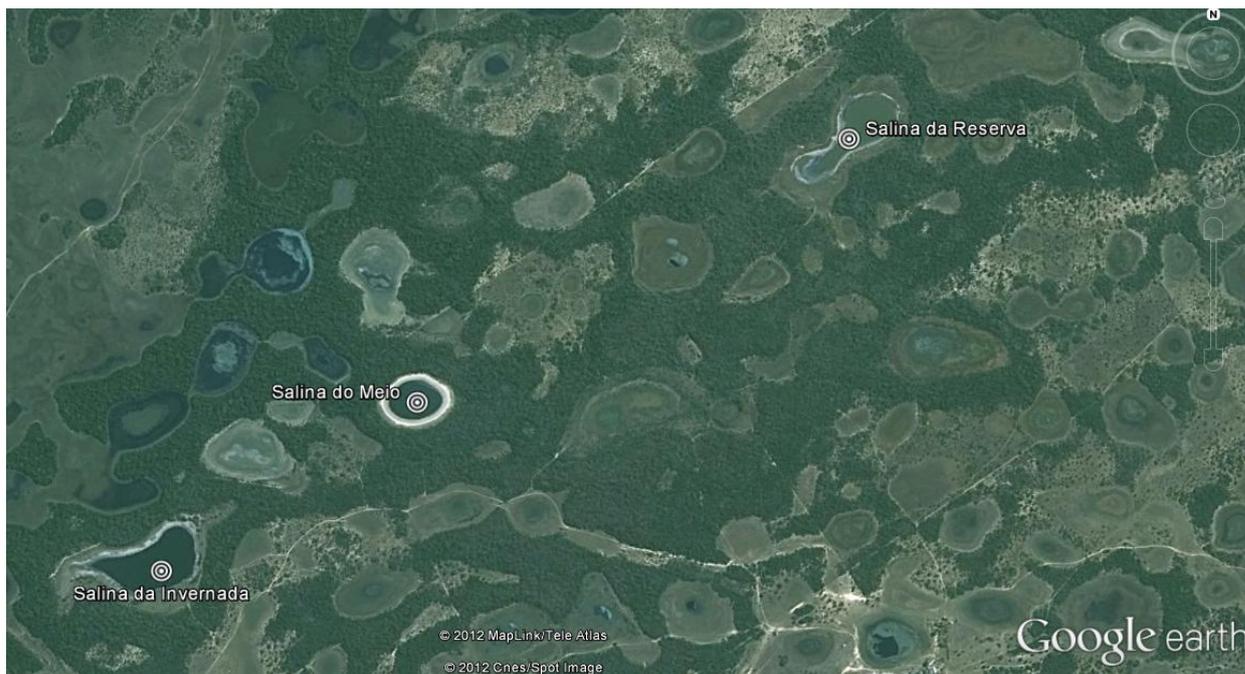
- Verificar a riqueza e diversidade de cianobactérias dessas mesmas amostras por meio de duas técnicas moleculares distintas: o perfil produzido em Gel de Eletroforese com Gradiente de Desnaturação (DGGE) e a Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).

- Comparar os resultados obtidos a partir das diferentes técnicas trabalhadas.

## **3. Metodologia**

### **3.1 Local de estudo**

A figura 2 mostra as três salinas da sub-região do Pantanal da Nhecolândia estudadas no presente trabalho, localizadas na região da Fazenda Nhumirim (EMBRAPA Pantanal): a Salina da Invernada (18°58'59" S e 56°39'42" W), Salina do Meio (18°58'27" S e 56°38'51" W) e Salina da Reserva (18°57'37" S e 56°37'25" W). As salinas na imagem são caracterizadas pela presença de praias marginais, que aparecem como faixas brancas, principalmente visíveis em torno da Salina do Meio, que é a salina mais característica.



**Figura 2.** Vista aérea gerada pelo programa Google Earth com a identificação das lagoas salinas amostradas no presente trabalho.

### 3.2 Período de coleta

Com o objetivo de se comparar a diversidade em estações distintas, foram feitas duas coletas em diferentes períodos: uma em outubro de 2011 e outra em abril de 2012.

O regime de chuvas do Pantanal é caracterizado por duas estações bem contrastantes, que interferem diretamente na composição dos seus sistemas hidrológicos. De um modo geral a estação seca perdura de abril a setembro e a estação úmida vai de março a outubro (Santos, 2008). Desta forma a coleta de outubro representa o final da estação chuvosa e a de abril o início da seca.

### 3.3 Coleta das amostras

Cada uma das salinas foi amostrada em único ponto de coleta, o mais central e distante da margem possível. A coleta do fitoplâncton foi realizada com auxílio de um béquer, na sub-superfície da água, tomando cuidado para não entrar em contato com o sedimento, principalmente no período em que as lagoas estavam mais rasas. A utilização de uma garrafa coletora de Van Dorn, comumente empregada em coletas para estudos limnológicos, mostrou-se inviável uma vez que as salinas são caracteristicamente rasas.

Uma sub-amostra da água coletada foi acondicionada em frascos de vidro de 100 mL e imediatamente fixada com 1% de lugol. Outra parte foi filtrada, com auxílio de uma

bomba a vácuo, em filtros de fibra de vidro de 47 mm de diâmetro e poro 0,7 µm (Macherey-Nagel) até ser observada a saturação dos mesmos, sendo registrado o volume final filtrado para cada filtro, que foi armazenado a -20°C para posterior extração do DNA genômico.

### **3.4 Identificação e quantificação da comunidade fitoplanctônica**

A comunidade fitoplanctônica foi identificada e quantificada utilizando-se microscópio invertido Zeiss, em aumento de 400 vezes, por meio da técnica de sedimentação descrita por Utermöhl (1958), em câmaras de sedimentação de 10 mL. A contagem foi realizada até que fossem registrados pelo menos 100 indivíduos da espécie dominante ou 400 indivíduos quando a espécie dominante era muito mais abundante que as demais e se completasse o transecto (Lund et al., 1958).

A abundância de cada espécie foi mensurada tanto em termos de número de células quanto de biovolume por mililitro, sendo as formas geométricas tridimensionais utilizadas para calcular o biovolume de cada espécie identificada baseadas nos trabalhos de Rott (1981), Hillebrand et al. (1999) e Sun & Liu (2003).

Para identificação do fitoplâncton foi utilizada a bibliografia adequada: Bourrelly (1968, 1970, 1972), Horecká & Komárek (1979), Komárek (1982, 1991), Komárek & Anagnostidis (1989, 1998, 2005), Popovský & Pfiester (1990), Bittencourt-Oliveira (1993), Castro (1993), Komárková-Legnerová & Kronberg (1994), Sant'Anna & Azevedo (1995), Sant'Anna et al. (2004), Tucci et al. (2006), Santos (2008) e Santos & Sant'Anna (2010).

Dois tipos de estrutura de resistência, acinetos e hormogônios, foram encontrados e identificados como possíveis acinetos de *Anabaenopsis elenkinii* e possíveis hormogônios de *Arthrospira platensis*. Os primeiros receberam essa identificação por terem sido vistos, nas mesmas amostras, indivíduos de *A. elenkinii* contendo células em processo de deterioração, mas com o acineto intacto. Os prováveis hormogônios de *A. platensis* foram assim identificados por sua semelhança com os descritos por Santos (2008) e Santos e Sant'Anna (2010).

A diversidade de cianobactérias baseada no biovolume celular foi calculada pelo Índice de Shannon-Wiener (Shannon, 1948) segundo a fórmula da equação 1.

$$H' = -\sum p_i \cdot \ln p_i$$

**Equação 1.** Índice de diversidade de Shannon-Wiener baseado no biovolume celular, onde “ $p_i$ ” = biovolume ( $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ ) da espécie “ $n$ ” dividido pelo biovolume ( $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ ) total da comunidade de cianobactérias.

Foi realizada uma análise de agrupamento por UPGMA (Agrupamento Pareado Não-ponderado baseado na Média Aritmética) conforme a similaridade das lagoas nos diferentes períodos de coleta quanto à distribuição das espécies identificadas. Utilizou-se o programa PAST (versão 2.17) e a medida de similaridade por correlação correspondente ao complemento ( $1-r$ ) do coeficiente de correlação ( $r$ ) de Pearson (Hammer et al., 2001).

### 3.5 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir dos filtros conforme o método de Kurmayer et al. (2003).

O filtro foi suspenso em TES (25% w/v sacarose, 0,050 mol/L Tris-HCl, 0,100 mol/L EDTA, pH 8,0). Em seguida foi adicionada lisozima, em uma concentração final de 5 mg/mL, seguida da enzima proteinase K, a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e SDS, na concentração final de 2% e foi feita incubação *overnight* a 55°C. Prosseguiu-se com a limpeza do DNA extraído por meio da adição de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v), seguido de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v). A última etapa consistiu na precipitação do DNA, feita adicionando-se um volume de etanol absoluto igual a 2,5X o volume do sobrenadante. O precipitado que se formou foi lavado com etanol 70%. A ressuspensão do DNA deu-se pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de TE (0,010 mol/L de Tris e 0,001 mol/L de EDTA, pH 8,0).

### 3.6 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) da região 16S rRNA

Para cada reação de PCR, utilizou-se a seguinte mistura de reagentes com suas respectivas concentrações finais: tampão Dream Taq (Fermentas) (1X),  $\text{MgCl}_2$  (0,625 mM), dNTP (0,25 mM), iniciador *forward* (0,25 pmol/ $\mu\text{L}$ ), iniciador(es) *reverse* (0,25 pmol/ $\mu\text{L}$ ), Dream Taq DNA polimerase (Fermentas) (0,025 U/ $\mu\text{L}$ ) e DNA genômico diluído (0,5 ng/ $\mu\text{L}$ ). Todas as reações ocorreram no termociclador BIORAD Mycycler.

A tabela 1 apresenta as sequências de todos iniciadores utilizados o trabalho.

O par de iniciadores utilizados para amplificação do segmento da região 16S rRNA usado como inserto na clonagem foi o CYA356F (específico para cianobactérias) e 1391R

(universal). O programa utilizado foi: desnaturação inicial a 94°C por 3 min e 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão).

Para a análise de DGGE os iniciadores foram o par CYA781R(a) e CYA781R(b) utilizado em quantidade equimolar e CYA359F, com grampo GC. As reações foram realizadas com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min (desnaturação), 58°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 1 min (extensão); dez minutos de extensão final a 72°C encerraram a reação.

O grampo GC corresponde a uma sequência rica em desoxiguanosina (G) e desoxicidina (C) adicionada à extremidade 5' do iniciador *forward* com o objetivo de impedir a completa desnaturação dos fragmentos de dupla fita de DNA durante a corrida eletroforética no gel com gradiente de desnaturação e assim permitir que os amplicons fiquem retidos uma certa altura do gel de DGGE (Boutte et al., 2006). A combinação dos iniciadores *reverse* CYA781R(a) e CYA781R(b), que se diferem em duas bases polimórficas situadas nas posições 7 e 23 (sentido 5' a 3'), é sugerida para amplificação de cianobactérias filamentosas, alvo preferencial do iniciador CYA781R(a), e unicelulares, alvo preferencial do iniciador CYA781R(b) (Boutte et al., 2006).

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados na amplificação da região 16S rRNA do DNA de Cyanobacteria.

Iniciador	Sequência 5'→3'	Posição <sup>a</sup>	Referência
CYA356F	GTGGGGAATTTTCCGCAA	356-374	de la Torre et al. (2003)
1391R	GACGGGCGGTGWGTRCA <sup>b</sup>	1391-1408	Turner et al. (1999)
CYA359F <sup>c</sup>	GGGGAATYTTCCGCAATGGG <sup>d</sup>	359-378	Nübel et al. (1997)
CYA781R(a)	GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT	781-805	Nübel et al. (1997)
CYA781R(b)	GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT	781-805	Nübel et al. (1997)

<sup>a</sup> Posição dos nucleotídeos em *Escherichia coli*

<sup>b</sup> W corresponde a um nucleotídeo A ou T

<sup>c</sup> Sequência de 40 nucleotídeos rica em GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCG GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3') anexada à extremidade 5' do iniciador.

<sup>d</sup> Y corresponde a um nucleotídeo C ou T

Os resultados das PCRs foram verificados em gel de agarose 1%, com revelação em brometo de etídio, após uma corrida eletroforética em tampão TAE 1X por

aproximadamente 30 minutos a 80 volts. O marcador de peso molecular Lambda-*Pst*I utilizado foi preparado da seguinte maneira: 150  $\mu$ L de Lambda DNA (Fermentas) foram misturados a 50  $\mu$ L de tampão (10 mM Tris-HCl (pH 7,6) e 1 mM EDTA), 8  $\mu$ L da enzima *Pst*I (Fermentas) (10 U/ $\mu$ L) e 292  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Após a digestão, foi acrescentado o tampão de corrida azul de bromofenol.

Para a visualização das bandas nos géis foi utilizado o equipamento de fotodocumentação UVP MultiDoc-It e o programa computacional UVP Launch Doc-ItLS.

As bandas obtidas por meio da amplificação dos iniciadores CYA356F e 1391R foram cortadas do gel de agarose e purificadas antes de utilizadas como inserto na reação de ligação ao vetor plasmidial para clonagem. A purificação das bandas foi feita conforme a metodologia de precipitação do DNA extraído, utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v). À fase aquosa sobrenadante obtida após esta última etapa foi adicionado um volume de etanol absoluto 2,5X o volume do sobrenadante e 1  $\mu$ L de acetato de sódio (3 mol/L) para cada 20  $\mu$ L do volume final. Esta solução foi deixada a -20°C por 12 h e posteriormente centrifugada por 25 min a 13000 rpm e 4°C. Ao *pellet* obtido foi adicionado etanol 70% e novamente submetido à centrifugação. Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 5  $\mu$ L de água ultrapura. A qualidade do DNA foi verificada em corrida em gel de agarose 1% (80 volts, 30 min) após corar-se com brometo de etídio.

Os produtos das reações de PCR feitas com os iniciadores CYA359F e CYA781R(a+b) foram quantificados por meio da comparação com a ladder Low Mass (Fermentas) no programa ImageJ (1.46). Das amostras que não apresentavam 400 ng de DNA, foram feitas duas reações de PCR e os produtos foram precipitados e submetidos a uma etapa de purificação. Após estar completamente seco o DNA foi ressuspensado em 18  $\mu$ L de TE e estava pronto para ser aplicado no gel de DGGE.

### **3.7 Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturação – DGGE**

A análise dos produtos de PCR por meio do DGGE foi realizada como descrito por Muyzer et al. (1993) usando o DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratórios, EUA). Cerca de 400 ng de DNA amplificado por PCR foram aplicados em cada canaleta do gel de acrilamida 6% (acrilamida:bis 37,5:1) (w/v). Foi feito um gradiente de desnaturação de 40% a 60% a partir de uma solução 100% desnaturante contendo ureia 7 mol/L e formamida deionizada 40% (v/v). Um volume de 40  $\mu$ L de DNA foi aplicado em

cada canaleta com adição de 4  $\mu$ L de tampão de amostra 10X. A corrida eletroforética do gel de DGGE foi realizada a 80 volts e 60°C durante 900 min (15 h).

Utilizou-se o corante SYBR Gold para visualização do perfil de bandas no gel. Este corante tem a vantagem de não apresentar coloração de fundo, tornando possível a observação dos fragmentos de DNA menos dominantes (Muyzer & Smalla, 1998). O gel foi corado durante 40 min em uma solução de SYBR Gold e as bandas foram visualizadas e fotografadas em luz ultravioleta utilizando-se o equipamento de foto-documentação UVP DigiDoc-It e programa computacional UVP Launch Doc-ItLS.

O perfil de DGGE foi estudado com auxílio do programa de análise de imagens de géis de DNA PyElph (versão 1.4) descrito por Pavel & Vasile (2012). Foi feita uma análise de UPGMA no programa PyElph (1.4).

### 3.8 Preparação das células competentes de *Escherichia coli*

Utilizou-se a linhagem TOP10 (Invitrogen) cedida pelo laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitos (Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG), coordenado pelo Professor Álvaro Cantini Nunes. Um traço da cultura de *E. coli* TOP10 foi colocado para crescer em meio de cultura LB (tabela 2). Após o crescimento da colônia 1 mL da cultura foi adicionado em 100 mL de SOC (tabela 2). O crescimento da colônia passou a ser monitorado, utilizando-se um espectrofotômetro, até que a leitura de OD<sub>600</sub> se aproximasse de 0,3 a 0,4. Atingido esse valor a cultura foi posta para resfriar em gelo por 30 min e após isso submetida à centrifugação refrigerada. Após secagem da massa de células, adicionaram-se 10 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,1 mol/L), e as células foram então suavemente ressuspensas e incubadas em gelo por 20 min. Após nova centrifugação, a massa de células precipitadas foi posta para secar. As células foram ressuspensas em 2 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,1 mol/L) e glicerol 15%. Alíquotas de 100  $\mu$ L foram preparadas em tubos estéreis e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. As células foram estocadas a -70°C.

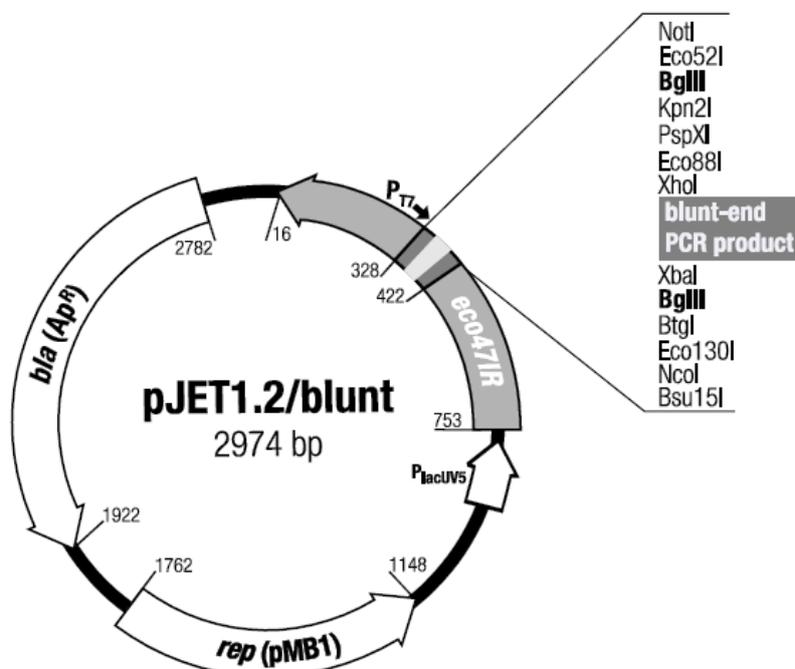
**Tabela 2.** Meios de cultura utilizados na preparação de células competentes de *E. coli* TOP10.

Meios de cultura	Reagentes	Concentração final
Meio LB	Triptona	10 g/L
	Extrato de levedura	5 g/L

<b>Meio LB-ágar</b>	NaCl	5 g/L
	Triptona	10 g/L
	Extrato de levedura	5 g/L
	NaCl	5 g/L
	Ágar	15 g/L
<b>Meio SOC</b>	Triptona	20 g/L
	Extrato de levedura	5 g/L
	NaCl	0,5 g/L
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Sacarose	20 M

### 3.9 Ligação do inserto no vetor e transformação das células

Para clonagem da região 16S rRNA foi utilizado o kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific) contendo o vetor pJET 1.2/blunt representado na figura 5.



**Figura 3.** Vetor pJET 1.2/blunt utilizado na ligação dos fragmentos 16S rRNA amplificados.

A enzima Taq polimerase possui uma atividade independente do DNA molde por meio da qual uma única desoxiadenosina (A) é adicionada à porção terminal 3' do produto de PCR e o vetor linearizado disponibilizado no kit possui um resíduo de desoxitimidina (T) pendente em cada uma de suas extremidades 3', estratégia que permite a ligação eficiente de qualquer inserto produto de PCR ao vetor.

A ligação no vetor pJET 1.2 foi feita inicialmente adicionando-se 1 µL do produto de PCR purificado a 5 µL do tampão de reação 2X, 0,5 µL de enzima *blunting* e 2,5 µL de água livre de ultrapura e deixando 5 min em banho-maria a 70°C. A seguir foi feito um choque térmico, deixando-se no gelo por 1 min e o vetor pJET 1.2 foi adicionado (0,1 µL) junto à enzima T4 DNA ligase (1 µL). Deixou-se a reação de ligação ocorrer por 10 min a 22°C e então as amostras foram congeladas (-20°C) por não mais que 24 h até se prosseguir com a etapa da transformação.

Para a transformação, 10 µL da mistura contendo vetor já ligado ao inserto foram adicionados a 100 µL de células competentes. As células com os vetores foram deixadas 30 min no gelo e a seguir foi feito um choque térmico de 45 segundos a 42°C seguidos de 5 min no gelo. Foi adicionado 1 mL de meio SOC estéril (tabela 2) e as células transformadas foram incubadas sob agitação a 37°C por 1 h. 400 µL dessa cultura foram centrifugados por 1 min a 6000 rpm. Após a centrifugação a massa de células precipitada foi ressuspensa e distribuída em uma placa com meio de cultura LB ágar contendo 50 µg/mL do antibiótico ampicilina. A placa foi incubada até o dia seguinte, quando foi feita a seleção dos clones para posterior amplificação dos fragmentos inseridos no vetor.

O fragmento amplificado de PCR insere-se numa região onde existe um gene letal (*eco471R*) no vetor pJET 1.2. Dessa forma além de apenas crescerem na placa os clones transformados, pois o vetor inclui um gene de resistência à ampicilina, os clones transformados cujo vetor não possui o inserto ligado são negativamente selecionados, por terem ainda ativos o gene *eco471R* que expressa uma enzima de restrição letal.

### **3.10 PCR a partir das colônias de clones**

Para amplificação do fragmento de interesse foram feitas PCRs a partir de cada colônia isolada selecionada, utilizando-se os mesmos iniciadores usados na amplificação a partir do DNA genômico: CYA356F e 1391R. A diferença aqui consiste no fato de que foram adicionados 2 µL da colônia previamente suspensa em 20 µL de água estéril para cada reação de 20 µL de PCR.

Foi feita uma corrida eletroforética com os produtos de PCR (80 volts, 30 min em tampão TAE 1X e revelação em solução de brometo de etídio) em gel de agarose 1% para verificar se realmente houve transformação da célula e ligação do inserto nas colônias selecionadas. Utilizou-se o marcador de peso molecular Lambda-*Pst*I e foram considerados clones positivos aqueles que apresentaram a banda de aproximadamente 1000 pb esperada.

### 3.11 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA

A enzima de restrição utilizada na digestão dos amplicons foi a *Bsu*RI (*Hae*III) (Thermo Scientific) com sítio de restrição GC ↓ CC.

Foram adicionados a 5 µL do produto de PCR dos clones positivos a uma mistura de 1 µL de tampão R 10X (0,1 mol/L Tris-HCl pH 8,5; 0,1 mol/L MgCl<sub>2</sub>; 1000 mM KCl; 1 mg/mL BSA), 0,4 µL da enzima *Bsu*RI (10 U/µL) e 3,6 µL de água ultrapura autoclavada. Foi feita incubação por 4 h a 37°C a fim de que uma completa digestão ocorresse. Os 10 µL da reação de digestão foram homogeneizados em 2 µL de azul de bromofenol (6X) e aplicados em gel de agarose 2%. Após uma corrida eletroforética a 100 volts por cerca de 25 min em tampão TAE 1X, as imagens foram captadas utilizando sob luz ultravioleta.

Cada perfil diferente produzido pela digestão enzimática do produto de PCR de um clone corresponde a um genótipo distinto e a diversidade destes foi calculada, para cada amostra, por meio do Índice de Shannon-Wiener, segundo a fórmula da equação 2.

$$H' = -\sum p_i \cdot \ln p_i$$

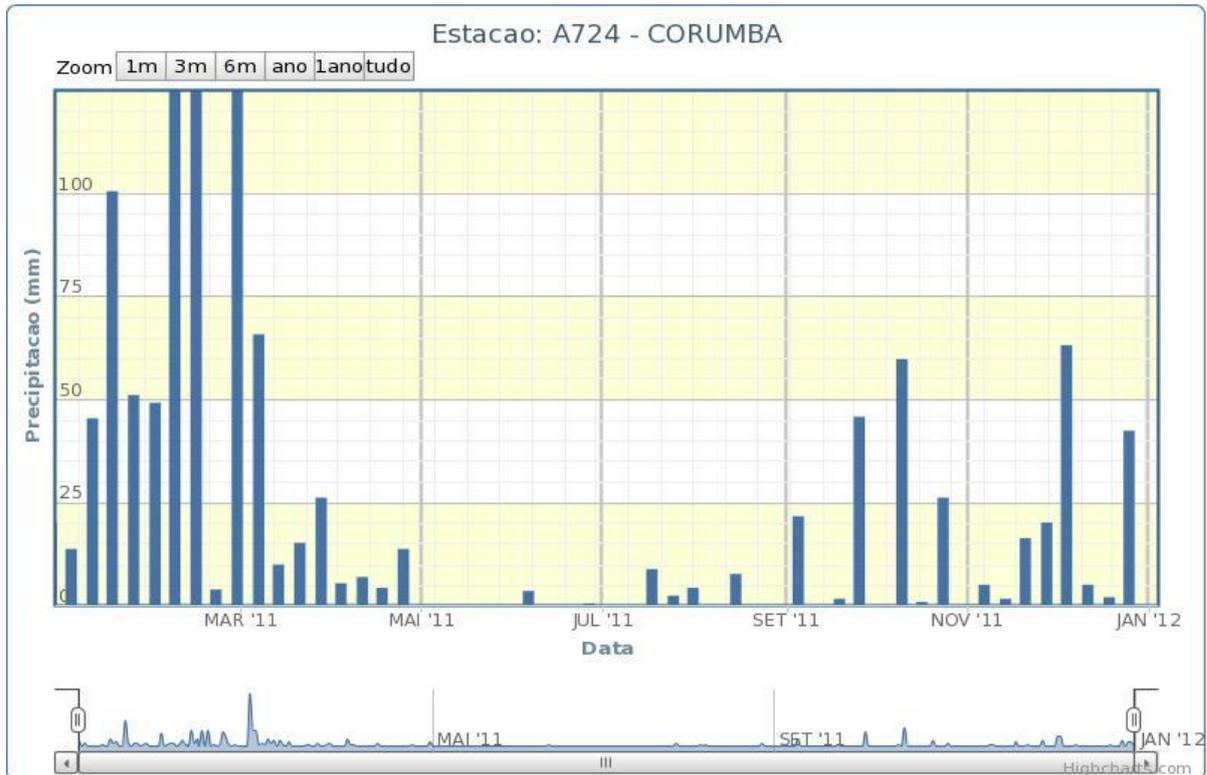
**Equação 2.** Índice de diversidade de Shannon-Wiener para os genótipos de cianobactérias, onde “*p<sub>i</sub>*” = número de clones com perfil “*n*” dividido pelo número total de clones analisados.

Foi realizada uma análise de agrupamento por UPGMA conforme a similaridade das lagoas nos diferentes períodos de coleta quanto à distribuição dos perfis genotípicos. Utilizou-se o programa PAST (versão 2.17) e a medida de similaridade por correlação correspondente ao complemento (1-*r*) do coeficiente de correlação (*r*) de Pearson (Hammer et al., 2001).

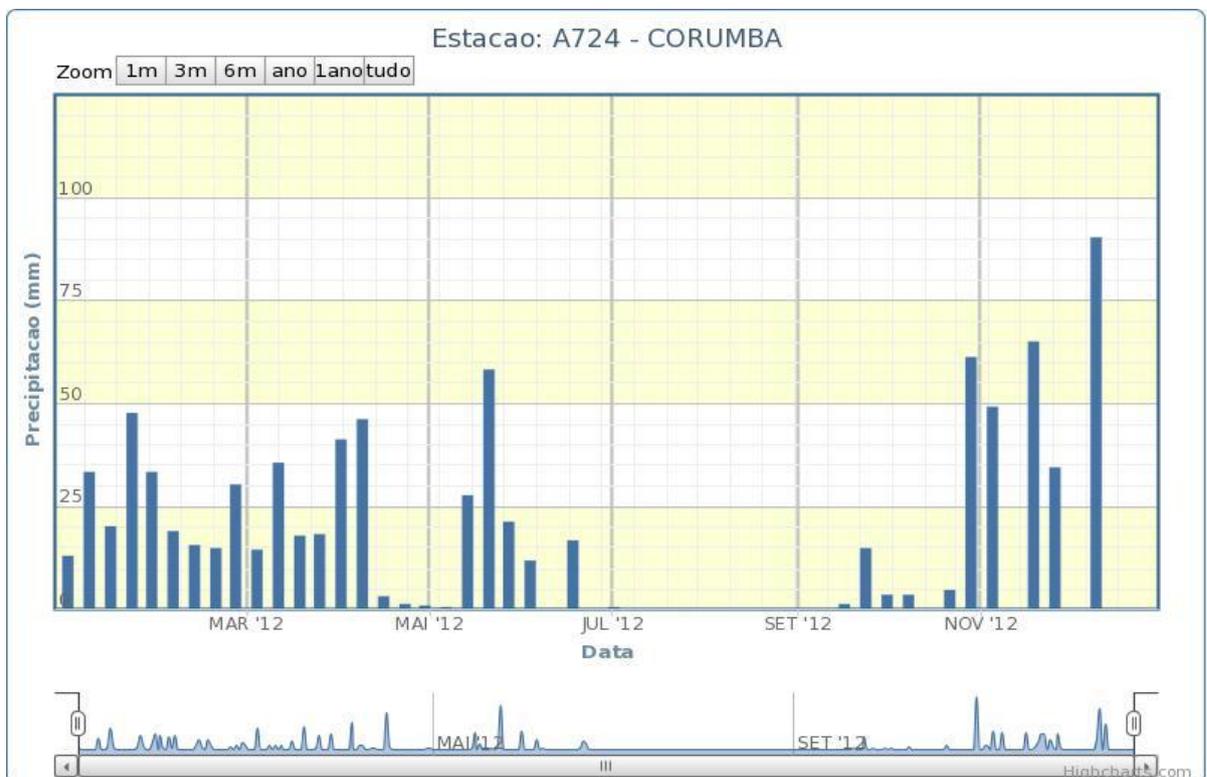
## **4. Resultados**

### **4.1 Caracterização dos períodos de chuva-seca**

O regime de chuvas no Pantanal da Nhecolândia não é rigorosamente cíclico e há ainda variações quantitativas na precipitação pluviométrica. A coleta de outubro foi feita após um longo período de chuvas, em que a precipitação atingiu os valores mais altos dos últimos 20 anos, chegando a 293 mm (INMET) (fig. 4). As lagoas estavam ainda cheias no final da estação chuvosa de 2011. Ao contrário, em 2012, no período que antecedeu a coleta de abril, a precipitação não ultrapassou os 63 mm registrados ainda em dezembro de 2011 (INMET) (fig. 5) e a coleta foi realizada numa época em que a profundidade das lagoas era inferior à profundidade registrada em 2011.



**Figura 4.** Precipitação registrada pela estação Meteorológica de Corumbá (MS) no período de janeiro de 2011 a janeiro de 2012 (INMET).



**Figura 5.** Precipitação registrada pela estação Meteorológica de Corumbá (MS) no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2012 (INMET).

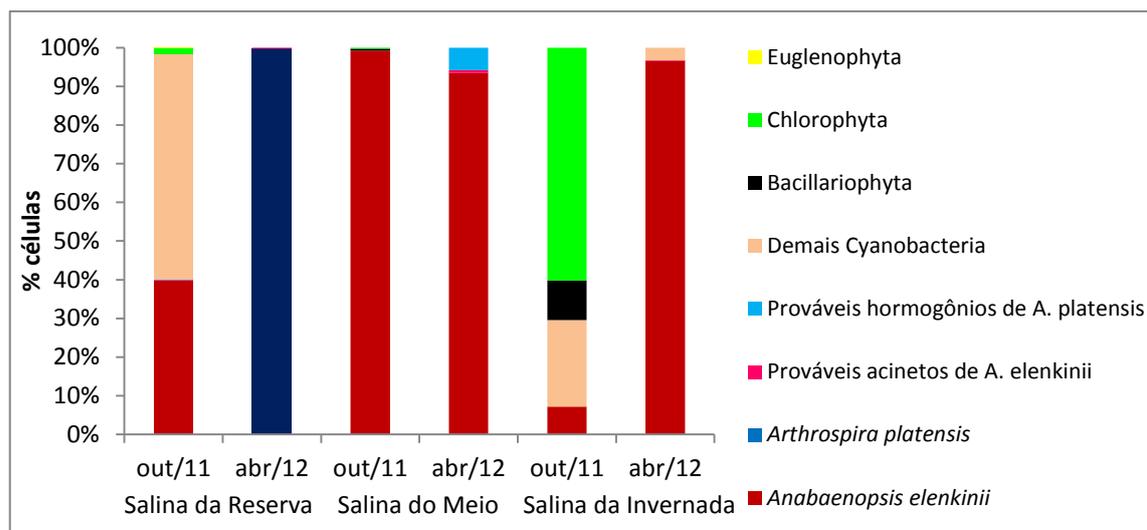
## 4.2 Comunidade fitoplanctônica

A figura 6 representa a comunidade fitoplanctônica das amostras estudadas em termos da porcentagem de células dos grupos identificados na contagem: os filos Euglenophyta, Chlorophyta e Bacillariophyta, as cianobactérias que apresentaram dominância monoespecífica, *Arthrospira platensis* e *Anabaenopsis elenkinii*, prováveis hormogônios de *A. platensis*, prováveis acinetos de *A. elenkinii* e as demais espécies do filo Cyanobacteria.

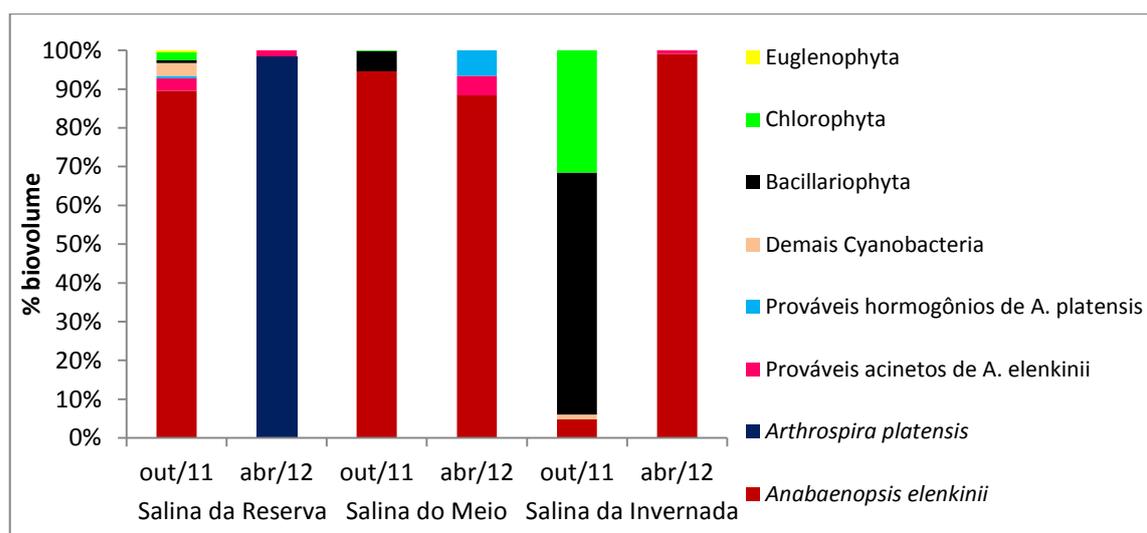
A figura 7 apresenta os mesmos dados da figura 6 em termos de biovolume.

Em ambos os gráficos é perceptível a dominância de uma única espécie de cianobactérias para todas as salinas no período de início da seca (abril de 2012). Nas salinas do meio e da invernada *A. elenkinii* foi a espécie dominante na seca, representando respectivamente de 88% e 99% do biovolume total, enquanto na salina na reserva no mesmo período *A. platensis* foi a espécie dominante (98,45% do biovolume total), tendo sido ainda identificados nesta última amostra apenas os possíveis acinetos de *A. elenkinii* (1,55% do biovolume total).

*A. elenkinii* apresentou dominância monoespecífica também em outubro de 2011 (final da cheia) nas salinas da reserva (89,5% do biovolume total) e do meio (94,6% do biovolume total). Na salina da invernada desse mesmo período não houve floração de cianobactéria e o filo Bacillariophyta (62,4% do biovolume total) apresentou maior abundância em termos de biovolume, seguido do filo Chlorophyta (31,5%), enquanto *A. elenkinii* (4,8%) e as demais cianobactérias (1,3%) representam os 6,1% restantes. Conforme os dados de contagem de células, contudo, a dominância foi das espécies do filo Chlorophyta (60,23% das células totais) contra as de Bacillariophyta (com uma representação de 10,18% do somatório das células).

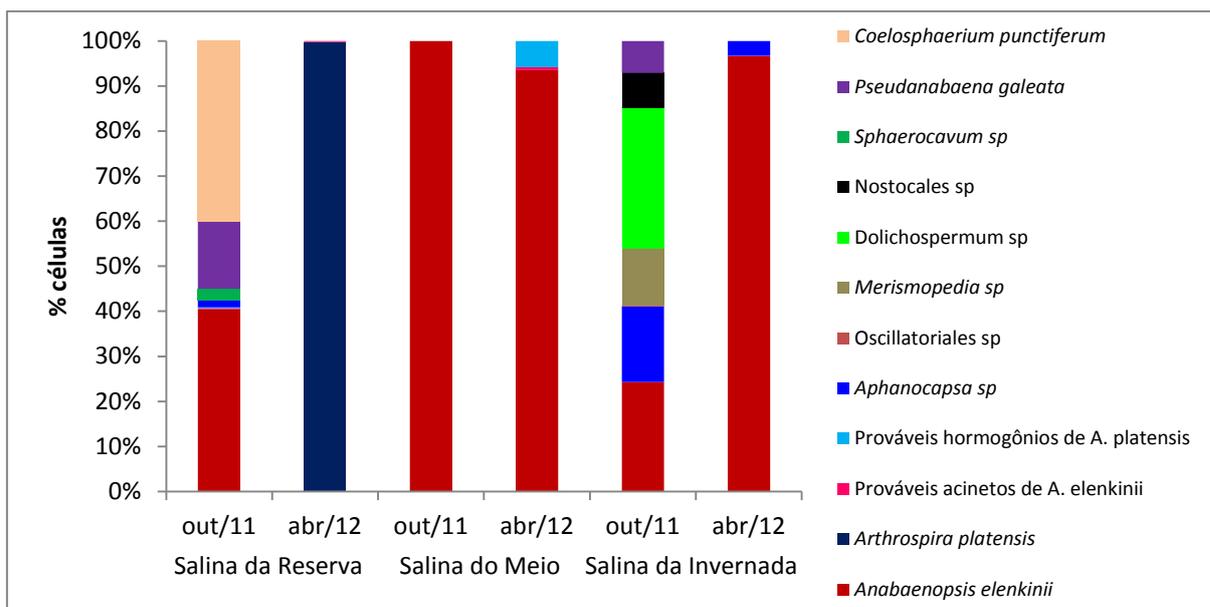


**Figura 6.** Estrutura da comunidade fitoplanctônica, em porcentagem de células dos grupos mais representativos, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.

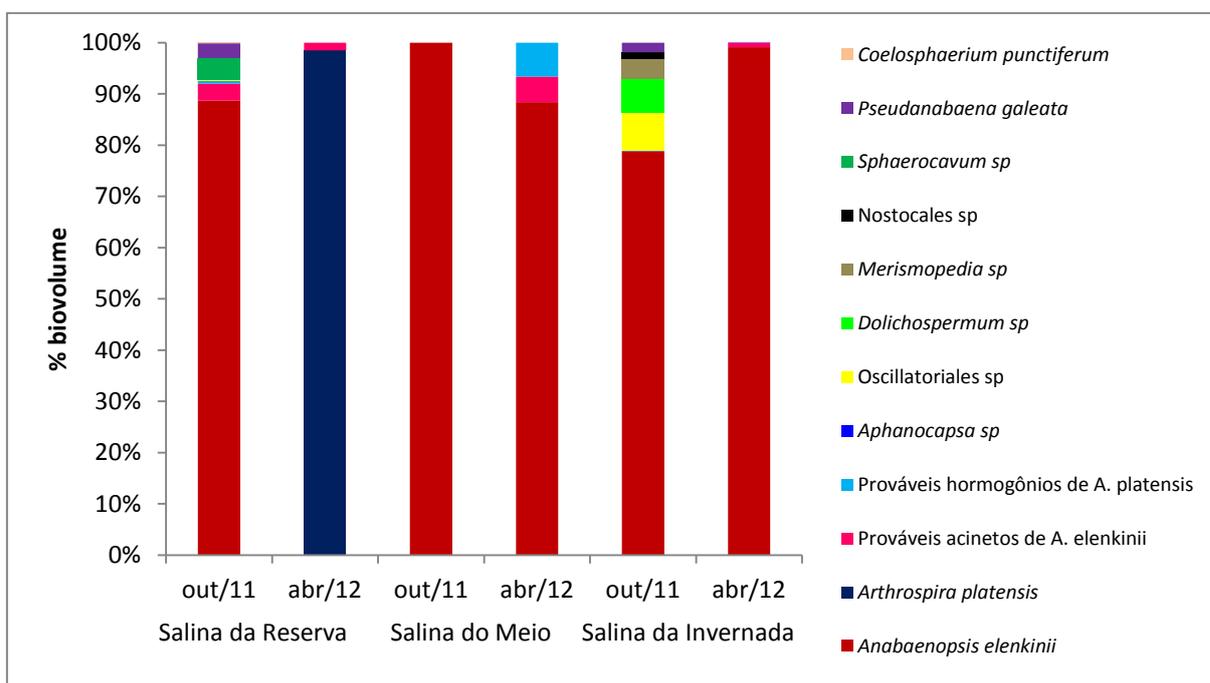


**Figura 7.** Estrutura da comunidade fitoplanctônica, em porcentagem de biovolume dos grupos mais representativos, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.

As figuras 8 e 9, por sua vez, consideram apenas a comunidade de cianobactérias e a abundância relativa (porcentagem) das espécies deste filo em termos de número de células e biovolume celular, respectivamente.



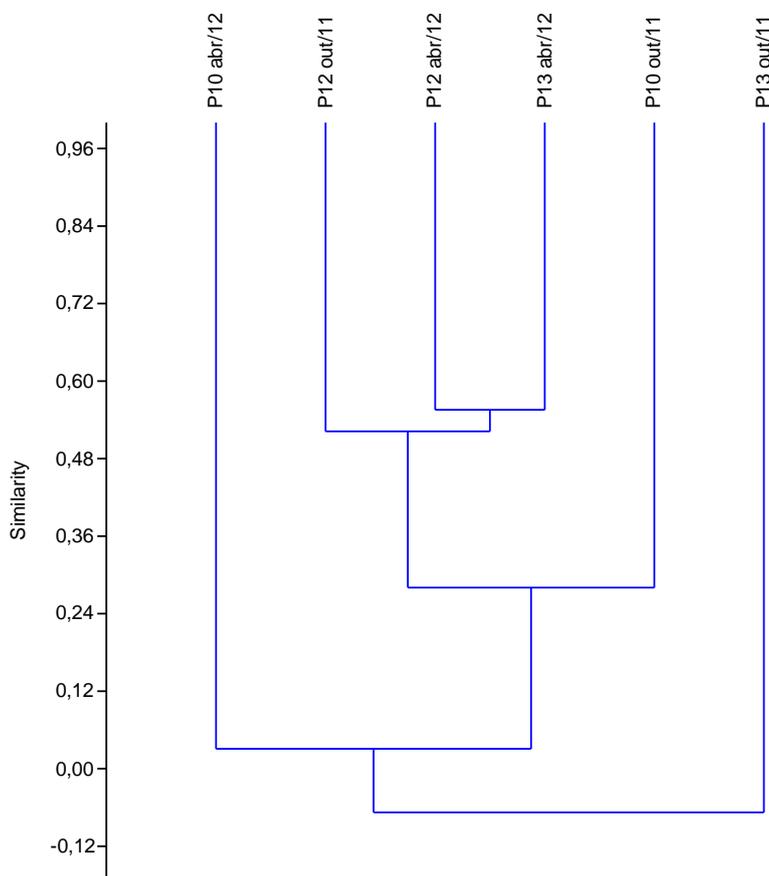
**Figura 8.** Estrutura da comunidade de Cyanobacteria, em porcentagem de células de cada espécie, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.



**Figura 9.** Estrutura da comunidade de Cyanobacteria, em porcentagem de biovolume de cada espécie, nas salinas da reserva, do meio e da invernada nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.

Nota-se a dominância da espécie *A. elenkinii* na comunidade de cianobactérias de quase todas as amostras, sendo a salina da reserva de abril de 2012, onde *A. platensis* é a espécie dominante, a única exceção.

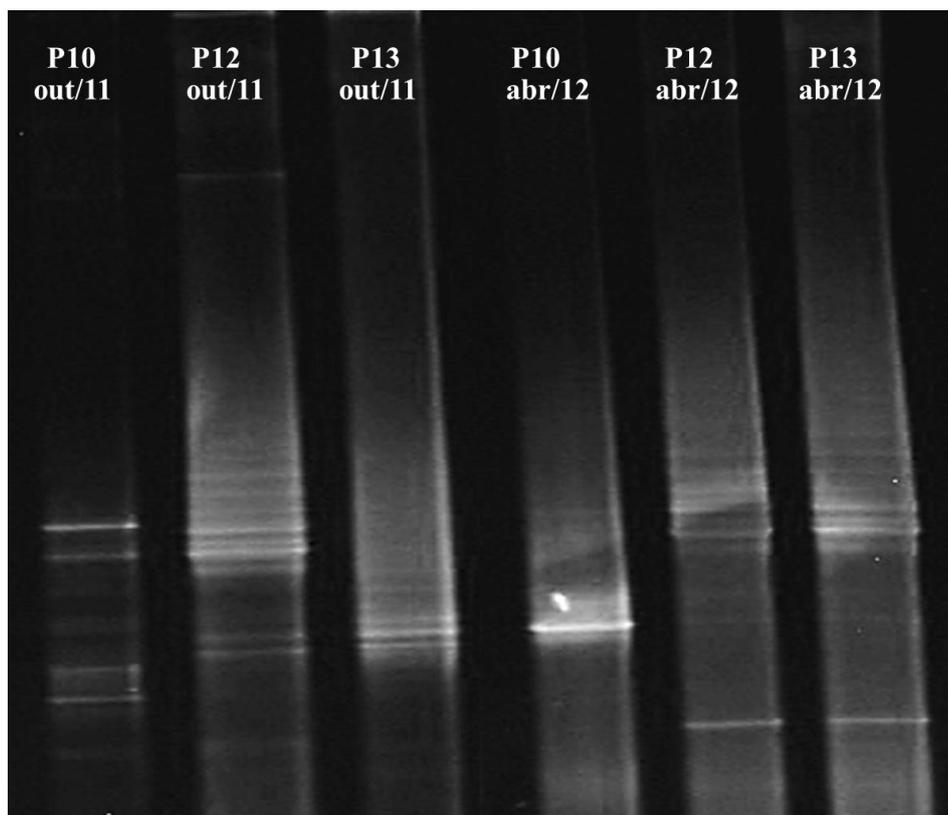
A figura 10 mostra o dendrograma resultante da análise de agrupamento por similaridade gerada pelo programa estatístico PAST (2.17) a partir da similaridade das amostras quanto à composição da comunidade de cianobactérias. Esta análise baseia-se na tabela de presença ou ausência de espécies, portanto não é influenciada pela abundância das mesmas. O coeficiente cofenético, que indica o quão bem o dendrograma reflete a estrutura de similaridade nos dados originais (Hammer et al., 2001), foi igual a 0,7573.



**Figura 10.** Análise de agrupamento UPGMA baseada na similaridade da composição da comunidade de cianobactérias identificadas morfológicamente nas amostras estudadas, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.

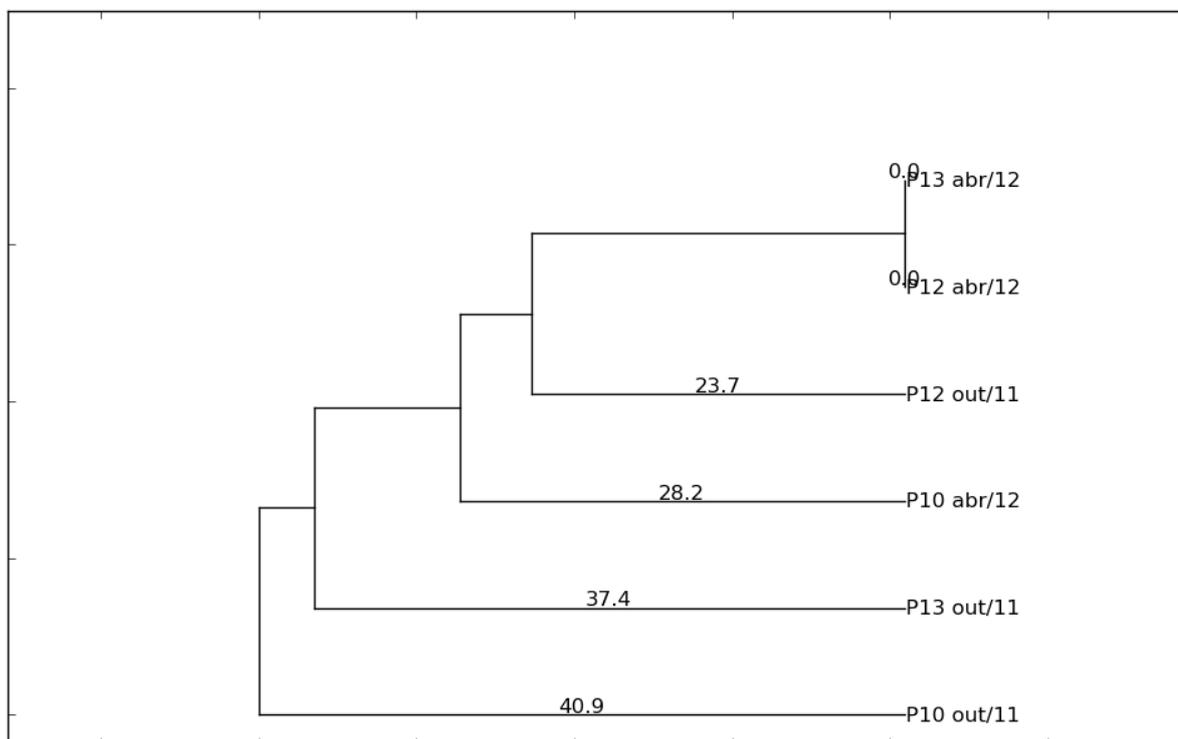
### 4.3 Gel de Eletroforese em Gradiente de Desnaturalização – DGGE

A figura 11 corresponde à foto do gel com o perfil de DGGE dos fragmentos da região gênica 16S rRNA de cianobactérias, amplificados por PCR a partir das amostras de DNA genômico das salinas estudadas. Foram detectadas 6, 10 e 6 bandas nas amostras das salinas da reserva, do meio e da internada de outubro de 2011, respectivamente. Nas amostras de abril de 2012, detectaram-se 3, 9 e 9 bandas para as salinas da reserva, do meio e da internada, respectivamente.



**Figura 11.** Perfil de DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA amplificados por PCR da comunidade de cianobactérias dos ambientes estudados, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da internada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012. **OBS.:** A nitidez limitada da imagem não permite a visualização de todas as bandas que estavam presentes e que foram usadas neste trabalho.

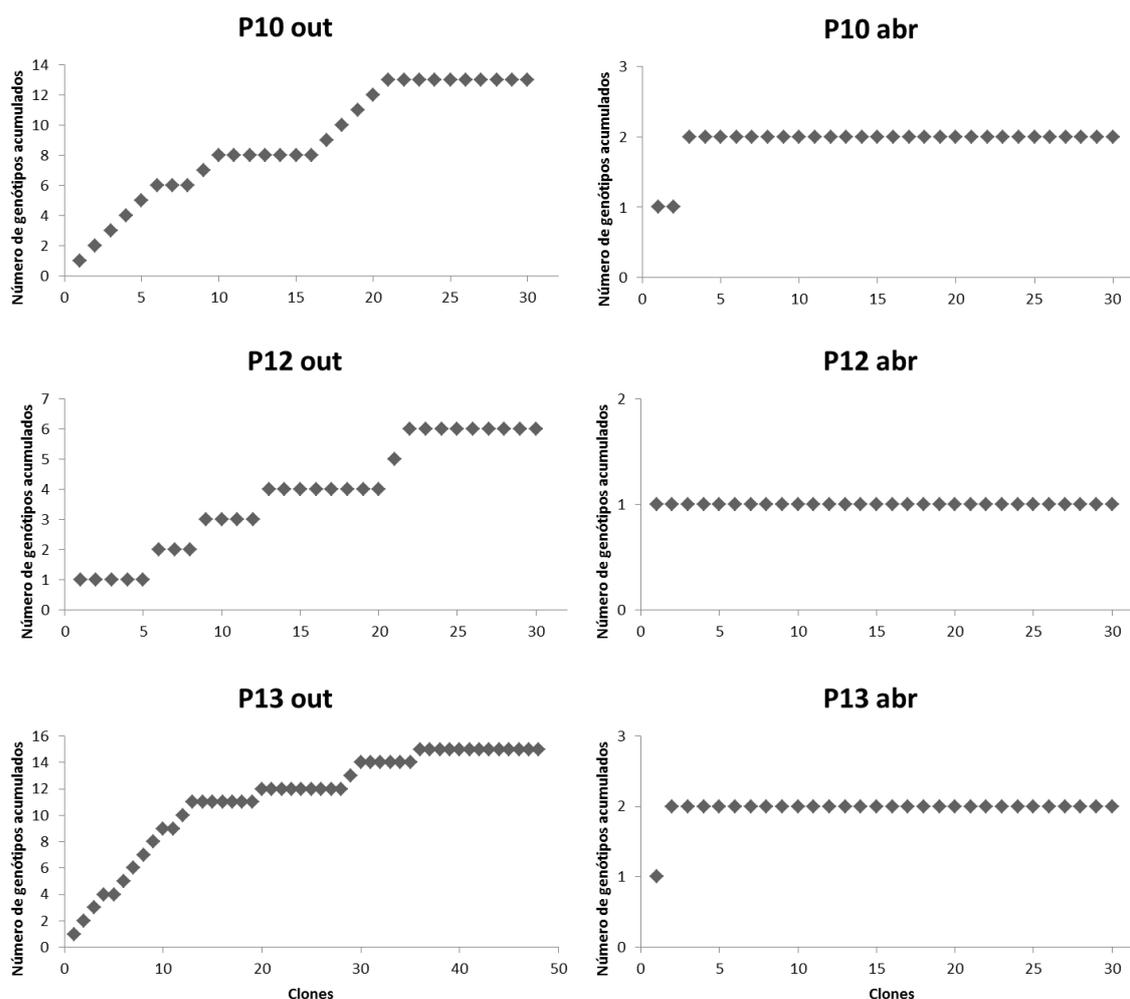
A figura 12 mostra o dendrograma resultante da análise de agrupamento por similaridade do perfil de DGGE produzido por amostra, gerada pelo programa de análise de imagens de géis de DNA PyElph (1.4). Os valores apresentados a cada ramo representam o grau de dissimilaridade, que varia de 0 a 100, entre a amostra que se desmembra neste ramo e o conjunto de amostras ainda agrupadas.



**Figura 12.** Análise de agrupamento UPGMA baseada na similaridade do perfil de DGGE de cada ambiente estudado, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da internada (P13) nos períodos de outubro de 2011 e abril de 2012.

#### 4.4 Clonagem

A figura 13 representa a relação entre o número de genótipos acumulados por clone cujo perfil de ARDRA foi estudado. Quando se alcança um ponto de saturação, isto é, o ponto a partir do qual apesar de mais clones serem genotipados, nenhum genótipo diferente é computado, a seleção de novos clones para genotipagem já pode ser seguramente interrompida. Esse ponto foi rapidamente alcançado para as amostras do período da seca (abril de 2012), indicando a baixa diversidade genética da comunidade de cianobactérias nesta época. Atingiu-se o ponto de saturação de forma relativamente rápida também nas amostras da salina da reserva e do meio de outubro, o que levou à utilização de 30 clones de cada uma dessas cinco amostras. A diversidade genética mostrou-se maior na salina da internada de outubro, fato que levou à seleção de 48 clones para genotipagem.



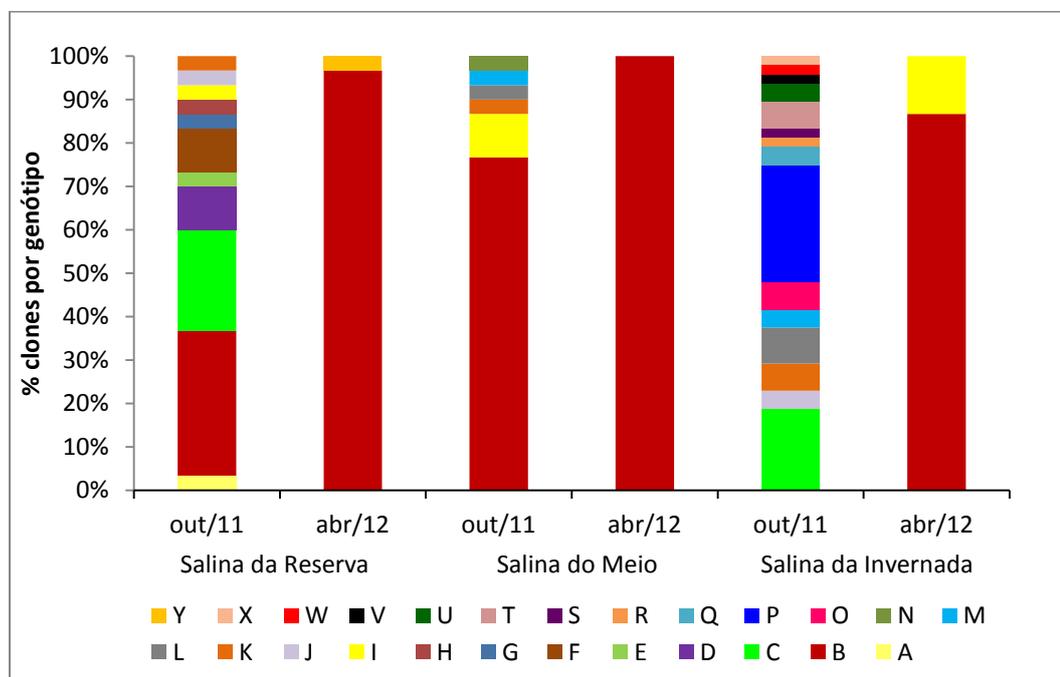
**Figura 13.** Relação do número de genótipos acumulados por clone para cada uma das amostras, salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da internada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.

#### 4.5 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado – ARDRA

Foram identificados ao total 25 genótipos distintos (A-Y) conforme a diferença no tamanho dos fragmentos produzidos após digestão com a enzima de restrição *Bsu*RI.

A distribuição desses genótipos dentre as amostras em termos da abundância de clones que os apresentavam é mostrada na figura 14. A alta diversidade da salina da internada em outubro de 2011 é novamente ressaltada nesta análise. O genótipo B, presente em todas as amostras com exceção da salina da internada de outubro de 2011, é também o mais abundante nelas (33,3% na salina da reserva em outubro e 96,7% em abril; 76,7% na salina do meio em outubro e 100% em abril; 86,7% na salina da internada em abril). A dominância de um único genótipo foi mais acentuada no período da seca. Em

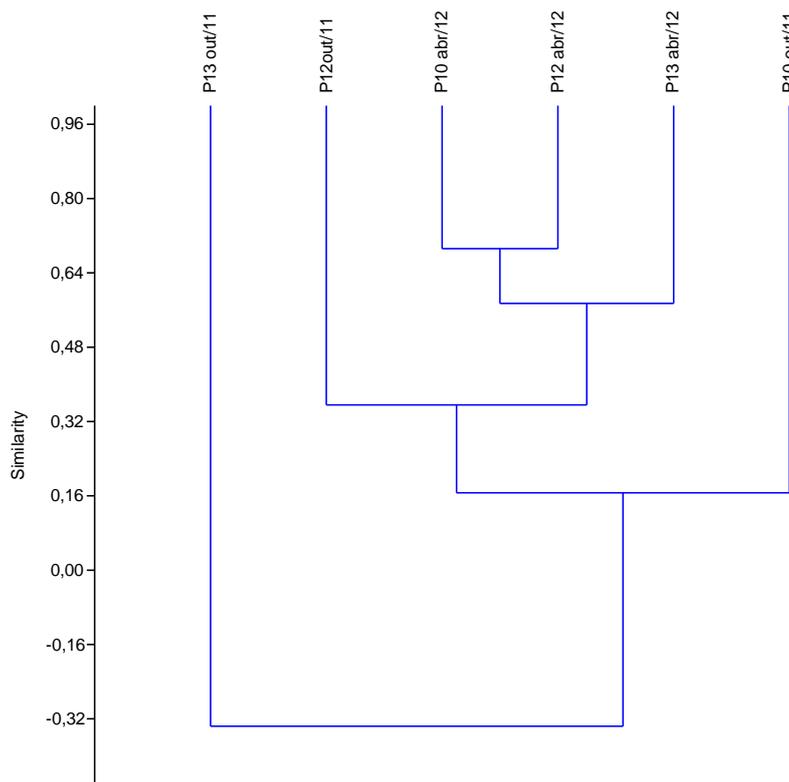
outubro de 2011, final da cheia, apenas a salina do meio apresentava um único genótipo em mais de 50% dos clones.



**Figura 14.** Distribuição dos genótipos dentro da comunidade de Cyanobacteria.

A figura 15 mostra o dendrograma produzido pela análise de agrupamento por similaridade da distribuição dos genótipos A a Y na comunidade de cianobactérias das amostras estudadas. Por se basear na presença ou ausência de genótipos, esta análise faz uma comparação somente da riqueza e da semelhança na presença dos genótipos entre as amostras, mas não da diversidade dos genótipos nelas presentes, partindo conceito de que a diversidade leva em conta a riqueza mais equitabilidade.

O coeficiente cofenético foi alto, igual a 0,9375, indicando a alta confiabilidade da análise.



**Figura 15.** Análise de agrupamento UPGMA baseada na similaridade da distribuição dos genótipos de cianobactérias nas salina da reserva (P10), salina do meio (P12) e salina da invernada (P13), nos meses de outubro de 2011 e abril de 2012.

#### 4.6 Riqueza e índices de diversidade de Shannon-Wiener

A tabela 3 mostra a riqueza da comunidade de cianobactérias em número de espécies, em número de bandas detectadas no perfil de DGGE e número de genótipos de cada amostra.

Para a salina da reserva, o padrão de diversidade foi similar para as observações a partir da identificação morfológica em microscópio óptico e as análises de DGGE, com maior riqueza de espécies no final da estação chuvosa (outubro/2011). Para a salina do meio não houve praticamente uma grande variação na riqueza entre os meses de outubro e abril (tabela 3). Porém, com relação aos valores, as análises morfológicas mostraram uma riqueza bem menor (1 e 2 espécies) do que as análises por DGGE (10 e 9 bandas). Finalmente, para a salina da invernada, houve uma diminuição na riqueza de outubro para abril, com relação às análises morfológicas, mas um ligeiro aumento, com relação ao

número de bandas encontradas por DGGE. Quando comparados aos resultados obtidos pelas análises morfológicas observa-se, em geral, um aumento da riqueza produzido pelas análises de DGGE.

A riqueza de genótipos foi em geral maior ou igual à riqueza de espécies identificadas morfológicamente (tabela 3). A única exceção foi a salina do meio, em abril de 2012, quando duas espécies morfológicamente distintas foram identificadas mas apenas um genótipo foi observado.

**Tabela 3.** Riqueza em número de espécies, genótipos ou bandas no perfil de DGGE das amostras estudadas para a comunidade fitoplanctônica e de Cyanobacteria.

Riqueza	Salina da Reserva		Salina do Meio		Salina da Invernada	
	out/11	abr/12	out/11	abr/12	out/11	abr/12
Espécies de Cyanobacteria (por morfotipos)	6	2	1	2	7	2
Bandas no perfil de DGGE	6	3	10	9	6	9
Genótipos de Cyanobacteria (ARDRA)	11	2	6	1	15	2

O índice de Shannon-Wiener foi calculado com base na abundância proporcional de cada espécie de cianobactéria (biovolume) ou genótipo produzido conforme o perfil de ARDRA. Em todas as amostras analisadas a diversidade de genótipos foi superior à diversidade calculada a partir do biovolume, com exceção da salina do meio em abril de 2012, onde a riqueza de genótipos foi igual a 1 (e por isso a diversidade igual a 0), mas morfológicamente duas espécies foram identificadas e a diversidade foi maior que 0.

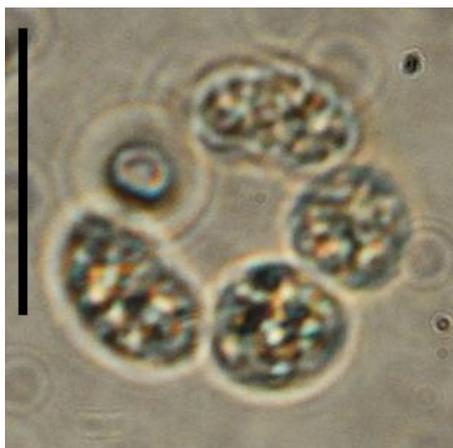
**Tabela 4.** Índice de Shannon-Wiener para a comunidade de cianobactérias das amostras estudadas com base na diversidade de espécies morfológicamente identificada (biovolume) e dos genótipos encontrados.

Índice de Shannon-Wiener	Salina da Reserva		Salina do Meio		Salina da Invernada	
	out/11	abr/12	out/11	abr/12	out/11	abr/12
Biovolume	0,2042	0,0800	0	0,2434	0,6824	0,0006
Genótipos	1,9600	0,1461	0,8874	0	2,9720	0,3927

## 5. Discussão

Nota-se a dominância das cianobactérias na comunidade fitoplanctônica de cinco das seis amostras estudadas. Em quatro delas (salina da reserva de out/11, salina do meio de out/11 e abr/12 e salina da internada de abr/12) a espécie mais abundante em termos de biovolume foi *A. elenkinii*, a qual foi também registrada como espécie dominante em trabalhos anteriores envolvendo ambientes salinos do Pantanal da Nhecolândia (Malone et al. 2007; Santos, 2008 e Santos & Sant'Anna, 2010).

*A. elenkinii* (Miller, 1923) (fig.16) é uma cianobactéria filamentosa pertencente à ordem Nostocales, com tricomas solitários, curvos e curtos (2-12 células); células cilíndricas, 4-7 µm compr., 2,5-4 µm larg.; conteúdo celular verde-azul claro; aerótopos presentes; heterócitos esféricos, 2-4 µm diâm.; acinetos elípticos a arredondados, 1-2 intercalares, 5-9 µm larg., 7-10 µm compr.



**Figura 16.** Indivíduo de *Anabaenopsis elenkinii* (salina do meio de abril de 2012). Escala equivalente a 10 µm.

*A. elenkinii* é uma espécie tropical de ambientes preferencialmente salinos e alcalinos, frequentemente encontrada na comunidade fitoplanctônica de lagos salinos e alcalinos do leste africano (Ballot et al., 2008). Santos & Sant'Anna (2010) sugerem que essa espécie possa ser um indicador de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, por ser bastante abundante nestes ambientes e muito rara ou ausente nas baías e salitradas (água doce) da mesma região. Os autores ressaltam ainda que, devido à sua importância ecológica nas lagoas salinas, deve ser dada mais importância a estudos que visem o desenvolvimento de experimentos em cultura dessa espécie, avaliando seu potencial tóxico e biotecnológico.

Santos et al. (2011) estudaram os efeitos do pH no crescimento e características morfológicas de uma cepa de *A. elenkinii* isolada da salina do meio no Pantanal da Nhecolândia. Os maiores valores de taxa de crescimento ( $\mu$ ; dia<sup>-1</sup>) e produtividade celular (R; cél. mL<sup>-1</sup>) foram observados no pH de 10,5, indicando que *A. elenkinii* é típica de sistemas alcalinos e que em valores de pH mais baixos (como 7 ou 9,5, testados no trabalho) pode ocorrer uma limitação do crescimento em termos de densidade e biomassa. Dessa forma, a formação de florações de *A. elenkinii* em lagos alcalinos do Pantanal é favorecida pelos elevados valores de pH. Ainda no mesmo trabalho, Santos et al. (2011) observaram que o pH não afeta a formação de heterócitos nem tampouco parece estar diretamente envolvido na formação de acinetos. Os autores ressaltam que os acinetos foram encontrados apenas na natureza (Santos & Sant'Anna, 2010) e que a sua ausência nos tratamentos analisados indica que as condições testadas não representam situações de estresse que induzam à produção de estruturas de resistência em *A. elenkinii*.

Na amostra de abril de 2012 da salina da reserva, a cianobactéria dominante foi *A. platensis*. A espécie *A. elenkinii*, consideravelmente menos numerosa nessa amostra, encontrava-se possivelmente apenas na forma de acinetos, sua estrutura de resistência contra fatores ambientais externos. As células em forma de acineto encontram-se em um estado fisiológico de hibernação do qual germinam após encontrarem situações ambientais favoráveis (Komárek, 2005). Considerando que *A. elenkinii* era a espécie mais abundante na comunidade fitoplanctônica das outras salinas no mesmo período, com as mesmas características de salinidade e alcalinidade que a salina da reserva, é improvável que estes fatores abióticos tenham levado à formação dos acinetos. O que se percebe, contudo, é que houve uma dominância competitiva da espécie *A. platensis* sobre *A. elenkinii*, algo inverso do que se observou neste mesmo ambiente em outubro de 2011, quando *A. elenkinii* superava competitivamente a presença de *A. platensis*, que possivelmente existia apenas na forma de hormogônios. Essa dominação competitiva pode consistir na situação de estresse que levou à formação de estruturas de resistência (acinetos ou hormogônios), mas a razão de uma espécie ou outra ser favorecida ainda permanece incerta.

*Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt 1892) é uma cianobactéria da ordem Oscillatoriales (fig.17), com tricomas solitários, regularmente espiralados (18-20  $\mu$ m altura das espiras e 20-52  $\mu$ m distância entre as espiras), geralmente longos (40-175  $\mu$ m comp.); células em geral mais curtas que largas (2-3  $\mu$ m comp., 4-5  $\mu$ m larg.); com células apicais arredondadas; conteúdo celular verde azulado; aerótopos presentes.



**Figura 17.** Indivíduo de *Arthrospira platensis* (salina da reserva de abril de 2012). Escala equivalente a 10  $\mu\text{m}$ .

*A. platensis* é também conhecida por apresentar dominância em comunidades fitoplanctônicas de lagos salinos e alcalinos e existe um considerável interesse econômico no seu cultivo comercial pelo fato de suas células serem ricas fontes de proteína (60-70% do seu peso seco), de ácidos graxos insaturados (6-7% do peso seco) e vitaminas (Ayachi et al., 2007).

A adaptabilidade de *A. platensis* ao estresse salino tem sido amplamente estudada (Zeng & Vonshak, 1998; Lu & Vonshak, 1999, 2002), especialmente para dar suporte à produção de biomassa em locais abertos, onde a exposição à intensa luz solar em condições áridas ou semi-áridas leva à constante evaporação de água dos tanques de produção e a um progressivo aumento na concentração de sal nas culturas, conduzindo a um estresse salino usualmente acompanhado de inibição fotossintética (Vonshak, 1997). Esse efeito foi posteriormente detalhado por Lu & Vonshak (2002), cujas observações revelaram múltiplos efeitos sobre o funcionamento do fotossistema II (PSII) nas primeiras 12 horas após o estresse salino induzido. Detectou-se a inibição do transporte de elétrons,

tanto do lado acceptor quanto do doador no PSII, um dano ao ficobilissomo evidenciado por uma redução significativa no conteúdo de ficocianinas e a troca da distribuição da energia de excitação em favor ao PSI. Essas respostas iniciais ao estresse salino são cruciais no sentido de determinar se o organismo será capaz de sobreviver à rápida mudança de salinidade e entrar num estado de aclimação à elevada concentração de sais (Lu & Vonshak, 2002).

Segundo Pogoryelov et al. (2003), as funções celulares dos indivíduos de *A. platensis* são otimizadas em condições extremas (pH 9,5-11,5 e 150-250 mM de NaCl) e por isso essa cianobactéria é tida como organismo modelo na investigação da adaptação de organismos fotossintéticos a condições ambientais extremas. Mais especificamente, Pogoryelov et al. (2003) afirmam que em condições alcalinas o sistema transportador de elétrons do aparelho fotossintético depende gravemente de íons sódio, como também evidenciado por Schlesinger et al. (1996). Sugere-se que o principal papel dos íons sódio seja manter a homeostase do pH via antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  através da membrana plasmática.

Em de outubro de 2011, *A. platensis* encontrava-se na forma de possíveis hormogônios na salina da reserva, numa proporção de 0,5% do biovolume total, enquanto *A. elenkinii* era a espécie dominante, com suas células vegetativas representando 88,72% do biovolume total. Considerando-se que os hormogônios eram realmente de *A. platensis*, fica evidente que houve uma troca da espécie de cianobactéria dominante de um período para outro. Os indivíduos de *A. platensis*, que se encontravam na sua forma reprodutiva de resistência voltaram ao seu estado fisiológico ativo e aumentaram sua abundância de forma exponencial, enquanto os indivíduos de *A. elenkinii*, que existiam em maioria em sua forma vegetativa, sofreram drástica redução da abundância e passaram a existir somente em forma de acinetos, cuja identificação tornou-se possível graças à visualização de alguns indivíduos com células em processo de degradação e com o acineto intacto.

Comparando-se os gráficos das figuras 6 e 7, apresentadas nos resultados, é possível notar que existe diferença quando se trabalha com biovolume ou número de células dos indivíduos. Algumas espécies podem ser pouco abundantes em termos de células, mas ter uma representação maior em termos de biovolume por possuírem células volumosas, outras podem ser mais numerosas em termos de células, mas serem menores em tamanho e assim corresponderem a uma parcela menos representativa do biovolume total.

A diferença entre abundância medida por contagem de células e por biovolume celular foi maior para salina da invernada no período de outubro de 2011. O grupo mais abundante é representado pelo filo Chlorophyta (60,23%) ao se considerar o número de células, seguido do filo Bacillariophyta (10,18%) como subdominante. Essa situação se inverte ao se considerar o biovolume: Bacillariophyta (62,4%) passa a ser o filo dominante, seguido de Chlorophyta (31,5%). Essa diferença foi gerada pelos indivíduos de *Eutetramorus* sp (Chlorococcales, Chlorophyta), mais numerosos e com menor biovolume que os indivíduos de uma Bacillariophyta cuja identificação específica não foi efetivada, mas que provavelmente corresponde a uma espécie de Naviculaceae.

Para as demais amostras o cálculo do biovolume de um modo geral apenas reforçou a representatividade das espécies dominantes *A. elenkinii* ou *A. platensis*, especialmente na salina da reserva de outubro. Nesta amostra indivíduos de *Coelosphaerium punctiferum*, uma espécie de picocianobactéria colonial, foram abundantes em termos de número de células (39,44% da comunidade fitoplanctônica total, enquanto as células de *A. elenkinii* representaram 39,78% do total), mas pouco representativos ao se considerar o biovolume (0,15% do biovolume total enquanto *A. elenkinii* representou 85,95%).

Em termos ecológicos a abundância medida pelo biovolume representa melhor uma população fitoplanctônica dentro do ecossistema aquático, afinal não só o espaço ocupado, como também a quantidade de nutrientes consumida por uma espécie e a quantidade de energia produzida, representando a produtividade primária, está diretamente relacionada ao volume celular dos indivíduos. Dessa forma, índices de biodiversidade baseados no biovolume celular, como feito no presente trabalho, representam melhor mudanças ocorridas na estrutura da comunidade fitoplanctônica (Figueredo & Giani, 2001).

Analisando-se apenas a comunidade de cianobactérias (fig. 8 e 9) nota-se que não há grandes diferenças ao se comparar com a comunidade fitoplanctônica total (fig. 6 e 7), com exceção da amostra de outubro da salina da invernada, fato que evidencia a forte representação das cianobactérias dentro da comunidade fitoplanctônica das salinas do pantanal, como evidenciado também nos trabalhos anteriores de Malone et al. (2007), Santos (2008) e Santos et al. (2010).

O dendrograma gerado pela análise de similaridade da comunidade de cianobactérias das amostras reforça a semelhança entre as salinas do meio e da invernada no período da seca (P12 abr/12 e P13 abr/12) e a salina do meio ao final da cheia (P12 out/11), que apresentaram as comunidades mais pobres em termos de número de espécies

identificadas e cuja espécie em comum, *A. elenkinii*, crescia em altas densidades (produzindo o fenômeno que chamamos de floração). A salina da reserva ao final da cheia (P10 out/11), onde também foi observada floração de *A. elenkinii*, mas havia uma riqueza um pouco maior de cianobactérias, foi identificada como a mais semelhante às três citadas anteriormente, seguida da salina da reserva na seca (P10 abr/12), com riqueza também baixa, mas presença de floração de *A. platensis* enquanto *A. elenkinii* encontrava-se na forma de acinetos. A salina da invernada ao final da cheia (P13 out/11) é a mais distante das outras cinco, pois nela foi possível notar uma diversidade maior embora *A. elenkinii* ainda dominasse a comunidade de cianobactérias. O coeficiente cofenético (igual a 75,73%), que indica a fidelidade do dendrograma com relação ao quanto ele reflete a real similaridade dos dados, apresentou um valor razoável para a análise.

O perfil de DGGE dos fragmentos do gene 16S rRNA de diferentes espécies cianobactérias amplificados por PCR, mostrado na figura 11, permite uma visualização geral da composição da comunidade total de cianobactérias nas seis amostras estudadas. Partindo da consideração de que, em teoria, cada banda a uma altura diferente representa uma sequência distinta (Muyzer et al., 1993), a salina do meio de outubro seria a amostra mais rica (com 10 bandas detectadas), seguida das salinas da invernada e do meio de abril (com 9 bandas cada), salinas da reserva e da invernada de outubro (6 bandas) e salina da reserva de abril (3 bandas) (tabela 3). A maior riqueza encontrada para a maioria das amostras com as análises de DGGE, quando comparadas às análises morfológicas, poderia ser esperada, pois as análises moleculares são capazes de detectar cianobactérias de tamanho bem menor do que as visíveis ao microscópio óptico, permitindo, portanto, uma análise mais minuciosa da comunidade. Além disto, estudos moleculares em geral revelam uma riqueza maior quando comparados a estudos morfológicos, justamente por serem capazes de detectar pequenas mudanças em sequências de DNA capazes de refletir uma entidade ecológica distinta, mas que nem sempre refletem uma entidade morfológica distinta, sendo essa a grande vantagem e também o motivo pelo qual se faz necessário o estudo molecular (Taton et al., 2003; Estrada et al., 2004; Willame et al., 2006).

A análise de UPGMA mostrada na figura 12 ressalta a forte similaridade entre as salinas do meio e da invernada em abril de 2012, a salina do meio de outubro é indicada como a mais semelhante a essas duas, bem como sugeriram os dados de identificação morfológica (fig. 10). A diferença observada entre estes dois dendrogramas consiste apenas na amostra que mais se distinguiu do grupo. Esta foi representada pela salina da

reserva (P10) de outubro, quando analisado o perfil de DGGE, que produziu um padrão de bandas mais dispersas entre si, pouco similar ao observado nas demais canaletas, e pela salina da invernada (P13) de outubro quando analisados os dados morfológicos.

Enquanto dez espécies de cianobactérias foram identificadas morfológicamente combinando-se todas as amostras (fig. 8 e 9), 25 genótipos distintos foram identificados conforme o perfil de ARDRA (fig. 14). Este resultado corrobora com o encontrado em outras análises de diversidade de comunidades de cianobactérias que comparam dados morfológicos e genéticos baseados em sequências do gene 16S rRNA (Taton et al., 2003; Estrada et al., 2004; Willame et al., 2006; Campos 2008).

O gráfico da figura 14 indica que há uma clara diminuição da diversidade de cianobactérias em todas as salinas no período de início da seca (abril de 2012) e que um genótipo tende a dominar neste período (genótipo B). Existe aqui uma incongruência de dados quando se compara este gráfico ao obtido a partir das espécies identificadas em microscopia óptica no que se refere à amostra da salina da reserva de abril de 2012. Conforme a figura 9, a espécie de cianobactéria dominante nesta amostra é diferente da espécie dominante nas demais, o que não se evidencia pela análise dos genótipos. Considerando que não houve erro na identificação morfológica, pois as espécies são visivelmente distintas como se evidencia comparando as figuras 16 e 17, é possível que tenha ocorrido algum tipo de seleção negativa quanto à amplificação da sequência 16S rRNA da espécie *A. platensis*, detectada como dominante na salina da reserva de abril pelos dados morfológicos.

A análise de UPGMA a partir da composição genotípica revelada pelo perfil de ARDRA das comunidades de cianobactérias estudadas reforça a similaridade das salinas no período da seca (abril de 2012), quando a evaporação é mais intensa e conseqüentemente há maiores valores de salinidade. Esse resultado indica o forte efeito seletivo das elevadas concentrações de sal, responsável pela diminuição da diversidade de espécies no ambiente (Estrada et al., 2004). No período correspondente ao final da cheia a salina do meio foi aquela com maior semelhança com as amostras do período da seca. De fato, das três salinas estudadas, a salina do meio foi a que apresentou os mais altos valores de salinidade (2,3 ppt), pH (10,2) e condutividade iônica (4596  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) em outubro, contra a salinidade de 1,0 ppt, pH 9 e condutividade 2089  $\mu\text{S}/\text{cm}$  na salina da reserva e 0,8 ppt de sal, pH 9,1 e condutividade 1617  $\mu\text{S}/\text{cm}$  na salina da invernada no mesmo período (dados fornecidos pela EMBRAPA Pantanal). Por representar um ambiente mais seletivo que os

demais mesmo ao final da cheia, época em que os solutos encontram-se mais diluídos nas salinas, justifica-se a maior semelhança da salina do meio às amostras da época da seca, quando os solutos encontram-se mais concentrados. As salinas da reserva e da invernada de outubro apresentaram uma maior riqueza de genótipos e por isso se agruparam isoladamente na análise de UPGMA, sendo esta última aquela que mais se distanciou das demais e também a com maior diversidade, além de ter sido a única onde o genótipo B não foi encontrado.

A análise da tabela 3, com os valores de riqueza em número de espécies, genótipos produzidos por perfil de ARDRA ou bandas no DGGE, confirma o que foi discutido anteriormente: um número maior de genótipos foi encontrado quando comparado ao número de morfotipos e a riqueza de ambos foi visivelmente menor na seca considerando os dados da contagem e dos genótipos produzidos por ARDRA. Comparando-se esses dados com as bandas detectadas pelo perfil de DGGE houve, em alguns casos, um número maior de espécies detectadas pelo DGGE (por exemplo, na salina do meio em outubro e abril), e em outros o número de genótipos foi maior pela análise do ARDRA (em outubro, na salina da reserva e da invernada). Além disso, o fato de apenas um genótipo ter sido detectado pelo perfil de ARDRA na salina do meio de abril, ao contrário das duas espécies de cianobactéria identificadas morfologicamente, *A. elenkinii* e *A. platensis*, indica novamente a provável falha na detecção de uma dessas duas espécies pela metodologia do ARDRA. Essa evidência denuncia que o número de genótipos, apesar de em geral ser superior ao número de morfotipos, pode estar subestimado nas demais amostras que também apresentam essa espécie.

Os índices de diversidade de Shannon-Wiener, indicados na tabela 4, reforçam a hipótese e de que as análises moleculares acessam melhor a diversidade de microrganismos de um ambiente natural (Taton et al., 2003). Os estudos moleculares ecológicos aumentaram a habilidade de se detectar e identificar microrganismos na natureza (Amann et al., 1995). Isso pode ser consequência da viabilidade da detecção e diferenciação de genótipos por técnicas moleculares dentro do picocianoplâncton, cuja representatividade é muitas vezes subestimada em análises de biovolume por microscopia óptica e cuja diversidade genética, nem sempre refletida na morfologia, pode esconder diferenças ecologicamente significativas (Ernst et al., 2003; Campos, 2008). E não apenas espécies do picocianoplâncton podem apresentar diferenças genéticas importantes do ponto de vista ecológico que não se detectam pela análise morfológica, mas também espécies de

cianobactérias com tamanho superior a 2  $\mu\text{m}$ . A classificação morfológica de microrganismos é difícil devido a seu pequeno tamanho e aparência simples, muitas vezes sem características externas conspícuas que permitem um agrupamento confiável (Muyzer, 1999), por isso uma precisa identificação fenotípica requer tempo e experiência e é importante saber complementá-la com dados moleculares (Komárek, 2006). Komárek (2006) ressalta que, acima de tudo, é necessário saber fazer a devida correlação entre os dados morfológicos e moleculares para uma correta avaliação da função ecológica das entidades detectadas dentro da comunidade, para o entendimento do contínuo processo adaptativo e da conseqüente origem de novos ecótipos de cianobactérias.

## **6. Conclusões**

A clara distinção entre a diversidade de cianobactérias no período do final da cheia e o início da seca, caracterizando esta última como a estação de condições mais seletivas, foi demonstrada por todos os métodos utilizados no presente trabalho. Os resultados indicam tendências que provavelmente seriam ainda mais expressivas caso tivesse sido feito um número maior de coletas.

Apesar dos diferentes resultados encontrados por meio dos métodos moleculares e morfológicos, não se pode afirmar que um traga melhores informações que o outro, mas sim que ambos devam ser utilizados de forma complementar. Diferenças fisiológicas como a expressão de formas de resistência podem ser detectadas por microscopia óptica e não numa análise molecular a partir da amplificação de genes 16S rRNA, por serem resultado de uma expressão gênica diferencial que não produz alterações em nível genético. Os resultados mostraram ainda que nem todas as espécies identificadas por microscopia foram detectadas por um padrão de ARDRA diferente, embora em geral uma maior riqueza seja verificada a partir da análise das sequências de fragmentos de DNA do que pela identificação morfológica. Mesmo o método de DGGE, que recentemente tem sido alvo de críticas por gerar uma possível superestimativa da riqueza de espécies, se complementado por outras análises, como o ARDRA, para corrigir essa falha, mostra a vantagem de permitir a visualização do perfil da comunidade de cianobactérias de forma rápida e prática. Análises posteriores de sequenciamento das bandas detectadas no DGGE e dos genótipos identificados pelo perfil de ARDRA permitirão um maior entendimento dos resultados.

## 7. Referências

- Ab'Saber A N (1988) O Pantanal Mato Grossense e a teoria dos refúgios. *Revista Brasileira de Geografia* 50:9-57
- Amann R I, Ludwig W, Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1): 143-169
- Anagnostidis K & Komárek J (1988) Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie* 50/53(Suppl.80):327-472
- Armstrong H A & Brasier M D (2005) *Microfossils* (2ed). Oxford: Blackwell. 306p
- Ayachi S, El Abed A, Dhifi W, Marzouk B (2007) Chlorophylls, proteins and fatty acids amounts of *Arthrospira platensis* growing under saline conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(14):2286-2291
- Ballot A, Dadheech P K, Haande S, Krienitz L (2008) Morphological and phylogenetic analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from tropical inland water bodies. *Microbial Ecology* 55:608-618
- Barbiero L, Furian S, Queiroz Neto J P, Ciornei G, Sakamoto A Y, Capellari B, Fernandes E, Vallès V (2002) Geochemistry of water and ground water in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. *Wetlands* 22:528-540
- Barbiero L, Rezende Filho A, Furquim S A C, Furian S, Sakamoto A Y, Valles V, Graham R C, Fort M, Ferreira R P D, Queiroz Neto J P (2008) Soil morphological control on saline and freshwater lake hydrogeochemistry in the Pantanal of Nhecolândia, Brazil. *Geoderma* 148:91-106
- Bittencourt-Oliveira M C (1993) Ficoflórula do Reservatório de Balbina, Estado de Amazonas, I: Chlorococcales (Chlorophyceae). *Revista Brasileira de Biologia* 53(1):113-129
- Bourrely P (1968) *Les Algues de la Douce, Initiation à la Systematique. Volume II: Les Algues Jaunes et Brunes. Crysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées.* Paris: Éditions N. Boubée & Cie. 438p
- Bourrely P (1970) *Les Algues de la Douce, Initiation à la Systematique. Volume III: Les Algues Bleues et Rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadiens.* Éditions Paris: N. Boubée & Cie. 512p

- Bourrelly P (1972) *Les Algues de la Douce, Initiation à la Systematique*. Volume I: Les Algues Vertes. 2 ed. Paris: Éditions N. Boubée & Cie. 438p
- Boutte C, Grubisic S, Balthasart P, Wilmotte A (2006) Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *Journal of Microbiological Methods* 65:542-550
- Brown A D (1976) Microbial water stress. *Bacteriol Rev* 40:803-846
- Campos C A (2008). Estudo da diversidade de Cyanobacteria do reservatório de Furnas (MG, Brasil) por meio de caracterização morfológica e molecular. Dissertação de mestrado. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais. 91p
- Castenholz R W & Norris T B (2005) Revisionary concepts of species in the Cyanobacteria and their applications. *Algol. Stud.* 117:53-69
- Castro A A J (1993) *Cryptophyceae do Estado de São Paulo: Inventário Taxonômico*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 207p
- Coman C, Bica A, Druga B, Barbu-Tudoran L, Dragos N (2011) Methodological constraints in the molecular biodiversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:271-281
- de la Torre R, Goebel B M, Friedmann E I, Pace N R (2003) Microbial diversity of cryptoendolithic communities from McMurdo dry valleys, Antarctica. *Applied Environmental Microbiology* 69(7):3858-3867
- 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
- Doolittle W F, Woese C S, Sogin, M L, Bonen L, Stahl D (1975) Sequence studies on 16S ribosomal RNA from blue-green algae. *Journal of Molecular Evolution* 4:307-315
- Ernst A, Becker S, Wollenzien U I A, Postius C (2003) Ecosystem dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology* 149:217-227
- Estrada M, Henriksen P, Gasol J M, Casamayor E O, Pedrós-Alió C (2004) Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 281-293

- Fernandes E (2007) Organização espacial dos componentes da paisagem da baixa Nhecolândia. Tese de Doutorado. Departamento de Geografia, Universidade de São Paulo. 177p
- Fiqueredo C C & Giani A (2001) Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia* 445:165-174
- Furquim S A C, Graham R C, Barbiero L, Queiroz Neto J P, Vidal-Torrado P (2010) Soil mineral genesis and distribution in a saline lake landscape of the Pantanal Wetland, Brazil. *Geoderma* 154:518-528
- Hammer Ø, Harper D A T, Ryan P D (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1-9
- Hillebrand H, Dürselen C D, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35:403-424
- Horecká M & Komárek J (1979) Taxonomic position of three planktonic blue-green algae from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. *Preslia* 51:289-312
- INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Disponível em <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em 27 de dezembro de 2012
- Klähn S & Hagemann M (2010) Compatible solute biosynthesis in Cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 13:551-562
- Kolasa J & Biesiadka E (1984) Diversity concept in ecology. *Acta Biotheoretica* 33:145–162
- Komárek J (1982) Taxonomical definition of the genera and several species of *Ankistrodesmus* and *Selenastrum* (Chlorococcales). *Archiv für Hydrobiologie Suppl.* 63(3): 259-277
- Komárek J (1991) A Review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Algological Studies* 64:115-127
- Komárek J (2005) Phenotypic diversity of the heterocytous cyanoprokaryotic genus *Anabaenopsis*. *Czech Phycology* 5:1-35
- Komárek J (2006) Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21(4):349-375
- Komárek J & Anagnostidis K (1989) Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4: Nostocales. *Algological Studies* 56:247-345

- Komárek J & Anagnostidis K. (1998) Cyanoprokaryota I. Teil Chroococcales. *In*: Ettl H, Gärtner G, Heynig H, Mollenhauer D (eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Jena: G. Fischer Verlag
- Komárek J & Anagnostidis K (2005) Cyanoprokaryota II. Teil Oscillatoriales. *In*: Büdel B, Krienitz L, Gärtner G, Schagerl M (ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. München: Elsevier GmbH
- Komárková-Legnerová J & Kronberg G (1994) Planktic blue-green algae from lakes in South Scania, Sweden. Part I. Chroococcales. *Algological Studies* 72:13-51
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2):787-795
- Lane D L, Pace B, Oisen G J, Stahl D A, Sogin M L, Pace N R (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82: 6955-6959
- Lu C & Vonshak A (1999) Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *New Phytol.* 141:231-239
- Lu C & Vonshak A (2002) Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiol. Plant.* 114:405-413
- Lund J W G, Kipling C, Le Cren D (1958) The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170
- Malone C F S, Santos K R S, Neto M J, Sakamoto A Y (2007) Gêneros de algas no plâncton de lagoas salinas situadas na fazenda Nhumirim, Pantanal da Nhecolândia, MS. *Revista Brasileira de Biociências* 5:588-590
- Medina-Júnior P B & Rietzler A C (2005) Limnological study of a pantanal saline lake. *Braz. J. Biol.* 65(4):651-659
- Mourão G M, Ishii I H, Campos Z M S (1988) Alguns fatores limnológicos relacionados com a ictiofauna de Baías e Salinas do Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Limnológica Brasileira* 11:181-198
- 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
- Mur L R, Skulberg O M, Utkilen H (1999) Cyanobacteria in the Environment *In: Chorus, I. & Bartram, J. (ed.) Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management.* London: E & FN SPON 15-34
- Muyzer G & Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141
- Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700
- Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322
- Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8):3327-3332
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):422-430
- Pavel A B & Vasile C I (2012) PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13(9):1-6
- Pogoryelov D, Sudhir P R, Kovacs L, Gombos G, Brown I, Garab G (2003) Sodium-dependency of the photosynthetic electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35:427-437
- Popovský J & Pfiester L A (1990) Dinophyceae (Dinnoflagellida). *In: Pasher A, Ettl H, Gerloff J, Heyning H, Mollenhauer D (ed.) Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Jena: Gustav Fisher Verlag. 6:271
- Reynolds C S (1984) *The Ecology of Freshwater Phytoplankton – Cambridge Studies in Ecology.* Great Britain: Cambridge University Press
- Rott E (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43(1):34-62

- Sant'Anna C L & Azevedo M T P (1995) Oscillatoriaceae (Cyanophyceae) From São Paulo State, Brazil. *Nova Hedwigia* 60(1-2):19-58
- Sant'Anna C L, Azevedo M T P, Senna P A C, Komárek J, Komárková J. (2004) Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica* 27(2):213-227
- Santos K (2008) Biodiversidade de algas e cianobactérias de três lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 229p
- Santos K R S, Jacinavicius F R, Sant'Anna C L (2011) Effects of the pH on growth and morphology of *Anabaenopsis elenkinii* Miller (Cyanobacteria) isolated from the alkaline shallow lake of the Brazilian Pantanal. *Fottea* 11(1):119-126
- Santos K R S & Sant'Anna C L (2010) Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas (“salina”, “salitrada” e “baía”) representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 33(1):61-83
- Schlesinger P, Belkin S, Boussiba S (1996) Sodium deprivation under alkaline conditions causes rapid death of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Phycol.* 32:608-613
- Shannon C E (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27:623-656
- Silva J S V & Abdon M M (1998) Delimitação do pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33(Número Especial):1703-1711
- 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
- Sun J & Liu D (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of plankton research* 35(11):1331-1346
- Taton A, Grubisic S, Brambilla E, de Wit R, Wilmotte A (2003) Cyanobacterial diversity in a natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9): 5157-5169

- Tucci A, Sant'Anna C L, Gentil R C, Azevedo M T P (2006) Fitoplâncton do Lago das Garças, São Paulo, Brasil: Um Reservatório Urbano Eutrófico. *Hoehnea* 33(2):147-175
- Turner S, Pryer K M, Miao V P W, Palmer J D (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46:327-338
- Utermöhl H (1958) Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton. *Methodik. Mitt Int Limnol.* 9:1-38
- Vonshak A (ed) (1997) *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis
- Whitton B A (1992) Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. *In*: N.H. Mann N H & Carr N G (ed.) *Photosynthetic Prokaryotes*. New York: Plenum Press 1-51
- Willame R, Boutte C, Grubisic S, Wilmotte A, Komárek J, Hoffmann L (2006) Morphological and molecular characterization of planktonic Cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Journal of Phycology* 42:1312-1332
- Wilmotte A (1994) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, p1–25. *In* Bryant D A (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Zeng T M & Vonshak A (1998) Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 20:113-118