



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE ECOLOGIA E ANÁLISE AMBIENTAL BACHARELADO**

ICB
INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DNA *METABARCODING* PARA ANÁLISE DA MICROBIOTA AQUÁTICA EM UM
EXPERIMENTO DE MESOCOSMOS**

BEATRIZ BARBOSA ARAÚJO MARTINS

GOIÂNIA-GO 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Beatriz Barbosa Araújo Martins

Título do trabalho: DNA METABARCODING PARA ANÁLISE DA MICROBIOTA AQUÁTICA EM UM EXPERIMENTO DE MESOCOSMOS

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 17/07/2024, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Barbosa Araujo Martins, Discente**, em 23/07/2024, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4672602** e o código CRC **0A9695E8**.

Referência: Processo nº 23070.031159/2024-23

SEI nº 4672602

BEATRIZ BARBOSA ARAÚJO MARTINS

**DNA *METABARCODING* PARA ANÁLISE DA MICROBIOTA AQUÁTICA EM UM
EXPERIMENTO DE MESOCOSMOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ecologia e Análise Ambiental Bacharelado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel(a) em Ecologia e Análise Ambiental.

Orientador (a): Thannya Nascimento Soares
Coorientador (a): Jocilaine Santos de Jesus

GOIÂNIA-GO 2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Martins, Beatriz Barbosa Araújo
DNA METABARCODING PARA ANÁLISE DA MICROBIOTA
AQUÁTICA EM UM EXPERIMENTO DE MESOCOSMOS [manuscrito]
/ Beatriz Barbosa Araújo Martins, Thannya Nascimento Soares. -
2024.
Lxi, 61 f.

Orientador: Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares; co
orientadora Jocilaine Santos de Jesus.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Ecologia e
Análise Ambiental, Goiânia, 2024.
Apêndice.

1. Ecologia de comunidades. 2. eDNA. 3. Mudanças climáticas. 4.
18S rDNA . 5. 16S rDNA . I. Soares, Thannya Nascimento. II. Soares,
Thannya Nascimento, orient. III. de Jesus, Jocilaine Santos, co-orient.
IV. Título.

CDU 574



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos doze dias do mês de Julho do ano de 2024 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “DNA METABARCODING PARA ANÁLISE DA MICROBIOTA AQUÁTICA EM UM EXPERIMENTO DE MESOCOSMOS”, de autoria de Beatriz Barbosa Araújo Martins, do curso de Ecologia e Análise Ambiental, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pela Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares (ICB-UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito/EVZ/UFG e Ma. Ariany Tavares de Andrade/ICB/UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição da estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 9,67 (nove vírgula sessenta e sete), tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 12/07/2024, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito, Usuário Externo**, em 12/07/2024, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariany Tavares De Andrade, Discente**, em 15/07/2024, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Barbosa Araujo Martins, Discente**, em 19/07/2024, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4634927** e o código CRC **9F1D0DFB**.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa jornada muitas pessoas contribuíram com a minha formação de forma direta ou indireta. A todos quero deixar aqui os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade, pelo apoio. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - proc. 465610/2014-5) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG - proc. 201810267000023) por terem financiado essa pesquisa.

A minha orientadora, Thannya Nascimento Soares, que desde meados de 2019, quando dei meus primeiros passos nessa área de pesquisa, tem estado comigo me incentivando, apoiando me guiando e acompanhando meu desenvolvimento ao longo de todo o processo. Obrigada pela empatia e compreensão em todos os momentos difíceis pelo qual passei, pois sempre pude contar com a colaboração dessa pessoa incrível para me orientar.

A Cintia Pelegrineti Targueta por ter me ajudado na fase de montagem da biblioteca genômica e sequenciamento das amostras e por sempre se mostrar disponível para esclarecer todas as dúvidas referentes a esse processo.

Ao Diego Ortiz da Silva que me ajudou na fase de extração das amostras de DNA e a Jocilaine Santos de Jesus que me acompanhou em todo o processo de bancada, e foi de fundamental importância nas análises de bioinformática e estatísticas, na qual dedicou horas e horas do seu tempo para me ajudar.

Ao professor João Nabout que juntamente com sua aluna de mestrado Ariany Tavares cederam as amostras do experimento e disponibilizaram os scripts para as análises estatísticas. Ambos se mostraram muito solícitos a me auxiliar nas dúvidas que surgiram durante o processo.

Aos meus pais e minha avó, que quando ainda vivos, me deram todo o apoio emocional e financeiro para conseguir focar nos meus estudos e chegar onde estou agora, finalizando este trabalho e mais uma graduação.

Também agradeço aos meus amigos que sempre me incentivaram e torceram por mim, em especial ao Oliver Ramos por me ajudar na tradução do resumo desse trabalho.

No mais, quero agradecer a Deus por ter me dado força e ter me feito capaz de concluir esse trabalho encerrando mais uma etapa da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. <i>Coleta.....</i>	11
2.2. <i>Extração de DNA e sequenciamento.....</i>	12
2.3. <i>Análises dos dados.....</i>	14
3. RESULTADOS.....	15
3.1. <i>Qualidade do DNA extraído e dos produtos amplificados.....</i>	15
3.2. <i>Influência da temperatura e eutrofização na riqueza e composição de eucariotos (18S).....</i>	18
3.3. <i>Influência da temperatura e eutrofização na riqueza e composição de procariotos (16S).....</i>	27
4. DISCUSSÃO.....	37
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A - Planilhas com dados suplementares.....	46
APÊNDICE B - Gráficos suplementares	58

RESUMO

A microbiota aquática é muito importante nos ambientes aquáticos e desempenham funções ecossistêmicas essenciais, como a ciclagem de nutrientes e a decomposição de resíduos. Um grupo de organismos que compõem essa complexa biota é a comunidade fitoplanctônica. Para a comunidade fitoplanctônica, a temperatura mais altas e elevadas concentrações de nutrientes como o fósforo podem levar ao aumento da biomassa de algas, em especial as cianobactérias, diminuindo a biodiversidade e impactando todo o ecossistema aquático. A utilização de tecnologias e técnicas moleculares, tais como a do DNA *metabarcoding*, têm possibilitado um maior conhecimento sobre a biodiversidade da microbiota aquática. Neste estudo duas regiões do rDNA foram analisadas com o objetivo de investigar como o aumento da temperatura e a variação no estado trófico afetam a riqueza e composição das comunidades fitoplanctônicas de procariotos e microeucariotos em mesocosmos. Além disso, utilizamos diferentes abordagens metodológicas para acessar esses táxons (OTUs e ASVs) e analisar o padrão de resposta estatística entre três conjuntos de dados: OTUs/ASVs totais, OTUs/ASVs classificadas nos bancos de dados e OTUs/ASVs classificadas e filtradas manualmente para a comunidade do fitoplâncton com auxílio de artigos científicos. As amostras analisadas foram provenientes de um experimento em mesocosmos no qual foram simuladas diferentes condições de temperatura e estado trófico. O DNA foi extraído e quantificado e foram amplificadas as regiões 16S V3-V4 e 18S V4 do rDNA, para acessar organismos procariotos e eucariotos respectivamente. Os produtos amplificados foram preparados e sequenciados na plataforma MiSeq da Illumina, utilizando o kit Illumina MiSeq de 600 ciclos. Nas análises de bioinformática seguimos o pipeline PIMBA para a identificação e classificação das OTUs e ASVs. Foi realizada uma inspeção manual para a filtragem das OTUs e ASVs pertencentes ao fitoplâncton. Realizamos uma ANOVA para analisar a riqueza e a PERMANOVA para avaliar a composição de OTUs e ASVs mediante diferentes tratamentos. Os resultados obtidos em alguns casos foram diferentes para OTUs e ASVs. No entanto, percebemos que ASVs geram uma inflação nos resultados de riqueza e composição. Isso nos leva a concluir que a abordagem de OTUs seja mais adequada quando o objetivo é se aproximar do nível de espécies para avaliar comunidades da microbiota aquática. Foi observado que o aumento da carga de nutrientes foi prejudicial para a riqueza, pois promove a seleção de poucos organismos mais adaptados a ambientes eutrofizados e conseqüentemente alteram a composição e estrutura da comunidade de procariotos e eucariotos fitoplanctônicos. A faixa de temperatura de 25 °C a 28 °C não gerou alterações significativas de riqueza e composição de OTUs e ASVs para as cianobactérias, indicando que as espécies ali presentes são bem adaptadas à essa variação de temperatura. Já para os microeucariotos a temperatura teve influência positiva para a riqueza de OTUs e nenhuma influência na riqueza de ASVs. A temperatura por si só não influenciou a composição de OTUs entre os tratamentos, mas a complexa relação entre temperatura e nutriente foi importante para diferenciar essas comunidades. De forma geral, vimos que a eutrofização foi mais prejudicial para as comunidades fitoplanctônicas que o aumento da temperatura em 3°C.

Palavras-Chave: Ecologia de comunidades, eDNA, Mudanças Climáticas, 18S rDNA, 16S rDNA

ABSTRACT

Aquatic microbiota are very important in aquatic environments and perform essential ecosystem functions, such as nutrient cycling and waste decomposition. A group of organisms that make up this complex biota is the phytoplankton community. For the phytoplankton community, higher temperatures and high concentrations of nutrients such as phosphorus can lead to an increase in the biomass of algae, especially cyanobacteria, reducing biodiversity and impacting the entire aquatic ecosystem. The use of advanced molecular technologies and techniques, such as DNA metabarcoding, has enabled greater knowledge about the biodiversity of the aquatic microbiota. In this study, two rDNA regions were analyzed in order to investigate how temperature rise and trophic state variation affect the richness and composition of phytoplankton communities of prokaryotes and microeucariots in mesocosms. We employed various methods to examine these taxa (OTUs and ASVs) and evaluate the statistical pattern of response across three data sets: Total OTUs/ASVs, OTUs/ASVs classified in databases, and OTUs/ASVs classified and manually filtered for the phytoplankton community with the help of scientific articles. The samples were examined from a mesocosm experiment where various temperature and trophic state conditions were simulated. The DNA was extracted and quantified and the 16S V3-V4 and 18S V4 rDNA regions were amplified to access prokaryotic and eukaryotic organisms respectively. The amplified products were prepared and sequenced on the Illumina MiSeq platform using the 600-cycle Illumina MiSeq kit. In bioinformatics analyses, we follow the PIMBA pipeline for the identification and classification of OTUs and ASVs. A manual inspection was performed to filter the OTUs and ASVs belonging to the phytoplankton. We conducted an ANOVA and PERMANOVA to evaluate the richness and composition of OTUs and ASVs under different treatments. It was observed that there were differences in the results obtained for OTUs and ASVs in certain cases. However, we noticed that ASVs generate an inflation in the results of wealth and composition. This leads us to conclude that the OTUs approach is more appropriate when the objective is to approach the species level to evaluate aquatic microbiota communities. Our findings showed that the increase in nutrient load was harmful to richness, as it encourages the selection of specific organisms that are more suited to eutrophic environments, which, in turn, affects the composition and structure of the community of prokaryotes and phytoplankton eukaryotes. The richness and composition of OTUs and ASVs for cyanobacteria were not significantly altered by the temperature range between 25 °C and 28 °C, suggesting that the species present are well adapted to this temperature variability. For microeucariots, temperature had a positive influence on OTUs richness and no influence on ASVs richness. Temperature did not have any impact on the composition of OTUs between treatments, but the complex relationship between temperature and nutrients was crucial to distinguish these communities. In general, we saw that eutrophication was more harmful to phytoplankton communities than the increase in temperature at 3°C.

Keywords: Community Ecology, eDNA, Climate Change, 18S rDNA, 16S rDNA

1. INTRODUÇÃO

A microbiota aquática é representada por uma enorme diversidade de organismos, com diferentes origens evolutivas (procariotos e eucariotos), níveis tróficos (autotrófico, heterotróficos ou mixotrófico) e nichos ecológicos. São organismos indispensáveis a qualquer ambiente, pois realizam funções ecossistêmicas primordiais, tais como a ciclagem de nutrientes e decomposição de resíduos (Rodrigues-Valera, 2004). Boa parte desses microrganismos fazem parte da comunidade planctônica e é representado por uma grande variedade de organismos como bactérias, arqueas, fungos, vírus, protistas, etc (Zinger *et al.*, 2012). E dentro desse conjunto de microrganismos planctônicos destacamos aqui o fitoplâncton que são os principais responsáveis pela produção primária (Field *et al.*, 1998).

Dessa forma é importante que a comunidade seja bem estruturada, possuindo todos os organismos necessários para que todas as funções ecológicas sejam realizadas, e assim manter o bom funcionamento do ecossistema aquático. No entanto, alterações ambientais, como o aumento de temperatura e a elevação do nível de nutrientes na água, podem afetar de maneira diferente a microbiota aquática (Dudgeon *et al.*, 2006, Machado *et al.*, 2023). No caso do fitoplâncton, a temperatura elevada e maior quantidade de nutrientes podem levar ao aumento da biomassa de algas, em especial as cianobactérias, diminuindo a biodiversidade aquática (Yan *et al.*, 2023). Há também evidências de que o aumento da temperatura pode alterar a composição da comunidade fitoplanctônica favorecendo organismos de tamanhos menores (Machado, 2020). Ainda assim, muito precisa ser compreendido sobre como essas variáveis podem interferir nas comunidades da microbiota aquática.

Investigações científicas e o aumento do conhecimento sobre a biodiversidade da microbiota aquática, têm sido mais eficientes com o uso das tecnologias e técnicas moleculares cada vez mais avançadas, como o sequenciamento de nova geração (NGS) (Toyama, 2011). Amostras de DNA ambiental (eDNA) têm sido usadas para elucidar diversas questões, como a detecção de espécies raras, invasoras, ameaçadas de extinção, além de fazer o monitoramento da biodiversidade e da saúde do ecossistema (Banerjee *et al.*, 2022). O DNA *metabarcoding* é uma técnica que utiliza primers universais para a amplificação de regiões dos genes de subunidades pequenas do RNA ribossomal, em especial o 18S e 16S, e permite a identificação de diferentes linhagens e espécies raras, com alta resolução (Santoferrara 2019).

Tecnologias de sequenciamento cada vez mais robustas aliadas à disponibilidade de programas de bioinformática tem tornado possível diversas investigações a nível molecular (Chiarello *et al.*, 2022.).

Neste estudo, utilizamos a técnica de DNA *metabarcoding* para investigar como o aumento da temperatura e a variação no estado trófico do ambiente aquático afetam as comunidades de procariotos e microeucariotos aquáticos da microbiota fitoplanctônica. Analisamos amostras utilizando duas regiões do DNA ribossomal (18S e 16S), para responder às seguintes questões:

- i) Os padrões de Riqueza e de composição de OTUs (*Operational Taxonomic Units*) e/ou ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) mudarão em função do aumento da temperatura e/ou mudança no estado trófico?
- ii) Qual o padrão de resposta estatística entre três conjuntos de dados: OTUs/ASVs totais, apenas classificadas taxonomicamente e o grupo alvo (organismos da microbiota fitoplanctônica)?
- iii) As diferentes abordagens metodológicas (ASVs e OTUs) apresentam resultados semelhantes para procariotos (16S) e eucariotos (18S)?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta

As amostras de água analisadas no presente estudo são provenientes de um trabalho de experimentação de mesocosmos conduzido na Área Experimental em Ecologia Aquática, localizada na Universidade Estadual de Goiás (UEG), em Anápolis, Goiás, Brasil (16°22'43,8"S 48°56'45,8"W) por Andrade (2024) (dados não publicados). O experimento teve duração de 30 dias (22/11 a 22/12/2022) e foram simuladas condições de aumento de temperatura e mudança de estado trófico pela adição de fosfato e nitrato na água. Para tanto, foram utilizados 30 mesocosmos distribuídos de forma aleatória, sendo cinco réplicas para cada um dos seis tratamentos. Essas condições foram simuladas com o intuito de tentar reproduzir diferentes cenários de mudanças climáticas associadas às previsões mais pessimistas ou menos pessimistas de acordo com (IPCC 2023) e mudanças de estado trófico, conforme o quadro abaixo (Andrade, 2024) (Dados não publicados):

Tratamento	Cenário	Sigla
Ambiente eutrófico sem lona (temperatura ambiente)	Temperatura atual-eutrofizado	TA-E
Ambiente eutrófico com lona de 20 cm de abertura (aumento de 3°C na temperatura)	Temperatura pessimista-Eutrofizado	TP-E
Ambiente eutrófico com lona de 40 cm de abertura (aumento de 2°C na temperatura)	Temperatura moderada-eutrofizado	TM-E
Ambiente oligotrófico sem lona (temperatura ambiente) (controle)	Temperatura atual-oligotrófico	TA-O
Ambiente oligotrófico com lona de abertura de 20cm (aumento de 3°C na temperatura)	Temperatura pessimista-oligotrófico	TP-O
Ambiente oligotrófico com lona de abertura de 40cm (aumento de 2°C na temperatura)	Temperatura moderada-oligotrófico	TM-O

Para as análises moleculares as amostras foram coletadas no último dia de experimento. Antes da coleta, os mesocosmos foram homogeneizados e então foi retirado 1L de água de cada caixa utilizando garrafas de plástico branco leitoso de 1L. As amostras foram armazenadas em caixas de isopor contendo gelo para serem transportadas até o Laboratório de Genética & Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal de Goiás. Foi realizada a filtração de 350 ml de água para cada amostra com o auxílio de uma bomba à vácuo e utilizando uma membrana de porosidade de 0,45 micrômetros e 47 mm de diâmetro (Membrana HA em ésteres de celulose (NITRATO-75-80% e ACETATO) branca, lisa (Marca: MILLIPORE). Cada membrana foi colocada em tubo de eppendorf, sem tampão, e armazenada em freezer a -80 °C até o dia da extração de DNA.

2.2 Extração de DNA e sequenciamento

A extração foi realizada com o Kit *Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen). Seguimos o protocolo de extração de tecido do kit com as seguintes alterações: adição de beads, 380 µl de ATL e 20 µl de proteinase K, 400 µl de AL e a mesma quantidade de etanol à 100%, na etapa de lise celular as amostras foram incubadas por 10 min à 65 °C, a eluição foi feita com água nuclease free aquecida a cerca de 56 °C, com um volume final de 50 µl. Foram realizadas duas eluições de 50 µl em tubos separados. Após acrescentar a água aquecida na eluição,

incubamos por 15 min à temperatura ambiente antes de centrifugar. Além das amostras de *eDNA* foram incluídos controles negativos na extração de DNA, PCR e sequenciamento.

As regiões amplificadas via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram a 16S-v3-V4 rDNA e a 18S-V4 rDNA, para acessar organismos procariotos e eucariotos, respectivamente. Para a região 16S-V3-V4 foi utilizado o primer BAC341F (Klindworth *et al.*, 2013), modificado com a adição de sequências compatíveis com os adaptadores da Illumina (em negrito) (5'- **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG** CCTACGGGNGGCNGCAG-3') e BAC805R (5'-**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG** GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Para a região 18S-V4 utilizamos o par de primers TAREuk54FD1 (Stoeck *et al.*, 2010), modificado com a adição de sequências compatíveis com os adaptadores da Illumina (em negrito) (5'- **TCGTCGGCAGCGTAGATGTGTATAAGAGACAG** CCAGCASCYGCGGTAATTCC-3') e TAREukREV3 (5'-**GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG** ACTTTCGTTCTTGATYRA-3')

Antes de realizar as ampliações de todas as amostras, foi realizado um teste com três kits de PCR comerciais: o Qiagen Master Mix, o HiFi HotStart-Roche e o Qiagen Multiplex. Como observamos que a qualidade do kit Qiagen multiplex foi superior para ambas as regiões, as reações de PCR foram realizadas com esse kit. Cada reação de PCR foi composta por uma mistura de 5 µl de DNA (2,5 ng/µl), 2,5 µL do primer (F) (5 µM), 2,5 µL do primer (R) (5 µM) e 12,5 µL de Mix do Kit de PCR da Qiagen Multiplex, totalizando um volume final de 25 µL. As condições de termociclagem para a região 16S-V3-V4 foram de 95 °C por 15 min, seguido por 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, repetindo-se por 25 ciclos e extensão final de 72 °C por 5 min. Para a região 18S-V4 foram de 95 °C por 15 min, seguido por 94 °C por 30 seg, 53°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, 40 ciclos e extensão final de 72 °C por 10 min. As PCRs foram realizadas em triplicatas para cada amostra e, posteriormente, os produtos amplificados das triplicatas foram agrupados em uma mesma placa para o sequenciamento.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando esferas magnéticas IPB (Illumina Purification Beads). Os indexes foram adicionados a cada amostra utilizando o kit *Nextera XT Index* (Illumina), seguindo, com algumas alterações, o protocolo *16s Metagenomic*

Sequencing Library Preparation da Illumina. As amostras foram quantificadas pelo fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, kit Qubit dsDNA HS Assay). Algumas amostras foram tomadas aleatoriamente para a checagem do tamanho do produto amplificado utilizando o *Bioanalyzer Agilent Technology* 2100, seguindo as instruções do kit Agilent DNA 1000. Todas as amostras foram agrupadas em um único tubo eppendorf com uma concentração de 3,85 nM. A desnaturação do pool de amostras se deu primeiramente por meio da adição de NaOH 0,2 N. A concentração de carregamento foi de 9 pM e a proporção de phix foi de 40%. Por último essa biblioteca, já com o phix, foi incubada em banho seco à 96°C por 2 min, mantida em gelo por 5 min e então foi inserido ao cartucho de sequenciamento um volume de 600 µl. O sequenciamento foi realizado utilizando o kit MiSeq v3 de 600 ciclos, na plataforma MiSeq da Illumina.

2.3 Análises dos dados

Utilizamos o software FastQC para avaliar a qualidade das sequências brutas e seguimos o pipeline PIMBA (*Pipeline for MetaBarcoding Analysis*) para a determinação das OTUs e ASVs (Oliveira *et al.*, 2021). O PIMBA realiza as seguintes etapas: i) trimagem, que é a remoção dos primers e adaptadores e filtragem por qualidade; ii) montagem das sequências; iii) derreplicação, processo no qual remove sequências duplicadas e com cópia única, assim como sequências muito curtas; iv) agrupamento das sequências em OTUs ou ASVs; v) classificação taxonômica comparando as OTUs e ASVs com sequências disponíveis no banco de dados SILVA (<https://www.arb-silva.de/>).

Para nossas análises de qualidade ajustamos alguns parâmetros no PIMBA, tais como a determinação de phred mínimo de 20 e leituras mínimas de 100pb, as OTUs foram determinadas com 97% de identidade. Escolhemos o comprimento de corte das sequências montadas a partir do valor da moda do tamanho obtido para cada uma das regiões

Para realizar as análises estatísticas primeiramente separamos os dados de OTUs e ASVs em três conjuntos, sendo eles: i) todas as sequências, conjunto de dados totais; ii) apenas as classificadas taxonomicamente, conjunto de dados das classificadas; iii) apenas as identificadas como pertencentes ao fitoplâncton, que é o nosso grupo alvo. Para identificação dos microeucariotos aquáticos fotossintetizantes dentre as OTUs e ASVs classificadas foram consultados artigos acadêmicos que confirmavam o pertencimento das espécies a esse grupo (Ver apêndice A). A separação entre esses três grupos foi realizada tanto para os procariotos

quanto eucariotos e teve como objetivo apenas testar se existe um padrão estatístico de concordância entre esses três recortes de informações, que partem de um grupo mais geral para um grupo mais específico, os microorganismos fitoplanctônicos, que é o conjunto de dados mais importante para a presente pesquisa. Dentro desses três conjuntos de dados excluímos todas as OTUs e ASVs que apareceram no controle negativo, a fim de evitar dúvidas sobre possíveis contaminações das amostras em alguma etapa de bancada. Algumas OTUs e ASVs com classificações confusas no qual parte da classificação era um grupo de organismo mas a espécie pertencia a outro grupo, foram conferidas a partir da análise de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), utilizando a ferramenta disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências que não se confirmaram como sendo do grupo pretendido foram também excluídas.

O software R studio linguagem R versão 4.3.3 foi utilizado para rodar todas as análises estatísticas. A fim de entender se as variações de temperatura e a alteração do estado trófico da água tiveram influência significativa na riqueza de OTUs e ASVs foi realizada uma análise de variância de dois fatores (ANOVA two-way). Consideramos um p-Valor < 0,05 significativo para riqueza. A Análise de Variância Permutacional (PERMANOVA) foi realizada para avaliar os efeitos da temperatura e estado trófico do ambiente em relação à composição de OTUs/ASVs. Os dados de OTUs e ASVs foram convertidos em uma matriz de distância de Bray-Curtis e para visualizar o padrão de agrupamento entre os diferentes tratamentos foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA).

3. RESULTADOS

3.1 Qualidade do DNA extraído e dos produtos amplificados

No processo de extração conseguimos obter maior parte das amostras de DNA facilmente após as alterações realizadas no protocolo do kit utilizado. Essas amostras de DNA extraído tiveram, em grande parte, uma concentração entre 3,3 ng/μL e 10 ng/μL e apresentaram um pouco de arraste, indicando uma leve degradação do DNA (Figura 1). As duas eluições que fizemos para cada amostra não diferiram muito uma da outra, indicando que ainda havia DNA na coluna após a primeira eluição. Os controles negativos não apresentaram nenhuma banda no gel de agarose.

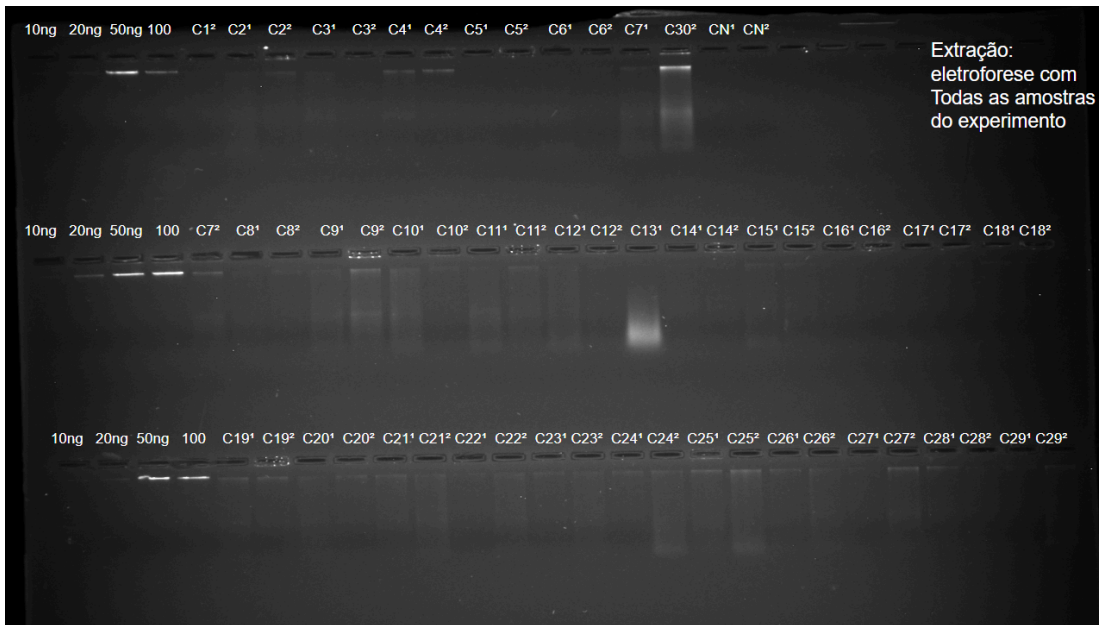


Figura 1: Gel de agarose das amostras de eDNA extraídas C= caixa; os números indicam qual caixa/mesocosmo e os expoentes indicam a eluição, 1= primeira eluição e 2 = segunda. CN= Controle Negativo

Os produtos de PCR para a região 18S-V4 apresentaram fragmentos amplificados com bandas fortes (Figura 2). Comparando o tamanho das regiões com o marcador de 1kb foi possível determinar que os fragmentos têm aproximadamente 500 pb, tamanho próximo ao esperado de aproximadamente (270 a 380 pb) mais adaptadores que acrescentaram aproximadamente 67 pb (*forward* e *reverse*). Foram testados três controles negativos que apresentaram bandas visíveis no gel, indicando uma contaminação de origem desconhecida.

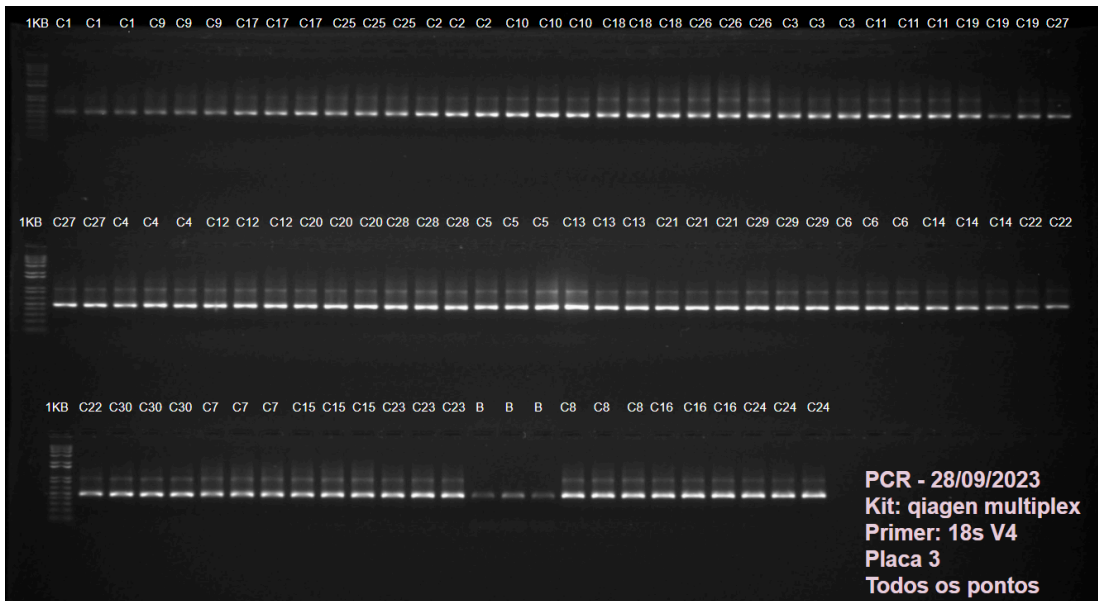


Figura 2: Representação em gel de agarose da amplificação da região 18S-V4 do rDNA para todos os mesocosmos. C= caixa/mesocosmo e os números na frente indicam qual a caixa. B= branco que representa o controle negativo

Para a região 16S os fragmentos amplificados apresentam uma boa qualidade de amplificação, com banda única e forte, excetuando se algumas poucas amostras que ficaram com uma intensidade um pouco mais fraca. Ao comparar com o marcador de 1kb observamos que o tamanho dos fragmentos também é de aproximadamente 500 pb, dentro do esperado para o tamanho do fragmento (aproximadamente 464 pb) mais os adaptadores que acrescentaram 67 pb (*forward* e *reverse*). Nessa região os três controles negativos testados não foram amplificados (Figura 3).



Figura 3: Representação em gel de agarose da amplificação da região 16S do rDNA para parte dos mesocosmos. C= caixa/mesocosmo e os números na frente indicam qual a caixa. B= Branco que representa o controle negativo

3.2 Influência da temperatura e eutrofização na riqueza e composição de eucariotos (18S)

Obtivemos um total de 3.758.278 leituras brutas para os eucariotos e, após corte de qualidade e mesclagem, ficamos com 1.521.294 leituras. Para cada tratamento/repetição observamos que a quantidade de leituras variou entre 192.704 e 289.624 entre os tratamentos (Figura 4). Essas leituras resultaram em um total de 940 OTUs com tamanho médio de 390 pb. Foi possível a atribuição taxonômica para 293 (31%). Foram excluídas por aparecerem no controle negativo um total de 158 OTUs, sendo que desse total, 80 eram classificadas. Dentro do grupo dos fitoplânctons foram excluídas um total de 11 OTUs por apresentarem classificações confusas que quando foi realizado um blast no NCBI vimos que não pertencia ao fitoplâncton. Nossos três conjuntos de dados finais apresentaram as seguintes quantidades de OTUs: Conjunto total 782, classificadas 213 e fitoplâncton 90.

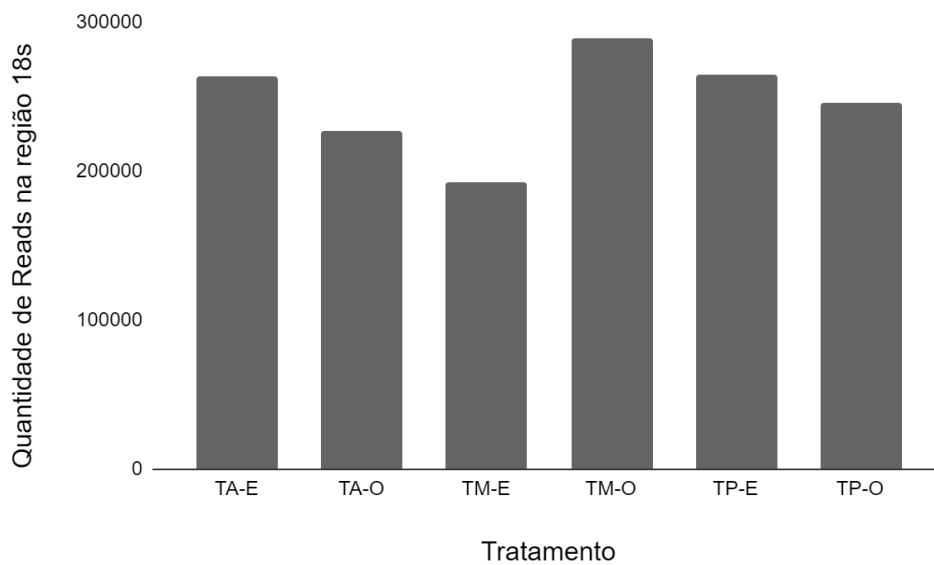


Figura 4: representação da quantidade de reads na região 18s por tratamento. As siglas representam: TA-E = temperatura atual-eutrofizado; TA-O = temperatura atual-oligotrófico; TM-E = temperatura moderada-eutrofizado; TM-O = temperatura moderada-oligotrófico; TP-E = temperatura pessimista-Eutrofizado; TP-O = temperatura pessimista-oligotrófico.

A média da riqueza de OTUs foi de 158 para o conjunto total, 65 para as classificadas e 30,5 para o fitoplâncton. O maior pico de riqueza para o conjunto de dados total foi no cenário de temperatura pessimista, aumento de 3°C, em um estado trófico oligotrófico (TP-O). No conjunto de dados das classificadas e fitoplâncton a maior riqueza foi encontrada no cenário de temperatura pessimista e ambiente oligotrófico (TP-O) (Figura 5 e 8). As interações entre os tratamentos seguiu um padrão claro no qual nos três conjuntos de dados a média da riqueza é maior em ambientes oligotróficos e em temperaturas mais elevadas (Ver Apêndice B - figura 1).

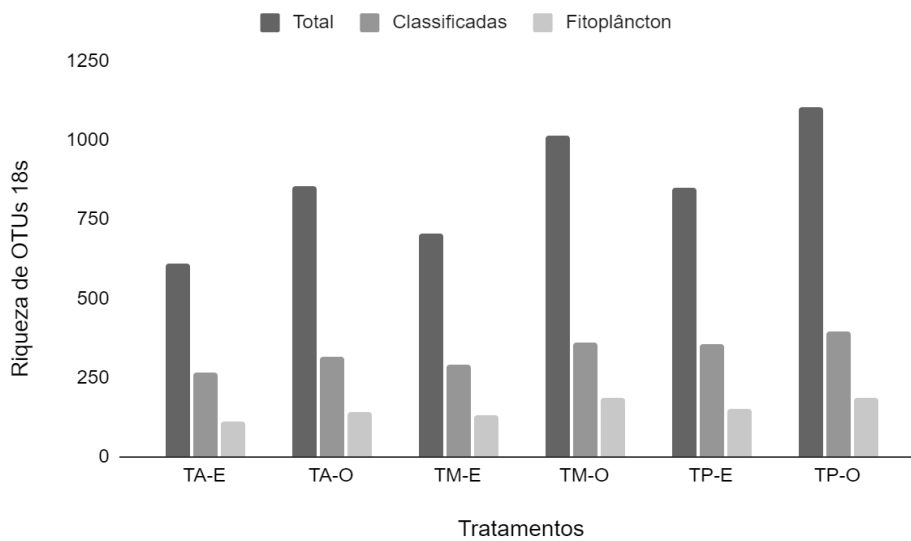


Figura 5: Riqueza de OTUs da região 18s por tratamento e por conjunto de dados. As siglas representam: TA-E = temperatura atual-eutrofizado; TA-O = temperatura atual-oligotrófico; TM-E = temperatura moderada-eutrofizado; TM-O = temperatura moderada-oligotrófico; TP-E= temperatura pessimista-Eutrofizado; TP-O = temperatura pessimista-oligotrófico.

Em relação às ASVs foi gerado um total de 4.001 ASVs no qual 1936 (48%) foi possível a atribuição taxonômica. A quantidade de ASVs é muito superior ao de OTUs e foi observado que, por serem mais sensíveis, várias ASVs apontam para a mesma classificação taxonômica. Por aparecerem no controle negativo foram excluídas 588, dessas, 387 possuem atribuições taxonômicas. Outras 24 ASVs também foram excluídas por apresentarem classificações confusas, e se confirmaram como não pertencentes ao fitoplâncton após o Blast no NCBI. Sendo assim, obtivemos no nosso conjunto de dados para ASVs 3.413 para o conjunto total, 1.549 para classificadas e 676 para fitoplâncton. A riqueza média de ASVs foi de 620 para o conjunto total, 326 para as classificadas e 155 para o fitoplâncton. Observamos que para o conjunto de dados total a riqueza foi maior no cenário pessimista, onde tivemos um aumento de 3 °C na temperatura e o estado trófico parece não ter influenciado pois não houve grande diferença na riqueza em relação ao ambiente oligotrófico e o eutrófico. Já para os conjuntos de dados classificados e fitoplâncton a maior pico de riqueza encontrada foi no cenário com temperatura pessimista e eutrofizado (TP-E) (Figura 6 e 9). As interações entre os tratamentos seguem um padrão bem diferente do visto pelas OTUs. Não há um padrão

entre os conjuntos de dados e a depender do aumento de temperatura a riqueza média pode ser maior ou menor em ambientes oligotróficos (Ver Apêndice B - Figura 2).

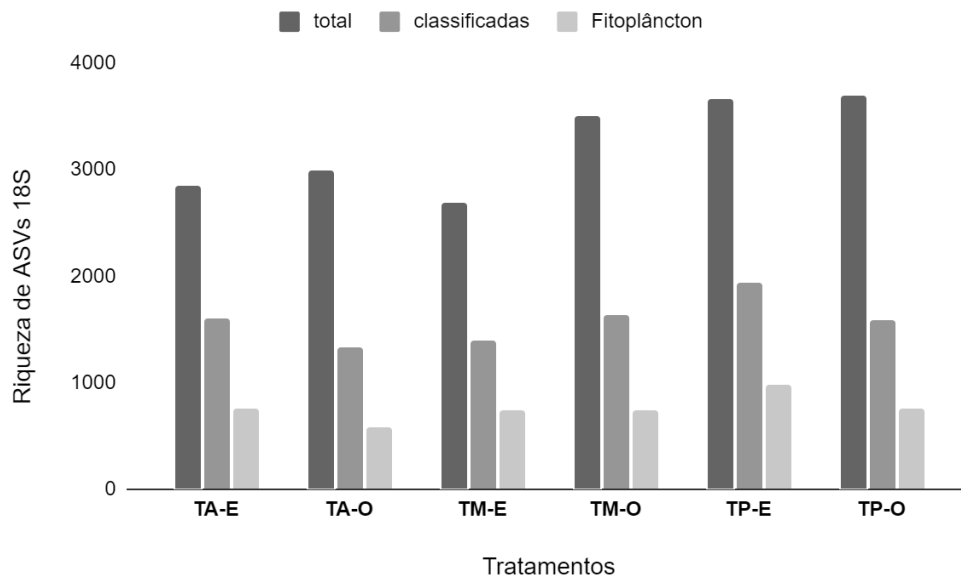


Figura 6: Riqueza de ASVs na região 18s por tratamento e por conjunto de dados. As siglas representam: TA-E = temperatura atual-eutrofizado; TA-O = temperatura atual-oligotrófico; TM-E = temperatura moderada-eutrofizado; TM-O = temperatura moderada-oligotrófico; TP-E= temperatura pessimista-Eutrofizado; TP-O = temperatura pessimista-oligotrófico.

Foram encontrados cinco grupos taxonômicos relacionados ao fitoplâncton, chlorophytas, ochophytas, cryptophyta, charophyta e rhodophyceetanto para OTUs e ASVs. O grupo mais representativo em números de OTUs e ASVs foram as Chlorophytas e Ochophytas, sendo que os dois juntos representam mais de 80% do total de OTUs e ASVs (Figura 7). A riqueza de OTUs foi influenciada pela alteração tanto de nutrientes quanto de temperatura, para os três conjuntos de dados (Tabela 1). Em relação às ASVs não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2).

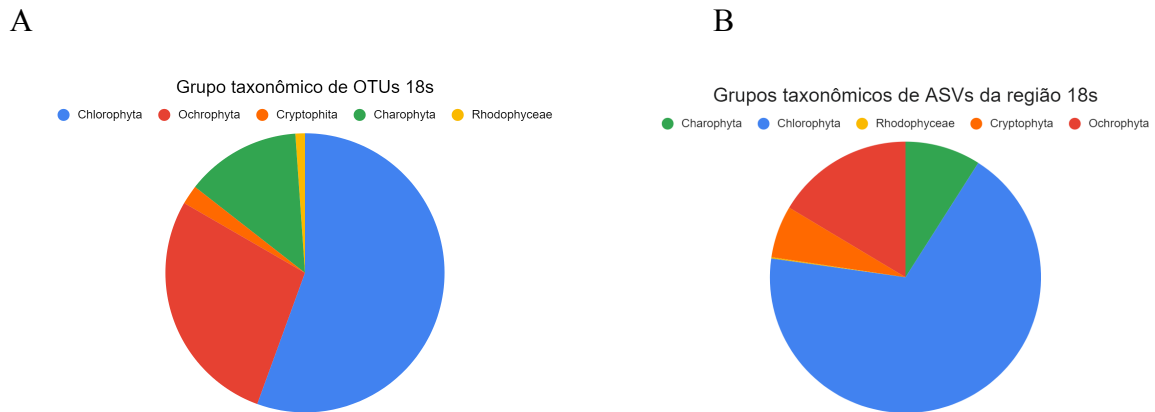


Figura 7: Representação da quantidade de OTUs (A) e ASVs (B) para cada grupo taxonômico de microeucariotos fitoplânctônicos, sendo as chlorophytas as principais representantes.

Tabela 1: Análise de Variância (ANOVA) de eucariotos estimando a riqueza de OTUs para as variáveis nutriente, temperatura e a interação entre elas. Sum sq = soma dos quadrados; Mean sq = média dos quadrados. O número entre parênteses representa os graus de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P < 0,05$).

ANOVA OTUs da Região 18s												
Tratamento	Total				Classificados				Fitoplâncton			
	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P
Nutriente (1)	0,72	0,72	14,1	0,0009	0,19	0,19	4,70	0,04	0,44	0,44	9,67	0,004
Temperatura (2)	0,38	0,19	3,81	0,03	0,30	0,15	3,66	0,04	0,42	0,21	4,59	0,02
Nutriente X Temperatura (2)	0,02	0,01	0,21	0,8	0,02	0,01	0,26	0,7	0,02	0,01	0,28	0,7

Tabela 2: Análise de Variância (ANOVA) de eucariotos estimando a riqueza de ASVs para as variáveis nutriente, temperatura e a interação entre elas, Sum sq = soma dos quadrados; Mean sq = média dos quadrados, O número entre parênteses representa o grau de liberdade, Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P < 0,05$),

ANOVA ASVs da Região 18s												
Tratamento	Total				Classificados				Fitoplâncton			
	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P
Nutriente (1)	0,07	0,07	1,53	0,22	0,03	0,03	0,84	0,36	0,16	0,16	1,85	0,18
Temperatura (2)	0,28	0,14	2,86	0,07	0,18	0,09	02,07	0,14	0,40	0,20	2,23	0,12
Nutriente X Temperatura (2)	0,10	0,05	1,00	0,37	0,23	0,11	2,66	0,09	0,14	0,07	0,79	0,46

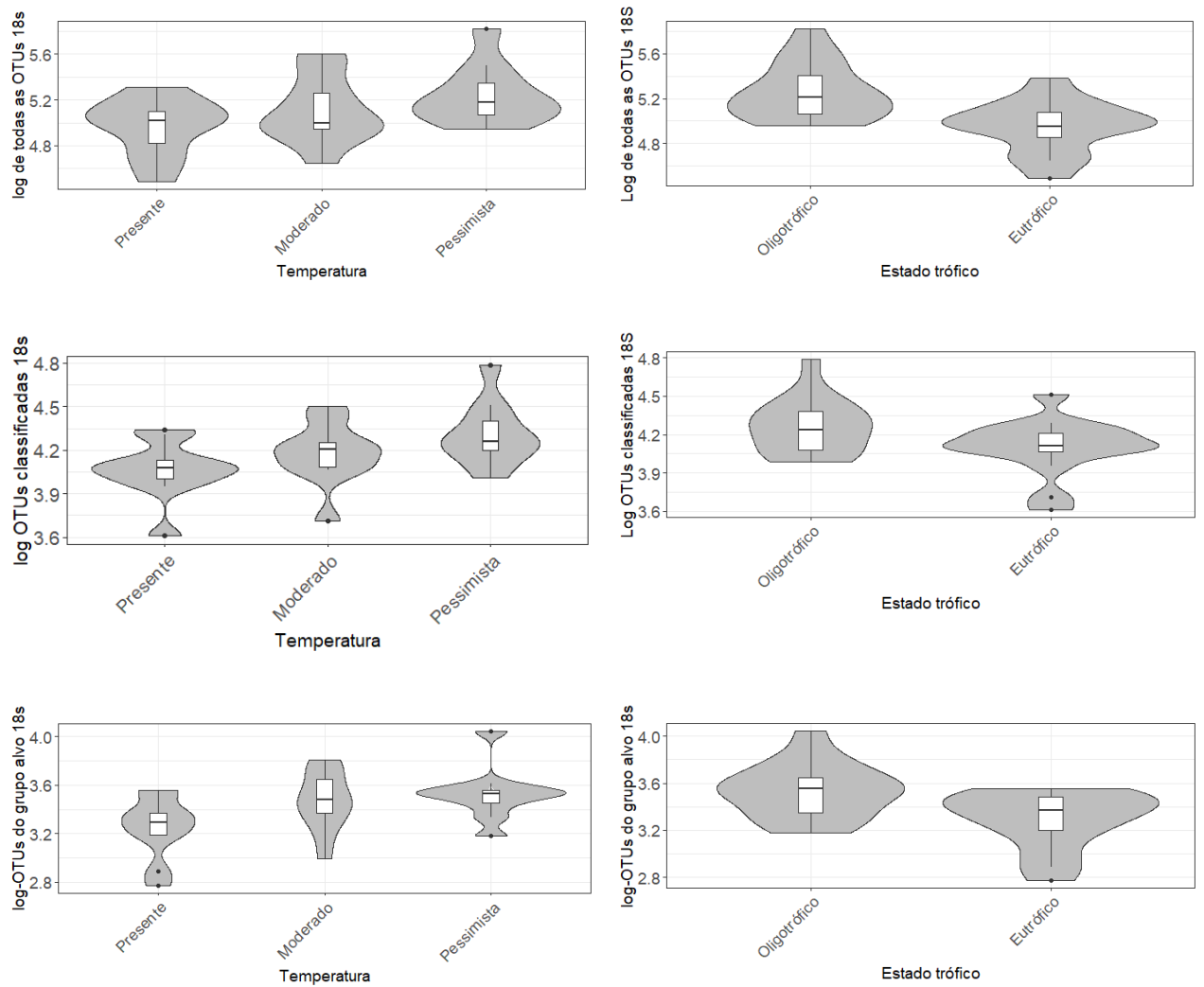


Figura 8: Representação da riqueza de OTUs de Eucariotos. Podemos ver por conjuntos de dados, total, classificadas e grupo alvo e por tratamentos, a distribuição da riqueza de OTUs. Observamos que nos três conjuntos de dados a riqueza de OTUs é maior no cenário de temperatura pessimista (aumento de 3°C) e em ambientes oligotróficos.

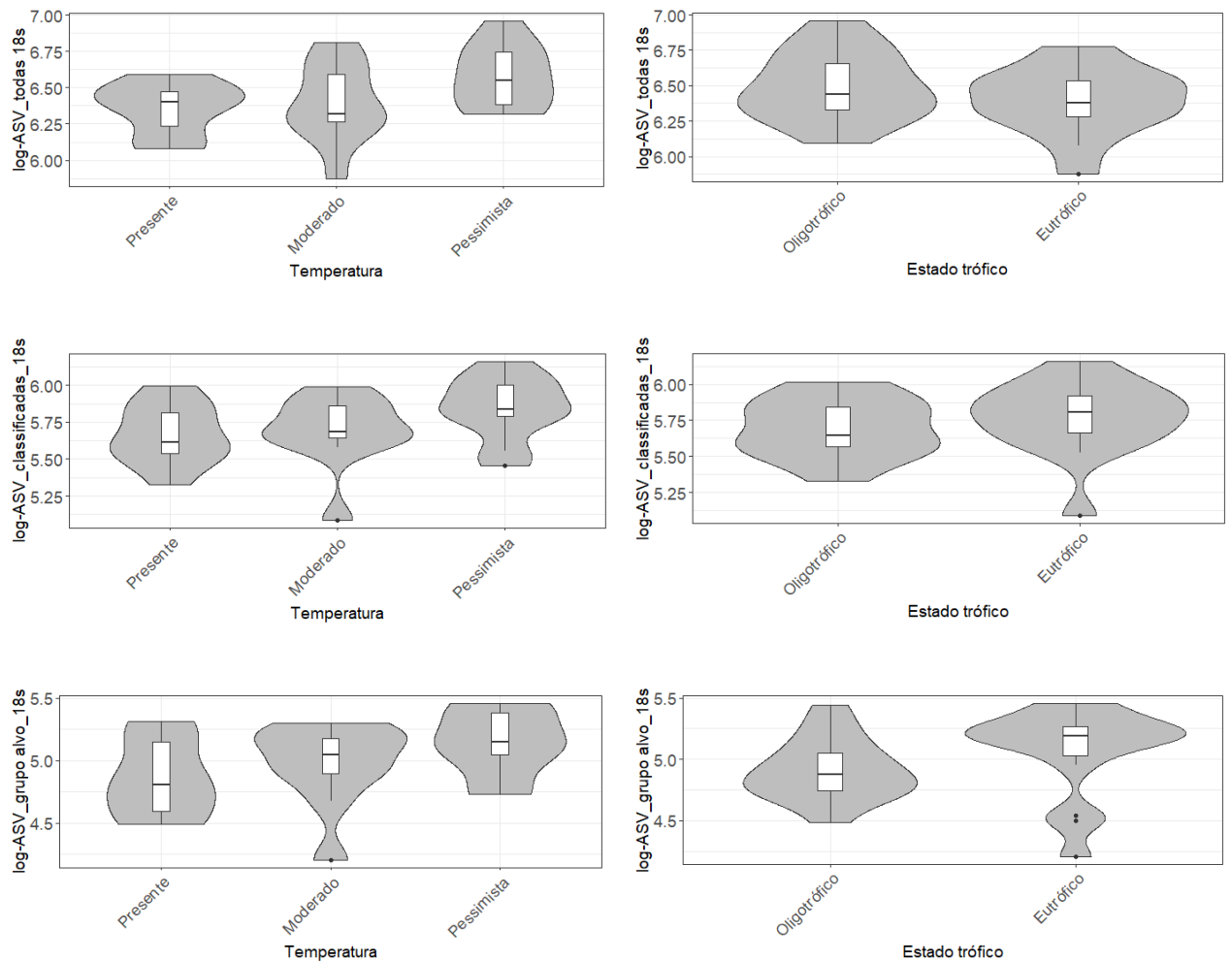


Figura 9: Representação da riqueza de ASVs de Eucariotos. Podemos ver por conjuntos de dados, total, classificadas e grupo alvo e por tratamentos, a distribuição da riqueza de ASVs. Observamos que nos três conjuntos de dados a riqueza de ASVs é um pouco maior no cenário de temperatura pessimista (aumento de 3°C), porém essa diferença não foi significativa. Já em relação ao estado trófico os resultados de riqueza são bem similares entre oligotrófico e eutrófico e também não apresentam diferenças significativas.

A composição de OTUs das comunidades foi influenciada pela eutrofização, apresentando valores significativos de R^2 para os três conjuntos de dados de OTUs, (Total=0,28, Classificadas=0,27 e Fitoplâncton=0,40). A temperatura e a interação entre temperatura e nutriente tiveram um impacto significativo na composição de OTUs nos conjuntos de dados total e classificadas. Para o conjunto de dados do fitoplâncton, a temperatura por si só não foi significativa, apenas a interação entre temperatura e nutriente. Na comparação entre os três níveis de temperatura vimos que a única diferença de

composição de OTUs significativa foi entre a temperatura atual *versus* moderada (aumento de 2 °C) para o conjunto total e Atual *versus* pessimista (aumento de 3 °C) para as classificadas (Tabela 3 e Figura 10). A composição de ASVs foi influenciada por todos os tratamentos sendo o nível de nutrientes a variável que mais explica as diferenças entre a composição de ASVs nos três conjuntos de dados (R^2 - Total=0,25, Classificado=0,25 e Fitoplâncton=0,34). Dentre os três níveis de temperaturas, vimos que a composição de ASVs apresenta diferenças significativas entre atual *versus* moderada e atual *versus* pessimista para o grupo total e atual *versus* moderada para as classificadas (Tabela 4 e Figura 11).

Tabela 3: Tabela 8: Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) de eucariotos para avaliar a composição de OTUs entre os tratamentos. O número entre parênteses representa os graus de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P < 0,05$ e R^2)

PERMANOVA OTUs da Região 18s									
Tratamentos	Total			Classificados			Fitoplâncton		
	R^2	F	P	R^2	F	P	R^2	F	P
Nutriente (1)	0,28	12,67	0,001	0,27	12,33	0,001	0,40	22,73	0,001
Temperatura (2)	0,09	2,07	0,014	0,09	2,14	0,012	0,06	1,73	0,084
Nutriente X Temperatura (2)	0,07	1,75	0,029	0,09	2,03	0,015	0,10	2,82	0,011
Atual X Moderado (1)	0,09	1,79	0,056	0,08	1,60	0,084	0,06	1,20	0,273
Moderado X Pessimista (1)	0,03	0,69	0,768	0,04	0,76	0,606	0,009	0,16	0,991
Atual X Pessimista (1)	0,08	1,67	0,095	0,09	1,88	0,051	0,06	1,26	0,261

Tabela 4: Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) de eucariotos para avaliar a composição de ASVs entre os tratamentos. O número entre parênteses representa os graus de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P < 0,05$ e R^2)

PERMANOVA ASVs da Região 18s									
Tratamentos	Total			Classificados			Fitoplâncton		
	R^2	F	P	R^2	F	P	R^2	F	P
Nutriente (1)	0,25	10,46	0,001	0,25	10,6	0,001	0,34	16,81	0,001
Temperatura (2)	0,09	02,05	0,006	0,10	2,12	0,011	0,08	1,98	0,025
Nutriente X Temperatura (2)	0,07	1,51	0,05	0,08	1,76	0,025	0,07	1,69	0,057
Atual X Moderado (1)	0,10	2,00	0,02	0,10	2,12	0,016	0,09	1,84	0,07
Moderado X Pessimista (1)	0,03	0,68	0,84	0,03	0,69	0,78	0,02	0,37	0,98
Atual X Pessimista (1)	0,08	1,76	0,05	0,08	1,72	0,07	0,07	1,50	0,16

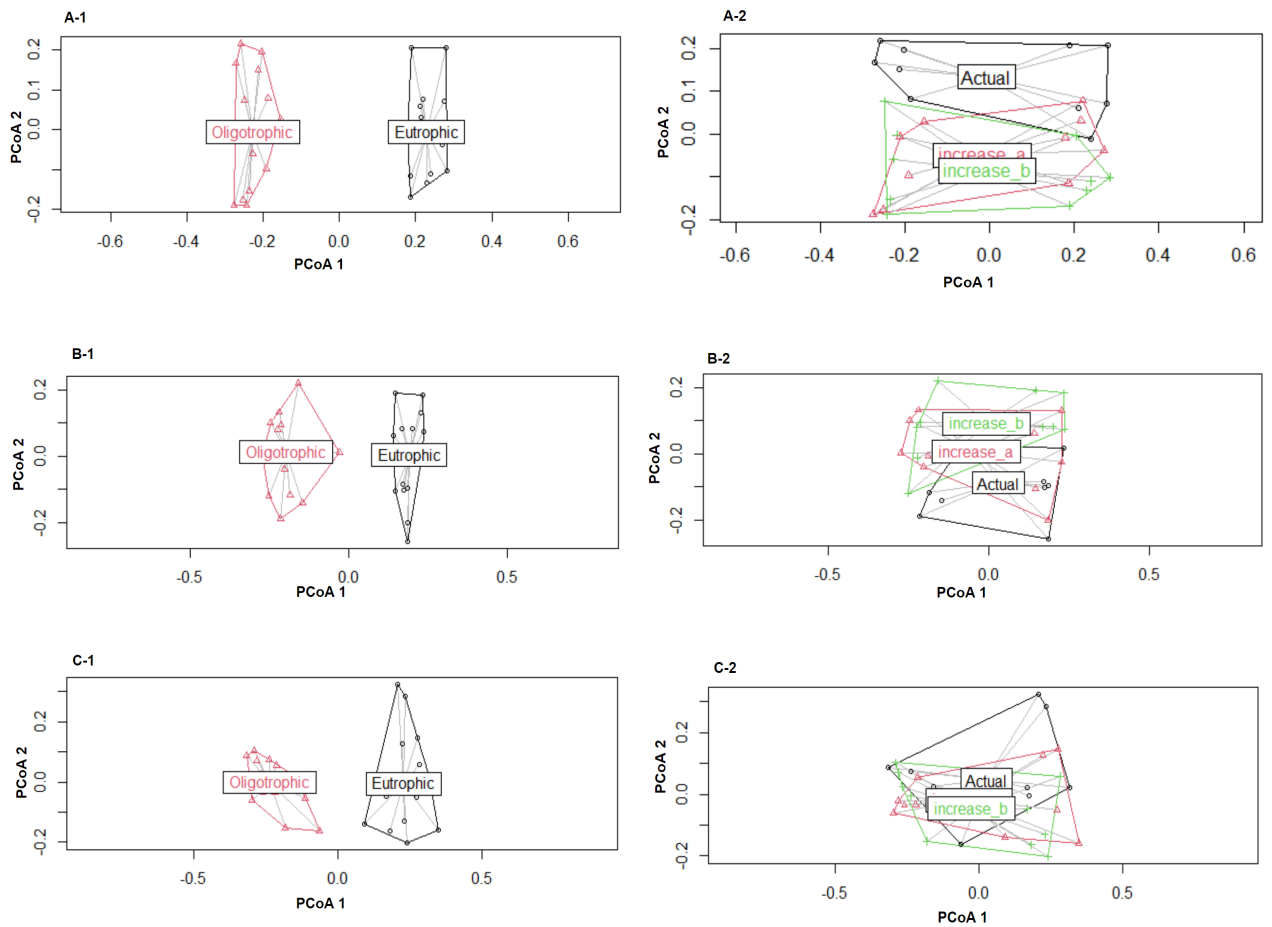


Figura 10: Representação gráfica das análises de PCoA para eucariotos, evidenciando o padrão de agrupamento das OTUs dentro dos tratamentos (estados tróficos e temperaturas). A= Grupo total, B= Grupo classificado e C= Grupo alvo. N° 1= estado trófico e N° 2= Temperaturas.

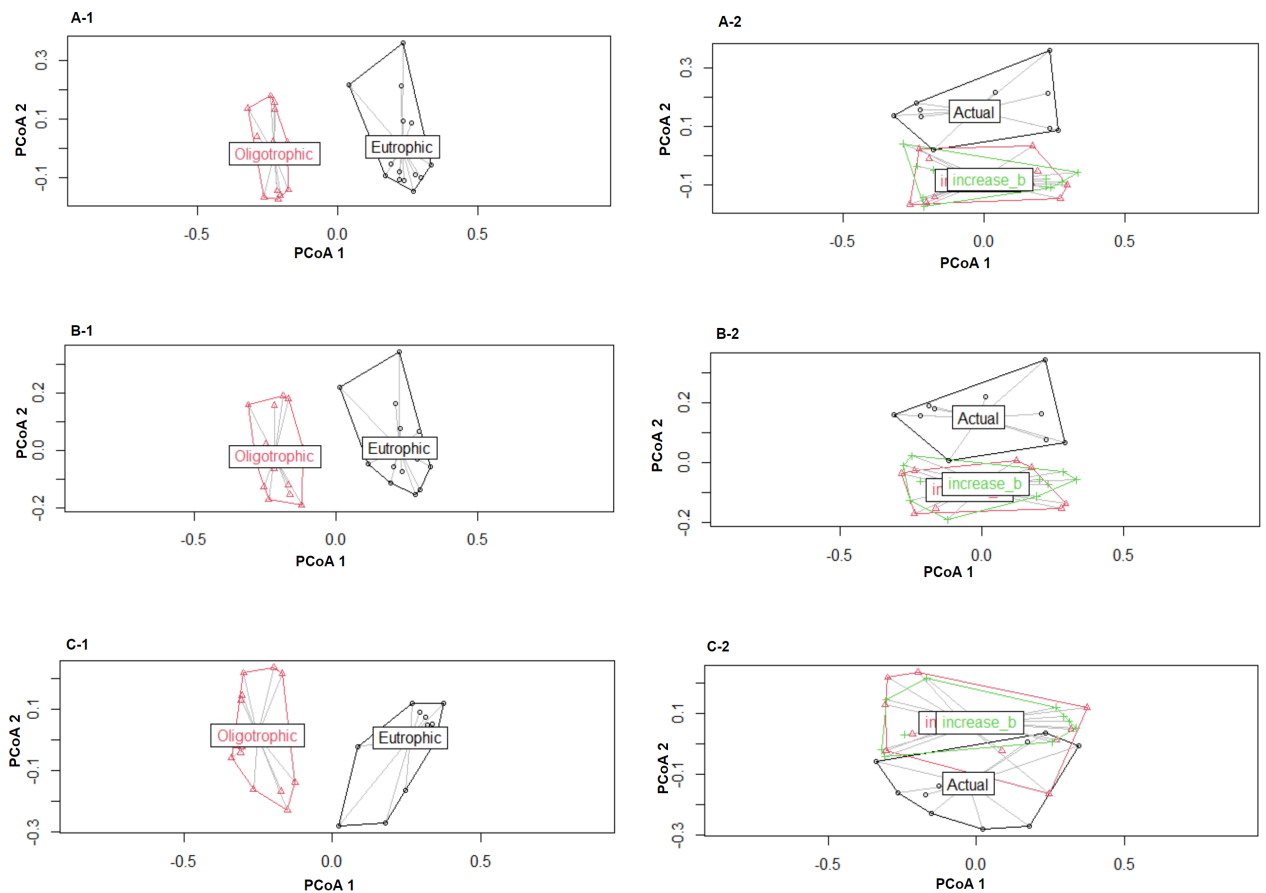


Figura 11: Representação gráfica das análises de PCoA para eucariotos, evidenciando o padrão de agrupamento de ASVs dentro dos tratamentos (estados tróficos e temperaturas). A= Grupo total, B= Grupo classificado e C= Grupo alvo. N° 1= estado trófico e N° 2= Temperaturas.

3.3 Influência da temperatura e eutrofização na riqueza e composição de procariotos (16S)

Para os procariotos o total de leituras brutas foi de 3.127.924 e 1.310.703 após corte de qualidade e mesclagem. A quantidade de leituras por tratamento variou entre 211.169 e 228.019 (Figura 12). Foram obtidas 884 OTUs com tamanho médio de 430 pb, dessas, 336 (38%) foram classificadas taxonomicamente. Foram excluídas por aparecerem no controle negativo um total de 38 OTUs, sendo que destas, 31 são classificadas. Por apresentarem classificações confusas, que após checagem no NCBI se confirmaram como não sendo parte do fitoplâncton, foram excluídas 12 OTUs. O conjunto total de dados de OTUs por grupo foi de 834 para o conjunto total, 293 para as classificadas e 27 para o fitoplâncton. A riqueza

média de OTUs foi 281 para o grupo total, 119,5 para as classificadas e 12,5 para o fitoplâncton. O maior pico de riqueza no conjunto de dados total foi no cenário de temperatura moderada, aumento de 2°C e ambiente oligotrófico (TM-O). Já para as classificadas não houve muita diferenciação de riqueza entre os tratamentos, ficando estes com uma riqueza em torno de 600 OTUs, exceto para o cenário de temperatura atual e ambiente eutrofizado (TA-E) que apresentaram riqueza abaixo de 600 OTUs. Para as cianobactérias (grupo dos fitoplâncton) os maiores picos de riqueza foram para os tratamentos oligotróficos, independente da temperatura (Figura 13).

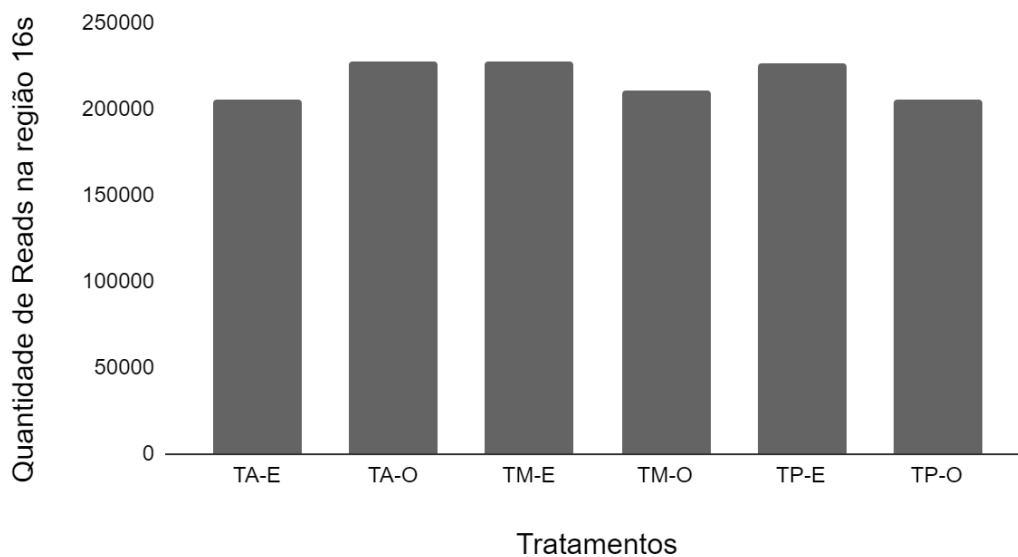


Figura 12: Representação da quantidade de *reads* na região 16s por tratamento. As siglas representam: TA-E = temperatura atual-eutrofizado; TA-O = temperatura atual-oligotrófico; TM-E = temperatura moderada-eutrofizado; TM-O = temperatura moderada-oligotrófico; TP-E = temperatura pessimista-Eutrofizado; TP-O = temperatura pessimista-oligotrófico.

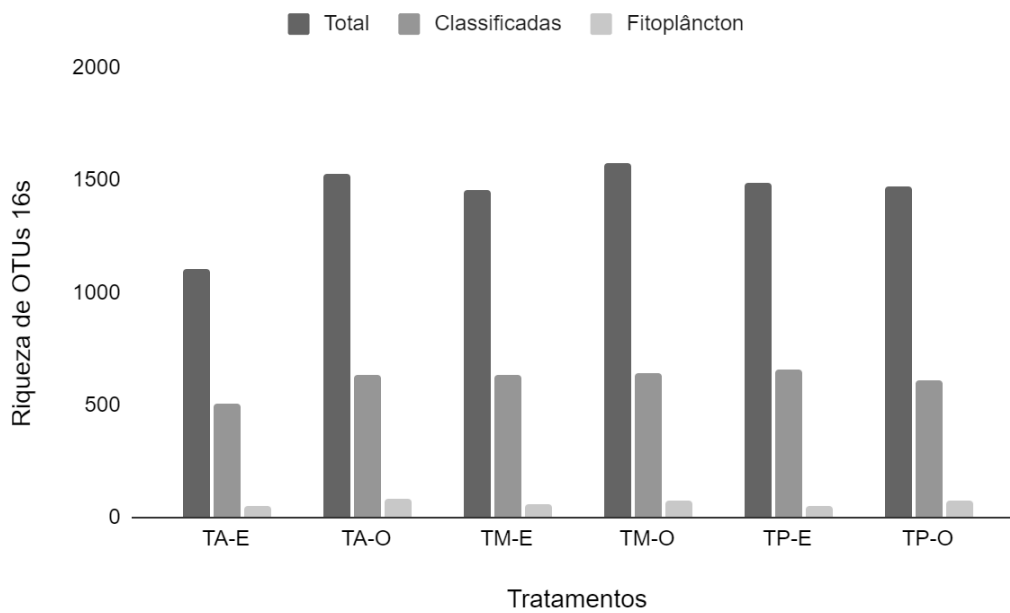


Figura 13: Riqueza de OTUs na região 16S por tratamento e por conjunto de dados. As siglas representam: TA-E = temperatura atual-eutrofizado; TA-O = temperatura atual-oligotrófico; TM-E = temperatura moderada-eutrofizado; TM-O = temperatura moderada-oligotrófico; TP-E = temperatura pessimista-Eutrofizado; TP-O = temperatura pessimista-oligotrófico.

Para as ASVs obtivemos um total de 2349, para o qual 1087 (46%) foram classificadas taxonomicamente. A quantidade de ASVs é muito superior ao de OTUs, pois notamos que diferentes ASVs apontaram para uma mesma atribuição taxonômica. Foram excluídas por estarem no controle negativo um total de 44 ASVs, das quais 39 eram classificadas. Por apresentarem classificações confusas, que após blast do NCBI se confirmarem como não pertencentes ao fitoplâncton foram excluídas 38 ASVs. A quantidade de ASVs para cada grupo foi de 2267 para o grupo total, 1010 para as classificadas e 138 para o fitoplâncton. A riqueza média para o grupo total foi 645,5, para as classificadas 321,5 e para o fitoplâncton 49. Para o conjunto de dados do conjunto total não houve um padrão claro de diferenciação de riqueza entre os tratamentos, tendo estes ficado entre 3168 e 3534, exceto para o cenário de temperatura atual e eutrofizado (TA-E), que ficou bem abaixo dos demais (2705 ASVs). Para o grupo total também não houve uma diferenciação clara de riqueza entre os tratamentos. Já o conjunto de dados de fitoplâncton os maiores picos de riqueza foram nos cenários onde o ambiente era oligotrófico, independente da temperatura (Figura 14). A interação entre os tratamentos também não gerou um padrão claro de riqueza nos grupos total

e classificadas, mas em relação ao fitoplâncton pode ser observado um padrão no qual o ambiente oligotrófico apresentou uma maior média de riqueza sendo e as diferentes temperaturas apresentou riqueza média semelhantes (Ver Apêndice B - figura 3).

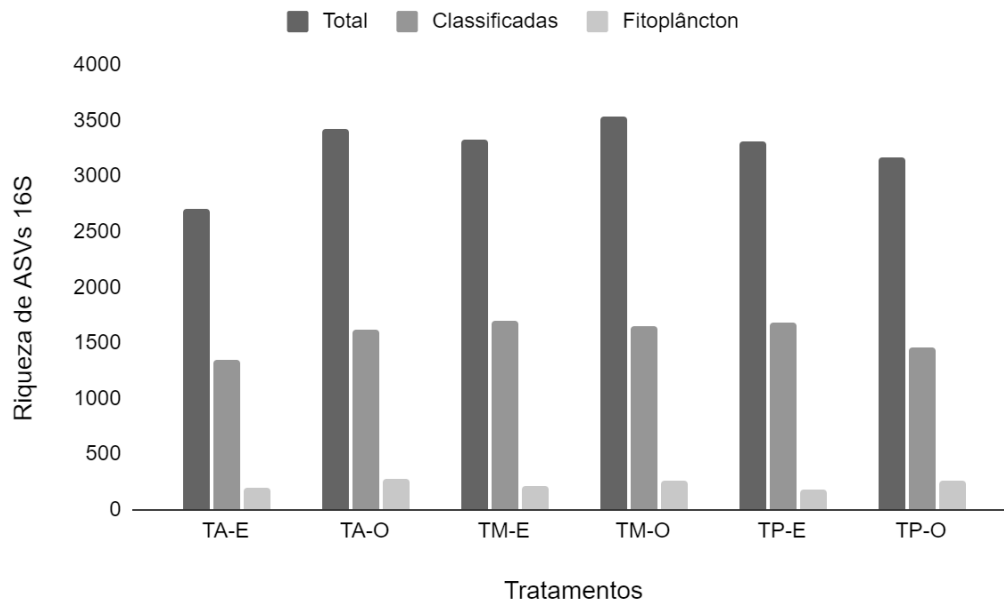


Figura 14: Riqueza de ASVs na região 16S por tratamento e por conjunto de dados. As siglas representam: TA-E = temperatura atual-eutrofizado; TA-O = temperatura atual-oligotrófico; TM-E = temperatura moderada-eutrofizado; TM-O = temperatura moderada-oligotrófico; TP-E= temperatura pessimista-Eutrofizado; TP-O = temperatura pessimista-oligotrófico.

Foram encontrados 13 grupos taxonômicos para as OTUs sendo estes: acidobacteria, actinobacteria, bacteroidetes, cyanobacterias, patescibacteria, proteobacteria, verrucomicrobia, chloroflexi, deinococcus-thermus, firmicutes, gemmatimonadetes e spirochaetes e 14 para as ASVs sendo as planctomycetes o único grupo diferente do encontrado nas OTUs. As Proteobactérias seguidas das Bacteroidetes foram os grupos mais representativos no qual juntos compõem um total de mais de 60% de OTUs e ASVs (Figura 15).

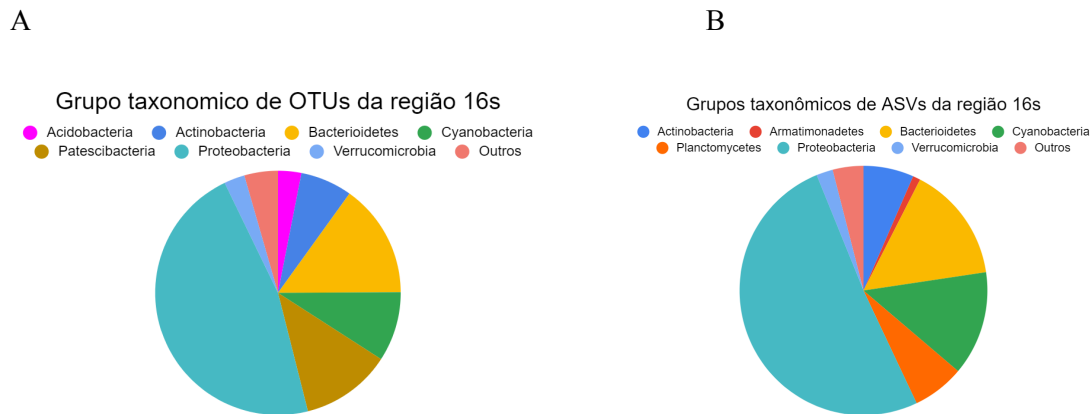


Figura 15: Representação dos principais grupos taxonômicos de OTUs (A) e ASVs (B) encontrados na região 16S sendo as proteobacteria o representante com maior quantidade em ambas

Nas análises de riqueza de OTUs de procariotos vimos que os três conjuntos de dados não apresentaram resultados concordantes. O grupo total apresentou valores significativos entre os tratamentos de nutrientes, temperatura e para a interação entre temperatura e nutrientes. Para as classificadas, nenhum tratamento foi significativo para a riqueza. Quando analisadas apenas as cianobactérias vimos que esse grupo apresentou diferenças significativas de riqueza entre os estados tróficos (Tabela 5 e Figura 16). Em relação às ASVs a interação entre nutrientes e temperatura foi significativa no conjunto de dados classificadas mas não foi significativo em nenhum dos tratamentos no conjunto de dados total. O grupo fitoplanctônico, as cianobactérias, acessadas com ASVs, apresentou diferenças significativas na riqueza com o aumento de nutrientes (Tabela 6 e Figura 17). Assim como para as OTUs, a interação entre os diferentes tratamentos só apresentou um padrão para o grupo dos fitoplâncton (Ver Apêndice B - Figura 4).

Tabela 5: Análise de Variância (ANOVA) de procariotos estimando a riqueza de OTUs para as variáveis nutriente, temperatura e a interação entre elas. Sum sq = soma dos quadrados; Mean sq = média dos quadrados. O número entre parênteses representa o grau de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P < 0,05$).

ANOVA OTUs da Região 16S													
	Total				Classificados				Fitoplâncton				
	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P	
Nutriente (1)	0,10	0,10	5,12	0,03	0,01	0,01	0,80	0,37	1,08	01,08	32,7	6,72e-06	
Temperatura (2)	0,13	0,06	3,21	0,05	0,08	0,04	2,26	0,12	0,03	0,01	0,48	0,6	
Nutriente X Temperatura (2)	0,14	0,07	3,49	0,04	0,11	0,05	2,84	0,07	0,07	0,03	1,14	0,3	

Tabela 6: Análise de Variância (ANOVA) de procariotos estimando a riqueza de ASVs para as variáveis nutriente, temperatura e a interação entre elas. Sum sq = soma dos quadrados; Mean sq = média dos quadrados. O número entre parênteses representa o grau de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P < 0,05$).

ANOVA ASVs da Região 16s													
	Total				Classificados				Fitoplâncton				
	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P	Sum sq	Mean sq	F	P	
Nutriente (1)	0,04	0,04	2,80	0,10	0,0001	0,00007	0,004	0,95	0,80	0,80	14,6	0,0008	
Temperatura (2)	0,07	0,03	2,11	0,14	0,08	0,04	2,26	0,12	0,02	0,01	0,22	0,797	
Nutriente X Temperatura (2)	0,10	0,05	2,86	0,07	0,13	0,06	3,70	0,03	0,04	0,02	0,39	0,676	

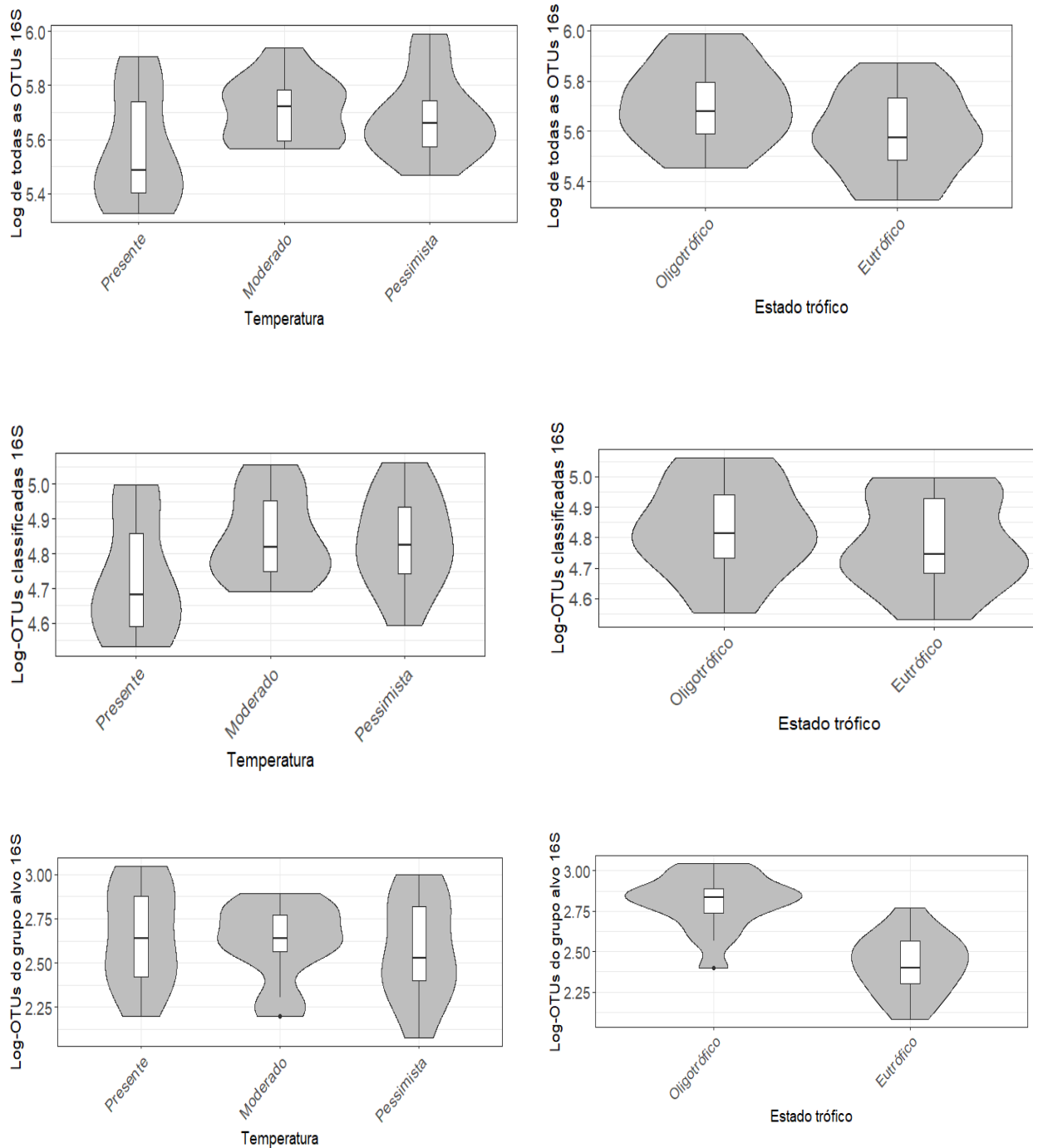


Figura 16: Representação da riqueza de OTUs de procariotos. Podemos ver por conjuntos de dados, GT, GC e GF (que é o grupo alvo) e por tratamentos, temperatura e estado trófico, a distribuição da riqueza de OTUs. No grupo das OTUs totais temos maior riqueza com o aumento da temperatura (moderado e pessimista) e em ambiente oligotrófico. No grupo das OTUs classificadas os diferentes cenários de temperatura apresentam riqueza bastante semelhantes, assim como no estado trófico. Já para o grupo Alvo a temperatura é similar entre os níveis de temperatura, mas o estado oligotrófico apresenta maior riqueza de OTUs.

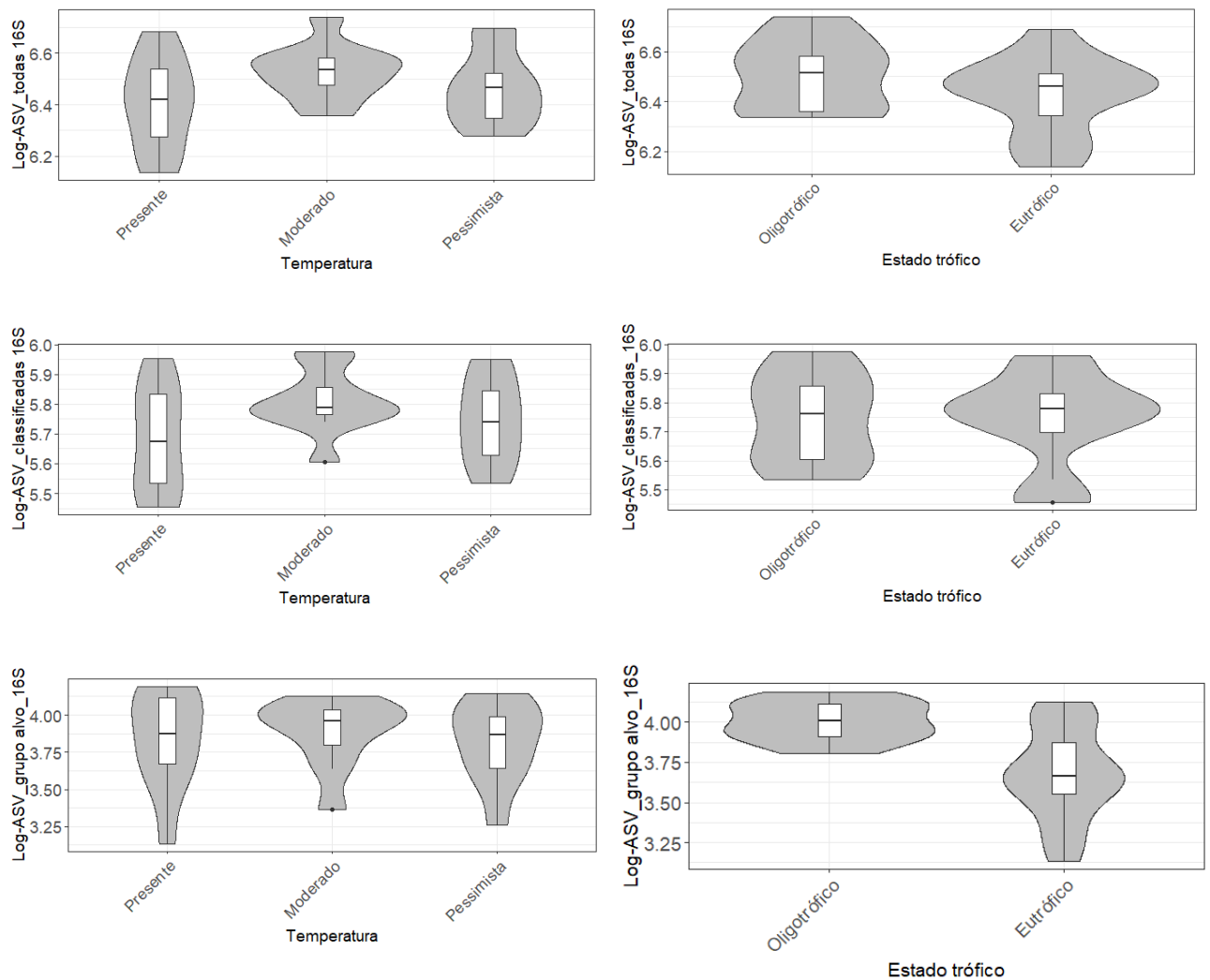


Figura 17: Representação da riqueza de ASVs de procariotos. Podemos ver por conjuntos de dados, Total, Classificadas e grupo alvo e pelos tratamentos, temperatura e estado trófico, a distribuição da riqueza de ASVs. Para os três grupos de ASVs os diferentes níveis de temperatura não tiveram grande influência na riqueza. Para o grupo total e classificadas o estado trófico também não diferenciou a riqueza de ASVs. A única diferença expressiva na riqueza de ASVs ocorreu entre os diferentes estados tróficos dentro do grupo alvo, as Cianobactéria, no qual o estado oligotrófico apresenta maior riqueza.

Foi possível observar que a eutrofização influenciou na composição de OTUs dos três grupos: total, classificadas e fitoplâncton/grupo alvo ($R^2= 0,41$, $R^2= 0,38$, $R^2= 0,39$, respectivamente). A diferença de temperatura influenciou apenas nos conjuntos de dados total e classificadas, sendo que no grupo total também observamos que a interação entre as duas variáveis foi significativa (Tabela 7 e Figura 18). Foi possível observar que os diferentes

níveis de nutrientes também influenciaram a composição de ASVs dos conjuntos de dados total, classificadas e grupo alvo ($R^2= 0,51$, $R^2= 0,53$, $R^2= 0,62$, respectivamente). Entretanto, as diferentes condições de temperatura influenciaram na composição de ASVs apenas no conjunto de dados total (Tabela 8 e Figura 19).

Tabela 7: Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) de procariotos para avaliar a composição de OTUs entre os tratamentos. O número entre parênteses representa o grau de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P<0,05$ e R^2)

PERMANOVA OTUs da Região 16s									
Tratamentos	Total			Classificados			Fitoplâncton		
	R^2	F	P	R^2	F	P	R^2	F	P
Nutriente (1)	0,41	23,01	0,001	0,38	20,00	0,001	0,49	29,77	0,001
Temperatura (2)	0,08	2,48	0,016	0,08	2,32	0,017	0,04	1,31	0,232
Nutriente X Temperatura (2)	0,07	2,03	0,033	0,06	1,72	0,075	0,05	1,58	0,133
Atual X Moderado (1)	0,09	1,89	0,092	0,09	1,91	0,07	0,04	0,78	0,518
Moderado X Pessimista (1)	0,87	0,48	0,872	0,01	0,34	0,97	0,02	0,42	0,765
Atual X Pessimista (1)	0,17	1,55	0,170	0,08	1,70	0,10	0,03	0,64	0,633

Tabela 8: Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA) de procariotos para avaliar a composição de ASVs entre os tratamentos. O número entre parênteses representa o grau de liberdade. Os valores em negritos representam os resultados significativos ($P<0,05$ e R^2)

PERMANOVA ASVs da Região 16s									
Tratamentos	Total			Classificados			Fitoplâncton		
	R^2	F	P	R^2	F	P	R^2	F	P
Nutriente (1)	0,51	34,79	0,001	0,53	36,88	0,001	0,62	46,86	0,001
Temperatura (2)	0,07	2,37	0,035	0,05	2,01	0,07	0,02	0,91	0,41
Nutriente X Temperatura (2)	0,05	1,87	0,07	0,05	1,72	0,11	0,03	1,20	0,25
Atual X Moderado (1)	0,07	1,48	0,18	0,06	1,19	0,18	0,019	0,35	0,84
Moderado X Pessimista (1)	0,02	0,38	0,86	0,01	0,34	0,86	0,012	0,23	0,89
Atual X Pessimista (1)	0,06	1,20	0,20	0,05	0,99	0,26	0,023	0,43	0,75

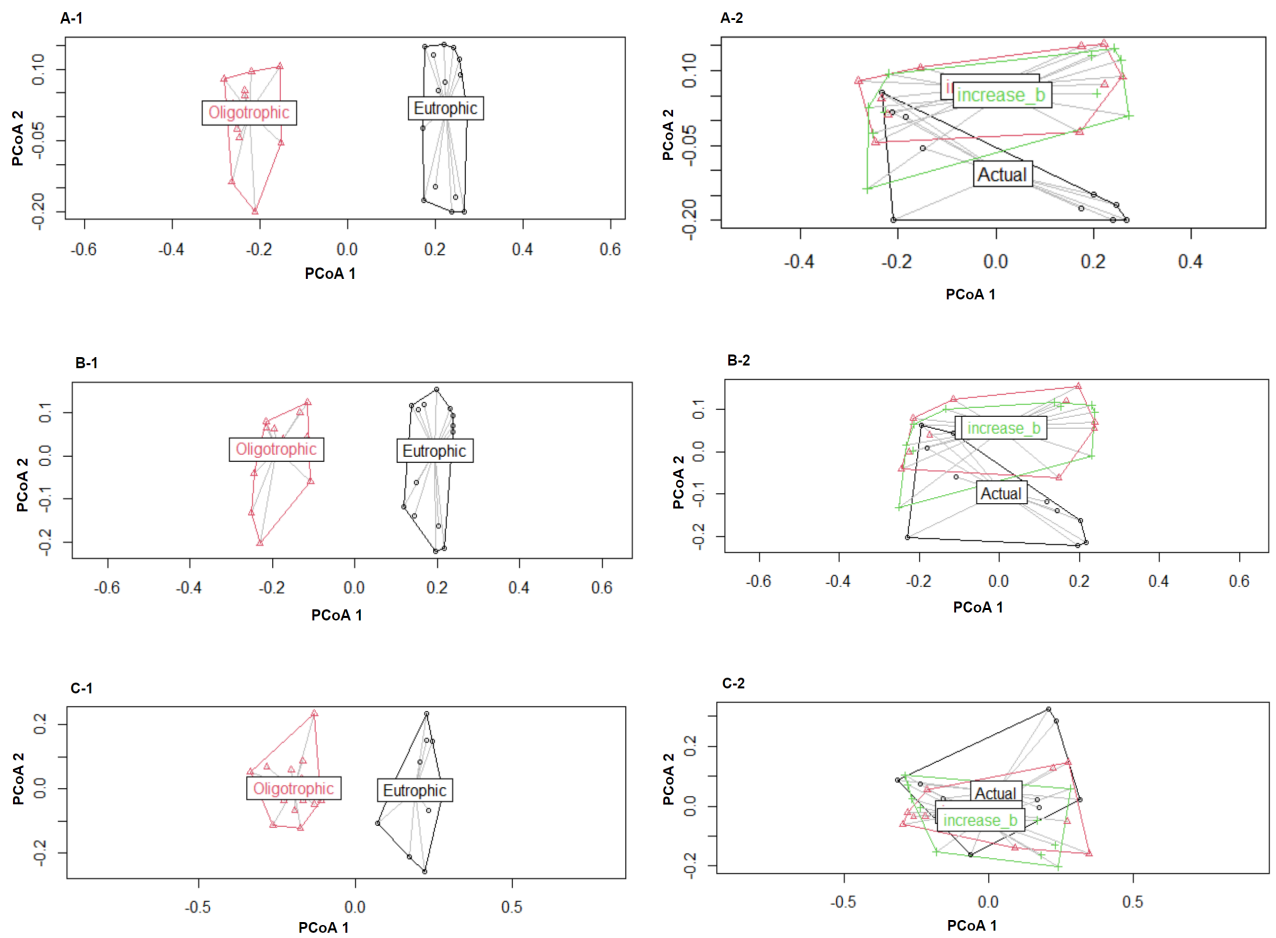


Figura 18: Representação gráfica das análises de PCoA para procariotos, evidenciando o padrão de agrupamento de OTUs dentro dos tratamentos. A= Grupo total, B= Grupo classificado e C= Grupo alvo. N° 1= estados tróficos e N° 2= Temperaturas.

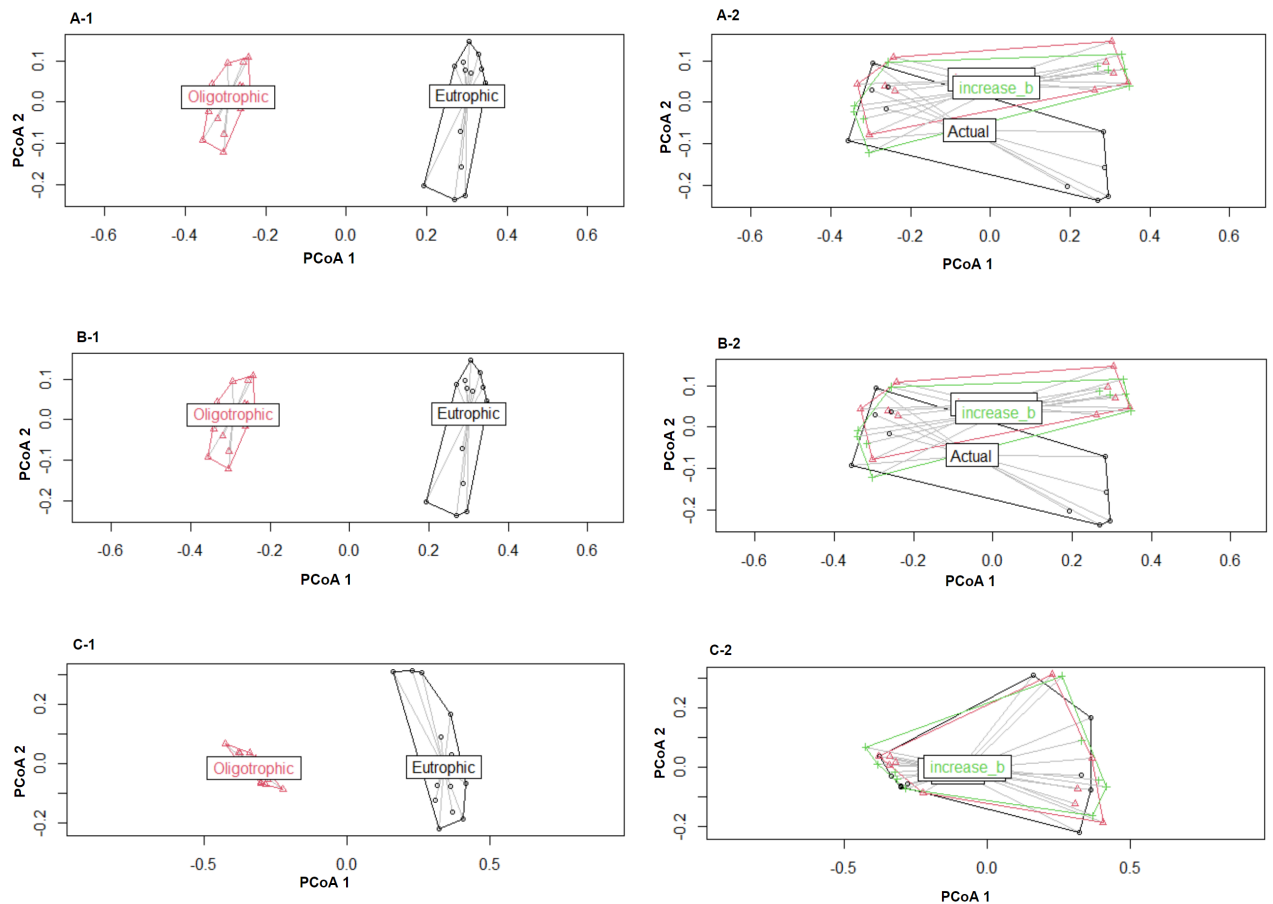


Figura 19: Representação gráfica das análises de PCoA para procariotos, evidenciando o padrão de agrupamento de ASVs dentro dos tratamentos. A= Grupo total, B= Grupo classificado e C= Grupo alvo. Nº 1= estados tróficos e Nº 2= Temperaturas.

4. DISCUSSÃO

É esperado um aumento da temperatura em pelo menos 1,5 °C em um curto período de tempo, podendo este ser ainda maior a depender de emissões mais altas de gases do efeito estufa (IPCC, 2023). A temperatura é de fato uma variável importante e que pode alterar a estrutura física e processos químicos (Elliot, 2012) e, por consequência, limitar diversos processos ecológicos da microbiota aquática (Machado, 2020). A entrada de grandes cargas de nutrientes, causadas principalmente por ações antrópicas, também é um forte influenciador da alteração de espécies fitoplanctônicas, provocando um aumento da massa de algas (Paerl *et*

al., 2013; Kleinteich *et al.*, 2019). Neste estudo, buscamos entender os efeitos do aumento da temperatura e da mudança do estado trófico na riqueza e na composição de OTUs e ASVs da microbiota aquática, mais especificamente procariotos e microeucariotos fitoplanctônicos. Para isso, usamos abordagens de DNA *metabarcoding* em amostras de um experimento que manipulou essas duas variáveis.

Em nossas análises estatísticas, utilizamos conjuntos de dados que incluía OTUs e ASVs não classificadas, classificadas e restritas ao grupo focal (fitoplâncton). Nosso objetivo foi verificar a existência de um padrão estatístico entre esses três conjuntos de dados. Observamos que, nas OTUs e ASVs de eucariotos com atribuições taxonômicas, há uma grande variedade de organismos, incluindo micro e macro-organismos, plantas, animais e fungos, muitos dos quais não são aquáticos. Esse resultado era esperado devido à sensibilidade da técnica de metabarcoding de DNA. Mesmo assim, encontramos um padrão consistente nas análises de riqueza, tanto para OTUs quanto para ASVs. Nas análises de composição, as ASVs também apresentaram o mesmo padrão entre os conjuntos de dados. No caso das OTUs, observamos pequenas diferenças, principalmente relacionadas à temperatura, que influenciou a composição de todos os grupos, exceto para os microeucariotos fitoplanctônicos. Como o foco do presente estudo são os microeucariotos fotossintetizantes, enfatizamos a discussão sobre este conjunto de dados.

Para os microeucariotos fitoplanctônicos observamos que os nutrientes e a temperatura influenciam na riqueza de OTUs. O grupo das chlorophyceae tem como temperatura ótima de crescimento algo entre 27,5 °C e 35 °C (Lürling *et al.*, 2013), o que pode justificar o aumento da riqueza no cenário mais pessimista com temperatura de 28 °C, tendo em vista que esse grupo compõe maior parte do fitoplâncton. Rasconi *et al.*, 2017 foi de encontro a dados um pouco diferentes, indicando que o aumento da temperatura, +4 °C acima da temperatura ambiente, diminui a riqueza do fitoplâncton pois seleciona apenas espécies mais adaptadas a ambientes mais quentes. Provavelmente em nossa comunidade fitoplanctônica temos mais espécies que se adaptam bem a altas temperaturas que no experimento citado, levando a conclusões diferentes. Em relação a eutrofização notou-se que ambientes oligotróficos apresentam maior riqueza de OTUs indicando efeito negativo da eutrofização na riqueza.

A quantidade de nutrientes teve um alto poder explicativo para as diferentes composições de OTUs, já a temperatura por si só não foi um fator importante na diferença da

composição desses organismos autotróficos, assim como ocorreu com as cianobactérias. Esse resultado, tal como os resultados para a riqueza, vai de encontro a outros estudos (Kleinteich *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2020) que indicam a proliferação de poucas táxons, diminuindo a diversidade e também diferenciando a composição das comunidades ali presentes, devido ao aumento da carga de nutrientes. A complexa relação entre nutriente e temperatura também foi um fator influente para a composição de OTUs. Aparentemente existe uma forte correlação entre essas duas variáveis no qual temperaturas mais altas é igual a maior absorção de nutrientes causando limitação de nitrogênio e o favorecimento de espécies fixadoras desse composto (Rasconi *et al.*, 2017). E em uma revisão realizada por Elliot, (2012). aponta que o impacto das alterações climáticas no fitoplâncton também depende do estado trófico, ou seja, além do aumento de temperatura também depende da carga de nutrientes para que haja maior ou menor efeito no aumento da biomassa de algas. Em nosso estudo, essa interação nos proporcionou diferenças na composição de OTUs fitoplanctônicas. Já quando utilizamos ASVs observamos que nenhum dos tratamentos levaram a uma alteração da riqueza de ASVs. Porém, todos os tratamentos foram importante para diferir a composição de ASVs fazendo com que, tal qual aconteceu no grupo de OTUs classificadas de procariotos, grupos taxonômicos mais adaptados a temperaturas mais altas e maior carga de nutrientes fossem substituídos por grupos que eram menos adaptados.

Os procariotos fitoplanctônicos, ou seja, as cianobactérias também conhecidas como algas azuis, foram fortemente afetadas pelo aumento da carga de nutrientes. Esse evento afetou tanto a riqueza quanto sua composição de OTUs e ASVs. Ambientes Oligotróficos possuem uma riqueza de OTUs e ASVs bem maior que ambientes eutrofizados e independem da temperatura. Apesar da temperatura aqui não influenciar na riqueza, é sabido na literatura que este grupo de organismos fitoplanctônicos se proliferam melhor em temperaturas mais altas (Yan *et al.*, 2023, Paerl *et al.*, 2013). No entanto, muitas cianobactérias têm uma alta plasticidade de nicho como por exemplo o gênero *Leptolyngbya* que pode ser encontrado em ambientes com diversas temperaturas, desde extremamente altas a extremamente baixas (Sciuto, 2016). Dessa forma, como vimos em nossas análises, para o grupo taxonômico que compõem a comunidade encontrada nesta pesquisa, a temperatura não foi um fator importante e sim a quantidade de nutrientes. Aparentemente a eutrofização selecionou um grupo de cianobactérias que provavelmente assimilaram melhor esses nutrientes inibindo outras

espécies e conseqüentemente diminuindo a riqueza e diferenciando a composição de OTUs e ASVs.

As bactérias classificadas não apresentaram diferenças na riqueza de OTUs diante as mudanças de temperatura e nutrientes, mostrando-se menos sensíveis que as cianobactérias, que foram afetadas pela adição de nutrientes. Mas esses fatores foram relevantes para alterar os padrões da composição de OTUs fazendo com que houvesse uma substituição por grupos taxonômicos mais adaptados a temperaturas mais altas e maior carga de nutrientes. Dessa forma, vimos que processos heterotróficos parecem ser mais dependentes da temperatura que os autotróficos (Machado, 2020; Panigrahi, 2013). Em relação às ASVs observamos que o aumento de nutrientes é o único responsável por diferenciar a composição de ASVs, assim como observado para as cianobactérias. Já a riqueza só é afetada diante da interação entre nutriente e temperatura. Isso mostra que a depender dessa combinação podemos ter por exemplo na temperatura atual combinada a eutrofização baixa riqueza de ASVs, mas com um aumento de 3°C combinado a eutrofização temos uma maior riqueza de ASVs, porém, essa riqueza pode estar superestimada.

Um padrão totalmente diferente do grupo de OTUs classificadas foi encontrado quando usamos o conjunto de dados total de OTUs. Todos os tratamentos foram relevantes para alterar a riqueza, fato não observado no grupo das classificadas. As ASVs do grupo total além do fator nutriente, único fator influente no grupo das classificadas, a temperatura também influenciou na composição, mas não houve alteração na riqueza mediante nenhuma das variáveis ou interação entre elas. Talvez essas discrepâncias nos resultados entre OTUs do grupo total e classificadas, assim como entre as ASVs dos dois grupos, se deve ao fato de que muitas espécies que não foram classificadas apresentarem variados grupos taxonômicos que são mais suscetíveis às mudanças das variáveis estudadas ou talvez seja apenas uma questão amostral.

Neste estudo usamos dois tipos de metodologias de identificação de sequências de DNA *metabarcoding*, OTUs e ASVs, que normalmente culminam em resultados diferentes (Nearing *et al.*, 2018). Vimos que a quantidade de OTUs geradas foi bem menor que as de ASVs. Isso é esperado tendo em vista que as OTUs são um cluster de sequências agrupadas com uma identidade, geralmente de 97%, que diminuem o tamanho do conjunto de dados brutos. Por outro lado, as ASVs são variantes de sequências exatas, sendo estas mais sensíveis na detecção de variações de organismos dentro do mesmo grupo taxonômico (Chiarello, *et al.*,

2022). Em nosso conjunto de dados observamos que diferentes ASVs, atribuídas ao mesmo grupo por serem mais sensíveis, indicavam uma mesma atribuição taxonômica, o que pode levar a uma hiperinflação nas análises de riqueza e composição. Dessa forma, as respostas das análises estatísticas também diferiram em muitos casos e como o objetivo é se aproximar de espécie, chegamos a conclusão que a abordagem de OTUs é mais adequada ao nosso propósito.

5. CONCLUSÕES

- Para os microeucariotos fitoplanctônicos, acessados por 18S, os resultados das OTUs evidenciam que o aumento da temperatura em 28 °C teve um efeito positivo na riqueza. Isso indica que as microalgas encontradas em nossas amostras têm maior preferência por temperaturas mais elevadas. O aumento da carga de nutrientes foi prejudicial para a riqueza de OTUs, fazendo com que espécies menos adaptadas fossem suprimidas do ambiente abrindo espaço para a proliferação de espécies mais adaptadas. Já os resultados acessados por ASVs não indicaram alteração da riqueza em nenhum dos tratamentos.
- A maior parte da variação na composição de OTUs de microeucariotos fitoplanctônicos foi explicada pelo aumento da carga de nutrientes no ecossistema. Já a variação da temperatura por si só, não foi influente para diferenciar a composição. Porém, quando associada ao aumento da carga de nutrientes, teve efeito significativo para diferenciar as comunidades de OTUs. As ASVs apresentaram resultados similares, mas por essa metodologia a temperatura também foi importante para diferir as comunidades.
- Observamos que a temperatura não foi um fator limitante para alterar a riqueza e a composição de OTUs e ASVs das cianobactérias, acessadas por 16S, evidenciando que a faixa de temperatura utilizada em nosso experimento (25 °C a 28°C) está dentro do limite de tolerância desse grupo taxonômico. Em contrapartida, o aumento da carga de nutrientes foi bastante relevante para as cianobactérias. Assim como ocorre para os microeucariotos, a eutrofização também foi negativa para os procariotos fitoplanctônicos diminuindo a riqueza de OTUs e ASVs.

- Nosso estudo revela algumas divergências entre os resultados obtidos com dados de OTUs e ASVs. Várias ASVs foram classificadas como o mesmo táxon, causando uma inflação na riqueza e composição de ASVs. Sendo assim, é preferível a utilização de OTUs quando a finalidade é se aproximar de espécies para avaliar comunidades da microbiota aquática.
- Os diferentes recortes de dados (todos, apenas classificados, e grupo alvo) nem sempre apresenta uma concordância estatística. Em alguns casos geraram resultados completamente diferentes, provavelmente devido a grande diferença amostral entre os conjuntos de dados.
- De forma geral, observa-se que a composição da comunidade fitoplanctônica (procarioto e eucarioto), sejam acessadas por OTUs ou ASVs, é mais sensível a mudanças no estado trófico e a eutrofização do ambiente aquático é prejudicial para a riqueza, levando a seleção de poucas espécies que se proliferam no ecossistema aquático. A depender da metodologia (OTUs ou ASVs), a riqueza e composição do fitoplâncton eucarioto foi mais sensível à mudança de temperatura, provavelmente por serem um grupo de organismos mais diversos e o aumento da carga de nutriente causou maior prejuízo ao ecossistema que o aumento da temperatura em 3 °C.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. T. Influência do aumento da temperatura e do enriquecimento de nutrientes na estrutura da comunidade fitoplanctônica. 2024. 75 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Cerrado) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2024.

BANERJEE, P. *et al.* Environmental DNA analysis as an emerging non-destructive method for plant biodiversity monitoring: a review. *AoB plants*, v. 14, n. 4, 2022.

CALVIN, K. *et al.* IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report, summary for Policymakers. Contribution of working groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [core writing team, H. lee and J. romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. (P. Arias et al., Eds.) IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), , 25 jul. 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.59327/ipcc/ar6-9789291691647.001>>

CHIARELLO, M. *et al.* Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PloS one*, v. 17, n. 2, 2022.

DUDGEON, D. *et al.* Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 81, n. 2, p. 163–182, 2006.

ELLIOTT, J. A. Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. *Water research*, v. 46, n. 5, p. 1364–1371, 2012.

FIELD, C. B. *et al.* Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science (New York, N.Y.)*, v. 281, n. 5374, p. 237–240, 1998.

KLEINTEICH, J. *et al.* Structural changes of the microplankton community following a pulse of inorganic nitrogen in a eutrophic river. *Limnology and oceanography*, v. 65, n. S1, 2020.

KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, v. 41, n. 1, 2013.

LÜRLING, M. *et al.* Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater biology*, v. 58, n. 3, p. 552–559, 2013.

MACHADO, K. B. *et al.* DNA metabarcoding reveals the responses of prokaryotes and eukaryotes microbiota to warming: Are the patterns similar between taxonomic and trophic groups? *Ecological indicators*, v. 115, 2020.

- MACHADO, K. B. *et al.* Functional and taxonomic diversities are better early indicators of eutrophication than composition of freshwater phytoplankton. *Hydrobiologia*, v. 850, n. 6, p. 1393–1411, 2023.
- NEARING, J. T. *et al.* Denoising the Denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ*, v. 6, n. e5364, 2018.
- OLIVEIRA, R. R. M. *et al.* PIMBA: A Pipeline for MetaBarcoding Analysis. Em: *Advances in Bioinformatics and Computational Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 106–116.
- PAERL, H. W.; OTTEN, T. G. Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls. *Microbial ecology*, v. 65, n. 4, p. 995–1010, 2013.
- PANIGRAHI, S. *et al.* Strong seasonal effect of moderate experimental warming on plankton respiration in a temperate estuarine plankton community. *Estuarine, coastal and shelf science*, v. 135, p. 269–279, 2013.
- RASCONI, S.; WINTER, K.; KAINZ, M. J. Temperature increase and fluctuation induce phytoplankton biodiversity loss – Evidence from a multi-seasonal mesocosm experiment. *Ecology and evolution*, v. 7, n. 9, p. 2936–2946, 2017.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS microbiology letters*, v. 231, n. 2, p. 153–158, 2004.
- SANTOFERRARA, L. F. Current practice in plankton metabarcoding: optimization and error management. *Journal of plankton research*, v. 41, n. 5, p. 571–582, 2019.
- SCIUTO, K.; MORO, I. Detection of the new cosmopolitan genus *Thermoleptolyngbya* (Cyanobacteria, Leptolyngbyaceae) using the 16S rRNA gene and 16S–23S ITS region. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 105, p. 15–35, 2016.
- STOECK, T. *et al.* Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular ecology*, v. 19, n. s1, p. 21–31, 2010.
- TOYAMA, D. Análise da diversidade microbiana aquática em rios e lagos da região Amazônica. 2011. 183 p. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos -SP, 2011
- XU, H. *et al.* 18S rRNA gene sequencing reveals significant influence of anthropogenic effects on microeukaryote diversity and composition along a river-to-estuary gradient ecosystem. *The Science of the total environment*, v. 705, n. 135910, 2020.
- YAN, D. *et al.* Lake sediment DNA reveals the response of phytoplankton to warming. *Quaternary science reviews*, v. 317, 2023.

ZINGER, L.; GOBET, A.; POMMIER, T. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity: SEQUENCING AQUATIC MICROBIAL DIVERSITY. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 1878–1896, 2012.

APÊNDICE A: Planilhas com dados suplementares

OTUs	Classificações taxonômicas				Referências
OTU6321375	Charophyta	Chaetosphaeriales	Chaetosphaeridium	Chlorophyceae	SLUIMAN, H. J.; GUIHAL, C. Phylogenetic position of Chaetosphaeridium (Chlorophyta), a basal lineage in the charophyceae inferred from 18S rDNA sequences. <i>Journal of phycology</i> , v. 35, n. 2, p. 395–402, 1999.
OTU622922435	Charophyta	Desmidiáles	Closterium	navicula	SHAKHMATOV, A. S. Newly recorded and rare Desmidiáles (Charophyta: Conjugatophyceae) from the Middle Urals, Russia. <i>Check list (Luis Felipe Toledo)</i> , v. 12, n. 6, p. 2013, 2016.
OTU633573340	Charophyta	Desmidiáles	Closterium	spinosporum	TSUCHIKANE, Y.; SEKIMOTO, H. The genus Closterium, a new model organism to study sexual reproduction in streptophytes. <i>The new phytologist</i> , v. 221, n. 1, p. 99–104, 2019.
OTU502953215	Charophyta	Desmidiáles	Cosmarium	bioculatum	ORATA, S. M. Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. <i>Limnetica</i> , v. 22, n. 2, p. 35–52, 2003.
OTU743489057	Charophyta	Desmidiáles	Cosmarium	bioculatum	ORATA, S. M. Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. <i>Limnetica</i> , v. 22, n. 2, p. 35–52, 2003.
OTU832230555	Charophyta	Desmidiáles	Cosmarium	bioculatum	ORATA, S. M. Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. <i>Limnetica</i> , v. 22, n. 2, p. 35–52, 2003.
OTU994530022	Charophyta	Desmidiáles	Cosmarium	bioculatum	ORATA, S. M. Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. <i>Limnetica</i> , v. 22, n. 2, p. 35–52, 2003.
OTU998416405	Charophyta	Desmidiáles	Cosmarium	bioculatum	ORATA, S. M. Asociaciones fitoplanctónicas y su periodicidad en un lago marcadamente estratificado. <i>Limnetica</i> , v. 22, n. 2, p. 35–52, 2003.
OTU339882997	Charophyta	Desmidiáles	Cosmarium	regnellii	SHAKHMATOV, A. S. Newly recorded and rare Desmidiáles (Charophyta: Conjugatophyceae) from the Middle Urals,

					Russia. Check list (Luis Felipe Toledo), v. 12, n. 6, p. 2013, 2016.
OTU684659440	Charophyta	Desmiales	Cosmocladium	saxonicum	SUREK, B. Mucilage regeneration in the green alga <i>Cosmocladium saxonicum</i> De Bary (Desmidiaceae): A light microscopic and quantitative study. <i>British phycological journal</i> , v. 18, n. 1, p. 73–81, 1983.
OTU996275852	Charophyta	Desmiales	Gonatozygon	brebissonii	SHAKHMATOV, A. S. Newly recorded and rare Desmiales (Charophyta: Conjugatophyceae) from the Middle Urals, Russia. Check list (Luis Felipe Toledo), v. 12, n. 6, p. 2013, 2016.
OTU798700851	Charophyta	Phragmoplastophyta	Zygnematophyceae		SILVA, F. K. L. DA; FONSECA, B. M.; FELISBERTO, S. A. Community structure of periphytic Zygnematophyceae (Streptophyta) in urban eutrophic ponds from central Brazil (Goiânia, GO). <i>Acta Limnologica Brasiliensia</i> , v. 30, n. 0, 2018.
OTU39770516	Chlorophyta	Chlamydomonadales	Characiochloris	sasae	NOZAKI, H. Morphology, reproduction and taxonomy of <i>Characiochloris sasae</i> sp. nov. (Chlorophyta) from Japan. <i>Phycologia</i> , v. 32, n. 2, p. 129–135, 1993.
OTU481054636	Chlorophyta	Chlamydomonadales	Chlamydomonas	orbicularis	SARAS, S.; SAXENA, P. The Effect of Physico-Chemical Stress on the Population of <i>Chlamydomonas</i> Species in a permanent pond of Kanpur, (U.P.) India. <i>Flora and Fauna (Jhansi)</i> , v. 29, n. 2, 2023.
OTU682006135	Chlorophyta	Chlamydomonadales	Chlamydomonas	orbicularis	SARAS, S.; SAXENA, P. The Effect of Physico-Chemical Stress on the Population of <i>Chlamydomonas</i> Species in a permanent pond of Kanpur, (U.P.) India. <i>Flora and Fauna (Jhansi)</i> , v. 29, n. 2, 2023.
OTU84382290	Chlorophyta	Chlamydomonadales	Chlorogonium	euchlorum	NOZAKI, H. et al. Toward a natural system of species in chlorogonium (Volvocales, chlorophyta): a combined analysis of morphological and rbcL gene sequence data. <i>Journal of phycology</i> , v. 34, n. 6, p. 1024–1037, 1998.

OTU148363107	Chlorophyta	Chlorellales	Makinoella	tosaensis	SCHNEPF, E.; HEGEWALD, E. The ultrastructure of <i>Makinoella tosaensis</i> OKADA (Chlorophyta, Oocystaceae). <i>Algological studies</i> , v. 97, p. 79–91, 2000.
OTU772375018	Chlorophyta	Chlorophyceae	Characium		KHALID, A. A. H. et al. Enhanced growth and nutrients removal efficiency of <i>Characium</i> sp. cultured in agricultural wastewater via acclimatized inoculum and effluent recycling. <i>Journal of environmental chemical engineering</i> , v. 4, n. 3, p. 3426–3432, 2016.
OTU474177296	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadaceae		BOROWITZKA, M. A. <i>Biology of microalgae</i> . Em: <i>Microalgae in Health and Disease Prevention</i> . [s.l.] Elsevier, 2018. p. 23–72.
OTU624939729	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadaceae		BOROWITZKA, M. A. <i>Biology of microalgae</i> . Em: <i>Microalgae in Health and Disease Prevention</i> . [s.l.] Elsevier, 2018. p. 23–72.
OTU363453093	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadales		BOROWITZKA, M. A. <i>Biology of microalgae</i> . Em: <i>Microalgae in Health and Disease Prevention</i> . [s.l.] Elsevier, 2018. p. 23–72.
OTU218100324	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonas		BOROWITZKA, M. A. <i>Biology of microalgae</i> . Em: <i>Microalgae in Health and Disease Prevention</i> . [s.l.] Elsevier, 2018. p. 23–72.
OTU27190591	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonas		BOROWITZKA, M. A. <i>Biology of microalgae</i> . Em: <i>Microalgae in Health and Disease Prevention</i> . [s.l.] Elsevier, 2018. p. 23–72.
OTU902627060	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlorochytrium		WUJEK, D. E.; THOMPSON, R. H. Endophytic unicellular chlorophytes: a review of <i>Chlorochytrium</i> and <i>Scotinosphaera</i> . <i>Phycologia</i> , v. 44, n. 3, p. 254–260, 2005.
OTU801779970	Chlorophyta	Chlorophyceae			
OTU300579102	Chlorophyta	Chlorophyceae			
OTU291580276	Chlorophyta	Chlorophyceae	Desmodesmus		SHUBERT, E.; WILK-WOŹNIAK, E.; LIGĘZA, S. An autoecological investigation of <i>Desmodesmus</i> : implications

					for ecology and taxonomy. <i>Plant ecology and evolution</i> , v. 147, n. 2, p. 202–212, 2014.
OTU679184426	Chlorophyta	Chlorophyceae	Desmodesmus		SHUBERT, E.; WILK-WOŹNIAK, E.; LIGEŻA, S. An autoecological investigation of <i>Desmodesmus</i> : implications for ecology and taxonomy. <i>Plant ecology and evolution</i> , v. 147, n. 2, p. 202–212, 2014.
OTU433573310	Chlorophyta	Chlorophyceae	Dunaliellaceae		DEHGhani, J. et al. The use of 18S ribosomal DNA, ITS and rbcL molecular markers to study the genus <i>Dunaliella</i> (Dunaliellaceae) in Iranian samples: A phylogenetic approach. <i>Oceanological and hydrobiological studies</i> , v. 49, n. 1, p. 88–98, 2020.
OTU641890989	Chlorophyta	Chlorophyceae	Dunaliellaceae		DEHGhani, J. et al. The use of 18S ribosomal DNA, ITS and rbcL molecular markers to study the genus <i>Dunaliella</i> (Dunaliellaceae) in Iranian samples: A phylogenetic approach. <i>Oceanological and hydrobiological studies</i> , v. 49, n. 1, p. 88–98, 2020.
OTU929986222	Chlorophyta	Chlorophyceae			
OTU437638514	Chlorophyta	Chlorophyceae	Monoraphidium		EL-SHEEKH, M. M. et al. Impact of macronutrients and salinity stress on biomass and biochemical constituents in <i>Monoraphidium braunii</i> to enhance biodiesel production. <i>Scientific reports</i> , v. 14, n. 1, p. 2725, 2024.
OTU411216947	Chlorophyta	Chlorophyceae	Neochloris		ZHOU, H. et al. Two-step cultivation of <i>Neochloris oleoabundans</i> in a novel horizontal thin-layer algal reactor: Interplay of pH and dissolved inorganic carbon. <i>Biochemical engineering journal</i> , v. 205, n. 109244, p. 109244, 2024.
OTU41946845	Chlorophyta	Chlorophyceae	Oophila		BISHOP, C. D.; GARBARY, D. J. Taxonomy and nomenclature of <i>Oophila amblystomatis</i> (Chlorophyceae, Chlamydomonadales). <i>Journal of phycology</i> , v. 60, n. 2, p. 380–386, 2024.

OTU426896037	Chlorophyta	Chlorophyceae	Scenedesmus		DAS, S. et al. Diclofenac enhances Boron nitride nanoparticle toxicity in freshwater green microalgae, <i>Scenedesmus obliquus</i> : Elucidating the role of oxidative stress. <i>Toxicology reports</i> , v. 13, n. 101696, p. 101696, 2024.
OTU770089507	Chlorophyta	Chlorophyceae	Viridiplantae		
OTU353009426	Chlorophyta	Monomastigales	Monomastix	minuta	TURMEL, M. et al. The chloroplast genomes of the Green algae <i>Pyramimonas</i> , <i>Monomastix</i> , and <i>Pycnococcus</i> shed New light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. <i>Molecular biology and evolution</i> , v. 26, n. 3, p. 631–648, 2009.
OTU722987909	Chlorophyta	Monomastigales	Monomastix		TURMEL, M. et al. The chloroplast genomes of the Green algae <i>Pyramimonas</i> , <i>Monomastix</i> , and <i>Pycnococcus</i> shed New light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. <i>Molecular biology and evolution</i> , v. 26, n. 3, p. 631–648, 2009.
OTU839031195	Chlorophyta	Oedogoniales	Oedogonium	pusillum	BORAH, D.; ROUT, J.; NOORUDDIN, T. Distribution and diversity of algal communities in rice terrace agroecosystem of a hilly district of southern Assam, North-East India. <i>Tropical ecology</i> , v. 63, n. 1, p. 75–93, 2022.
OTU310384109	Chlorophyta	Pedinomonadales	Pedinomonas		MANIGANDAN, V. et al. Phylogenetic affiliation of <i>Pedinomonas noctilucae</i> and green <i>Noctiluca scintillans</i> nutritional dynamics in the Gulf of Mannar, Southeastern Arabian Sea. <i>Protist</i> , v. 175, n. 2, p. 126019, 2024.
OTU339936964	Chlorophyta	Pedinomonadales	Pedinomonas		MANIGANDAN, V. et al. Phylogenetic affiliation of <i>Pedinomonas noctilucae</i> and green <i>Noctiluca scintillans</i> nutritional dynamics in the Gulf of Mannar, Southeastern Arabian Sea. <i>Protist</i> , v. 175, n. 2, p. 126019, 2024.
OTU670003892	Chlorophyta	Prasiolales	Stichococcus	jenerensis	NEUSTUPA, J.; ELIÁŠ, M. Š. E. A taxonomic study of two <i>Stichococcus</i> species (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with

					a starch-enveloped pyrenoid. <i>Nova Hedwigia</i> , v. 84, n. 1–2, p. 51–63, 2007.
OTU10057746	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU345570197	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU449706526	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU479812039	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU58146518	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU675389910	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU927421844	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.

OTU135003957	Chlorophyta	Sphaeropleales	Desmodesmus	pirkollei	NGUM, L. F. et al. Separation of microalgae from bacterial contaminants using spiral microchannel in the presence of a chemoattractant. <i>Bioresources and bioprocessing</i> , v. 11, n. 1, p. 36, 2024.
OTU786107312	Chlorophyta	Sphaeropleales	Radiococcus	polycoccus	SANTHAKUMARAN, P.; KOOKAL, S. K.; RAY, J. G. Biomass yield and biochemical profile of fourteen species of fast-growing green algae from eutrophic bloomed freshwaters of Kerala, South India. <i>Biomass & bioenergy</i> , v. 119, p. 155–165, 2018.
OTU857039200	Chlorophyta	Sphaeropleales	Scenedesmus	armatus	DAS, S. et al. Diclofenac enhances Boron nitride nanoparticle toxicity in freshwater green microalgae, <i>Scenedesmus obliquus</i> : Elucidating the role of oxidative stress. <i>Toxicology reports</i> , v. 13, n. 101696, p. 101696, 2024.
OTU124637663	Chlorophyta	Sphaeropleales	Verrucodesmus	parvus	RODRÍGUEZ-PALACIO, M. C. et al. The cultivation of five microalgae species and their potential for biodiesel production. <i>Energy, sustainability and society</i> , v. 12, n. 1, 2022.
OTU110743759	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorophyta		DÍAZ-PÉREZ, M. et al. Application of microalgae in cauliflower fertilisation. <i>Scientia horticulturae</i> , v. 337, n. 113468, p. 113468, 2024.
OTU516667324	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorophyta		DÍAZ-PÉREZ, M. et al. Application of microalgae in cauliflower fertilisation. <i>Scientia horticulturae</i> , v. 337, n. 113468, p. 113468, 2024.
OTU75437544	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorophyta		DÍAZ-PÉREZ, M. et al. Application of microalgae in cauliflower fertilisation. <i>Scientia horticulturae</i> , v. 337, n. 113468, p. 113468, 2024.
OTU819669204	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Coccomyxa		DÍAZ-PÉREZ, M. et al. Application of microalgae in cauliflower fertilisation. <i>Scientia horticulturae</i> , v. 337, n. 113468, p. 113468, 2024.

OTU912403146	Chlorophyta	Trebouxiophyceae	Chlorella		DÍAZ-PÉREZ, M. et al. Application of microalgae in cauliflower fertilisation. <i>Scientia horticultrae</i> , v. 337, n. 113468, p. 113468, 2024.
OTU380204187	Chlorophyta	Ulvophyceae	Viridiplantae		HUANG, R. et al. Ocean acidification alters microeukaryotic and bacterial food web interactions in a eutrophic subtropical mesocosm. <i>Environmental research</i> , v. 257, n. 119084, p. 119084, 2024.
OTU691295078	Chlorophyta	Botryococcus	braunii		GELIN, F. et al. Mechanisms of flash pyrolysis of ether lipids isolated from the green microalga <i>Botryococcus braunii</i> race A. <i>Journal of analytical and applied pyrolysis</i> , v. 27, n. 2, p. 155–168, 1993.
OTU805152460	Chlorophyta	Botryococcus	braunii		GELIN, F. et al. Mechanisms of flash pyrolysis of ether lipids isolated from the green microalga <i>Botryococcus braunii</i> race A. <i>Journal of analytical and applied pyrolysis</i> , v. 27, n. 2, p. 155–168, 1993.
OTU361421861	Chlorophyta	Dilabifilum	rthropyreniae		LEMLEY, D. A.; ADAMS, J. B.; TALJAARD, S. Comparative assessment of two agriculturally-influenced estuaries: Similar pressure, different response. <i>Marine pollution bulletin</i> , v. 117, n. 1–2, p. 136–147, 2017.
OTU80445812	Rhodophyceae	Florideophycidae	Nemaliophycidae	<i>Kumanoa curvata</i>	ARISTYA, G. R. et al. Species diversity of the freshwater red algal genus <i>Kumanoa</i> in Taiwan with the description of two new species: <i>Kumanoa taiwanensis</i> sp. nov. and <i>Kumanoa yuanyangensis</i> sp. nov. <i>Phycologia</i> , v. 61, n. 5, p. 459–472, 2022.
OTU269098082	Cryptophita	Cryptophyceae			
OTU425058644	Cryptophita	Cryptophyceae	Cryptomonadales	<i>Cryptomonas</i>	MARTENS, N. et al. Metabarcoding reveals potentially mixotrophic flagellates and picophytoplankton as key groups of phytoplankton in the Elbe estuary. <i>Environmental research</i> , v. 252, n. 119126, p. 119126, 2024.

OTU102659367	Ochrophyta	Bacillariophytina	Mediophyceae	eriensis	MARTENS, N. et al. Metabarcoding reveals potentially mixotrophic flagellates and picophytoplankton as key groups of phytoplankton in the Elbe estuary. Environmental research, v. 252, n. 119126, p. 119126, 2024.
OTU558303300	Ochrophyta	Bacillariophyceae	Navicula	capitata	YANG, J. et al. Distribution patterns and co-occurrence network of eukaryotic algae in different salinity waters of Yuncheng Salt Lake, China. Scientific reports, v. 14, n. 1, p. 8340, 2024.
OTU373726514	Ochrophyta	Chattonellales	Merotricha	bacillata	MENEZES, M.; BICUDO, C. E. DE M. Freshwater Raphidophyceae from the State of Rio de Janeiro, southeast Brazil. Biota Neotropica, v. 10, n. 3, p. 323–331, 2010.
OTU224299151	Ochrophyta	Chromulinales			NEMCOVA, Y.; DIAZ-PULIDO, G. Floristic and ecological insights into silica-scaled chrysophytes in southeastern Queensland, Australia. 2023.
OTU470342586	Ochrophyta	Chromulinales			NEMCOVA, Y.; DIAZ-PULIDO, G. Floristic and ecological insights into silica-scaled chrysophytes in southeastern Queensland, Australia. 2023.
OTU599026754	Ochrophyta	Chromulinales			NEMCOVA, Y.; DIAZ-PULIDO, G. Floristic and ecological insights into silica-scaled chrysophytes in southeastern Queensland, Australia. 2023.
OTU553478511	Ochrophyta	Chromulinales	Poterioochromonas		YAN, H. et al. Octanoic acid helps Poterioochromonas malhamensis control toxic Microcystis sp. Journal of applied phycology, 2024.
OTU685801523	Ochrophyta	Chromulinales	Poteriospumella		NEMCOVA, Y.; DIAZ-PULIDO, G. Floristic and ecological insights into silica-scaled chrysophytes in southeastern Queensland, Australia. 2023.
OTU330420887	Ochrophyta	Chromulinales			NEMCOVA, Y.; DIAZ-PULIDO, G. Floristic and ecological insights into silica-scaled chrysophytes in southeastern Queensland, Australia. 2023.
OTU255288366	Ochrophyta	Chrysophyceae			SOROKIN, B. et al. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding

					efficiency of tilapia fry. Journal of applied phycology, v. 36, n. 4, p. 1767–1780, 2024.
OTU501894555	Ochrophyta	Chrysophyceae			SOROKIN, B. et al. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry. Journal of applied phycology, v. 36, n. 4, p. 1767–1780, 2024.
OTU657249653	Ochrophyta	Chrysophyceae	chrysophyte		SOROKIN, B. et al. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry. Journal of applied phycology, v. 36, n. 4, p. 1767–1780, 2024.
OTU812320617	Ochrophyta	Chrysophyceae			SOROKIN, B. et al. Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry. Journal of applied phycology, v. 36, n. 4, p. 1767–1780, 2024.
OTU574339581	Ochrophyta	Eustigmatales	Monodus	subterraneus	SUPARMANIAM, U. et al. Influence of environmental stress on microalgae growth and lipid profile: a systematic review. Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 2022.
OTU657426268	Ochrophyta	Eustigmatales	Pseudellipsoidion		ŠEVČÍKOVÁ, T. et al. Plastid genomes and proteins illuminate the evolution of eustigmatophyte algae and their bacterial endosymbionts. Genome biology and evolution, v. 11, n. 2, p. 362–379, 2019.
OTU780465009	Ochrophyta	Eustigmatales	Trachydiscus		ŠTĚRBOVÁ, K. et al. Microalgae as an aquaculture feed produced in a short light-path annular column photobioreactor. Journal of applied phycology, v. 35, n. 2, p. 603–611, 2023.
OTU474097405	Ochrophyta	Hibberdiales	Lagynion	scherrfeli	BARINOVA, S. S. et al. Diversity and ecology of algae from the Nahal Qishon river, northern Israel. Plant biosystems, v. 138, n. 3, p. 245–259, 2004.

OTU138297682	Ochrophyta	Ochromonadales	Epipyxis	pulchra	WETHERBEE, R.; ANDERSEN, R. A. Flagella of a chrysophycean alga play an active role in prey capture and selection: Direct observations on <i>Epipyxis pulchra</i> using image enhanced video microscopy. <i>Protoplasma</i> , v. 166, n. 1–2, p. 1–7, 1992.
OTU439984795	Ochrophyta	Ochromonadales	Ochromonas		KIM, J. Y. et al. Uptake of spherical nucleic acid (SNA) in <i>Ochromonas danica</i> : A new potential biotechnological tool. <i>Algal research</i> , v. 78, n. 103385, p. 103385, 2024.
OTU865990769	Ochrophyta	Ochromonadales	Ochromonas	sphaerocystis	KIM, J. Y. et al. Uptake of spherical nucleic acid (SNA) in <i>Ochromonas danica</i> : A new potential biotechnological tool. <i>Algal research</i> , v. 78, n. 103385, p. 103385, 2024.
OTU888272061	Ochrophyta	Ochromonadales	Ochromonas	sphaerocystis	KIM, J. Y. et al. Uptake of spherical nucleic acid (SNA) in <i>Ochromonas danica</i> : A new potential biotechnological tool. <i>Algal research</i> , v. 78, n. 103385, p. 103385, 2024.
OTU919724178	Ochrophyta	Ochromonadales	Ochromonas	sphaerocystis	KIM, J. Y. et al. Uptake of spherical nucleic acid (SNA) in <i>Ochromonas danica</i> : A new potential biotechnological tool. <i>Algal research</i> , v. 78, n. 103385, p. 103385, 2024.
OTU674654728	Ochrophyta	Ochromonadales	Ochromonas		KIM, J. Y. et al. Uptake of spherical nucleic acid (SNA) in <i>Ochromonas danica</i> : A new potential biotechnological tool. <i>Algal research</i> , v. 78, n. 103385, p. 103385, 2024.
OTU483105594	Ochrophyta	Ochromonadales	Paraphysomonas	vestita	HILTUNEN, M. et al. Trophic upgrading via the microbial food web may link terrestrial dissolved organic matter to <i>Daphnia</i> . <i>Journal of plankton research</i> , v. 39, n. 6, p. 861–869, 2017.
OTU243807303	Ochrophyta	Synurales	Mallomonas	rasilis	PIĄTEK, J. <i>Mallomonas Camerunensis</i> Sp. Nov. (Chrysophyceae, Stramenopiles) From A Shallow Puddle In The Guineo-Congolian Rainforest (Cameroon). <i>Polish botanical journal</i> , v. 60, n. 2, p. 119–126, 2015.

APÊNDICE B - Gráficos suplementares

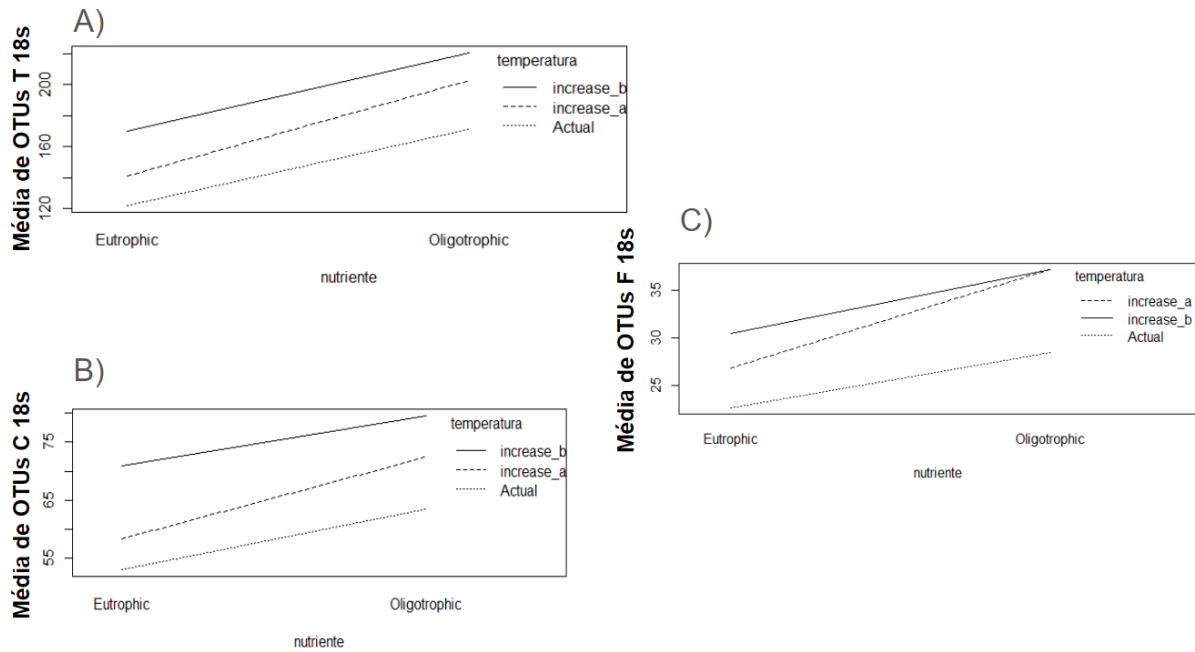


Figura 1: Representação da riqueza média de OTUs comparando diferentes temperaturas e estados tróficos. A) Dados de OTUs do grupo Total (T). B) Dados do grupo das OTUs Classificadas (C). C) Dados do grupo de fitoplâncton das OTUs (F). Actual = Temperatura Ambiente, increase_a = aumento de temperatura em 2°C e increase_b = aumento de temperatura em 3°C.

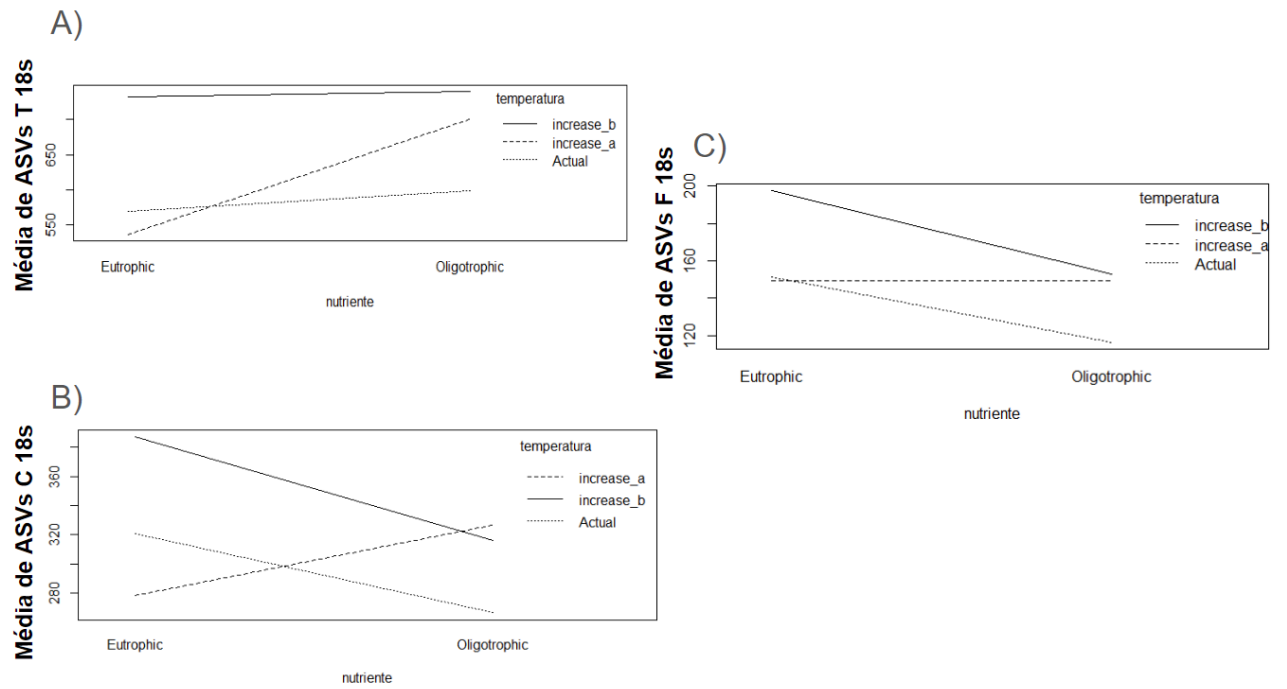


Figura 2: Representação da riqueza média de ASVs de Eucariotos comparando diferentes temperaturas e estados tróficos. A) Dados de ASVs do grupo total (T). B) Dados do grupo das ASVs Classificadas (C). C) Dados do grupo das ASVs do fitoplâncton (F). Actual = Temperatura ambiente, increase_a = aumento de temperatura em 2°C e increase_b = aumento de temperatura em 3°C.

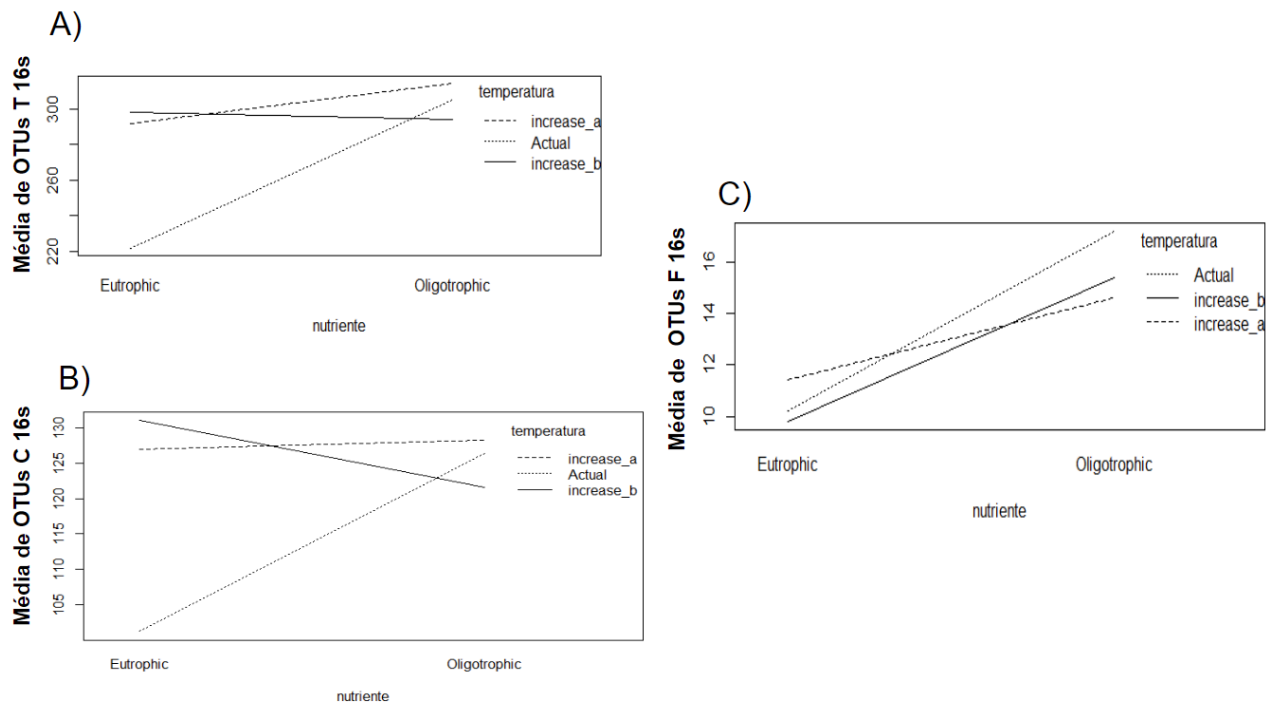


Figura 3: Representação da riqueza média de OTUs de procariotos comparando diferentes temperaturas e estado trófico. **A)** Dados de OTUs do grupo total (T) observamos um padrão similar ao encontrado na figura B. **B)** Dados do grupo das OTUs classificadas (C) onde há uma certa interação entre temperatura e nutriente onde em temperaturas mais altas temos maior riqueza no ambiente eutrófico e temperatura mais baixa a riqueza é maior no ambiente oligotrófico; **C)** Dados do grupo de todas as OTUs (T) em que observamos um padrão no qual o ambiente oligotrófico possui uma riqueza maior, mas a temperatura não diferencia muito a riqueza. Os diferentes tipos de temperaturas são; Actual = temperatura ambiente, Increase_a = aumento da temperatura em 2°C e Increase_b = aumento da temperatura em 3°C.

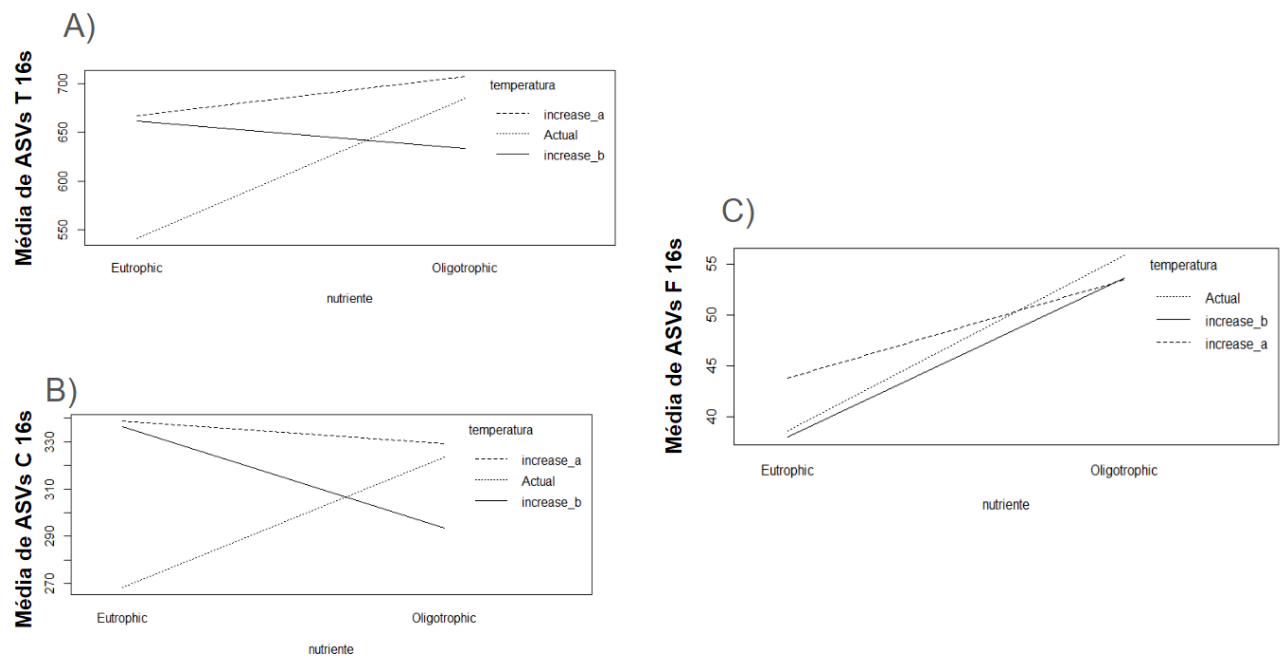


Figura 4: Representação da riqueza média de ASVs de procariotos comparando diferentes temperaturas e estado trófico. **A)** Dados de ASVs do grupo total (T) segue um padrão semelhante ao B. **B)** Dados do grupo das ASVs classificadas (C), não há um padrão pois a interação entre as variáveis faz com que o ambiente oligotrófico tenha maior riqueza em temperaturas baixas e pouca riqueza em temperaturas mais altas. **C)** Dados de OTUs do grupo dos fitoplânctons (F) no qual a riqueza é maior no ambiente oligotrófico, mas não varia muito em relação à temperatura. Temperatura Atual que corresponde à temperatura ambiente, increase_a aumento de temperatura de 2°C e increase_b temperatura com aumento de 3°C.