

UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL -
MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GESTÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL

CARLA GISELDA HEINRICH

**SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES DE DIATOMÁCEAS EPILÍTICAS
PARA APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA EM SISTEMAS
LÓTICOS SUBTROPICAIS E TEMPERADOS BRASILEIROS**

Santa Cruz do Sul
2021

Carla Giselda Heinrich

**SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES DE DIATOMÁCEAS
EPILÍTICAS PARA APLICAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA
EM SISTEMAS LÓTICOS SUBTROPICAIS E TEMPERADOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para o título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Lobo Alcayaga

Coorientadora: Prof.^(a) Dr.^(a) Lisianne Brittes Benitez

Santa Cruz do Sul
2021

RESUMO

As algas diatomáceas têm sido amplamente utilizadas como bioindicadores para avaliar a qualidade da água em sistemas lóticos, devido à sua sensibilidade específica a uma variedade de condições ecológicas, respondendo rapidamente às mudanças ambientais, destacando que os índices bióticos são baseados na abundância relativa de espécies, cujo diagnóstico taxonômico usa caracteres da frústula por meio de microscopia óptica convencional. No entanto, a obtenção de tais índices é demorada, cara e requer excelente experiência taxonômica. Este diagnóstico taxonômico pode ser complementado com ferramentas moleculares. Assim, esta pesquisa teve como objetivo aplicar técnicas moleculares utilizando os genes 18S rRNA V4 e *rbcl*, para identificar espécies de diatomáceas utilizadas no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Durante 2020, amostras de água e algas diatomáceas epilíticas foram coletadas em um trecho superior da Bacia do Arroio Preto, Município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, para caracterização ambiental e obtenção de culturas de diatomáceas unialgais para identificação morfológica e análise molecular. Os resultados indicaram o isolamento de três espécies de diatomáceas epilíticas ecologicamente importantes, identificadas molecularmente como *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing, *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G.Mann e *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot. A comparação das sequências com o banco de dados do GenBank auxiliou na identificação morfológica, sendo que o gene *rbcl* apresentou melhor capacidade discriminatória para as três espécies sequenciadas. Este estudo contribui para aumentar os dados moleculares de espécies de diatomáceas disponíveis nas bases de dados, destacando o uso da abordagem molecular como ferramenta taxonômica complementar para avaliar a qualidade da água de sistemas lóticos subtropicais e temperados brasileiros.

Palavras-chave: Diatomáceas epilíticas, gene 18S rDNA, gene *rbcl*, biomonitoramento, identificação molecular.

ABSTRACT

Diatom algae have been widely used as bioindicators to assess water quality in lotic systems, due to their specific sensitivity to a variety of ecological conditions, responding quickly to environmental changes, highlighting that biotic indices are based on the relative abundance of species, whose taxonomic diagnosis uses frustule characters by means of conventional optical microscopy. However, obtaining such indices is time-consuming, expensive and requires excellent taxonomic expertise. This taxonomic diagnosis can be complemented using molecular tools. Thus, this research aimed to apply molecular techniques using 18S rRNA V4 and *rbcL* genes, to identify diatom species used in the biomonitoring of aquatic ecosystems. During 2020, water samples and epilithic diatom algae were collected in an upper reach of the Preto Stream Basin, Municipality of Santa Cruz do Sul, RS, Brazil, for environmental characterization and obtaining cultures of unialgal diatoms for morphological identification and molecular analysis. The results indicated the isolation of three ecologically important epilithic diatom species, identified molecularly as *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing, *Sellaphora seminulum* (Grunow) D.G.Mann and *Eolimna minima* (Grunow) Lange-Bertalot. The comparison of the sequences with the GenBank database helped the morphological identification, and the *rbcL* gene showed better discriminatory capacity for the three sequenced species. This study contributes to increase the molecular data of diatom species available in the databases, highlighting the uses of the molecular approach as complementary taxonomical tool to evaluate the water quality of Brazilian subtropical and temperate lotic systems.

Keywords: epilithic diatoms, 18S rDNA gene, *rbcL* gene, biomonitoring, molecular identification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo Geral.....	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
3.1 Bacillariophyta: classificação e características gerais	10
3.2 Algas diatomáceas como bioindicadores da qualidade da água	15
3.3 Identificação taxonômica de algas diatomáceas com abordagem molecular para biomonitoramento.....	19
4. METODOLOGIA	23
4.1 Área de amostragem	24
4.2 Coleta de algas diatomáceas epilíticas	25
4.3 Coleta de água para análises físico-químicas e microbiológicas	25
4.4 Cultivo de algas diatomáceas.....	26
4.5 Isolamento de espécies de algas diatomáceas	28
4.6 Identificação morfológica	29
4.7 Análise molecular	30
5. ARTIGO.....	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
7. REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO.....	9
8. APÊNDICE.....	62
9. ANEXOS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Os corpos hídricos das Bacias Hidrográficas estão sendo cada vez mais afetados pelo aumento da densidade populacional, industrialização e atividades agrícolas, destacando a eutrofização antrópica considerada como um dos problemas mais críticos da atualidade, responsável pela perda da qualidade da água e degradação dos ecossistemas aquáticos.

A eutrofização pode ser natural ou cultural. Quando natural, é um processo lento e contínuo que resulta do aporte de nutrientes trazidos pelas chuvas e pelas águas superficiais que erodem e lavam a superfície terrestre. Quando cultural, ou seja, quando é provocada pela ação do homem, a eutrofização torna-se um processo dinâmico, cuja característica principal é a quebra da homeostasia, ocasionando um desequilíbrio ecológico acompanhado de profundas mudanças no metabolismo de todo ecossistema (ESTEVES, 2011).

De fato, a eutrofização cultural é um problema de âmbito global e resulta na perda da qualidade ecológica do ecossistema, podendo levar à perda da biodiversidade e à extinção de espécies (SAYER; ROBERTS, 2001; BENNION; SIMPSON, 2011; SILVA, 2012). De forma geral, inicialmente leva a um aumento no número de espécies e indivíduos, e o surgimento de algumas espécies ocorre, geralmente, em detrimento do desaparecimento de outras. Além disso, impossibilita a permanência dos organismos mais sensíveis e, em razão disto, reduz a diversidade de espécies anteriormente existentes (TUNDISI, 2003).

Dessa maneira, faz-se necessária a aplicação de ferramentas eficazes de monitoramento da qualidade da água para Gestão e Manejo de Recursos Hídricos, com a capacidade de detectar e representar a carga poluidora bem como seus efeitos nos ecossistemas límnicos.

Tundisi (2008) destaca o importante papel do monitoramento da qualidade da água nos programas de gerenciamento, uma vez que deste depende o sucesso de todas as etapas, efetivando a capacidade de prognóstico e ainda auxiliando na tomada de decisões.

Nesse contexto, as algas diatomáceas têm sido amplamente utilizadas como bioindicadores para a avaliação da qualidade da água de sistemas lóticos, destacando que os índices bióticos são baseados na abundância relativa das espécies cuja taxonomia através da identificação morfológica, baseia-se somente em microcaracteres das frústulas, analisados por meio de microscopia óptica convencional. No entanto, a obtenção de tais índices consome tempo, é dispendiosa e requer excelente perícia taxonômica.

Para superar tais limitações, a identificação das espécies passou a ser realizada através de *barcode* de DNA, isto é, pequenas sequências de DNA conhecidas e padronizadas, caracterizadas como marcadores moleculares, capazes de identificar e discriminar espécies. É um método que tem potencial para ser mais rápido, barato, universalmente aplicável e fornece uma identificação taxonômica inequívoca (KECK et al., 2017, HERING et al 2018, KELLY et al., 2018), que servirá de base para o desenvolvimento de uma ferramenta tecnológica baseada em técnicas moleculares para o monitoramento do estado ecológico de ecossistemas aquáticos.

Neste contexto, a presente pesquisa objetiva o uso de técnicas moleculares, utilizando sequências de DNA de espécies de algas diatomáceas, abrindo novos caminhos para a aplicação rotineira de ferramentas genéticas para bioavaliação e biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.

2. REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *ABNT NBR 12.648: Ecotoxicologia aquática-Toxicidade Crônica-Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.
- AFNOR. Norme Française NF T 90-354: Détermination de l'Indice Biologique Diatomeés (IBD). Paris: Association Française de Normalisation, 2000.
- ÁLVAREZ-BLANCO, I.; BLANCO, S.; CEJUDO-FIGUEIRAS, C. ; BÉCARES, E. The Duero Diatom Index (DDI) for river water quality assessment in NW Spain: design and validation. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 85, p.969–981, 2013. ISSN 0167-6369.
- ANDERSEN, Robert A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Burlington: Elsevier. 2005. ISBN 0-12-088426-7.
- AN, S. M.; CHOI, D.H.; LEE, J.H.; NOH, J.H. Next-generation sequencing reveals the diversity of benthic diatoms in tidal flats. **Algae**, v. 33, p.167-180, 2018. ISSN 1226-2617.
- APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. 21 ed. Washington. 2005.
- APOTHÉLOZ-PERRET-GENTIL, L. et al. Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. **Molecular ecology resources**, v. 17, p.1231-1242, 2017. ISSN 1755-098X.
- BALLESTEROS, I.; CASTILLEJO, P.; HARO, A. P.; MONTES, C. C., HEINRICH, C.; LOBO, E. A. Genetic barcoding of Ecuadorian epilithic diatom species suitable as water quality bioindicators. **Comptes Rendus Biologies**, v. 343, p. 41-52, 2020. ISSN 1631-0691.
- BAILET, B. et al. Molecular versus morphological data for benthic diatoms biomonitoring in Northern Europe freshwater and consequences for ecological status. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 3, p. e34002, 2019. ISSN 2534-9708.
- BALDAUF, S.L. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 46, p. 263–273, 2008. ISSN:1759-6831.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de março de 2005. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.
- BELLINGER, E. G.; SIGEE, D.C. **Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators**. Chichester: John Wiley & Sons. 2015.

BENNION, H.; SIMPSON, G. L. The use of diatom records to establish reference conditions for UK lakes subject to eutrophication. **Journal of paleolimnology**, v. 45, p. 469-488, 2011. ISSN 0921-2728.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, L.; LIPMAN, D.A.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 42, p. D32-D37, 2013. ISSN 1362-4962.

BES, D.; ECTOR, L.; TORGAN, L.C.; LOBO, E.A. Composition of the epilithic diatom flora from a subtropical river, Southern Brazil. **Iheringia Série Botânica**, v. 67, p. 93-125, 2012. ISSN 2446-8231.

BÖHM, J. S. et al. Response of epilithic diatom communities to downstream nutrient increases in Castelhana Stream, Venâncio Aires City, RS, Brazil. **Journal of Environmental Protection**, v. 4, p. 20-26, 2013. ISSN 2152-2219.

CAVALCANTE, K. Diatomáceas – as algas douradas. 2012. Disponível em: <https://docs.ufpr.br/~veiga/fitologia/diatomaceas.html> Acesso em: outubro. 2020.

CAPO, E.; DEBROAS, D.; ARNAUD, F.; PERGA, M.E.; CHARDON, C.; DOMAIZON, I. Tracking a century of changes in microbial eukaryotic diversity in lakes driven by nutrient enrichment and climate warming. **Environmental Microbiology**, v.19, p. 2873-2892. 2017. ISSN 1462-2920.

CEMAGREF. **Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux**. CEMAGREF rapport Q.E. Lyon A.F. Bassin Rhône-Méditerranée-Corse. 50. 1982.

CHONOVA, T. et al. Benthic diatom communities in an Alpine river impacted by waste water treatment effluents as revealed using DNA metabarcoding. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 653, 2019. ISSN 1664-302X.

DELANEY, J.A.; ULRICH, R. M.; PAUL, J. H. Detection of the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* using the RuBisCO small subunit (rbcS) gene in two real-time RNA amplification formats. **Harmful Algae**, v.11, p. 54-64, 2011. ISSN 1568-9883.

DELL'UOMO, A. **L'indice diatomico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti**. Linee guida. APAT Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici, Roma, 2004.

DESCY, J.P.; COSTE, M. A test of methods for assessing water quality based on diatoms. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v.24, p. 2112-2116, 1991. ISSN 0368-0770.

DE RIVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Porto Alegre: Artmed. 2006.

DRESCH, E. *Inovação metodológica na avaliação da qualidade ambiental urbana aplicada na bacia hidrográfica do Arroio Preto, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil*.

Dissertação de Mestrado (Tecnologia Ambiental) Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2017.

DÜPONT, A.; LOBO, E.A.; COSTA, A B.; SCHUCH, M. Avaliação da qualidade da água do Arroio do Couto, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa**, Santa Cruz do Sul, v. 19, p. 56-74, 2007. ISSN 1677-5600.

ECTOR, L.; RIMET, F. **Using bioindicators to assess rivers in Europe**: An overview. In LEK, S., SCARDI, M., VERDONSCHOT, PFM., DESCY, JP. and PARK, YS. (Eds.). *Modelling Community Structure in Freshwater Ecosystems*. Berlin: Springer Verlag, Heidelberg. 2005.

ENDO, H.; OGATA, H. & SUZUKI, K. Contrasting biogeography and diversity patterns between diatoms and haptophytes in the central Pacific Ocean. **Scientific Reports**, v.8,10916. 2018. ISSN 2045-2322.

ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 2011.

EUROPEAN COMMUNITY. Council directive of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). **Official Journal of the European Community**, v. 135, p.40-52, 1991. ISSN 0378-6978

EVANS, K. M.; WORTLEY, A. H.; MANN, D. G. An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). **Protist**, v. 158, n. 3, p. 349-364, 2007. ISSN 1434-4610.

FREITAS, N.C.W.; HEINRICH, C.G.; ETGES, T.; CELENTE, G.S.; LOBO, E.A. Assessment of potential reference sites for evaluating the ecological status of subtropical and temperate Brazilian lotic systems using the epilithic diatom community. **Environmental Science Pollution Research**, v. 28, p. 1-11, 2020. ISSN 1614-7499.

Jahn, R. **Diatoms and DNA barcoding: a pilot study on an environmental sample**. Proceedings of the 1st Central European Diatom Meeting 2007, (January), p. 63–68. 2007.

GÓMEZ, N., & LICURSI, M. The Pampean Diatom Index (IDP) for assessment of rivers and streams in Argentina. **Aquatic Ecology**, v.35, p.173-181, 2001. ISSN 1386-2588.

GOWDA, G.; GUPTA, T.;RAJESH, K.; GOWDA, H.; LINGADHAL,C.;RAMESH, A. Seasonal distribution of phytoplankton in Nethravathi estuary, Mangalore. **Journal of the Marine Biological Association of India**, v. 43, p. 31-40, 2001. ISSN 0025-3146.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there?. **Journal of phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012. ISSN 15298817.

GUO, L.; SUI, Z.; ZHANG, S.; REN, Y.; LIU, Y. Comparison of potential diatom ‘barcode’genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. **International**

journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 65, n. 4, p. 1369-1380, 2015. ISSN 1466-5034.

HAUBOIS, A.G.; SYLVESTRE, F.; GUARINI, J.M.; RICHARD, P.; BLANCHARD, G.F. Spatio-temporal structure of the epipelagic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France. **Estuarine Coastal and Shelf Science**, v. 64, p. 385–394, 2005. ISSN 0272-7714.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: **Biological Sciences**, v.270, n.1512, p.313-321, 2003. ISSN 1449-2288.

HEINRICH, C. G.; LEAL, V.; SCHUCH, M.; DÜPONT, A.; LOBO, E.A. Epilithic diatoms in headwater areas of the hydrographical sub-basin of the Andreas Stream, RS, Brazil, and their relation with eutrophication processes. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 347-355, 2014. ISSN 2179-975X.

HERMANY, G.; SCHWARZBOLD, A; LOBO, E.A.; OLIVEIRA, M.A. Ecology of the epilithic diatom community in a low-order stream system of the Guaíba hydrographical region: subsidies to the environmental monitoring of southern Brazilian aquatic systems. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.18, p.25-40, 2006. ISSN 2179-975X.

HERING, D. et al. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European water framework directive. **Water Research**, v. 138, p.192–205, 2018. ISSN 0043-1354.

HOFMANN, G. **Aufwuchs-Diatomeen in Seen und ihre Eignung als Indikatoren der Trophie**. Bibliotheca Diatomologica. Stuttgart: Schweizerbart science publishers. 1994.

KECK, F.; BOUCHEZ, A.; FRANC, A.; RIMET, F. Linking phylogenetic similarity and pollution sensitivity to develop ecological assessment methods: a test with river diatoms. **Journal of Applied Ecology**, v. 53, p. 856-864, 2016. ISSN 1365-2664.

KECK, F.; VASSELON, V.; TAPOLCZASI, K.; RIMET, F.; BOUCHEZ, A. Freshwater biomonitoring in the information age. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, n. 5, p. 266-274, 2017. ISSN 1540-9295.

KECK, F.; VASSELON, V.; RIMET, F.; BOUCHEZ, A.; KAHLERT, M. Boosting DNA metabarcoding for biomonitoring with phylogenetic estimation of OTUs' ecological profiles. **Molecular Ecology Resources**, v.18, n.6, p.1299-1309, 2018. ISSN 1755-0998.

KEELING, P. J. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 583-607, 2013. ISSN 15452123.

KELLY, M.G.; WHITTON, B.A. The tropic diatom index: a new index for monitoring eutrophication in rivers. **Journal of Applied Phycology**, v.7, p. 433-444, 1995. ISSN 0921-8971.

KELLY, M. Identification of common benthic diatoms in rivers. **Field Studies**, v. 9, p. 583-700, 2000. ISSN 0078-1649.

KELLY M.G.; JUGGIS, S.; GUTHRIE, R.; PRITCHARD, S.; JAMIESON, J.; RIPPEY, B.; HIRST, H.; YALLOP, M. Assessment of ecological status in U.K. rivers using diatoms. **Freshwater Biology**, v.53, n.2, p. 403-422, 2008. ISSN 1365-2427.

KELLY, M. et al. **A DNA based diatom metabarcoding approach for Water Framework Directive classification of rivers**. Bristol: Environment Agency, 2018. ISBN 978-1-84911-406-6.

KERMARREC, L.; FRANC, A.; RIMET, F.; CHAUMEIL, P.; HUMBERT, J.F.; BOUCHEZ, A. Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. **Molecular Ecology**, v.13, p. 607-619, 2013. ISSN 0962-1083.

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. **Bacillariophyceae. Teil 1: Naviculaceae**. In: Ettl, H.; Gerloff, J.; Heyning, H.; Mollehnauer, D. (Eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag. 1986.

KRAMMER, K. & LANGE-BERTALOT, H. **Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnantaceae**. Kritische Ergänzungen zu Achnanthes, Navicula und Gomphonema. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1991.

KUMAR S.; STECHER G.; LI M.; KNYAZ C.; TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p.1547-1549, 2018. ISSN 0737-4038.

LANGE-BERTALOT, H. Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation. **Nova Hedwigia Beiheft**, v. 64, p. 285-304. 1979. ISSN 1438-9134.

LOBO, E. A., CALLEGARO, V.L.M., OLIVEIRA, M.A et al. Pollution tolerant diatoms from lotic systems in the Jacuí Basin, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 47, p. 45–72, 1996. ISSN 2446-8231.

LOBO, E. A., CALLEGARO, V.L.M., BENDER, E.P. **Utilização de Algas Diatomáceas Epilíticas como Indicadores da Qualidade da Água em Rios e Arroios da Região Hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2002.

LOBO, E. A.; WETZEL, C.E.; ECTOR, L.; KATOH, K.; BLANCO, S.; MAYAMA, S. Response of epilithic diatom communities to environmental gradients in subtropical temperate Brazilian rivers. **Limnetica**, v. 29, n. 2, p. 323-340, 2010. ISSN 1989-1806.

LOBO, E. A. **O perifíton como indicador da qualidade da água**. In: Schwarzbold A, Burliga AL, Torgan LC (eds) *Ecologia do Perifíton*. São Carlos: RIMA. 2013.

LOBO, E. A.; WETZEL, C. E.; SCHUCH, M., ECTOR, L. **Diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em sistemas lóticos subtropicais e temperados brasileiros**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2014.

LOBO, E.A.; SCHUCH, M.; HEINRICH, C.G.; COSTA, A.B.; DÜPONT, A.; WETZEL, C.E.; ECTOR, L. Development of the Trophic Water Quality Index (TWQI) for subtropical temperate Brazilian lotic systems. **Environmental and Monitoring Assessment**, v. 6, p. 354-366, 2015. ISSN 01676369.

LOBO, E.A.; HEINRICH, C.D.; SCHUCH, M.; WETZEL, C.E.; ECTOR, L. **Diatoms as bioindicators in rivers**. p. 245-271. *In*: NECCHI Jr. (Ed.). *River Algae*. Switzerland: Springer International Publishing. 2016a. ISBN 9783319-31984.

LOBO, E. A.; HEINRICH, C. D.; SCHUCH, M.; DÜPONT, A.; COSTA, A. B.; WETZEL, C. E.; ECTOR, L. **Índice trófico de qualidade da água: guia ilustrado para sistemas lóticos subtropicais e temperados brasileiros**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2016a. ISBN 8575784315.

LOBO, E.A.; FREITAS, N.W.; SALINAS, V.H. Diatomeas como bioindicadores: Aspectos ecológicos de la respuesta de las algas a la eutrofización en América Latina. **Mexican Journal of Biotechnology**, v.4, p.1-24, 2019. ISSN 2448-6590.

MARGALEF, R. **Limnología**. Omega Barcelona, 1983.

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, n. 1, p.15-78, 2010. ISSN 1802-5439.

MEDLIN, L.; ELWOOD, H.; STICKEL, S.; SOGIN, M. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. **Gene**, v. 71, n. 2, p. 491-499, 1988. ISSN 0378-1119.

METZELIN, D. & GARCÍA-RODRÍGUEZ, F. **Las diatomeas Uruguayas**. Montevideo: DI.R.A.C. Facultad de Ciencias. 2003.

METZELIN, D. & LANGE-BERTALOT, H. **Tropical Diatoms of South America II. Special remarks on biogeographic disjunction**. Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag K. G. 2007.

MONIZ, M. B. J.; KACZMARSKA, I. Barcoding diatoms: is there a good marker? **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 65-74, 2009. ISSN 1755-098X.

MORETTO, D.L.; PANTA, E.; COSTA, A.B.; LOBO, E.A. Calibration of Water Quality Index (WQI) based on Resolution nº 357/2005 of the Environment National Council (CONAMA) Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 24, p. 29-42, 2012. ISSN 2179-975X.

OKONECHNIKOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, p.1166–1167, 2012. ISSN 1367-4803.

PATRICK, R.; REIMER, C. W. **The diatoms of United States**. Philadelphia: Academy of Natural Sciences. 1966.

PAWLOWSKI, J.; LEJZEROWICZ, F.; APOTHELOZ-PERRET-GENTIL, L.; VISCO, J.; ESLING, P. Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: time for change. **European Journal Protistology**, v. 55, p.12–25, 2016. ISSN 09324739.

PAWLOWSKI, J. et al. The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 637, p. 1295-1310, 2018. ISSN 0048-9697.

PANTLE, R. & BUCK, H. Die biologisch Überwachung der Gewässer und die Darstellung der Ergebnisse. **Gas und Wasserfach**, v. 96. p. 609-620, 1955. ISSN 0016-3651.

POMPANON, F.; COISSAC, E.; TABERLET, P. Metabarcoding a new way to analyze biodiversity. **Biofutur**, v.319. p.30-32, 2011. ISSN 0294-3506.

POSSELT, E. L.; COSTA, A.B.; LOBO, E.A. Software IQADData 2015. Registro no INPI BR 512015000890-0. Programa de Mestrado em Sistemas e Processos Industriais (PPGSI), Programa em Tecnologia Ambiental - Mestrado e Doutorado (PPGTA), UNISC. Disponível em: <http://www.unisc.br/ppgsi>. 2015.

POULÍČKOVÁ, A.; SPACKOVÁ, J.; KELLY, M.G.; DUCHOSLAV, M.; MANN, D.G. Ecological variation within Sellaphora species complexes (Bacillariophyceae): specialists or generalists? **Hydrobiologia**, v. 614, p. 373-386, 2008. ISSN 0018-8158.

Quick-Start Protocol DNeasy® Blood & Tissue, 2016. Disponível em www.qiagen.com. Acesso em dezembro de 2020.

RAVEN, P. A.; EVERT, R. F. & EICHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996.

RIVERA, S. F.; VASSELON.; JACQUET, S.; BOUCHEZ, A.; ARIZTEGUI, D.; RIMET, F. DNA metabarcoding and microscopic analyses of sea turtles biofilms: Complementary to understand turtle behavior. **Plos One**, v.13, e0195770. 2018a. ISSN 1932-6203.

RIVERA, S. F.; VASSELON.; JACQUET, S.; BOUCHEZ, A.; ARIZTEGUI, D.; RIMET, F. Metabarcoding of lake benthic diatoms: from structure assemblages to ecological assessment. **Hydrobiologia**, v. 807, p. 37-51, 2018b. ISSN 0018-8158.

RIMET, F. Recent views on river pollution and diatom. **Hydrobiologia**, v. 683, p.1-24, 2012. ISSN 1573-5117.

RIMET, F. et al. R-Syst:: diatom: an open-access and curated barcode database for diatoms and freshwater monitoring. **Database**, v. 2016, 2016.

RIMET, F. et al. Diat. barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. **Scientific reports**, v.9, p.1-12, 2019. ISSN 2045-2322.

ROUND, F. E. A Review of Methods for the Use of Epilithic Diatoms for Detecting and Monitoring Changes in River Water Quality 1993: Methods for Examination of Waters and Associated Materials. Dunfermline: The Stationery Office Books.1993. ISBN 0117527718.

SALOMONI, S.E.; ROCHA, O.; CALLEGARO, V.L.M.; LOBO, E.A. Epilithic diatoms as indicators of water quality in the Gravataí river, Rio Grande do Sul, Brazil. **Hydrobiologia**. v. 559, p.233-246, 2006. ISSN 1573-5117.

SALOMONI, S.E.; TORGAN, L.C. Epilithic diatoms as organic contamination degree indicators in Guaíba Lake, Southern Brazil. **Acta Limnologica Brasílica**, v. 20, p.313-324, 2008. ISSN 2179-975x.

SALOMONI, S.E.; ROCHA, O.; HERMANY, G.; LOBO, E.A. Application of water quality biological indices using diatoms as bioindicators in Gravataí River, RS, Brazil, **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p. 949-959, 2011. ISSN 1678-4375.

SALOMONI, S.E.; ROCHA, O.; TORGAN, L. C. Seasonal and spatial variation of the epilithic diatoms: case study of an organic pollution gradient in a subtropical region of southern Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.29, 2017. ISSN 2179-975X.

SAYER, C. D.; ROBERTS, N. Establishing realistic restoration targets for nutrient-enriched shallow lakes: linking diatom ecology and palaeoecology at the Attenborough Ponds, UK. **Hydrobiologia**, v. 448, p. 117-142, 2001. ISSN 0018-8158.

SCHUCH, M.; ABREU JR, E.; LOBO, E. A. Water quality evaluation of urban streams in Santa Cruz do Sul city, RS, Brazil. **Bioikos**, v. 26, p.3-12, 2012. ISSN 0102-9568.

SCHUCH, M.; OLIVEIRA, M.A., & LOBO, E.A. Spatial response of epilithic diatom communities to downstream nutrient increases. **Water Environment Research**, v. 87, p. 547-558, 2015. ISSN 1554-7531.

SILVA, P. D. A. Biodiversidade e distribuição das diatomáceas planctônicas e de sedimento superficial nas represas de abastecimento do Sistema Alto Cotia (SP). Instituto de Botânica. São Paulo, 2012.

SILVA, C. D. M. D.; BRIXNER, B.; RENNER, J. D. P.; POSSUELO, L. G.; LEAL, V. L. **Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia**. Santa Cruz do Sul: UNISC. 2019. ISBN 978-85-66241-17-4.

SMOL, J. P.; STOERMER, E. F. **The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

TAPOLCZAI, K.; BOUCHEZ, A.; STENGER-KOVÁCS, C.; PADISÁK, J.; RIMET, F. Taxonomy-or trait-based ecological assessment for tropical rivers? Case study on benthic diatoms in Mayotte island (France, Indian Ocean). **Science of the Total Environment**, v. 607, p. 1293-1303, 2017. ISSN 0048-9697.

TUNDISI, J. G. **A crise da água: eutrofização e suas consequências**. TUNDISI, JG **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. Rima, IIE, São Carlos. 247p, 2003.

TUNDISI, J. Recursos hídricos no futuro: Problemas e soluções. **Estudos Avançados**, v. 22, p.7-14, 2008. ISSN 1806-9592.

VASSELON, V.; RIMET, F.; TAPOLCZAI, K.; BOUCHEZ, A. Assessing ecological status with diatoms DNA metabarcoding: scaling-up on a WFD monitoring network (Mayotte island, France). **Ecological Indicators**, v. 82, p. 1-12, 2017. ISSN 1470-160X.

VASSELON, V. et al. Avoiding quantification bias in metabarcoding: application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring. **Methods in Ecology and Evolution**, v.9, p.1060-1069, 2018. ISSN 2041-210X.

VAN DAM, H.; MERTENS A.; SKINDELAM, J. A coded checklist and ecological indicator values of freshwaters diatoms from The Netherlands. **Netherlands Journal of Aquatic Ecology**, v. 28, p.117-133, 1994. ISSN 13862588.

VANELSLANDER, B. et al. Ecological differentiation between sympatric pseudocryptic species in the estuarine benthic diatom *Navicula Phyllepta* (Bacillariophyceae) 1. **Journal of phycology**, v. 45, n. 6, p. 1278-1289, 2009. ISSN 0022-3646.

VIEIRA, C. E. L. **Diatomáceas**. In: Carvalho, I. de S. (Ed.). *Paleontologia: Microfósseis, Paleoinvertebrados*. Rio de Janeiro: Interciência. 2011.

VISCO, J. A.; PERRET-GENTI, L.A.; CORDONIER, A.; ESLING, P.; PILLET, L.; PAWLOWSKI, J. Environmental monitoring: inferring the diatom index from next-generation sequencing data. **Environmental science & technology**, v. 49, p. 7597-7605, 2015. ISSN 0013-936X.

WIESEL, P.G.; SANTANA, E.R.; LOBO, E.A. Avaliação da qualidade da água na Bacia Hidrográfica do Arroio Preto, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa**, v. 30, p.6-12, 2018. ISSN 1677-5600.

ZELINKA, M. & MARVAN, P. Zur Präzisierung der biologischen Klassifikation der Reinheit fliessender Gewässer. **Archiv für Hydrobiologie**. v. 57, p. 389-407, 1961. ISSN 1864-1316.

ZIMMERMANN, J.; JAHN, R.; GEMEINHOLZER, B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. **Organisms Diversity & Evolution**, v. 11, p. 173-192, 2011. ISSN 1439-6092.

ZIMMERMANN, J.; ABARCA, N.; ENK, N.; SKIBBE.; KUSBER, W.H.; JAHN, R. Taxonomic reference libraries for environmental barcoding: a best practice example from diatom research. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. e108793, 2014. ISSN 1932-6203.

ZIMMERMANN, J.; GLÖCKNER, G.; JAHN, R.; ENKE, N.; GEMEINHOLZER, B. Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, p. 526-542, 2015. ISSN 1755-098X.