

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA CAROLINA FERREIRA

DIATOMÁCEAS DE AMBIENTES OLIGOTRÓFICOS DA REGIÃO DOS MANANCIAIS
DA SERRA, PIRAQUARA, PARANÁ, BRASIL.

CURITIBA

2022

PAULA CAROLINA FERREIRA

DIATOMÁCEAS DE AMBIENTES OLIGOTRÓFICOS DA REGIÃO DOS MANANCIAIS
DA SERRA, PIRAQUARA, PARANÁ, BRASIL.

Relatório final apresentado Instituto
Água e Terra do estado do Paraná,
sobre a autorização de coleta número
20.20, protocolo 17.086.112-4.

CURITIBA

2022

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	3
OBJETIVO.....	4
MATERIAL E MÉTODOS	4
RESULTADOS	6
REFERÊNCIAS	7

INTRODUÇÃO

As diatomáceas constituem um dos grupos de microalgas com maior riqueza de espécies na maioria dos ambientes aquáticos, tanto na comunidade fitoplanctônica, quanto na perifítica. Representam importante parcela da biomassa total e exercem papel fundamental na cadeia trófica como produtores primários e fixadores de carbono no ambiente. (WETZEL, 1983).

A estrutura e as complexas ornamentações observadas nas frústulas das diatomáceas são fundamentais para taxonomia do grupo (BOLD; WYNNE, 1985). Estudos recentes, para melhor circunscrição de espécies, tem embasamento em características morfológicas da frústula em microscopia de luz e microscopia eletrônica dos complexos populacionais de espécies de diatomáceas (*Gomphonema gracile* e *Achnantheidium minutissimum*).

As espécies de diatomáceas são frequentemente organizados em grupos morfológicamente semelhantes que compartilham inúmeras características e os intervalos morfométricos se sobrepõem (POTAPOVA; HAMILTON, 2007). Vários “complexos de espécies” foram relatados com um alto nível de diversidade (AJANI et al., 2013). A resolução de táxons morfológicamente semelhantes são especialmente difícil através de análises em microscopia óptica (MO) (BLANCO et al., 2017), pois muitas espécies de diatomáceas são, frequentemente, organizadas em grupos morfológicamente semelhantes que compartilham características e sobrepõe medidas (POTAPOVA; HAMILTON, 2007), como por exemplo *Frustulia crassinervia*/*F. australocrassinervia*, *Eunotia serra*/*E. georgii*, *E. sudetica*/*meridiana*/*pseudosudetica*, *Nitzschia palea*/*N. paleaceae*, *Nitzschia amphibial*/*N. semirobusta* e *Gomphonema parvulum*/*G. angustum*, morfoespécies, sendo estas espécies, frequentemente incluídas em floras de diatomáceas. No entanto, métodos auxiliares como análises moleculares podem revelar se estes complexos de diatomáceas são complexos de espécies constituídos por poucas ou muitas espécies, cuja identificação em MO é difícil (POTAPOVA; HAMILTON, 2007; MANN et al., 2008; POULÍČKOVÁ et al., 2010).

Cox (2014) explicita que, embora a microscopia óptica (MO) e a microscopia eletrônica (ME) ainda sejam a base para a taxonomia das diatomáceas, é fundamental a adoção de abordagens complementares, como a biologia molecular, rendendo ricas fontes de informações com relação à diversidade genética dentro de espécies de diatomáceas bem caracterizadas morfológicamente e auxiliando na resolução de problemas taxonômicos.

Muitos grupos de protistas, como as diatomáceas, ainda são pouco caracterizados através da biologia molecular, apesar da incontestável importância ecológica e econômica destes organismos (STERN et al., 2010). Desde que as técnicas moleculares foram aplicadas à pesquisa de diatomáceas pela primeira vez na década de 1980 (MEDLIN et al., 1988) estudos filogenéticos moleculares têm sido realizados para identificar e classificar as diatomáceas (THERRIOT et al., 2010), na tentativa de superar as limitações morfológicas (EVANS et al., 2007; MONIZ; KACZMARSKA, 2010; MANN et al., 2010; URBANKOVÁ et al., 2016; ZOU et al. 2021).

Estudos usando taxonomia refinada, com ferramentas diversas, apoiada por dados moleculares podem elucidar questões a cerca de complexos de espécies, além de fornecer dados mais confiáveis com relações de espécies individuais e parâmetros ambientais, permitindo assim, uma melhor precisão ecológica das espécies de diatomáceas e sua real distribuição geográfica.

OBJETIVO

Ampliar e aprofundar o conhecimento taxonômico de espécies de diatomáceas da região dos Mananciais da Serra, Piraquara, Paraná com base no estudo detalhado de populações, visando a identificação de táxons, a harmonização taxonômica das espécies e a detecção de novidades taxonômicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras:

Amostras perifíticas foram coletadas no dia 01/12/2020, ao longo de trilhas da região dos Mananciais da Serra. As amostras foram coletadas contemplando principalmente a comunidade perifítica, através de coleta de substratos variados. Dados abióticos das águas superficiais dos ambientes amostrados foram mensurados no momento da coleta: pH, T água e condutividade, através de equipamentos de campo disponíveis no Laboratório de Ficologia (UFPR) (TABELA 1).

Tabela 1: Dados abióticos dos locais de coleta.

Coleta	pH	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Amostra	Substrato	Coordenadas
01/12/2020	6,2	13,4	11,6	Epifíton	Briófita	25°29'47,5"S 48°58'52,1"W
01/12/2020	6,5	14,5	13,5	Epifíton	Briófita	25°29'42,7"S 48°58'51,6"W

Isolamento e Cultivo:

Alíquotas de cada amostra foram transferidas para um Placa de Petri de 50 mm com 12 mL de meio GG com silicato e elementos traço adicionados (VON STOSCH; FECHER, 1979; MANN; CHEPURNOV, 2004), ou meio PM (GUILLARD; LORENZEN, 1972), recomendados para o cultivo de diatomáceas de água doce a partir de habitats oligotróficos ácidos, *Eunotia* em particular. Também, foi utilizado o meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) padrão para diatomáceas de ambientes com pH neutro ou mais elevado. Após alguns dias, culturas clonais foram então estabelecidos pela transferência de células com micropipetas para microplacas de 24 poços, com 2 mL do meio. Os cultivos foram mantidos à 21°C, com fotoperíodo de 12:12 h luz:escuro e 25-30 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Estudo taxonômico morfológico:

O material foi oxidado segundo a técnica de Simonsen (1974) modificado por Moreira-Filho e Valente-Moreira (1981) nesta técnica a matéria orgânica foi removida pela adição de KMnO_4 e HCl . Lâminas permanentes foram montadas com resina Naphrax® (R.I.1.74) e analisadas em microscópio óptico Olympus BX40. As ilustrações foram obtidas utilizando-se microscópio Olympus BX-40 com câmera de captura acoplada Olympus DP-071.

Para análise da ultraestrutura das frústulas, parte do material oxidado foi depositado e seco sobre suportes de alumínio, metalizado com ouro em aparelho Balzers Union SCD 030 e analisados em microscópio eletrônico de varredura – MEV (JEOL JSM 6360LV e TESCAN VEGA3LMU, 15 kV e WD 8 mm).

RESULTADOS

Em laboratório, testamos diferentes formas de isolamento das células, assim como, diferentes tipos de cultura.

Realizamos o isolamento seguindo duas técnicas:

1. isolamento por capilaridade;
2. inoculação em placa de Petri com agar.

No isolamento por capilaridade, o qual, utiliza-se o capilar para coletar os indivíduos das espécies de interesse para o estudo, conseguimos uma alíquota com menor número de organismos, porém, não conseguimos isolar somente um indivíduo por vez.

Na inoculação em placa de Petri com agar, retiramos um pequeno volume da amostra, e pingamos sobre uma fina camada de agar enriquecido (meio WC ou GG) e espalhamos a amostra por toda a placa com o auxílio da Alça de Drigalski, não realizando assim, nenhuma seleção de organismos.

Quando comparamos as duas técnicas, os organismos isolados a partir da inoculação em placa de Petri apresentaram uma maior diversidade de organismos vivos e algum crescimento populacional, entretanto, no isolamento por capilaridade também eram observados indivíduos viáveis.

Para o cultivo utilizamos três técnicas:

1. meio sólido;
2. meio sólido + meio líquido (1:1);
3. meio líquido;

As diatomáceas apresentaram maior viabilidade quando colocadas em meio sólido ou meio sólido + líquido, a cada sete dias realizamos o repique dos organismos destes meios.

Conseguimos isolar três organismos, duas cepas do gênero *Gomphonema* Ehrenberg e uma cepa do gênero *Nitzschia* Hassall.

No gênero *Gomphonema* temos duas espécies bem distintas, uma diminuta pertencente a espécie *Gomphonema parvulum* (Kutzing) Kutzing e a outra com maiores dimensões pertence a *Gomphonema naviculoides* Smith. No gênero *Nitzschia* temos cepas da espécie *Nitzschia paleacea* (Grunow) Grunow.

Atualmente este material encontra-se liofilizado e armazenado no freezer -80°C e estamos esperando a chegada de alguns insumos para a realização da extração do DNA das cepas isoladas, para posterior análise molecular.

REFERÊNCIAS

AJANI, P.; MURRAY, S.; HALLEGRAEFF, G.; LUNDHOLM, N.; GILLINGS, M.; BRETT, S.; ARMAND, L. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New South Wales, Australia: morphotaxonomy, molecular phylogeny, toxicity, and distribution. *Journal of Phycology*, v. 49, p. 765–785, 2013.

BLANCO, S.; BORREGO-RAMOS, M.; OLENICI, A. Disentangling diatom species complexes: does morphometry suffice? *PeerJ*, v. 5, e4159, 2017.

BOLD, C.H.; WYNNE, M.J. *Introduction to the Algae*. 2 ed. Englewood Cliffs: Prentice – Hall, 1995.

COX, E.J. Diatom identification in the face of changing species concepts and evidence of phenotypic plasticity. *Journal of Micropalaeontology*, v. 33, n. 2, p. 111–120, 2014.

EVANS, K.M. WORTLEY, A.H.; MANN, D.G. An assessment of potential diatom "barcoding" genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, v. 158, p. 349-364, 2007.

GUILLARD, R.R.L.; LORENZEN, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *Journal of Phycologie*, v. 8, p. 10-14, 1972.

MANN, D.G.; CHEPURNOV, V.A. What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematics. *Nova Hedwigia*, v. 79, p. 237-291, 2004.

MANN, D.G.; THOMAS, S.J.; EVANS, K.M. Revision of the diatom genus *Sellaphora*: a first account of the larger species in the British Isles. *Fottea*, v. 8, p. 75–78, 2008.

MANN, D.G.; SATO, S.; TROBAJO, R.; VANORMELINGEN, P.; SOUFFREAU, C. DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie Algologie*, v. 31, p. 557– 577, 2010.

MEDLIN, L.K.; ELWOOD, H.J.; STICKEL, S.; SOGIN, M.L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Genetica*, v. 71, p. 491-499, 1988.

MONIZ, M.B.J.; KACZMARSKA, I. Barcoding of diatoms: Nuclear encoded ITS revisited. *Protist*, v. 161, p. 7-34, 2010.

MOREIRA-FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I. M. Avaliaçãotaxonomica e ecologica das diatomáceas (Bacillariophyceae) epifítas em algas pluricelulares obtidas nos litorais dos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. Boletim do Museu Botânico Municipal, v. 47, n. 1-2, p. 1-17, 1981.

POTAPOVA, M.; HAMILTON, P.B. Morphological and ecological variation within the *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyceae) species complex. *Journal of Phycology*, v. 43, p. 561–575, 2007.

POULÍČKOVÁ, A.; VESELÁ, J.; NEUSTUPA, J.; ŠKALLOUD, P. Pseudocryptic diversity versus cosmopolitanism in diatoms: a case study on *Navicula cryptocephala* Kütz. (Bacillariophyceae) and morphologically similar taxa. *Protist*, v. 161, p. 353–369, 2010.

RIMET, F.; CHAUMEIL, P.; KECK, F.; KERMARREC, L.; VASSELON, V.; KAHLERT, M.; FRANC, A.; BOUCHEZ, A. R-Syst::diatom: an open-access and curated barcoding database for diatoms and freshwater monitoring. *Database*, p. 1-21, 2016.

SIMONSEN, R. The diatom plankton of Indian Ocean Expedition of R/V "Meteor", 1964-65 Meteor Forschungsergebnisse. Reihe D-Biologie, v. 19, p. 1-66, 1974.

STERN, R.F.; HORAK, A.; ANDREW, R.L.; COFFROTH, M.A.; ANDERSEN, R.A.; KÜPPER, F.C.; JAMESON, I.; HOPPENRATH, M.; VÉRON, B.; KASAI, F.; BRAND, J.; JAMES, E.R.; KEELING, P. Environmental Barcoding Reveals Massive Dinoflagellate Diversity in Marine Environments. *PlosOne*, v. 5, 2010.

THERIOT, E.C.; ASHWORTH, M.P.; RUCK, E.; NAKOV, T.; JANSEN, R.K. A preliminary multigene phylogeny of the diatoms (Bacillariophyta): challenges for future research. *Plant Ecology and Evolution*, v. 143, p. 278-296, 2010.

URBÁNKOVA, P.; VESELÁ, J. DNA-barcoding: A case study in the diatom genus *Frustulia* (Bacillariophyceae). *Nova Hedwigia*, v. 142, p. 147-162, 2013.

VON STOSCH, H.A.; FECHER, K. „Internalthecae“ of *Eunotia soleirolii* (Bacillariophyceae): development, structure and function as resting spores. *Journal of Phycology*, v. 15, p. 233-243, 1979.

WETZEL, R. G. *Limnology*. 2. ed. Philadelphia: SandersCollege, 1983. 767p.