

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

SCHIRLEY TOSTES

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS PRESENTES EM
ÁGUAS DOCES SUPERFICIAIS POR FTIR SUPERVISIONADA POR MÉTODOS
MOLECULARES

Santa Cruz do Sul

2023

Schirley Tostes

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS PRESENTES EM
ÁGUAS DOCES SUPERFICIAIS POR FTIR SUPERVISIONADA POR MÉTODOS
MOLECULARES

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 Valeriano Antônio Corbellini

Co-orientador (a): Prof.^(a) Dr (a). Rosana de Cassia de Souza Schneider

Santa Cruz do Sul
2023

Dedico esta dissertação aos meus pais, José e Suzana Tostes, pelo amor e incentivo de sempre. Com muito esforço, sempre me apoiaram para que eu pudesse seguir estudando e me desenvolvendo. São meus exemplos e inspirações para cada passo que dou em minha vida. Muito obrigada pela torcida de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Valeriano A. Corbellini e Dra. Rosana C. S. Schneider, pelo apoio e incentivo para que esta dissertação fosse desenvolvida. Agradeço as diversas orientações, que aconteceram até mesmo em momentos de descanso. Vocês foram fundamentais para me guiar e motivar a ir em busca dos resultados que almejávamos. Obrigada pela paciência, pela compreensão e por estarem presentes durante toda a caminhada do mestrado. Tenho grande admiração pelo amor e dedicação de vocês à nossa comunidade acadêmica do PPGTA. Obrigada por estarem ao meu lado e pelo esforço para que enfrentássemos cada obstáculo.

Agradeço o professor Dr. H. Dail Lauhginghouse pelo aceite do estágio desenvolvido com seu grupo de pesquisa e agradeço à University of Florida pela recepção e suporte ao intercâmbio. Agradeço ao professor por me orientar, apoiar e se colocar à disposição durante o período que estive em atividades no laboratório, bem como em outros momentos à distância para que fosse possível acontecer esta parceria. Obrigada pela confiança e pelos ensinamentos, foi uma experiência enriquecedora mesmo em um curto período. Agradeço ao grupo de pesquisa que mesmo em suas rotinas atarefadas com dedicação as pesquisas, não mediram esforços para me orientar e acompanhar nas atividades. Obrigada Forrest Lefler, Jéssica Moretto, David Berthold, Jing Hu, Yi Wang, e Maximiliano Barbosa. Vocês e o professor Dr. Dail foram fundamentais para finalizar o estágio com êxito.

Agradeço às colegas Jocelene Soares e Tiele Rizzeti, pelos esforços e tempo dedicado em nos orientar a otimizar protocolos e ao uso de equipamentos para que fosse possível testar novos caminhos para a pesquisa. Obrigada pelo apoio e pela compreensão quando não pude estar presente diretamente. Agradeço a colega e amiga Karla Puntel, que se fez presente nos dias de campo se dedicando a ajudar com as filtrações e me apoiando com muito carinho. Agradeço a torcida e a parceria no laboratório para que tudo fosse possível a tempo de processar todo material. Com isso, agradeço também a colega Michele J. Rodrigues pela companhia e apoio nos laboratórios durante os dias incansáveis de trabalho.

Agradeço aos colegas do Programa em Tecnologia Ambiental, aos colegas de trabalho, à empresa Profigen do Brasil, que foram essenciais durante a caminhada no programa. A torcida e o carinho de cada um foram fundamentais para me incentivar a

seguir. Obrigada por estarem comigo e por compreenderem as ausências. Em especial, agradeço a parceria da colega e amiga Jéssica Leal, por me acompanhar de perto e sempre me apoiar tanto nos estudos como no meu desenvolvimento pessoal. Agradeço ao prof. Dr. Alexandre Rieger, que acompanhou meu desenvolvimento na universidade, obrigada pelo apoio de sempre e pela amizade construída. Sempre estive a disposição para ensinamentos que foram fundamentais durante as minhas jornadas acadêmicas e profissionais.

Para encerrar, meus profundos agradecimentos a minha família. Obrigada pela compreensão de minha ausência em muitos momentos. Obrigada por acreditarem em mim e pelo esforço dedicado para que eu sempre estivesse em busca do meu melhor. O amor incondicional de vocês é o que me faz evoluir. Obrigada José e Suzana, por serem pais presentes e pela torcida imensurável. Agradeço a parceria para os dias de campo que só aconteceram porque estiveram comigo. Vocês foram sensacionais. Aos irmãos e cunhados, agradeço o apoio e por serem pilares importantes que me sustentam em minhas caminhadas, agradeço profundamente o carinho de vocês.

RESUMO

Florações de cianobactérias nocivas são cada vez mais comuns devido às mudanças climáticas e impactos antropogênicos. As florações de cianobactérias nocivas causam danos severos ao meio ambiente e a diferentes organismos, incluindo humanos e animais domésticos. Por esta razão, é importante conhecer as cianobactérias nocivas em diferentes biomas para monitorar e mitigar os impactos no meio ambiente. A identificação de micro-organismos ainda é dependente de tecnologias caras e demoradas. Neste sentido, este estudo tem por objetivo avaliar o uso de ATR-FTIR e quimiometria supervisionados por métodos moleculares para determinar cianobactérias nocivas de biomassa bruta e correlacionar os dados com parâmetros físico-químicos dos pontos de amostragem localizado no Vale do Rio Pardo, RS, Brasil. Parâmetros físico-químicos foram medidos. Os dados espectrais, táxons identificados por metagenômica e parâmetros físico-químicos foram analisados usando PCA e OPLS métodos. Metagenômica de amplicons foram analisados com uso dos pacotes Dada2 e Phyloseq e os táxons foram determinados através do banco de dados CynaoSeq. Um total de 12 gêneros foram identificados em 14 pontos. O gênero *Sphaerospermopsis* apresentou a maior abundância no ponto SP14 estando relacionado aos níveis de alumínio, ferro e nitrogênio total. *Dolichospermum* e *Wollea* foram correlacionados as concentrações de fósforo total e sódio. O gênero *Planktothricoides* é fortemente relacionado ao ponto SP01 devido a sua alta abundância relativa de 95,15%. Todos os modelos de ATR-FTIR/OPLS resultaram em desempenho adequado para a predição de abundâncias e identificação a partir dos 12 gêneros de cianobactérias investigadas por metagenômica de amplicons de biomassa bruta. Considerando o número máximo de 6 variáveis latentes, o modelo alcançou valores de RMSECV entre $1,3 \cdot 10^{-5}$ - $5,3 \cdot 10^{-4}$ com R^2 acima de 0,99999.

Palavras-chaves – ATR-FTIR, cianobactérias nocivas, Sul do Brasil, biomassa bruta, quimiometria.

ABSTRACT

Harmful cyanobacteria blooms are becoming common due climate changes and anthropogenic impacts. The HABs cause severe damages to the environment and to different organisms, including humans and domestic animals. For this reason, it is important to know the harmful cyanobacteria in different biomes to monitor and mitigate the impacts in the environment. The identification of microorganism is still dependent of expensive and time demanding technologies. This study aims to evaluate the use of ATR-FTIR and chemometrics supervised by molecular methods to determine harmful cyanobacteria from raw biomass and correlate the data with physical-chemical parameters of sampling points located in Rio Pardo Valley, RS, Brazil. Physical-chemical parameters were measured. The spectra data, taxa identified, and physical-chemical parameters were analyzed using PCA and OPLS methods. Metagenomic amplicons were analyzed using Dada2 and Phyloseq packages, and taxa determination were performed using CyanoSeq database. A total of 12 genera of harmful cyanobacteria were identified in 14 locations. The genera *Sphaerospermopsis* had higher abundance in SP14 location being related to the aluminum, iron, and total nitrogen levels. *Dolichospermum* and *Wollea* genera were correlated to the concentration of total phosphorus and sodium. The *Planktothricoides* genera is strongly related to SP01 sampling point due its high relative abundance of 95,15%. All ATR-FTIR/OPLS models resulted in adequate performance for the prediction of abundances and identification from the 12 genera of harmful cyanobacteria investigated by metabarcoding of amplicons from raw biomass. Considering the maximum number of 6 latent variables, the model reached RMSECV values between $1,3 \cdot 10^{-5}$ - $5,3 \cdot 10^{-4}$ with R^2 values above 0.99999.

Keywords – ATR-FTIR, harmful cyanobacteria, South Brazil, raw biomass, chemometrics

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRINCIPAIS HEPATOTOXINAS E SUAS ESTRUTURAS QUÍMICAS. REFERÊNCIAS: 1- (MEREL ET AL., 2013)	17
FIGURE 2 - SAMPLING POINTS LOCATED IN PARDO RIVER BASIN. SAMPLINGS POINTS: SP01 TO SP14.31	
FIGURE 3 - HARMFUL CYANOBACTERIA COMMUNITIES IDENTIFIED IN THE 14 SAMPLES FROM PARDO RIVER BASIN AND ITS RELATIVE ABUNDANCES. LEGEND: DOWN – SAMPLES DOWNSTREAM DOURADO LAKE; LAKE - DOURADO LAKE; GRUTA PARK – STREAM; UPPER - SAMPLES UPSTREAM DOURADO LAKE; VA- CASTELHANO STREAM.	37
FIGURE 4 - DISTRIBUTION OF SAMPLES ACCORDING TO RELATIVE ABUNDANCES OF TAXA AND THEIR SIMILARITIES THROUGH PCOA ANALYSIS AND DIVERSITY OF SAMPLING POINT SP02, SP03, AND SP09.	38
FIGURE 5 - DISTRIBUTION OF SAMPLES ACCORDING TO RELATIVE ABUNDANCES OF TAXA AND THEIR SIMILARITIES THROUGH PCOA ANALYSIS AND DIVERSITY OF SAMPLING POINT SP01.	39
FIGURE 6 - DISTRIBUTION OF SAMPLES ACCORDING TO RELATIVE ABUNDANCES OF TAXA AND THEIR SIMILARITIES THROUGH PCOA ANALYSIS AND DIVERSITY OF SAMPLING POINTS SP04, SP05, SP06, SP07, SP08, SP10, SP11, SP12, SP13 AND SP14.	40
FIGURE 7 - ATR-FTIR MEAN SPECTRA OF RAW DEHYDRATED BIOMASS FROM WATER BODIES (4000-650 cm^{-1}). B, C AND D = AMPLIFIED VIEW OF REGIONS HIGHLIGHTED IN FIGURE A.	41
FIGURE 8 - RELATIVE VARIANCE BY PRINCIPAL COMPONENT (PC) ACCORDING TO RAW DATA AND TRANSFORMED SPECTRA OF ATR-FTIR AVERAGE (4000-650 cm^{-1}) OF RAW DEHYDRATED BIOMASS SUSPENDED IN WATER BODIES. PCA APPLIED AFTER NORMALIZATION THROUGH THE AMPLITUDE FOLLOWED BY VECTORIAL NORMALIZATION.	42
FIGURE 9 - PC1xPC2 DIAGRAM AND THEIR RESPECTIVE LOADINGS OF RAW DATA (UPPER) AND 1 ST DERIVATIVE (MIDDLE) AND 2 ND DERIVATIVE (BOTTOM) RELATED TO THE ATR-FTIR AVERAGE SPECTRA OF RAW DEHYDRATED BIOMASS OF WATER BODIES (4000-650 cm^{-1}). DATA MIN-MAX NORMALIZED FOLLOWED BY VECTORIAL NORMALIZATION.	44
FIGURE 10 - PC1xPC2 DIAGRAM AND THEIR RESPECTIVE LOADINGS OF ATR-FTIR AVERAGE SPECTRA OF RAW DEHYDRATED BIOMASS OF WATER BODIES (4000-650 cm^{-1}) – LEFT. PC1XPC2 DIAGRAM AND THEIR RESPECTIVE LOADING OF GENERA ABUNDANCES AND PHYSICAL CHEMICAL PARAMETERS – RIGHT. DATA MIN-MAX NORMALIZED FOLLOWED BY VECTORIAL NORMALIZATION. .	45
FIGURE 11- RMSECV FROM ATR-FTIR/OPLS MODELS FOR PREDICTION OF HARMFUL CYANOBACTERIA SUPERVISED BY METAGENOMIC AMPLICONS DATA (RELATIVE ABUNDANCES AND GENERA). SPECTRAL DATA NORMALIZED BY MIN-MAX NORMALIZATION, FOLLOWED BY VECTORIAL NORMALIZATION, TRANSFORMED BY 1 ST DERIVATIVE (SAVITZKY-GOLAY, 5 POINTS), ONE ORTHOGONAL SIGNAL CORRECTION AND LEAVE-THREE OUT STEP VALIDATION. AT RIGHT: AMPLIFIED VIEW OF RANGE 0.00 TO 0.005.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PONTOS DE COLETAS COM RESPECTIVAS COORDENADAS, LOCAL E DATA DE COLETA	24
TABELA 2 – ATRIBUIÇÕES DE BANDAS RELEVANTES OBSERVADAS EM ESPECTROS DE BIOMASSA BRUTA EM SUSPENSÃO (VOLKOV ET AL., 2021).	27
TABLE 3 - PHYSICAL-CHEMICALS PARAMETERS OF SAMPLING POINTS.	35
TABLE 4 - SPEARMAN'S CORRELATION MATRIX. LEGEND: NIT-NITRATES, T_P-TOTAL PHOSPHORUS, T_N-TOTAL NITROGEN, TN_TP-TOTAL NITROGEN:TOTAL PHOSPHORUS, ONF-ORTHOPHOSPHATE NOT FILTERED, mV_ORP-OXIDATION REDUCTION POTENTIAL (mV), DO- DISSOLVED OXYGEN (%), PPMDO- DISSOLVED OXYGEN (PPM), TEMP- TEMPERATURE, AP- PRESSURE. ALL PARAMETERS, EXCEPT DO, PPMDO, ORP, WERE MEASURED IN MG L ⁻¹	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 Cianobactérias.....	14
3.2 Cianotoxinas	16
3.3 Tecnologias para determinação e quantificação de microcistinas e cianobactérias e os desafios para o monitoramento de corpos hídricos	18
3.4 FTIR e métodos quimiométricos usualmente aplicados na identificação bacteriana e na quantificação de metabólitos em microbiologia	21
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Pontos de amostragem	24
4.2 Coleta, filtragem e armazenamento de biomassa de fitoplâncton para análises no FTIR e análises de metagenômica de <i>amplicons</i>	24
4.3 Coleta de dados e amostragem para análises dos parâmetros físico-químicos das amostras de água.....	25
4.4 Extração de DNA total, PCR e sequenciamento.....	25
4.5 Leitura, análise de dados e quimiometria de biomassa filtrada através de espectroscopia ATR-FTIR.....	26
5. RESULTADOS	28
5.1 ARTIGO 1 – The use of metabarcoding amplicons, FTIR and chemometrics for characterization of harmful cyanobacteria communities from freshwaters in South Brazil	28
1. Introduction	29
2. Material and methods	30
3. Results	33
4. Discussion	46
5. Conclusion.....	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O MESTRADO.....	52

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água é analisada por diversos indicadores, entre eles está a presença e concentração de toxinas produzidas pela biota devido às frequentes ocorrências de florações excessivas de algas e cianobactérias nocivas. O aparecimento destas florações é o fenômeno conhecido como “Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (cHABs)”. O monitoramento das águas é essencial para preservação dos recursos hídricos além de impactar positivamente na saúde pública (Carmichael and Boyer, 2016, Passos et al., 2022).

Poucos estudos realizaram levantamentos completos dos impactos socioeconômicos e os impactos na saúde causados por florações de algas em águas doces, devido à falta de registros e informações relacionadas às florações nocivas e à dificuldade de acesso a estes registros. As toxinas presentes nas florações causam danos leves como dores gastrointestinais e dermatites de contato; como também podem causar intoxicação aguda e crônica (Carmichael and Boyer, 2016). Apresentam potencial de bioacumulação e são tóxicas a diversos organismos, podendo causar a morte de peixes, zooplânctons, mamíferos e até mesmo humanos (Zhang et al., 2023). Há registros epidemiológicos de que as cianotoxinas apresentam potencial no desenvolvimento de câncer em humanos, seja por exposição aguda ou crônica aos cianopeptídeos, incluindo as microcistinas (Janssen, 2019).

A dificuldade em estabelecer um monitoramento frequente de cianotoxinas em águas superficiais está relacionado à baixa concentração destas moléculas, que já são consideradas tóxicas aos organismos vivos, exigindo métodos de preparação e análise mais caros como a cromatografia líquida com espectrometria de massas (LC/MS ou LC/MS/MS) (Kaushik and Balasubramanian, 2013, Hemmati et al., 2019). Neste sentido, as empresas de saneamento optam por investir em etapas de tratamento para a remoção das toxinas, que por vezes ainda são detectadas na água potável em concentrações maiores do que o permitido pelo Ministério da Saúde no Brasil, onde o valor máximo permitido é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Brasil, 2016).

Para monitorar um indicador de toxicidade da água que é importante, no entanto, inacessível para as empresas de saneamento e a comunidade em geral, torna-se relevante a busca de métodos novos de detecção da presença da toxina ou das espécies de cianobactéria que podem liberar estas moléculas nos corpos hídricos. Uma das alternativas para solucionar a dificuldade de avaliar os corpos hídricos é a aplicação de uma ferramenta limpa e de baixo custo como FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), que pode ser aplicado para

identificar a biodiversidade de espécies de cianobactérias presentes nas florações (Domenighini and Giordano, 2009). Isso demonstra a necessidade de se desenvolver um modelo quimiométrico acoplado à FTIR para garantir o monitoramento das comunidades que possam ser um alerta do potencial de proliferação de espécies nocivas.

Ademais, a FTIR apresenta vantagens em relação ao sequenciamento, pois é uma técnica rápida, barata e de fácil aplicação, trazendo benefícios para o monitoramento das comunidades presentes em águas naturais. O sequenciamento exige diferentes etapas, como extração de DNA, PCR, preparo das amostras para o sequenciamento, além do tempo necessário para avaliar as sequências obtidas. Em vista disso, o sequenciamento poderá ter uma ferramenta que anteceda suas análises mais profundas, pois estudos demonstraram obter resultados satisfatórios com a aplicação de FTIR para a identificação de espécies de microorganismos, incluindo cianobactérias (Kansiz et al., 1999, Domenighini and Giordano, 2009, Bounphanmy et al., 2010).

Dessa maneira, a dissertação leva como tema principal o uso de uma ferramenta limpa (FTIR) para determinação de cianobactérias nocivas tendo enfoque na área de Microbiologia Aplicada à Tecnologias Ambientais. Isso trará benefícios para o gerenciamento dos recursos hídricos bem como resultará em impactos positivos na saúde pública e animal. A ferramenta poderá ser usada para o monitoramento de espécies de cianobactérias nocivas facilitando o rastreamento de mudanças nas comunidades presentes em florações de algas (Domenighini and Giordano, 2009).

REFERÊNCIAS

- Acuna-Alonso, C., X. Alvarez, E. Valero and F. A. L. Pacheco (2022). "Modelling of threats that affect Cyano-HABs in an eutrophicated reservoir: First phase towards water security and environmental governance in watersheds." Sci Total Environ **809**: 152155.
- Aguilera, A., S. Haakonsson, M. V. Martin, G. L. Salerno and R. O. Echenique (2018). "Bloom-forming cyanobacteria and cyanotoxins in Argentina: A growing health and environmental concern." Limnologia **69**: 103-114.
- Alvarenga, D. O., A. P. D. Andreote, L. H. Z. Branco, E. Delbaje, R. B. Cruz, A. M. Varani and M. F. Fiore (2021). "Amazonocrinis nigriterrae gen. nov., sp. nov., Atlanticothrix silvestris gen. nov., sp. nov. and Dendronalium phyllosphericum gen. nov., sp. nov., nostocacean cyanobacteria from Brazilian environments." Int J Syst Evol Microbiol **71**(5).
- APHA (2017). Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association.
- ASTM E1655-17 (2017). Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. West Conshohocken, PA, ASTM International.
- Ayhan, K., S. Coşansu, E. Orhan-Yanikan and G. Gülseren (2021). "Advance methods for the qualitative and quantitative determination of microorganisms." Microchemical Journal **166**: 106188.
- Batista, A. M. M. and A. Giani (2019). "Spatiotemporal variability of cyanobacterial community in a Brazilian oligomesotrophic reservoir: The picocyanobacterial dominance." Ecohydrology & Hydrobiology **19**(4): 566-576.
- Borges, H. L. F., L. H. Z. Branco, M. D. Martins, C. S. Lima, P. T. Barbosa, G. A. S. T. Lira, M. C. Bittencourt-Oliveira and R. J. R. Molica (2015). "Cyanotoxin production and phylogeny of benthic cyanobacterial strains isolated from the northeast of Brazil." Harmful Algae **43**: 46-57.
- Bounphanmy, S., S. Thammathaworn, N. Thanee, K. Pirapathrungsuriya, J. Beardall, D. McNaughton and P. Heraud (2010). "Discrimination of cyanobacterial strains isolated from saline soils in Nakhon Ratchasima, Thailand using attenuated total reflectance FTIR spectroscopy." J Biophotonics **3**(8-9): 534-541.
- Branco, L., A. Moura, A. Silva and M. d. C. Bittencourt-Oliveira (2003). "Biodiversity and biogeographical considerations of Cyanobacteria from a Mangrove area of Pernambuco State, Brazil." Acta Botanica Brasilica **17**: 585-596.
- Brandes Ammann, A. and H. Brandl (2011). "Detection and differentiation of bacterial spores in a mineral matrix by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and chemometrical data treatment." BMC Biophys **4**(1): 14.

Brasil, C. (2005). Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. C. N. d. M. Ambiente.

Brasil, M. d. S. (2016). Orientações técnicas para o monitoramento de cianobactérias/cianotoxinas nos mananciais de abastecimento de água para consumo humano. S. d. V. e. S. Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador.

Butarelli, A. C. A., L. S. S. Ferreira, R. Riyuzo, H. M. B. Dall'Agnol, C. M. Piroupo, A. M. da Silva, J. C. Setubal and L. T. Dall'Agnol (2022). "Diversity assessment of photosynthesizers: comparative analysis of pre-cultivated and natural microbiome of sediments from Cerrado biome in Maranhao, Brazil." Environ Sci Pollut Res Int **29**(51): 77359-77374.

Calado, S. L. M., J. Wojciechowski, G. S. Santos, V. F. Magalhaes, A. A. Padial, M. M. Cestari and H. C. D. Silva de Assis (2017). "Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health." Toxicon **126**: 12-22.

Carmichael, W. W. and G. L. Boyer (2016). "Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes." Harmful Algae **54**: 194-212.

Casero, M. C., D. Velazquez, M. Medina-Cobo, A. Quesada and S. Cires (2019). "Unmasking the identity of toxigenic cyanobacteria driving a multi-toxin bloom by high-throughput sequencing of cyanotoxins genes and 16S rRNA metabarcoding." Sci Total Environ **665**: 367-378.

Ceccon, D. M., H. Faoro, P. D. C. Lana, E. M. Souza and F. O. Pedrosa (2019). "Metataxonomic and metagenomic analysis of mangrove microbiomes reveals community patterns driven by salinity and pH gradients in Paranagua Bay, Brazil." Sci Total Environ **694**: 133609.

Chellappa, N. T. and M. A. M. Costa (2003). "Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a Eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil." Acta Oecologica **24**: S3-S10.

Chen, G., L. Wang, M. Wang and T. Hu (2021). "Comprehensive insights into the occurrence and toxicological issues of nodularins." Marine pollution bulletin **162**: 111884.

Crispim, C. A., C. C. Gaylarde and P. M. Gaylarde (2004). "Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria." International Biodeterioration & Biodegradation **54**(2-3): 121-124.

Djurhuus, A., J. Port, C. J. Closek, K. M. Yamahara, O. Romero-Maraccini, K. R. Walz, D. B. Goldsmith, R. Michisaki, M. Breitbart, A. B. Boehm and F. P. Chavez (2017). "Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels." Frontiers in Marine Science **4**.

- Domenighini, A. and M. Giordano (2009). "Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Microalgae as a Novel Tool for Biodiversity Studies, Species Identification, and the Assessment of Water Quality(1)." J Phycol **45**(2): 522-531.
- Dos, S. V. J. M., P. A. M. T. de, S. M. de Oliveira Azevedo, R. Y. Honda and B. Correa (2005). "Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region." Toxicon **45**(7): 901-909.
- Downing, J. A., S. B. Watson and E. McCauley (2001). "Predicting Cyanobacteria dominance in lakes." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **58**(10): 1905-1908.
- Duan, X., C. Zhang, I. Struewing, X. Li, J. Allen and J. Lu (2022). "Cyanotoxin-encoding genes as powerful predictors of cyanotoxin production during harmful cyanobacterial blooms in an inland freshwater lake: Evaluating a novel early-warning system." Sci Total Environ **830**: 154568.
- Elkadi, O. A., R. Hassan, M. Elanany, H. J. Byrne and M. A. Ramadan (2021). "Identification of *Aspergillus* species in human blood plasma by infrared spectroscopy and machine learning." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **248**: 119259.
- Farouk, F., S. Essam, A. Abdel-Motaleb, R. El-Shimy, W. Fritzsche and H. M. E. Azzazy (2022). "Fast detection of bacterial contamination in fresh produce using FTIR and spectral classification." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **277**: 121248.
- Fiore Mde, F., B. A. Neilan, J. N. Copp, J. L. Rodrigues, S. M. Tsai, H. Lee and J. T. Trevors (2005). "Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain." Water Res **39**(20): 5017-5026.
- Fonseca, L. A. and L. Rodrigues (2007). "Periphytic Cyanobacteria in different environments from the upper Paraná river floodplain, Brazil." Acta Limnol. Bras. **19**(1): 53-65.
- Forrester, J. B., N. B. Valentine, Y. F. Su and T. J. Johnson (2009). "Chemometric analysis of multiple species of *Bacillus* bacterial endospores using infrared spectroscopy: discrimination to the strain level." Anal Chim Acta **651**(1): 24-30.
- Genuario, D. B., A. P. D. Andreote, M. Vaz and M. F. Fiore (2017). "Heterocyte-forming cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes." Mol Phylogenet Evol **109**: 105-112.
- Genuário, D. B., C. L. Sant'Anna and I. S. Melo (2018). "Elucidating the *Cronbergia* (cyanobacteria) dilemma with the description of *Cronbergia amazonensis* sp. nov. isolated from Solimões river (Amazonia, Brazil)." Algal Research **29**: 233-241.
- Genuario, D. B., M. Vaz and I. S. Melo (2017). "Phylogenetic insights into the diversity of homocytous cyanobacteria from Amazonian rivers." Mol Phylogenet Evol **116**: 120-135.
- Gerikas Ribeiro, C., A. Lopes Dos Santos, D. Marie, F. Pereira Brandini and D. Vaultot (2018). "Small eukaryotic phytoplankton communities in tropical waters off Brazil are

dominated by symbioses between Haptophyta and nitrogen-fixing cyanobacteria." ISME J **12**(5): 1360-1374.

Ghosh, S. B., K. Bhattacharya, S. Nayak, P. Mukherjee, D. Salaskar and S. P. Kale (2015). "Identification of different species of Bacillus isolated from Nisargruna Biogas Plant by FTIR, UV-Vis and NIR spectroscopy." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **148**: 420-426.

Grace, C. E. E., P. K. Lakshmi, S. Meenakshi, S. Vaidyanathan, S. Srisudha and M. B. Mary (2020). "Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **224**: 117382.

Guedes, I. A., C. Rachid, L. M. Rangel, L. H. S. Silva, P. M. Bisch, S. Azevedo and A. B. F. Pacheco (2018). "Close Link Between Harmful Cyanobacterial Dominance and Associated Bacterioplankton in a Tropical Eutrophic Reservoir." Front Microbiol **9**: 424.

Gurbanov, R., A. G. Gozen and F. Severcan (2018). "Rapid classification of heavy metal-exposed freshwater bacteria by infrared spectroscopy coupled with chemometrics using supervised method." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **189**: 282-290.

Haraguchi, L., J. Carstensen, P. C. Abreu and C. Odebrecht (2015). "Long-term changes of the phytoplankton community and biomass in the subtropical shallow Patos Lagoon Estuary, Brazil." Estuarine, Coastal and Shelf Science **162**: 76-87.

Hemmati, M., C. Tejada-Casado, F. J. Lara, A. M. Garcia-Campana, M. Rajabi and M. Del Olmo-Iruela (2019). "Monitoring of cyanotoxins in water from hypersaline microalgae colonies by ultra high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometry detection following salting-out liquid-liquid extraction." J Chromatogr A **1608**: 460409.

Hernandez, B. Y., X. Zhu, P. Sotto and Y. Paulino (2021). "Oral exposure to environmental cyanobacteria toxins: Implications for cancer risk." Environment international **148**: 106381-106381.

Heussner, A. H., I. Winter, S. Altaner, L. Kamp, F. Rubio and D. R. Dietrich (2014). "Comparison of two ELISA-based methods for the detection of microcystins in blood serum." Chemico-Biological Interactions **223**: 10-17.

Ho, J. C., A. M. Michalak and N. Pahlevan (2019). "Widespread global increase in intense lake phytoplankton blooms since the 1980s." Nature **574**(7780): 667-670.

Jamovi (2022). The Jamovi Project - Computer Software. Retrieved from <https://www.jamovi.org> .

Janssen, E. M. (2019). "Cyanobacterial peptides beyond microcystins - A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment." Water Res **151**: 488-499.

Jiang, Y., P. Xiao, Y. Liu, J. Wang and R. Li (2017). "Targeted deep sequencing reveals high diversity and variable dominance of bloom-forming cyanobacteria in eutrophic lakes." Harmful Algae **64**: 42-50.

Kansiz, M., P. Heraud, B. Wood, F. Burden, J. Beardall and D. McNaughton (1999). "Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains." Phytochemistry **52**(3): 407-417.

Kaplan Can, H., F. Gurbuz and M. Odabaşı (2019). "Partial characterization of cyanobacterial extracellular polymeric substances for aquatic ecosystems." Aquatic Ecology **53**(3): 431-440.

Kaushik, R. and R. Balasubramanian (2013). "Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **43**(13): 1349-1383.

Kim, S., R. Mehrotra, S. Kim and A. Sharma (2021). "Probabilistic forecasting of cyanobacterial concentration in riverine systems using environmental drivers." Journal of Hydrology **593**: 125626.

Kramer, B. J., R. Hem and C. J. Gobler (2022). "Elevated CO₂ significantly increases N₂ fixation, growth rates, and alters microcystin, anatoxin, and saxitoxin cell quotas in strains of the bloom-forming cyanobacteria, *Dolichospermum*." Harmful Algae **120**: 102354.

Landry, C. and L. Tremblay (2012). "Compositional differences between size classes of dissolved organic matter from freshwater and seawater revealed by an HPLC-FTIR system." Environ Sci Technol **46**(3): 1700-1707.

Lee, J., M. S. Ahn, Y. L. Lee, E. Y. Jie, S. G. Kim and S. W. Kim (2019). "Rapid tool for identification of bacterial strains using Fourier transform infrared spectroscopy on genomic DNA." J Appl Microbiol **126**(3): 864-871.

Lefler, F. W., D. E. Berthold and H. D. t. Laughinghouse (2023). "Cyanoseq: A database of cyanobacterial 16S rRNA gene sequences with curated taxonomy." J Phycol **59**(3): 470-480.

Li, X., S. Huo, J. Zhang, C. Ma, Z. Xiao, H. Zhang, B. Xi and X. Xia (2019). "Metabarcoding reveals a more complex cyanobacterial community than morphological identification." Ecological Indicators **107**.

Machado-de-Lima, N. M., V. M. C. Fernandes, D. Roush, S. Velasco Ayuso, J. Rigonato, F. Garcia-Pichel and L. H. Z. Branco (2019). "The Compositionally Distinct Cyanobacterial Biocrusts From Brazilian Savanna and Their Environmental Drivers of Community Diversity." Front Microbiol **10**: 2798.

Machado de Lima, N. M., M. Muñoz-Rojas, X. Vázquez-Campos and L. H. Z. Branco (2021). "Biocrust cyanobacterial composition, diversity, and environmental drivers in two contrasting climatic regions in Brazil." Geoderma **386**: 114914.

MacKeigan, P. W., R. E. Garner, M. E. Monchamp, D. A. Walsh, V. E. Onana, S. A. Kraemer, F. R. Pick, B. E. Beisner, M. D. Agbeti, N. B. da Costa, B. J. Shapiro and I. Gregory-Eaves (2022). "Comparing microscopy and DNA metabarcoding techniques for identifying cyanobacteria assemblages across hundreds of lakes." Harmful Algae **113**: 102187.

Magalhães, A. A. J., Luz, L. D., Aguiar Junior, T. R. (2019). "Environmental factors driving the dominance of the harmful bloom-forming cyanobacteria *Microcystis* and *Aphanocapsa* in a tropical water supply reservoir." Water Environ Res **91**(11): 1466-1478.

Maity, J. P., S. Kar, C. M. Lin, C. Y. Chen, Y. F. Chang, J. S. Jean and T. R. Kulp (2013). "Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy." Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc **116**: 478-484.

Massey, I. Y., P. Wu, J. Wei, J. Luo, P. Ding, H. Wei and F. Yang (2020). "A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins." Toxins (Basel) **12**(10).

Merel, S., M. C. Villarin, K. Chung and S. Snyder (2013). "Spatial and thematic distribution of research on cyanotoxins." TOXICON **76**: 118-131.

Merel, S., D. Walker, R. Chicana, S. Snyder, E. Baures and O. Thomas (2013). "State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins." Environ Int **59**: 303-327.

Merel, S., D. Walker, R. Chicana, S. Snyder, E. Baurès and O. Thomas (2013). "State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins." Environment International **59**: 303-327.

Miglio, R., S. Palmery, M. Salvalaggio, L. Carnelli, F. Capuano and R. Borrelli (2013). "Microalgae triacylglycerols content by FT-IR spectroscopy." Journal of Applied Phycology **25**(6): 1621-1631.

Munoz, M., S. Cirés, Z. M. de Pedro, J. Á. Colina, Y. Velásquez-Figueroa, J. Carmona-Jiménez, A. Caro-Borrero, A. Salazar, M.-C. Santa María Fuster, D. Contreras, E. Perona, A. Quesada and J. A. Casas (2021). "Overview of toxic cyanobacteria and cyanotoxins in Ibero-American freshwaters: Challenges for risk management and opportunities for removal by advanced technologies." Science of The Total Environment **761**: 143197.

Munoz, M., S. Cires, Z. M. de Pedro, J. A. Colina, Y. Velasquez-Figueroa, J. Carmona-Jimenez, A. Caro-Borrero, A. Salazar, M. C. Santa Maria Fuster, D. Contreras, E. Perona, A. Quesada and J. A. Casas (2021). "Overview of toxic cyanobacteria and cyanotoxins in Ibero-American freshwaters: Challenges for risk management and opportunities for removal by advanced technologies." Sci Total Environ **761**: 143197.

Mutoti, M., J. Gumbo and A. I. O. Jideani (2022). "Occurrence of cyanobacteria in water used for food production: A review." Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C **125**: 103101.

Paerl, H. W. and M. A. Barnard (2020). "Mitigating the global expansion of harmful cyanobacterial blooms: Moving targets in a human- and climatically-altered world." Harmful Algae **96**: 101845.

Parada, A. E., D. M. Needham and J. A. Fuhrman (2016). "Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples." Environ Microbiol **18**(5): 1403-1414.

Passos, L. S., E. C. de Almeida, A. Villela, A. N. Fernandes, M. M. Marinho, L. C. Gomes and E. Pinto (2022). "Cyanotoxins and water quality parameters as risk assessment indicators for aquatic life in reservoirs." Ecotoxicol Environ Saf **241**: 113828.

Pearson, L. A., N. D. Crosbie and B. A. Neilan (2020). "Distribution and conservation of known secondary metabolite biosynthesis gene clusters in the genomes of geographically diverse *Microcystis aeruginosa* strains." Marine and Freshwater Research **71**(5): 701-716.

Pearson, L. A., E. Dittmann, R. Mazmouz, S. E. Ongley, P. M. D'Agostino and B. A. Neilan (2016). "The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria." Harmful Algae **54**: 98-111.

Pelusi, A., Y. Hanawa, H. Araie, I. Suzuki, M. Giordano and Y. Shiraiwa (2016). "Rapid detection and quantification of haptophyte alkenones by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)." Algal Research **19**: 48-56.

Preece, E. P., F. J. Hardy, B. C. Moore and M. Bryan (2017). "A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk." Harmful Algae **61**: 31-45.

Preisner, O., J. A. Lopes, R. Guiomar, J. Machado and J. C. Menezes (2007). "Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination." Anal Bioanal Chem **387**(5): 1739-1748.

Quinteiro Rodríguez, M. P. (2000). "Fourier Transform Infrared (FTIR) Technology for the Identification of Organisms." Clinical Microbiology Newsletter **22**(8): 57-61.

Ramos, V. M. C., R. Castelo-Branco, P. N. Leao, J. Martins, S. Carvalhal-Gomes, F. Sobrinho da Silva, J. G. Mendonca Filho and V. M. Vasconcelos (2017). "Cyanobacterial Diversity in Microbial Mats from the Hypersaline Lagoon System of Araruama, Brazil: An In-depth Polyphasic Study." Front Microbiol **8**: 1233.

Rao, K., X. Zhang, M. Wang, J. Liu, W. Guo, G. Huang and J. Xu (2021). "The relative importance of environmental factors in predicting phytoplankton shifting and cyanobacteria abundance in regulated shallow lakes." Environ Pollut **286**: 117555.

Rigonato, J., N. Goncalves, A. P. Andreote, M. R. Lambais and M. F. Fiore (2016). "Estimating genetic structure and diversity of cyanobacterial communities in Atlantic forest phyllosphere." Can J Microbiol **62**(11): 953-960.

Rigonato, J., A. D. Kent, T. Gumiere, L. H. Z. Branco, F. D. Andreote and M. F. Fiore (2018). "Temporal assessment of microbial communities in soils of two contrasting mangroves." Braz J Microbiol **49**(1): 87-96.

Rijal Leblad, B., R. Amnhir, S. Reqia, F. Sitel, M. Daoudi, M. Marhraoui, M. K. Ouelad Abdellah, B. Veron, H. Er-Raioui and M. Laabir (2020). "Seasonal variations of phytoplankton assemblages in relation to environmental factors in Mediterranean coastal waters of Morocco, a focus on HABs species." Harmful Algae **96**: 101819.

Sant'Anna, C. L., M. T. P. Azevedo, M. F. Fiore, A. S. Lorenzi, J. Kaštovský and J. Komárek (2011). "Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae)." Brazilian Journal of Botany **34**.

Sant'Anna, C. L., L. H. Z. Branco, W. A. Gama Júnior and V. R. Werner (2011). "Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo." Biota Neotropica **11**(suppl 1): 455-495.

Sant'Anna, C. L., W. A. Gama, J. Rigonato, G. Correa, M. C. B. Mesquita and M. M. Marinho (2019). "Phylogenetic connection among close genera of Aphanizomenonaceae (Cyanobacteria): *Amphiheterocytum* gen. nov., *Cylindrospermopsis* and *Sphaerospermopsis*." Algal Research **37**: 205-214.

Santos, K. R. D. S., G. S. Hentschke, A. P. D. Andreote, H. D. Laughinghouse Iv, A. Ballot, E. Novelo, M. F. Fiore and C. L. Sant'Anna (2018). "Polyphasic characterization of newly isolated *Anabaenopsis* (Cyanobacteria) strains from tropical Brazil and Mexico." Phytotaxa **367**(1): 1-12.

Sildever, S., Y. Kawakami, N. Kanno, H. Kasai, A. Shiimoto, S. Katakura and S. Nagai (2019). "Toxic HAB species from the Sea of Okhotsk detected by a metagenetic approach, seasonality and environmental drivers." Harmful Algae **87**: 101631.

Silva, C. S., D. B. Genuario, M. G. Vaz and M. F. Fiore (2014). "Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves." Syst Appl Microbiol **37**(2): 100-112.

Soares, M. C. S., V. L. M. Huszar, M. N. Miranda, M. M. Mello, F. Roland and M. Lürling (2013). "Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences." Hydrobiologia **717**(1): 1-12.

Summers, E. J. and J. L. Ryder (2023). "A critical review of operational strategies for the management of harmful algal blooms (HABs) in inland reservoirs." J Environ Manage **330**: 117141.

Tessler, M., J. S. Neumann, E. Afshinnekoo, M. Pineda, R. Hersch, L. F. M. Velho, B. T. Segovia, F. A. Lansac-Toha, M. Lemke, R. DeSalle, C. E. Mason and M. R. Brugler (2017). "Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing." Sci Rep **7**(1): 6589.

Volkov, D. S., O. B. Rogova and M. A. Proskurnin (2021) "Organic Matter and Mineral Composition of Silicate Soils: FTIR Comparison Study by Photoacoustic, Diffuse

Reflectance, and Attenuated Total Reflection Modalities." *Agronomy* **11** DOI: 10.3390/agronomy11091879.

Wagner, H., Z. Liu, U. Langner, K. Stehfest and C. Wilhelm (2010). "The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae." *J Biophotonics* **3**(8-9): 557-566.

Wenning, M., F. Breitenwieser, R. Konrad, I. Huber, U. Busch and S. Scherer (2014). "Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry." *J Microbiol Methods* **103**: 44-52.

Wenning, M. and S. Scherer (2013). "Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method." *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(16): 7111-7120.

Werner, V. R., M. M. Cabezudo, L. M. d. Silva and E. B. Neuhaus (2015). "Cyanobacteria from two subtropical water bodies in southernmost Brazil." *IHERINGIA Sér. Bot* **70**: 357-374.

Werner, V. R., M. D. Martins and F. O. da Silva (2018). "Cyanobacteria from a Brazilian subtropical freshwater water body." *Brazilian Journal of Botany* **41**(4): 901-921.

Werner, V. R., A. Tucci, L. M. d. Silva, J. S. Yunes, E. B. Neuhaus, D. E. Berthold and H. D. Laughinghouse (2020). "Morphological, ecological and toxicological aspects of *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria) in a eutrophic urban subtropical lake in southern Brazil." *Iheringia, Série Botânica* **75**: e2020018-e2020018.

Whitton, B. A. and M. Potts (2012). Introduction to the Cyanobacteria. *Ecology of Cyanobacteria II*. B. A. Whitton, Springer: 1-13.

Winder, C. L., E. Carr, R. Goodacre and R. Seviour (2004). "The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy." *J Appl Microbiol* **96**(2): 328-339.

Yang, Y., G. Yu, Y. Chen, N. Jia and R. Li (2021). "Four decades of progress in cylindrospermopsin research: The ins and outs of a potent cyanotoxin." *Journal of Hazardous Materials* **406**: 124653.

Zanchett, G. and E. C. Oliveira-Filho (2013). "Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects." *Toxins (Basel)* **5**(10): 1896-1917.

Zhang, Y., J. K. Whalen, C. Cai, K. Shan and H. Zhou (2023). "Harmful cyanobacteria-diatom/dinoflagellate blooms and their cyanotoxins in freshwaters: A nonnegligible chronic health and ecological hazard." *Water Res* **233**: 119807.