

Rede de observatórios Microbianos

Protocolos de padronização e amostragem de água na América Latina



Rede de Observatórios Microbianos

Protocolos de padronização e coleta de água na América Latina

Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen,

Sánchez María Laura, Mateus-Barros Erick, Schiaffino Romina

Compiladores

Cassiano-Oliveira Israel, Espolau Greyce, Garcia Nara, Mateus-Barros

Erick

Tradutores

2022

Primeira Edição

Resumo

O impacto antrópico e os fatores climáticos atuam de forma conjunta sobre os ecossistemas como agentes de mudança, e muitas vezes os levam à deterioração. O efeito desses agentes depende da localização geográfica, clima, tipo de vegetação, entre outros fatores naturais e antrópicos que podem ser encontrados nos ambientes estudados. Para compreender o impacto destes fatores sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres é importante contar com informações contínuas, padronizadas e estendidas no tempo.

Dentro dos ecossistemas aquáticos, as assembléias microbianas desempenham um papel fundamental nos ciclos da matéria e da energia; e, além disso, tem o potencial de ser indicadores robustos do estado ecológico e sanitário dos ambientes, devido a sua sensibilidade e rápida resposta às mudanças ambientais. Neste sentido, o monitoramento de longo prazo poderia fornecer informações valiosas sobre as características dos corpos d'água e as mudanças pelas quais estes passam.

Considerando estas premissas, durante a primeira reunião da Rede colaborativa em Ecologia Microbiana Aquática da América Latina (μ SudAqua), realizada em La Paloma (Rocha, Uruguai) em dezembro de 2017, foi estabelecida a criação de um conjunto de observatórios cujo objetivo principal é avaliar de que maneira o impacto antrópico e de fatores climáticos, em um gradiente latitudinal, afetam a dinâmica da comunidade microbiana em nível continental. E assim nasceu a Rede de observatórios Microbianos da América Latina.

Os Observatórios são ferramentas valiosas que se estabeleceram ao redor do mundo para agregar informação sistematizada sobre as comunidades microbianas, porém, na América Latina são raros. Nesta Rede de Observatórios foram selecionados sítios-observatórios levando-se em conta a acessibilidade aos locais escolhidos, facilitando assim a continuidade das coletas. Os sítios-observatórios escolhidos contemplam uma frequência mínima bimestral e simultânea, na camada superficial da coluna d'água (zona eufótica), e a medição de parâmetros mais simples, para facilitar a continuidade de cada Observatório a longo prazo.

O presente livro pretende enumerar os protocolos estabelecidos e padronizados para a coleta de amostras de parâmetros físico-químicos e comunidades biológicas na água, além de análises posteriores no laboratório, levando em consideração os diferentes corpos d'água.

Esta Rede tem como objetivo fundamental fortalecer os laços de colaboração entre laboratórios de pesquisa de diferentes países Latinoamericanos e assim aumentar as capacidades e conhecimentos de cada grupo. Desta maneira, pretendemos promover o intercâmbio de saberes para encontrar respostas coletivas a perguntas que nos interessem regionalmente.

Prólogo

Fermani Paulina, Gereá Marina, Graziano Martín, Sabio y García Carmen, Schiaffino Romina

Os observatórios microbianos são um valioso instrumento para a obtenção de informação sistematizada sobre as comunidades microbianas. Apesar disso, são encontrados poucos observatórios que contemplem amostragens de longo prazo na América Latina, devido principalmente à dificuldade em se manter a infraestrutura necessária para este tipo de atividade. Neste sentido, durante o primeiro encontro da Rede colaborativa em Ecologia Microbiana Aquática na América Latina (μ SudAqua, <https://microsudaqua.netlify.app/>) realizada em dezembro de 2017, na cidade de Rocha (Rocha, Uruguai), foi proposta a criação de uma Rede de Observatórios Microbianos Aquáticos da América Latina. Ali foram lançadas as bases sobre os objetivos a longo prazo para a Rede. Assim, foi estabelecido como objetivo geral a formação de um conjunto de observatórios (sítios) para avaliar de que maneira o impacto antrópico e os fatores climáticos afetam a estrutura e dinâmicas de comunidades microbianas aquáticas, em um gradiente latitudinal e abrangendo uma área continental. Complementarmente, isto nos permitirá gerar um trabalho coletivo entre grupos latinoamericanos e assim fortalecer as pesquisas regionais e colaborativas.

Para a conformação inicial da Rede de Observatórios Microbianos Aquáticos da América Latina, na primeira reunião da Rede μ SudAqua, foram propostos 8 observatórios abarcando diferentes tipos de ambientes aquáticos (água doce, marinhos, lênticos, lóticos). Para alcançar uma continuidade de longo prazo nas coletas, se almejou que os sítios criados seguissem como critérios sua facilidade de acesso e que estivessem inseridos em projetos de pesquisa locais que auxiliassem na sustentabilidade dos esforços de amostragem. Estes sítios foram re-avaliados com base nas dificuldades encontradas durante a fase de consolidação da rede. Assim, as amostragens dos observatórios seguiram uma frequência mensal (eventualmente bimestral, a depender da acessibilidade do sítio), na superfície da coluna d'água (zona eufótica, epilímnio), e com a medição de parâmetros simples que facilitassem a continuidade em longo prazo do projeto. Posteriormente, se realizou um re-levantamento dos sítios propostos e a eventual incorporação de novos observatórios.

Para que fosse possível realizar uma análise em conjunto com os parâmetros de cada sítio, no primeiro encontro também foram definidas quais variáveis comuns seriam analisadas. Uma vez definidos os parâmetros, foi iniciado um longo processo de busca por protocolos para cada um deles. Neste sentido, buscou-se protocolos que, na medida do possível, poderiam ser utilizados nos diferentes contextos de cada observatório (rios, rios de cabeceira, lagos,

estuários, etc). Por meio de pesquisas e intercâmbios virtuais, foram levantados os equipamentos, técnicas e protocolos utilizados por cada localidade e procurou-se chegar a um consenso sobre protocolos unificados para cada um dos parâmetros propostos. Durante este processo, ficou claro que os ambientes eram muito heterogêneos e que os protocolos que serviam para um tipo de observatório poderiam não se revelar úteis para outros. Por exemplo, a eficiência de extração da clorofila com etano ou acetona varia com o tipo de ambiente (água doce ou salgada), e por isso se decidiu incluir ambos os métodos. Por outro lado, no caso particular da extração de DNA, os sítios que já analisavam esses dados previamente à construção da rede empregaram distintos procedimentos, incluindo métodos mais artesanais (utilizando SDS, CTAB, Fenol-clorofórmio, etc) ou por meio de kits de extração produzidos por distintas empresas. Isto inviabilizou encontrar um critério comum para este procedimento e se decidiu não estabelecer uma metodologia particular. Em todo caso, o presente livro inclui uma das metodologias mais utilizadas para que se tenha um método como por padrão a ser sugerido para futuros novos observatórios.

Toda esta informação foi compilada em um documento compartilhado entre os grupos dos Observatórios para que as amostragens Piloto da Rede pudessem ter início. Estes protocolos padronizados que permitiram o levantamento vantagens e dificuldades de cada grupo neste período inicial que foram discutidos na segunda reunião da Rede, empreendida em novembro de 2019. O segundo encontro do μ SudAqua, realizado em Chascomús (Buenos Aires, Argentina) deu lugar à segunda reunião da Rede de Observatórios Microbianos da América Latina. Lá foram apresentados os resultados preliminares, e deu-se prosseguimento na discussão sobre os avanços e dificuldades de cada grupo da Rede e no estabelecimento de novas metas. Até esta reunião, a Rede incluía observatórios localizados em Costa Rica, Brasil, Uruguai e Argentina, cujas comunidades microbianas e principais características limnológicas vinham sendo monitoradas ao menos bimistralmente. A Rede contava, então, com 8 sítios de monitoramento (período 2019-2020) sendo: 4 lagos, 2 rios, 1 estuário e 1 sítio marinho. Pelo discutido nesta reunião, e dada a impossibilidade de unificar todos os protocolos, o objetivo inicial da Rede de Observatórios foi modificada, consensuando-se manter os documentos com os protocolos mais comuns utilizados. Neste documento, os procedimentos para a maioria dos parâmetros se encontram unificados, enquanto alguns possuem mais de uma opção metodológica, dependendo do tipo de ambiente analisado, enquanto outros se mantêm um critério de cada sítio (p. ex.: amostragem de DNA ambiental). Além disso, considerando as dúvidas metodológicas suscitadas por alguns dos procedimentos, foram gravados e incluídos ao documento vídeos explicativos destas metodologias mais complicadas.

No ano de 2020, como consequência da pandemia do COVID-19, a maioria dos sítios deve suas amostragens pausadas por um período de um ano e meio. Neste período foi realizada uma reunião virtual da Rede em outubro de 2021, em que foi decidida a retomada das amostragens síncronas em todos os sítios, com início para Abril de 2022, e foi proposta a incorporação de novos Observatórios neste mesmo período. Atualmente, a Rede conta com 13 Observatórios ativos nos seguintes ambientes: 3 lagos, 4 rios, 2 estuários e 4 sítios marinhos (<https://microsudaqua.netlify.app/>).

Apresentamos aqui o livro de Protocolos Normalizados da Rede de Observatórios da América Latina, como um guia consensuado na Reunião do ano de 2019 em Chascomús, e que utilizamos atualmente em todos os Observatórios para a realização das amostragens.

Dezembro de 2023

Participantes da Rede de Observatórios Microbianos

Argentina

Baliña Sofía - UBA-CONICET

Bernal María Carolina -UBA-CONICET

Fermani Paulina -IBIOMAR-CONICET

Gerea Marina - INIBIOMA (UN del Comahue - CONICET)

Graziano Martín -UBA-CONICET

Lagomarsino Leonardo -INTECH-CONICET

Lozada Mariana -IBIOMAR-CONICET

Malits Andrea - CADIC-CONICET

Martyniuk Nicolas - INIBIOMA (UN del Comahue - CONICET)

Padulles María Luz -INEDES (UNLu-CONICET-CIC)

Porcel María Sol -UBA-CONICET

Quiroga María Victoria -INTECH (CONICET-UNSAM)

Saad Juan - San Antonio Oeste, Río negro

Sabio y García Carmen -UBA

Sánchez María Laura -UBA-CONICET

Santucho Gladys Janet -INTECH (CONICET-UNSAM)

Saraceno Martín -UBA-CONICET

Schiaffino Romina - Universidad Nacional de Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Torremorell Ana - INEDES (UNLu-CONICET-CIC)

Unrein Fernando -INTECH (CONICET-UNSAM)

Brasil

Cassiano-Oliveira Israel - Universidade Federal de São Carlos

Costa, Mariana - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

de Melo, Michaela - Université du Québec à Montréal

Espolau Greyce - Universidade Federal de São Carlos

Junger, Pedro - Universidade Federal de São Carlos

Garcia, Nara - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Mateus-Barros, Erick - Universidade Federal de São Carlos

Sarmento, Hugo - Universidade Federal de São Carlos

Costa Rica

Gómez Eddy - Universidad de Costa Rica

Uruguai

Alonso Cecilia - CURE-Udelar

Pereira Emiliano - CURE-Udelar

Griffero Luciana - CURE-Udelar

Zanetti Juan - CURE-Udelar

Martínez Ana - CURE-Udelar

Protocolos

Protocolo de Clorofila-a: Romina Schaffino y Maria Laura Sánchez

Protocolo de Fitoplancton cuantitativo: María Laura Sánchez y Romina Schiaffino

Protocolo de Citometría: Fernando Unrein y Andrea Malitz

Protocolos de Nutrientes Disueltos: Martín Graziano, Leonardo Lagomarsino

Protocolo de Nutrientes Totales: María Luz Padulles y Eddy Gómez

Protocolo de ADN ambiental: Carmen Sabio y García, Luciana Griffero, Paulina Fermani

Protocolo de Materia orgánica disuelta y Carbono orgánico disuelto: Marina Gereá

Índice

Indicações gerais para realizar as coletas.....	1
Seção 1: Preparação de material para coleta.....	3
1.1 Clorofila-a e Nutrientes.....	4
1.2 Fitoplâncton quantitativo.....	4
1.3 Citometria.....	5
1.4 DNA ambiental.....	7
1.5 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD).....	7
Seção 2: Material para levar ao campo e protocolo de amostragem.....	9
2.1 Medições no campo.....	10
2.2. Clorofila-a e Nutrientes dissolvidos.....	10
2.3 Fitoplâncton quantitativo	10
2.4 Citometria.....	11
2.5 DNA ambiental.....	12
2.6 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD).....	13
Seção 3: Protocolo de análise em laboratório.....	14
3.1 Turbidez.....	15
3.2 Clorofila-a y Nutrientes.....	15
3.2.1 Determinação de Clorofila-a.....	16
3.2.2 Nutrientes dissolvidos.....	19
3.3 Fitoplâncton quantitativo.....	19

3.4 Citometria.....	20
3.4.1 Bactérias heterótrofas.....	21
3.4.2 Picoplâncton autotrófico.....	21
3.4.3 Nanofitoplâncton autotrófico.....	21
3.5 DNA ambiental.....	22
3.5.1 Procedimento de extração de DNA ambiental.....	22
3.6 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD).....	25
3.6.1 Carbono orgânico dissolvido (COD).....	25
3.6.2 Matéria orgânica dissolvida (MOD).....	26
Seção 4: Bibliografia.....	28
Seção 5: Epílogo.....	29

Indicações gerais para realização das coletas

Esta seção indica como as coletas serão realizadas, com que frequência, lugar do corpo d'água e quais parâmetros devem ser medidos.

Coletas:

- ✓ Coleta bimestral (preferentemente mensal)
- ✓ Coletas matutinas, durante a segunda quinzena dos meses pares (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro, dezembro), na zona fótica do corpo d'água
- ✓ Forma de identificar as amostras: **DUAS LETRAS PARA SÍTIO_aammdd**

Parâmetros a medir:

1) Clorofila-a (Chl-a)

2) Nutrientes:

- Nutrientes totais ----> Fósforo total (FT), nitrogênio total (NT)
- Nutrientes dissolvidos ----> Amônio (NH_4^+), nitratos (NO_3^-), fosfatos (PO_4^+)

3) Fitoplâncton quantitativo

4) Citometria

- Bactérias heterótrofas
- Picoplâncton e nanoplâncton autotrófico

5) DNA ambiental

- *Procariotos*

6) Matéria Orgânica Dissolvida (MOD) e Carbono Orgânico Dissolvido (COD)

Preparação de material para coleta

Os materiais para a coleta estão resumidos na lista a seguir:

- ✓ *Frascos plásticos de 250 ou 500 ml (para medição de nutrientes totais, nutrientes dissolvidos/Clorofila-a, fitoplâncton, DNA ambiental, COD/MOD);*
- ✓ *HCl 10%;*
- ✓ *H₂O destilada ou ultrapura;*
- ✓ *Solução de Lugol acidificado (1%) (fitoplâncton);*
- ✓ *Criovials estéreis de 5 ou 4,5 ml com fixador a definir para cada corpo de água (para análises de procariotos, picoeucariotos e nanoplâncton por citometria);*
- ✓ *Caixas para guardar criovials (citometria);*
- ✓ *Garrafa térmica de N₂ líquido (citometria);*
- ✓ *Pipetas automáticas e ponteiras;*
- ✓ *Garrafa Niskin ou Van Dorn (dependendo do local);*
- ✓ *Rede de 50 μ m*

As particularidades de cada parâmetro a se medir estão detalhadas nos parágrafos adiante.

1.1 Clorofila-a e Nutrientes

Nutrientes totais: lavar frascos plásticos de 250 ou 500 ml com HCl 10%. Em seguida, enxaguar pelo menos 3 vezes com água destilada ou ultrapura.

Clorofila-a e nutrientes dissolvidos: lavar frascos plásticos com HCl 10%. Em seguida, enxaguar pelo menos 3 vezes com água destilada ou ultrapura. Pode ser utilizado o mesmo frasco para ambas medições. O tamanho do frasco dependerá do volume que será necessário filtrar para a determinação da concentração de clorofila-a.

1.2 Fitoplâncton quantitativo

Lavar uma garrafa/frasco de 200 - 500 ml com água destilada e preparar o Lugol acidificado.

- *Preparação de Lugol acidificado:*
 - Preparar 200 ml de Lugol 13,6% (30 gramas de soluto em 220 ml de solução = 13,6% m/v):
 - 20 g IK + 10 g I2 em 200 ml de água destilada (utilizar um agitador magnético para ser mais rápido) + 10% de ácido acético glacial (20 ml).

Nota 1: Caso o Lugol já esteja preparado, adicionar apenas 10% de ácido acético glacial.

Nota 2: A solução de Lugol acidificada deve ser armazenada na geladeira (4°C) e em frasco revestido com papel alumínio para permanecer em local escuro.

1.3 Citometria

Os materiais necessários para preparar as amostras de citometria dependem do fixador a ser utilizado (P+G, Glutaraldeído ou GlyTE) e do tipo de organismos a ser preservado (bactérias, picoautotróficos e nanoplâncton). Abaixo estão detalhados os materiais para preparar as amostras de citometria:

- *Bactérias, picoautotróficos e nanoplâncton*
 - *Rotular frascos criogênicos de 4,5 ml previamente aliquotados com 400 µl do fixador utilizado pelo laboratório*

As preparações dos fixadores são detalhadas a seguir, de acordo com o tipo de organismo a ser preservado e o local de coleta.

- *Preparação de 1 litro de P+G (1% Paraformaldeído + 0,05% Guataraldeído Final):*
 - *Trabalhe sob uma coifa de extração;*
 - *Aqueça 800 mL de 1X PBS a 60°C e mantenha a essa temperatura com um agitador magnético;*
 - *Adicione 100 g de paraformaldeído;*
 - *Adicione os grânulos de NaOH um de cada vez e continue mexendo até que a solução fique límpida (deve demorar 1-5 min);*
 - *Retire do calor;*
 - *Adicione 20 ml de Glutaraldeído 25%;*
 - *Ajuste ao pH = 7,2 com HCl;*
 - *Completar para 1 litro com 1X PBS;*
 - *Filtrar através de um filtro de polycarbonato de 0,22 µm;*
 - *Alíquota de 400 µl em cada frasco criogênico;*
 - *Conservar no congelador a -20°C (melhor a -80°C)*

Nota: uma vez descongelado deve guardar a 4°C e usar dentro de uma semana ou descartar!

- *Preparação de glutaraldeído:*

- *O glutaraldeído a 25% é pré-filtrado através de 0,22 µm e armazenado em geladeira (4°C).*

- *Preparação de GlyTE:*

- *Prepare 100 ml de solução de EDTA 0,5 M:*
- *Coloque 18,6 g de EDTA + 80 ml de água ultrapura (Enquanto mistura com o agitador magnético, ajuste o pH = 8 adicionando lentamente NaOH).*
- *Adicione água ultrapura a um volume final de 100 mL.*
- *Filtrar através de 0,22 µm.*
- *Prepare 100X TE (1 M Tris; 100 mM EDTA):*
- *Coloque 12,1 g de TRIS + 20 ml de 0,5 M EDTA (previamente preparado)*
- *Adicione água ultrapura até 80 mL (Enquanto mistura com agitador magnético, ajuste o pH = 8 adicionando lentamente HCl a 37%).*
- *Adicione água ultrapura a um volume final de 100 mL.*
- *Filtrar através de 0,22 µm.*

- *Preparação do estoque GlyTE:*

- *Misturar:*

- *20 ml 100x TE pH 8,0*
- *60ml de água ultrapura*

- 100 ml de glicerol de grau molecular (use seringa)
- Após a mistura, passe o GlyTE por um filtro de 0,22 μm e armazene refrigerado (4°C).
- Refiltre antes de usar.

Nota: autoclavar os restantes 0,5M EDTA e 100X TE para armazenar (próxima preparação de GlyTE).

1.4 DNA ambiental

Lave as garrafas plásticas de 250, 500 ml ou um tamanho maior (se necessário) com HCl 10% (1 vez). Em seguida, lave 2 vezes com água destilada e finalize com 1 lavagem com ultrapura/H₂O destilado. O tamanho da garrafa dependerá do volume que será posteriormente filtrado.

Lave um aparato de filtração da mesma forma que as garrafas, para uso no laboratório.

Nota: Em geral, são filtrados entre 100 e 300 ml de amostra. Em lagoas hipereutróficas como Chascomús, são filtrados entre 30 e 50 ml. No mar, são filtrados entre 1 e 4 litros.

1.5 Carbono Orgânico Dissolvido (DOC) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)

Lavar um frasco de polipropileno (plástico) 1 vez com HCl 10% e pelo menos 3 vezes com água destilada ou ultrapura para levar ao campo e coletar novamente amostras de água.

Lavar um aparato de filtração de vidro com HCl 10% e muflar a 440°C durante pelo menos 1 hora. Também muflar (a 440°C durante pelo menos 1 hora) frascos âmbar de 100mL, um para cada parâmetro analisado (DOC e MOD). Ambos serão usados no laboratório, logo após a coleta.

2.

Material para levar a campo e protocolo de coleta

Abaixo estão listados os materiais necessários para levar a campo:

- *Planilha de campo;*
- *pHmetro;*
- *Condutivímetro;*
- *Oxímetro;*
- *Disco de Secchi;*
- *Garrafa Niskin ou Van Dorn (dependendo do local);*
- *Pipeta e ponteira;*
- *Material para etiquetagem;*
- *Rede de 50 μm ou similar;*
- *Geladeira, gelo e/ou bolsa térmica;*
- *N₂ líquido (para citometria);*
- *Frascos plásticos de 250 ou 500 ml previamente lavados (nutrientes totais, nutrientes dissolvidos/Clorofila-a, fitoplâncton, DNA ambiental, COD/MOD);*
- *Lugol acidificado e pipeta pasteur de plástico (fitoplâncton);*
- *Criotubos de 4,5 mL com P+G (citometria): bactérias, picoplâncton autotrófico e nanoplâncton;*

- *Criotubos de 4,5 mL com GlyTE (citometria): bactérias, picoplâncton autotrófico e nanoplâncton;*

Os procedimentos de cada parâmetro a se medido estão detalhados nos parágrafos adiante.

2.1 Medições no campo

Tomar medidas de temperatura da água, pH, condutividade e oxigênio dissolvido; seguindo as indicações do equipamento a utilizar.

Identificar variáveis relevantes para os distintos ambientes. Por exemplo, em riachos podem ser medidos largura, profundidade vazão, tipo de vegetação circundante, etc. Em lagos e mar, transparência utilizando disco de Secchi, vegetação circundante, profundidade, etc.

2.2 Clorofila-a e Nutrientes

Clorofila-a e Nutrientes dissolvidos: *re-colatar as amostras em frascos plásticos previamente lavados (sem filtrar). Se distante do laboratório, transportar as amostras em local frio (4°C) e ao abrigo da luz.*

Nutrientes totais: *re-coletar a amostra em frascos plásticos de 250 ou 500 ml previamente lavados (sem filtrar). Se distante do laboratório, transportar as amostras em local frio (4°C) e ao abrigo da luz.*

2.3 Fitoplâncton quantitativo

Coletar entre 200 e 500 ml (dependendo do local do estudo) de água subsuperficial não filtrada e armazenar em uma garrafa/frasco previamente lavado.

Fixar a amostra com Lugol acidificado a 1% (concentração final). Armazenar em local seco e abrigado da luz.

Nota 1 Periodicamente verificar o estado das amostras e adicionar mais Lugol, caso seja necessário.

Nota 2 Caso não seja possível fixar a amostra em campo, manter os frascos abrigados da luz e em local fresco.

2.4 Citometria

Tomar amostras de água e pré-filtrar com rede de 50 μ m para retirada de zooplâncton.

Adicionar amostra nos cryovials, contendo distintos fixadores a depender do tipo de organismo que será contado e características físico-químicas de cada sítio:

- Bactérias, picoautótrofos e nanoplâncton: Se utilizando um frasco de 4.5ml, adicionar 4 ml de amostra e completar com 400 μ l do conservante ou fixador escolhido (Glyte, P+G ou formol).*

Homogeneizar cada amostra por inversão delicada e manter em local protegido da luz por 10 minutos. Em seguida, submergir as amostras em nitrogênio líquido até seu congelamento e armazenar em freezer -80°C dentro de sua respectiva caixa (se não for possível, guardar a -20°C).

Nota: Há um [vídeo disponível na pasta compartilhada](#) sobre o processamento destas amostras para sua conservação.

Considerações para a preservação correta das amostras de citometria:

- O **congelamento** é uma etapa chave para a preservação da amostra. um congelamento imediato evita que células se quebrem e lixo seja acumulado, o que prejudica a etapa de leitura no equipamento. Portanto, as amostras precisam ser fixadas **o mais rápido possível e no nitrogênio líquido!**
- Evitar que fixadores que são preservados em geladeira ou freezer fiquem descongelados e à temperatura ambiente por muito tempo, em especial para o P+G.
- Idealmente, levar o nitrogênio líquido ao sítio de coleta e fixar a amostra *in situ*. Se não for possível, levar a amostra em local frio (4°C) e ao abrigo de luz até o laboratório e fixar o mais rápido possível.
- O P+G, uma vez descongelado, deve ser utilizado imediatamente. Após o uso, é possível guardar o excedente a 4°C por uma semana no máximo. Não pode voltar a ser congelado nem mantido em temperatura ambiente por muito tempo, por alterar a eficiência de sua fixação.
- **A amostra não deve ser descongelada até que seja medida.** O transporte de amostras já fixadas deve ser feito com estas congeladas!

2.5 DNA ambiental

Enxaguar as garrafas previamente lavadas 2 vezes com a água do local antes de recolher a amostra. Recomenda-se, especialmente nos locais mais impactados, pré-filtrar com um filtro de 50 µm. Transportar a amostra sob refrigeração até o laboratório (4°C).

2.6 Carbono Orgânico Dissolvido (COD) y Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)

Coletar 250 ml de água no frasco plástico previamente lavado (esse volume é suficiente para as duas análises). Transportar as amostras ao abrigo da luz e em temperatura ambiente ou sob refrigeração.

3.

Protocolo de análises em laboratório

Abaixo estão listados os materiais necessários para serem utilizados no laboratório após a extração das amostras de campo:

- *HCl 10%;*
- *H₂O destilada e/ou ultrapura;*
- *Sistema de filtração (Nutrientes dissolvidos/Clorofila-a e DNA);*
- *Reagentes, tipo Hach (Nutrientes);*
- *Filtros tipo Whatman GF/F, com tamanho 0.7 μ m e muflados a 450° C durante ao menos 4 horas (Nutrientes dissolvidos/Clorofila-a);*
- *Papel alumínio (Clorofila-a);*
- *Sistema de filtração de vidro lavado com ácido e muflados a 440°C durante ao menos 1 hora (COD e MOD);*
- *Filtros de policarbonato com poro de 0.22 μ m (tipo Millipore GTTP04700) (DNA);*
- *Filtros com poro de 3 μ m (opcional DNA);*
- *Filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou Membrana GV (Millipore - GVWP04700) com poro de 0.22 μ m (COD e MOD);*

- *Frasco âmbar de 100 mL muflado a 440°C durante ao menos 1 hora (COD e MOD);*
- *Turbidímetro (caso disponha);*
- *Espectrofotômetro UV.*

Os procedimentos que devem ser realizados para cada parâmetro estão detalhados nos parágrafos adiante.

3.1 Turbidez

- *Separar um volume para medição de turbidez, caso possua turbidímetro.*

Nota: Caso não tenha o turbidímetro, é possível realizar a determinação de sólidos em suspensão a partir de protocolos APHA.

3.2 Clorofila-a e Nutrientes

Nutrientes totais:

- *Após a coleta, as amostras deverão ser armazenados a -20°C até a sua análise.*
- *A análise será feita pelos métodos APHA ou EPA. Para a água do mar, recomendamos seguir os métodos de Strickland-Parsons (1972).*

Clorofila-a e Nutrientes dissolvidos:

- *Filtrar um determinado volume de amostra utilizando o filtro Whatman GF/F de 0.7 μ m até o filtro entupir. O volume a ser filtrado dependerá da quantidade de material em suspensão, portanto, em ambientes eutróficos, será utilizado um volume pequeno, enquanto em ambientes oligotróficos ou marinhos entre 1000 e 2000 mL.*
- *Anotar o volume filtrado.*
- *Coloque o filtro (dobrado ao meio com a parte filtrada sobre si) em um pequeno pacote de papel alumínio etiquetado (data, nome do corpo d'água, mililitros filtrados e número de filtros).*
- *Armazenar os filtros em freezer a -20°C para facilitar a ruptura das paredes celulares e a liberação do pigmento. Os filtros podem ser armazenados por no máximo 3 semanas.*

Nota 1. O filtro será utilizado para a determinação da Clorofila-a.

Nota 2. O filtrado será utilizado para a determinação de Nutrientes dissolvidos.

3.2.1 Determinação de Clorofila-a:

- *Cortar os filtros em pequenos pedaços e colocar em frascos de plástico revestidos com papel alumínio.*
- *Adicionar 8 ml de etanol (pelo menos 80%), quente (entre 60°C e 70°C). Este será o solvente da extração. Em caso de utilizar 2 filtros para uma mesma amostra, utilizar 12 mL de etanol.*
- *Agitar vigorosamente para garantir que todos os pedaços de filtro estão mergulhados no etanol.*

- Anotar o volume do solvente adicionado.
- Deixar em repouso ao abrigo da luz em uma geladeira (4°C) para facilitar a extração dos pigmentos fotossintéticos.

Nota: Este passo pode ser realizado alguns dias depois da filtração e acondicionamento da amostra em -20°C, mas se recomenda não demorar mais do que 3 semanas após a coleta.

No dia seguinte à extração:

- Centrifugar a amostra por uns 10 minutos
- Ler absorbância a 665 e 750 nm em espectrofotômetro, realizando um branco previamente com etanol puro.
- Na mesma cuveta, adicionar 1 gota de HCl 1M e após 1 minuto ler a absorbância novamente nos dois comprimentos de onda. Não exceda a quantidade de HCl, pois alguns pigmentos acessórios podem alterar sua absorbância para a de feofitina-a e interferir na determinação.

Fórmula para o cálculo da concentração de Clorofila-a:

$$[\text{Clorofila-a sem feopigmentos}] = F \cdot [(Abs1_{665} - Abs1_{750}) - (Abs2_{665} - Abs2_{750})] \cdot k \cdot v$$

onde **[Clorofila-a sem feopigmentos]** é expressa em µg por litro; **Abs1** representa a absorbância antes de acidificar; **Abs2** representa a absorbância depois de acidificar; **F** é um fator de

correção para equiparar a redução na absorbância com a Clorofila-a inicial (2.43 para etanol, 2.72 para metanol e 2.43 para acetona); k é o coeficiente de absorção específica (11.2 para etanol, 11.62 para metanol e 10.48 para acetona); v é o volume do extrato de pigmentos, em ml / (volume da amostra em litros x espessura da cuveta em cm).

Considerações:

- ✓ Utilizar Etanol absoluto para a análise.
- ✓ Utilizar as cuvetas exclusivas para clorofila. Lavar com detergente EXTRAN e em seguida com etanol.
- ✓ Calibrar com etanol puro a 665 nm e a 750 nm para o branco.
- ✓ Calibrar novamente a cada 4 amostras para comprovar a calibração
- ✓ Lavar as cuvetas com etanol entre cada amostra.

• Extração com acetona para água marinha/salgada:

• Seguir os mesmos passos detalhados no protocolo anterior, mas ao invés de utilizar etanol absoluto quente, utilizar acetona (sem aquecer) como solvente de extração para fitoplâncton marinho.

Considerações:

- ✓ Utilizar Acetona 90% para a análise.
- ✓ Separar cuvetas para utilizar apenas para clorofila. Lavar com detergente EXTRAN e em seguida com acetona.
- ✓ Calibrar com acetona pura a 665 nm e a 750 nm para o branco.
- ✓ Calibrar novamente a cada 4 amostras para verificar a calibração
- ✓ Lavar as cuvetas com acetona entre cada amostra.

- *Extração com metanol para água doce:*

Como alternativa ao uso de etanol quente, pode-se utilizar metanol como solvente de extração. Os passos são os mesmos detalhados no protocolo com etanol absoluto.

Atenção: *se o grupo de trabalho pretende utilizar este solvente, é preciso realizar uma inter-calibração prévia para verificar a capacidade de extração de ambos solventes.*

3.2.2 Nutrientes dissolvidos:

- *Recomenda-se realizar a determinação no próprio dia ou nos dias seguintes.*
- *Caso a dosagem do nutriente não seja realizada no mesmo dia, o filtrado é armazenado a -20°C até a sua determinação.*

Nota: a determinação de cada um dos parâmetros será realizada pelos métodos APHA ou EPA. Recomendamos: Método do Salicilato de Amônio (Método EPA 350.1) - Método do Fenato Alternativo, APHA 4500-NH3-F; Nitratos: método de redução de cádmio, APHA 4500-NO3-E; Ortofosfato: método de vanadato-molibdato, APHA 4500-P-C - método de ácido ascórbico, APHA 4500-P-E. Para a água do mar, recomendamos seguir os métodos de Strickland-Parsons (1972).

3.3 Fitoplâncton quantitativo

- *Conservar a amostra sob refrigeração (4°C) e ao abrigo da luz, até sua posterior quantificação por microscópio invertido.*

Nota: A fixação com Lugol exige o monitoramento periódico da cor das amostras armazenadas, a fim de repor o Lugol perdido devido à oxidação do lodo. Se as amostras estiverem descoloridas, adicione novamente uma gota de Lugol acidificado.

O fitoplâncton será quantificado pelo método de sedimentação de Utermöhl (1958) com o auxílio de um microscópio invertido. O volume sedimentado irá variar de acordo com cada local de coleta.

3.4 Citometria

- Usando um citômetro de fluxo, as amostras extraídas e preservadas serão analisadas para bactérias heterotróficas (1), picoplâncton autotrófico (2) e nanofitoplâncton autotrófico (3).*
- Como cada grupo tem acesso a diferentes tipos de citômetros, não é possível padronizar as configurações, porém alguns critérios de análise podem ser estabelecidos.*

Em geral:

- O limite das configurações "sempre" deve ser definido como fluorescência "FL1 ou FITC" para coloração SybrGreen e "FL3 ou PerCP" para algas.*
- Adicione beads Yellow-Green de 1 μm para usar como referência de tamanho e fluorescência.*
- Anote o volume de amostra e diluição, velocidade, voltagem, configurações e nome do arquivo.*

3.4.1 Bactérias heterótrofas:

- *As bactérias são coradas com SYBR GREEN I.*

Preparação da solução de trabalho de SYBR GREEN I:

- *A solução de trabalho de SYBR GREEN I é preparada com uma diluição 1:100 da solução-estoque comercial (10.000X) em DMSO.*
- *Para analisar a amostra em citômetro, 100 µl de amostra são corados com 1 µl da solução de trabalho (1X concentração final).*
- *Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz antes de passar a amostra no citômetro.*
- *As bactérias são analisadas tipicamente em dois bi-plots: FL1 x SSC e FL3 x FL1*

3.4.2 Picoplâncton autotrófico:

- *As amostras são analisadas no citômetro sem corar.*
- *São utilizados tipicamente os gráficos: FL3 x SSC, FL3 x FL2 e FL3 x FL4. Os dois últimos vão depender se as picocianobactérias presentes nas amostras são ricas em ficoeritrina (FL2) ou em ficocianina (FL4).*

3.4.3 Nanofitoplâncton autotrófico:

- *Utiliza-se a mesma amostra e os mesmos gráficos indicados para o picoplâncton autotrófico, apenas modificando as configurações (reduzindo a voltagem de operação), de modo de posicionar os picoeucariotos abaixo e à esquerda, de forma que se visualize melhor toda a população de nanofitoplâncton.*

3.5 DNA ambiental

- Filtrar a água coletada em filtros de 0,22 μm . Para amostras de água doce, de 100 a 300 mL; para amostras marinhas, de 1 a 4 L. Para isso, utilize um aparato de filtração previamente lavado.
- Conservar os filtros em um criotubo ou eppendorf estéril, sem buffer, a -80°C .

Nota 1: em locais altamente impactados, recomenda-se realizar uma pré-filtração por 3 μm antes da filtração por 0,22 μm , a fim de evitar o entupimento do último filtro com partículas suspensas.

Nota 2: tutorial em vídeo disponível na pasta compartilhada sobre o procedimento de filtração:

<https://drive.google.com/file/d/1h7XTJY8vcSX59xdISlInn6uTrGJpcbAK/view?usp=sharing>

3.5.1 Procedimento de extração de DNA ambiental

A rede não tem um procedimento padronizado para extração de DNA e cada local usa seus próprios protocolos. Como orientação, aqui estão duas referências para um procedimento de extração usando um método caseiro (que é usado por vários locais) e outro usando um kit de extração.

a- Protocolo de extração com tampão CTAB: Fernández Zenoff *et al.* (2006)

b- Protocolo com kit de extração: Lozada *et al.* (2022).

a-Protocolo CTAB (Modificado de Fernández Zenoff et al. (2006))

CTAB seguido de extração com uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico:

- Realizar uma solução tampão de lise CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (2% CTAB; 1.4M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA pH 8). Essa solução é armazenada em temperatura ambiente. Ela é estável por vários anos. Antes do uso, adiciona-se β -mercaptoetanol a 0.2% (concentração final) e a solução é aquecida a 60°C.
- Aliquotar essa solução de CTAB em eppendorfs de 2 mL e incorporar cada filtro.
- Incubar a 60 °C durante 30 minutos
- Logo, se realizam dois passos de purificação: adicionar 0,7 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (24;1) e centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos.

Nota 1: ao centrifugar, tenha o cuidado de orientar todos os tubos na mesma direção, pois não é possível observar a olho nu o pellet que será formado.

- Recuperar a fase aquosa em outro tubo de 1,5 mL (tendo cuidado de não eliminar os resíduos restantes)
- Em seguida, o DNA é precipitado em isopropanol frio

Nota 2: colocar em geladeira por pelo menos 15 minutos. Quanto mais tempo o material ficar na geladeira, maior será a precipitação. Considere deixar o material precipitar durante a noite.

- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos

Nota 3: ao centrifugar, tenha o cuidado de orientar todos os tubos na mesma direção, pois não é possível observar a olho nu o pellet que será formado

- Retirar o sobrenadante, evitando cuidadosamente o pellet

- Em seguida, serão necessárias etapas de lavagem. Para isso, adicione etanol 80% gelado
- Mesclar e centrifugar durante 2 minutos a 5000 rpm

Nota 4: para ambientes oligotróficos, aumentar o tempo para 7 minutos

- Repetir o passo de etanol a 80%
- Desprezar o sobrenadante, evitando o pellet
- Secagem e armazenamento
 - Deixe o pellet secar ao ar, com o eppendorf de cabeça para baixo para proteger o pellet, por 15 minutos.

Nota 5: se preferir, a secagem pode ser feita em um SpeedVac

- Ressuspender o pellet em 100 μ L de água ultrapura ou miliQ®

Nota 6: em ambientes oligotróficos, ressuspender em 50 μ L;

Nota 7: ao adicionar água, procurar lavar o lado onde está aderido o pellet

- Determinar a concentração de DNA em Nanodrop®, Picodrop® o Fluorômetro
- Diluir o DNA para 10 ng/ μ L usando água ultrapura o miliQ®
- Armazenar em congelador a -20°C.

b- Utilizando kits de extracción

O DNA pode ser extraído com o Fast DNA Spin Kit (MP Biomedicals Inc., EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado com fluorômetro ou Nanodrop®.

Para amostras marinhas, podem ser seguidos os procedimentos de Lozada et al. (2022).

3.6 Carbono Orgânico Dissolvido (COD) e Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)

- Filtrar pelo menos 200 mL água através de filtros PVDF ou GF (0,22 μm) utilizando o aparato de filtração de vidro previamente lavado e muflado.

- Armazenar a amostra filtrada em dois frascos âmbar com tampa de teflon, previamente lavados e muflados - um para a medição de COD e o outro para a de MOD.

Nota: utilizar filtros de fluoreto de polivinilideno (PVDF) o membrana GV (Millipore - GVWPO4700) de 0,22 μm de poro.

3.6.1 Carbono orgânico dissolvido (COD)

- Conservar a amostra a 4°C ao abrigo da luz.

Nota: Se o ambiente amostrado apresenta grande quantidade de matéria orgânica (i.e. DOC \geq 10 mg/L), adicionar 3 gotas de HCl puro

- Processar a amostra em um analisador de carbono que determine NPOC (non purgable organic carbon).

3.6.2 Matéria orgânica dissolvida (MOD)

Se possível, realizar a medição do espectro de absorção da amostra imediatamente após a filtração. Tenha a precaução de homogeneizar a temperatura da amostra e da água ultrapura que será usada como branco no espectrofotômetro.

- Submergir os frascos de amostras em um recipiente limpo com água ultrapura, em um banho térmico a 20°C durante meia hora antes de realizar a medição. Esse processo é importante para homogeneizar as temperaturas e assim evitar ruído ou variações irregulares no espectro entre 700 e 800 nm, faixa que será usada para corrigir a amostra.*
- Uma vez que as amostras estejam a 20°C, ligue o espectrofotômetro e espere ao menos meia hora para aquecer as lâmpadas do equipamento.*
- Para a medição, utilize uma cuveta de quartzo com comprimento do passo óptico adequado para o ambiente estudado (i.e. 1 cm, 5 cm ou 10 cm).*
- Configurar o espectrofotômetro para fazer uma varredura do espectro de absorção entre 200 e 800 nm. Se possível, extrair as absorbâncias para trabalhar imediatamente após a filtração.*

Nota: Para otimizar e homogeneizar os cálculos, o grupo GESAP (Bariloche) elaborou [uma planilha Excel com macros](#). Esta planilha executa automaticamente os passos a seguir.

- Após subtrair o espectro da água ultrapura, realizar uma correção da amostra. Para isso, deve-se obter a média das absorbâncias entre 700 e 800 nm e subtrair esse valor de cada uma das absorbâncias do espectro por completo.*

- As unidades de absorbância (AU) deverão ser convertidas em coeficientes de absorção (Abs), de acordo com o modelo do espectrofotômetro, da seguinte maneira:

$$a = 2.303A/L$$

onde a é o coeficiente de absorção Napieriano (m^{-1}), A é a absorbância e L é o comprimento do passo óptico da cuveta (em metros).

- Com os espectros corrigidos e convertidos, deverão ser calculados os índices:

- a_{254} , a_{350} e a_{440}
- $S_{275-295}$ (declive espectral entre 275 e 295 nm) e S_R (slope ratio, razão do declive espectral)
- SUVA 254 ($a_{254} \cdot DOC$) e SUVA 350 ($a_{350} \cdot DOC$)
- Para cada amostra, anote na [planilha fornecida pela GESAP](#):
- Nome e as coordenadas geográficas do ponto de amostragem
- Volume do filtrado
- c- Filtro utilizado (PVDF, GV ou fibra de vidro),
- d- Modelo do espectrofotômetro
- e- Tipo de cuveta (comprimento do passo óptico em metros, e.g. 0,01m o 0,1m).

Seção 4.

Bibliografia

- APHA (American Public Health Association) (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. En: Clescerl LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds) Book 20. APHA, Washington, DC, p 4-487.
- Fernández Zenoff V., Siñeriz F. & Farías M.E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7857-7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>
- Lozada M., Zabala M.S., García P.E., Diéguez M.C., Bigatti G., Fermani P., Unrein F., Dionisi H.M. (2022). Microbial assemblages associated with the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in Patagonian coastal waters: structure and alginolytic potential. *Sci. Total Environ.* 154629. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154629>
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). *A practical handbook of sea-water analysis*, 2nd edn. J. Fish. Res. Board Can. 167, 311.

Seção 5.

Epílogo

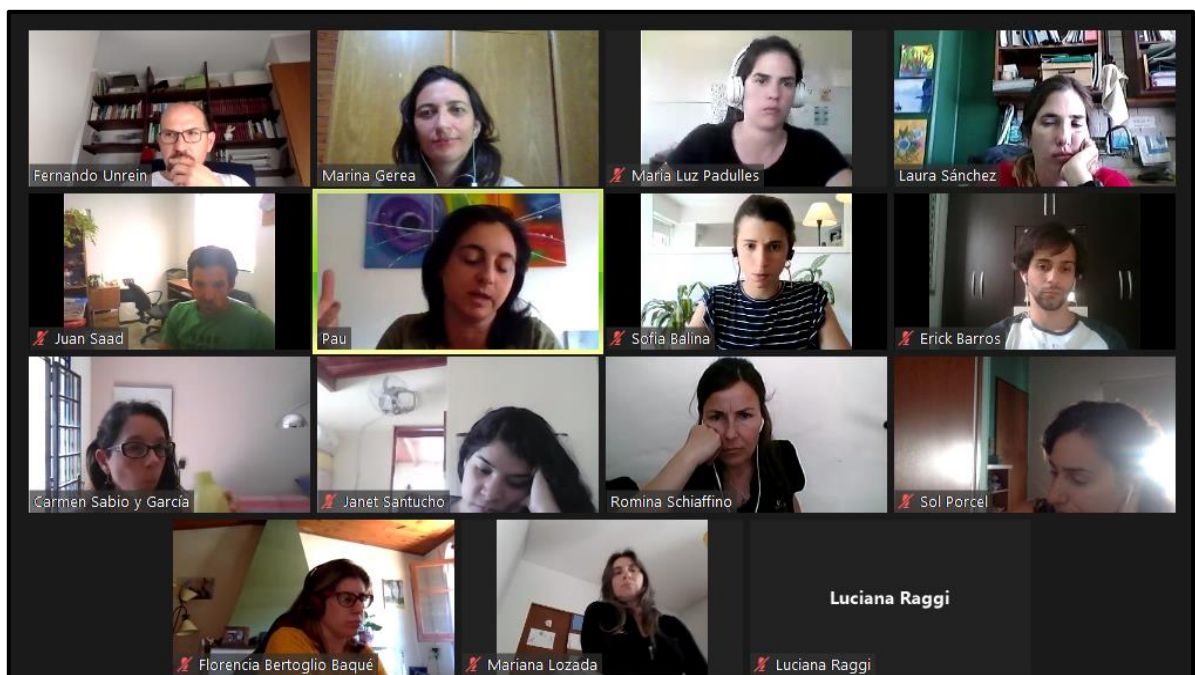
O trabalho em equipe e colaboração é imprescindível para levar a cabo este grande projeto. Sem dúvidas, o aporte de cada um de nós e a predisposição às reuniões virtuais e presenciais, são motores para persistir com entusiasmo as amostragens temporais e permitem planejar a projeção de longo prazo da Rede de Observatórios Microbianos. Aqui, apresentamos algumas fotos das reuniões, juntamente com a de alguns Observatórios Latinoamericanos.



2017 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (Uruguay)



2019 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (Argentina)



2021 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (virtual)



2022 - Grupo de Trabalho da Rede de Observatórios Microbianos (Brasil)



*Foto representativa do sítio-observatório marinho
Punta Este, Puerto Madryn, Chubut, Argentina*



*Foto representativa do sítio-observatório lótico de água doce
Riacho São Francisco, Claypole, Prov. Buenos Aires, Argentina*



Foto representativa do sítio-observatório lêntico de água doce
Laguna El Trébol, Bariloche, Prov. Río Negro, Argentina



Foto representativa do sítio-observatório lêntico artificial de água doce
Reservatório do Broa, Itirapina, São Paulo, Brasil