



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**EFEITOS ANTRÓPICO E SAZONAL NA DIVERSIDADE BACTERIANA DE AFLUENTES
DA MICROBACIA DO PARANÁ 3**

FERNANDO AUGUSTO FRAGA DINIZ GUERRA

Foz do Iguaçu
2025

**EFEITOS ANTRÓPICOS E SAZONAIS NA DIVERSIDADE BACTERIANA DE
AFLUENTES DA MICROBACIA DO PARANÁ 3**

FERNANDO AUGUSTO FRAGA DINIZ GUERRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida
e
da Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino-Americana, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli
Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia
Pereira

Foz do Iguaçu
2025

FERNANDO AUGUSTO FRAGA DINIZ GUERRA

EFEITOS ANTRÓPICOS E SAZONAIS NA DIVERSIDADE BACTERIANA DE AFLUENTES DA MICROBACIA DO PARANÁ 3

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Prof. Dr. Wagner Antonio Chiba de Castro
UNILA

Prof. Dra. Nathalia Correa Chagas de Souza
UNILA

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

Dedico este trabalho a...

Josélia Maria das Graças Fraga (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento, vai para minha grande mãe Josélia Fraga(*in memorian*), bióloga de formação, que atuou grande parte da vida como radialista, mas sem se afastar da paixão, atuando como ativista e educadora ambiental e principalmente pelo exemplo de pessoa que foi para mim e todos outros que tiveram a benção de ter cruzado seu caminho. Sigo com o agradecimento a meu pai Sérgio Guerra, também como exemplo a ser seguido como grande ativista social que é, e na vida acadêmica como grande estudioso e professor. Aos meus dois filhos Cecília e Saulo que são hoje minhas maiores inspirações e motivos de felicidade e orgulho. São o combustível de minha esperança e perseverança. Não menos importantes, meus irmãos, Serginho, Zé, Lu, João, Guto e Ina, que mesmo de longe sempre foram porto e pilar seguro onde posso recorrer e compartilhar as alegrias e me sustentar nos tempos difíceis.

Agradeço também aos amigos de infância e aos que chegaram na vida adulta para somar, aos colegas da Biotecnologia sempre presentes no apoio acadêmico e também nas horas de diversão na UNILA ou fora dela.

Agradeço à todos os professores e professoras que fizeram parte dessa jornada, todos os servidores de convívio e “bons-dias” quase diários, que contribuem com sua parte para que a Unila continue funcionando e fazendo ciência.

Por último, porém não menos importante, à minha orientadora Professora Dra. Rafaella pelos ensinamentos, paciência, compreensão e orientações nesta jornada na microbiologia e bioinformática, e ao coorientador Professor Dr. Luiz pelos ensinamentos e orientações.

Viva a Universidade Pública, Gratuita e de Qualidade!

*“Que eu me organizando posso desorganizar
Que eu desorganizando posso me organizar.”*
Chico Science

RESUMO

Bactérias são organismos de suma importância para o correto funcionamento de biomas, atuando como reguladoras e fixadoras de nitrogênio (N), fósforo (P) e carbono (C), além de controlarem a decomposição da matéria orgânica e outros nutrientes. Entretanto, a ação antrópica figura entre os principais fatores de desequilíbrio em ecossistemas naturais, afetando diretamente as comunidades bacterianas em ambientes aquáticos, tanto lênticos quanto lóticos. Neste estudo, investigou-se a diversidade bacteriana dos afluentes do Rio Paraná por meio de DNA ambiental (eDNA) coletado em diferentes pontos do reservatório, considerando duas estações do ano (chuvosa e seca), com o objetivo de avaliar a variação espacial e sazonal dessa diversidade. Paralelamente, foram mensurados parâmetros físico-químicos da água, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), dióxido de carbono dissolvido (DCD) e turbidez. Com o uso de imagens de satélite, foi realizado um mapeamento e categorização do grau de antropização nas áreas adjacentes aos pontos de coleta. O DNA extraído das amostras foi sequenciado utilizando a tecnologia Illumina, com foco na região V3–V4 do gene 16S rRNA (*metabarcoding*), para análise filogenética das comunidades bacterianas de cada local e tempo de coleta. Os dados obtidos foram confrontados com os parâmetros físico-químicos e o grau de antropização dos locais de coleta. —A análise da diversidade microbiana dos pontos de coleta revelou padrões distintos associados ao uso do solo. Nas áreas preservadas predominam Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes, grupos relacionados à ciclagem de nutrientes. Nas áreas de uso agropecuário moderado observou-se uma composição intermediária, marcada pelo aumento de Firmicutes e redução de Actinobacteria. Já nas áreas urbanizadas, mais antropizadas, destacaram-se Cyanobacteria e Firmicutes, indicando possível influência da eutrofização e do aporte excessivo de nutrientes. Os afluentes BR_11 e BR_16 apresentaram as maiores variações microbianas entre os pontos avaliados, com BR_11 exibindo alternância sazonal entre *Rhodoluna* (indicadora de melhor qualidade ambiental) e *Polynucleobacter* (associada a enriquecimento nutricional), enquanto BR_16 mostrou sinais persistentes de eutrofização e contaminação, incluindo alta dominância de *Clostridium* no verão e presença de grupos indicadores de aporte fecal no inverno. Com isto, este estudo pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de conservação ambiental e mitigação de impactos, —ampliando o conhecimento sobre o impacto da utilização do solo em margens de ambientes aquáticos e implicações práticas para o desenvolvimento de estratégias de preservação, conservação e remediação de áreas degradadas, além de potencial bioprospecção de microrganismos de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: eDNA; NGS; bioma; lótico; bactéria, microbiologia, ambiental

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Rede de riachos mostrando os valores de ordem de cursos d'água segundo Strahler para cada segmento (pág 15)
- Figura 2** - Mapa da rede de drenagem da Bacia Hidrográfica Paraná III (BHP III) (EMBRAPA, 2021) (pág. 23)
- Figura 3** - Mapa dos pontos de coleta (BR-02 ao BR-17) nos afluentes da BHP III (pág. 25)
- Figura 4** - Distribuição relativa dos principais filos bacterianos, presentes na água dos afluentes da BHP III (BR) na coleta Inverno. (pág. 29)
- Figura 5** - Distribuição relativa dos principais filos bacterianos, presentes na água dos afluentes da BHP III (BR) na coleta Verão. (pág. 30)
- Figura 6** - Análise NMDS da comunidade de bactérias presentes na água em dos afluentes da BHP III (BR) na coleta de verão e de inverno. (pág. 32)
- Figura 7** - Diversidade Alfa dos agrupamentos de acordo com o grau de antropização dos afluentes da BHP III. A) índice de Shannon (pág. 32)
- Figura 8** - Diversidade Alfa dos agrupamentos de acordo com o grau de antropização dos afluentes da BHP III. Índice de Chao1 (pág. 32)
- Figura 9** - Análise de dissimilaridade de Bray–Curtis mostrando o agrupamento das comunidades bacterianas de acordo com o grau de antropização dos afluentes da BHP III) (pág. 33)
- Figura 10** - Análise de NMDS das comunidades bacterianas por Filo (A) e por Gênero (B), mostrando o agrupamento das amostras conforme o grau de antropização dos afluentes da BHP III nos períodos de verão e inverno. (pág. 34)
- Figura 11** - Análise Envfit-like (R^2 das Variáveis Físico-químicas) (pág. 36)
- Figura 12** - Correlações Táxons × Variáveis (Spearman). (pág. 37)
- Figura 13** - Distribuição relativa dos principais gêneros bacterianos, presentes na água dos afluentes da BHP III(BR) na coleta Inverno. (pág. 39)
- Figura 14** - Distribuição relativa dos principais gêneros bacterianos, presentes na água dos afluentes da BHP III (BR) na coleta Verão. (pág. 39)
- ANEXO A** - Figuras 01A-05A Fotos de Satélite dos pontos de coleta 01-17. (pag 51-55)
- ANEXO B** - Tabela de Parâmetros Físico-Químicos por ponto e data de coleta (pag. 56)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	13
3 DESENVOLVIMENTO	15
4 METODOLOGIA	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 PERSPECTIVAS	44
7 REFERÊNCIAS	45
ANEXO A	51-55
ANEXO B	56

1 INTRODUÇÃO

Os processos biogeoquímicos envolvem a transformação e reciclagem de substâncias orgânicas e inorgânicas, geralmente mediados por microrganismos em solo, sedimentos e água (Madsen, 2011), e como destacado por Newton et al. (2011), é evidente que as bactérias aquáticas controlam a transformação e ciclagem da maioria dos elementos biologicamente ativos nestes ecossistemas. Essas comunidades são particularmente sensíveis a alterações ambientais decorrentes de atividades humanas, como mudanças no uso do solo, aporte de poluentes e flutuações sazonais em reservatórios artificiais (Hanski et al., 2017), como o lago de Itaipu. O reservatório de Itaipu, corpo de água formado pelo barramento do Rio Paraná para a operação da Usina Hidrelétrica de Itaipu, localizada na fronteira entre Brasil e Paraguai, recebe seu aporte hídrico do Rio Paraná, que por sua vez é alimentado por riachos afluentes.

Os rios e riachos que deságuam no Rio Paraná sofrem pressões ambientais causadas por atividades humanas em suas margens, como agricultura, urbanização e despejo de efluentes. Essas alterações podem influenciar diretamente a diversidade bacteriana e os processos ecológicos essenciais. Nestes ambientes, as comunidades bacterianas aquáticas desempenham funções ecológicas de extrema importância, atuando como reguladoras dos ciclos biogeoquímicos e mantenedoras da qualidade da água (Falkowski et al., 2008). São responsáveis por grande parte da mineralização de compostos, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e potássio e ciclagem da matéria orgânica.

Estudos recentes demonstram que a composição bacteriana em ecossistemas lênticos e lóticos é moldada por uma complexa interação entre fatores abióticos (temperatura, pH, nutrientes) e pressões antrópicas (Paerl e Paul, 2012; Wang et al., 2020; Shu et al., 2020). Especialmente sensíveis a variações sazonais e parâmetros físico-químicos como pH, temperatura, oxigênio dissolvido (OD), dióxido de carbono dissolvido (DCD) e turbidez. Impactando diretamente nas comunidades bacterianas.

Neste contexto, este estudo busca investigar a diversidade bacteriana dos afluentes do Rio Paraná por meio de DNA ambiental (eDNA), coletado em diferentes pontos dos riachos nas estações chuvosa e seca. Além disso, foram analisados os parâmetros físico-químicos da água e o grau de antropização do entorno, com base em imagens de satélite. A abordagem de *metabarcoding* do gene 16S rRNA (regiões V3–V4) possibilitou uma análise filogenética detalhada das comunidades bacterianas, correlacionando-as com os fatores ambientais. A hipótese central é que a composição bacteriana varia significativamente em resposta ao grau de antropização e às condições físico-químicas, mais do que apenas pela localização espacial dos riachos.

2 JUSTIFICATIVA

A crescente pressão antrópica sobre ecossistemas aquáticos tem levado a alterações significativas na qualidade da água e na biodiversidade microbiana. O Rio Paraná, por ser um rio de grande proporção e formar o reservatório de Itaipu, —que possui múltiplos usos, incluindo geração de energia, abastecimento público e turismo, —está sujeito a impactos provenientes de atividades humanas nas margens de seus afluentes.

Essas alterações podem modificar a estrutura das comunidades bacterianas, essenciais para a ciclagem de nutrientes e a manutenção do equilíbrio ecológico. Estudos como os de Wang et al. (2020) e Shu et al. (2020) destacam que a composição bacteriana em ambientes aquáticos é influenciada por fatores como temperatura, disponibilidade de nutrientes e grau de perturbação humana.

Apesar dos avanços, ainda existem lacunas no entendimento de como a antropização afeta especificamente ambientes lóticos tropicais. Este pretendeu gerar conhecimento aplicado e atualizado que para o monitoramento e a conservação desses ambientes, alinhando ferramentas biotecnológicas às demandas ambientais regionais. Para isso, o estudo busca preencher essa lacuna ao integrar análises moleculares (*metabarcoding*), dados físico-químicos e mapeamento de uso do solo.

A identificação de padrões de diversidade bacteriana em resposta a diferentes níveis de impacto humano permitirá:

- Avaliar a saúde do ecossistema, correlacionando a microbiota com parâmetros de qualidade da água;
- Identificar bioindicadores de degradação ambiental;
- Fornecer dados científicos para o manejo sustentável de riachos;
- E servir de base para a bioprospecção de micro-organismos com potencial aplicação biotecnológica.

Assim, este estudo contribui não apenas para o avanço do conhecimento em microbiologia ambiental, mas também para a gestão de recursos hídricos e a preservação de ecossistemas aquáticos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade bacteriana de afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III em diferentes pontos de coleta, considerando variações sazonais (estações chuvosa e seca) e o grau de antropização do entorno, e correlacionar esses dados com parâmetros físico-químicos da água.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a composição bacteriana utilizando ferramentas de bioinformática (QIIME2, SILVAngs) e comparar a diversidade entre os pontos de coleta e estações do ano a partir do sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S do DNA ambiental (eDNA) das amostras de água.
2. Mapear o grau de antropização das margens do reservatório utilizando imagens de satélite.
3. Correlacionar os dados microbianos com os parâmetros físico-químicos e o grau de antropização, identificando possíveis bioindicadores de impacto ambiental.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Revisão Bibliográfica

3.1.1 Caracterização de ordem de riachos e microbiota

A caracterização de sistemas fluviais é um passo fundamental para compreender a dinâmica hidrológica, a morfologia de bacias hidrográficas e os padrões ecológicos associados. Dentre os métodos disponíveis, a caracterização ordinal de riachos é amplamente utilizada por fornecer uma medida objetiva e padronizada da hierarquia de cursos d'água (Shekar; Mathew, 2023).

O conceito de ordenação de riachos tem suas raízes no trabalho de Horton (1945), que descreveu leis empíricas para o desenvolvimento de redes de drenagem e introduziu uma classificação baseada na ramificação dos canais. Mais tarde, Strahler (1957) refinou este sistema, estabelecendo o método mais utilizado atualmente: os cursos d'água de primeira ordem são aqueles sem afluentes; a confluência de dois trechos de mesma ordem origina um curso de ordem superior, enquanto a confluência com cursos de ordem inferior não altera a ordem do canal principal (Figura 1.). Esse critério tornou-se padrão em análises hidrológicas, geomorfológicas e ecológicas em todo o mundo.

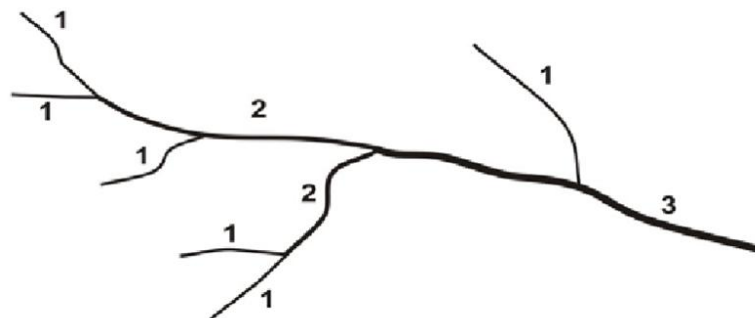


Figura 1. Rede de riachos mostrando os valores de ordem de cursos d'água segundo Strahler para cada segmento (Maddock, 2007).

A aplicação prática da ordenação permite calcular índices morfométricos, como a razão de bifurcação, o comprimento médio por ordem e a densidade de drenagem, que auxiliam na comparação entre bacias hidrográficas e na inferência sobre processos de escoamento, erosão e deposição (Moussa et al., 2009). Além disso, o advento de modelos digitais de elevação e ferramentas de geoprocessamento (SIG) possibilitou a automação da delimitação de redes hidrográficas e da aplicação da ordenação de Strahler em diferentes escalas espaciais, ampliando sua relevância em estudos ambientais (Jasrotia et al., 2013).

No campo da ecologia de riachos, a ordem do canal é frequentemente associada a mudanças longitudinais nas características físicas e químicas do ambiente aquático. Riachos de baixa ordem tendem a apresentar menor largura, maior sombreamento e maior dependência da entrada de matéria orgânica alóctone (como folhas e galhos), enquanto riachos de maior ordem apresentam maior volume de água, maior contribuição de produção primária autóctone e maior diversidade de habitats (Vannote et al., 1980).

Essas diferenças também influenciam a composição e diversidade da comunidade microbiológica aquática, que tende a variar ao longo do gradiente longitudinal dos riachos. Estudos demonstram que cursos d'água de diferentes ordens apresentam distintas estruturas microbianas, influenciadas por fatores como o tempo de residência da água, o acúmulo de matéria orgânica, e a conectividade com o solo e a vegetação ripária (Besemer et al., 2013).

No contexto brasileiro, estudos de caracterização morfométrica de bacias hidrográficas têm utilizado amplamente o sistema de Strahler, tanto para análises de vulnerabilidade ambiental quanto para monitoramento da qualidade da água em sistemas lóticos. Além disso, a ordenação fornece uma escala operacional de amostragem, permitindo organizar campanhas de coleta de dados físico-químicos e biológicos de forma sistemática (Silva et al., 2014).

Portanto, a caracterização ordinal de riachos constitui uma ferramenta essencial para integrar análises hidrológicas, geomorfológicas e ecológicas, funcionando como elo entre a estrutura física da paisagem e os processos bióticos associados. Seu uso, consolidado na literatura internacional e nacional, permanece atual e indispensável em estudos de manejo e conservação de recursos hídricos.

3.1.2 Microbiologia Ambiental de Rios e Represas

O ciclo biogeoquímico é a transformação de substâncias orgânicas e inorgânicas do ambiente, seja ele: solo, sedimentos ou ambiente aquático, através de processos bioquímicos em sua maioria mediados por microrganismos. Estes processos ocorrem por processos de oxirredução assistidos por enzimas catalíticas das substâncias presentes a fim de utilizá-las em etapas de produção de energia, metabólitos primários e secundários e regulações internas e externas dos microrganismos. Dentre os principais processos biogeoquímicos mediados por bactérias estão os ciclos do Carbono(C), Nitrogênio(N), Fósforo(P) e Potássio(K), e dos metais essenciais. (Falkowski et al., 2008)

As comunidades microbianas em ecossistemas aquáticos desempenham papéis fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, atuando na ciclagem de nutrientes, decomposição de matéria orgânica e manutenção da qualidade da água (Falkowski et al., 2008). Em rios e represas, a estrutura dessas comunidades é influenciada por fatores como a hidrodinâmica, considerando que as correntes e o tempo de residência da água afetam a dispersão microbiana (Crump et al., 2012), e pela disponibilidade de nutrientes, que pode influenciar diretamente a proliferação de

grupos favorecidos pela composição do ambiente, como as cianobactérias em ambientes com altas concentrações de nitrogênio e fósforo (Paerl et al., 2016). Estas modificações no ambiente além de favorecer alguns grupos, levam à reformulação de toda comunidade por meio de –interações bióticas, como competição e mutualismo que moldam a diversidade bacteriana (Fuhrman et al., 2015).

Estudos em reservatórios tropicais, como o de Broa (SP), demonstraram que bactérias das classes *Betaproteobacteria* e *Actinobacteria* dominam em áreas menos impactadas do ponto de vista trófico (oligotróficas), pobres em nutrientes e baixa bioprodutividade, geralmente com águas claras e pouco desenvolvimento de algas e plantas aquáticas, enquanto *Cyanobacteria* e *Bacteroidetes* são mais abundantes em condições eutróficas, ricas em nutrientes, com alta bioprodutividade, podendo apresentar baixa transparência devido ao excesso de algas, plantas aquáticas e bacterioplânctons (Pereira et al., 2021). Em rios urbanos, como o Tietê, a poluição reduz a diversidade microbiana e seleciona grupos resistentes, como *Gammaproteobacteria* (Silva et al., 2020)

3.1.3 Famílias bacterianas bioindicadoras ambientais e suas características ecológicas

O monitoramento da qualidade da água em ecossistemas lóticos e lênticos depende, tradicionalmente, de parâmetros físico-químicos e da presença de macroinvertebrados e peixes como bioindicadores. No entanto, nos últimos anos, as comunidades bacterianas têm recebido crescente atenção como bioindicadores ambientais devido à sua elevada diversidade, rápida resposta a mudanças ambientais e capacidade de metabolizar uma ampla gama de compostos químicos (ZEGGINI; YANG; NIELSEN, 2020).

As bactérias desempenham papel central nos ciclos biogeoquímicos de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, além de participarem diretamente da degradação de agrotóxicos, hidrocarbonetos, solventes e metais pesados. Dessa forma, alterações na composição e abundância de grupos bacterianos refletem com precisão a exposição a diferentes estressores ambientais (CRUMP; HOBBIE, 2005; MAHAJAN; KAUR, 2021).

Entre as vantagens do uso de bioindicadores bacterianos aquáticos estão a alta sensibilidade à poluentes em baixas concentrações, possibilitando detecção precoce de impactos ambientais e a rapidez de resposta em comparação com organismos de maior porte, permitindo análises sazonais ou mesmo em curto prazo; e especificidades funcionais, já que diferentes famílias bacterianas estão associadas a tipos distintos de contaminantes (por exemplo, pesticidas, metais pesados ou nutrientes). Assim, a análise de famílias bacterianas em ambientes aquáticos fornece informações não apenas sobre a presença de poluentes, mas também sobre processos ecológicos em curso, como degradação de compostos tóxicos e resistência a estresses ambientais (SHARMA et al., 2018). Baseado nestes conhecimentos, é de suma importância destacar os principais grupos

bacterianos que atuam como bioindicadores em ecossistemas aquáticos impactados. A estrutura e a abundância relativa de determinadas famílias bacterianas em ambientes aquáticos e terrestres podem servir como bioindicadores da presença de poluentes. Entre elas, destacam-se:

- ◊ Pseudomonadaceae

A família Pseudomonadaceae do filo Proteobacteria, inclui o gênero *Pseudomonas*, é amplamente distribuído em ambientes aquáticos e terrestres. Estas bactérias apresentam elevada versatilidade metabólica, incluindo a capacidade de degradar pesticidas, hidrocarbonetos e solventes orgânicos. A presença aumentada de *Pseudomonas* em áreas agrícolas e poluídas têm sido amplamente documentada, refletindo seu papel adaptativo frente a compostos tóxicos (SINGH; WALKER, 2006; YANG et al., 2022).

- ◊ Bacillaceae

A família Bacillaceae, filo Firmicutes, recentemente nomeado como Bacillota, representada por gêneros como *Bacillus*, é conhecida por formar endósporos resistentes e por sua ampla distribuição em solos e ambientes aquáticos. Diversas espécies são capazes de degradar organofosforados e carbamatos, funcionando como bioindicadores de áreas impactadas por agrotóxicos (KOEHLER; STEIN, 2020). Além disso, algumas linhagens de *Bacillus* possuem resistência a metais pesados, o que reforça sua associação com ambientes contaminados (GAO et al., 2021).

- ◊ Nocardioideaceae e Arthrobacteraceae

Essas famílias, incluindo os gêneros *Nocardioides* e *Arthrobacter* do filo Actinobacteria, estão associadas a solos e águas impactadas por pesticidas. Apresentam enzimas catabólicas específicas capazes de degradar herbicidas, inseticidas e compostos aromáticos (NAIR; SHUKLA; SHARMA, 2013). Sua presença elevada é frequentemente ligada a áreas agrícolas intensivas, refletindo seleção por pressão de poluentes.

- ◊ Rhodobacteraceae

Membros da família Rhodobacteraceae, filo Proteobacteria, como *Methylobacterium*, são conhecidos por sua capacidade de degradar herbicidas e por participarem de processos foto-heterotróficos em ambientes aquáticos. Essa plasticidade metabólica lhes

confere vantagem em ambientes enriquecidos por xenobióticos e nutrientes derivados da agricultura (COTTRELL; KIRCHMAN, 2016).

◊ Sphingomonadaceae e Sphingobacteriaceae

Essas famílias, também do filo Proteobacteria, reúnem bactérias especializadas na degradação de compostos aromáticos recalcitrantes, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos e poluentes industriais (WHITE et al., 1996). A abundância dessas bactérias tende a aumentar em ambientes expostos a micropoluentes agrícolas e em rios urbanos impactados (PENG et al., 2017).

◊ Cianobactérias

As cianobactérias incluem gêneros como *Nostoc* e *Microcystis*, que podem proliferar em ambientes eutrofizados, favorecidos pelo aporte de nutrientes agrícolas (N e P). Além disso, já foi relatada a sensibilidade de algumas cianobactérias à presença de pesticidas, podendo ser utilizadas como bioindicadores de poluição agrícola (MATEO et al., 2019).

3.1.4 Antropização e Suas Consequências para Biomas Aquáticos

Três fatores principais atuam como fortes direcionadores das mudanças na diversidade e função microbiana:

1. A Agricultura, Urbanização e Lançamento de Efluentes: Estas atividades são as principais fontes difusas e pontuais de poluição por nutrientes, especialmente nitrogênio (N) e fósforo (P). A agricultura intensiva utiliza fertilizantes que, carregados pela chuva, atingem os corpos d'água. Já a urbanização e os efluentes domésticos e industriais contribuem com cargas significativas de nutrientes e matéria orgânica (PAERL et al., 2016). Esse enriquecimento, conhecido como eutrofização, altera fundamentalmente a disponibilidade de recursos, favorecendo grupos microbianos oportunistas em detrimento da diversidade nativa.

2. Relação entre Uso e Ocupação do Solo e Diversidade Microbiana: O uso do solo no entorno de uma bacia hidrográfica é um preditor robusto da integridade ecológica do corpo d'água. Áreas com maior percentual de agricultura e tecido urbano estão consistentemente associadas a uma menor diversidade microbiana e a uma homogeneização da comunidade. Como observado por Read et al. (2015), a alteração do habitat terrestre leva a uma "simplificação" da comunidade microbiana aquática, onde espécies generalistas e tolerantes à poluição tornam-se dominantes, reduzindo a resiliência do ecossistema.

3. Eutrofização e Proliferação de Cianobactérias: A eutrofização, entendida como o enriquecimento excessivo de nutrientes, é um dos maiores impulsionadores da perda de

biodiversidade e do surgimento de florações de cianobactérias em ambientes aquáticos. Embora o papel clássico do fósforo como nutriente limitante chave seja inquestionável, a compreensão moderna da eutrofização reconhece a complexa interação entre N, P e outros fatores. Ho et al. (2019), em uma extensa revisão, destacam que as mudanças climáticas globais, particularmente o aumento da temperatura e a estratificação prolongada dos corpos d'água, atuam sinergicamente com a eutrofização para criar condições ideais para as cianobactérias. Esses organismos possuem adaptações únicas (como vacúolos de gás para flutuabilidade e a capacidade de algumas espécies de fixar N₂) que lhes conferem vantagem competitiva em um ambiente enriquecido e mais quente, levando a proliferação massiva e persistente de gêneros como *Microcystis*.

Dito isto, fica claro que a ação humana altera drasticamente ecossistemas aquáticos, tanto indiretamente através de desmatamento de bordas dos rios e modificação da flora marginal, reduzindo a entrada de matéria orgânica e alterando a base da cadeia alimentar microbiana (Dudgeon et al., 2006), quanto diretamente por meio de despejamento de efluentes urbanos e industriais, introduzindo massivas quantidades de bacteroidetes (ex.: *Bacteroides*) e patógenos como *Escherichia coli* termotolerantes (Savichtcheva et al., 2007). Os resíduos industriais podem também ser agentes selecionadores de bactérias resistentes como *Pseudomonas* sp. ao despejar efluentes sem o devido tratamento, adicionando metais pesados como chumbo (Pb) e cádmio (Cd) nestes biomas (Ibekwe et al., 2016).

Outras ações antrópicas muito importantes são as construções de barragens que alteram toda a região afetada, aumentando áreas alagadas e alterando velocidade e dinâmica do curso do rio favorecendo bactérias metanogênicas (e.g., *Methanosaeta*) (Deemer et al., 2016).

3.1.5 Relação entre Carga de Nutrientes, Florações (*Blooms*) tóxicas e suas consequências

A relação entre a carga de nutrientes e a ocorrência de florações (*blooms*) tóxicas é bem estabelecida, mas não é simplesmente linear. Embora a eutrofização seja um pré-requisito para blooms de alta biomassa, a proporção de cepas produtoras de toxinas dentro da população de *Microcystis spp.* pode variar. Estudos demonstram que altas concentrações de fósforo estão fortemente correlacionadas com a biomassa total de cianobactérias. No entanto, fatores como a forma de nitrogênio disponível (NH₄⁺ vs. NO₃⁻) e a relação N:P podem influenciar a toxicidade do bloom. Gobler et al. (2016) argumentam que o enriquecimento combinado de N e P, típico de esgotos e escoamento agrícola, não apenas promove a biomassa de cianobactérias, mas também pode selecionar linhagens mais tóxicas de *Microcystis spp.* Em um cenário de eutrofização, onde o N pode se tornar limitante, cepas de *Microcystis spp.* que não fixam N, mas são eficientes na aquisição de N, podem ser favorecidas, e muitas dessas cepas são produtoras de microcistina. Portanto, o controle dos blooms tóxicos depende do gerenciamento integrado de ambos os nutrientes, nitrogênio e fósforo, e não apenas do P, como se acreditava no passado.

A dominância de *Microcystis* spp. em um ecossistema aquático traz uma série de consequências negativas, tanto ecológicas quanto toxicológicas.

Consequências Ecológicas: Os blooms de *Microcystis* spp. formam uma biomassa densa na superfície da água, impedindo a penetração de luz e limitando a fotossíntese de algas submersas e macrófitas. A subsequente morte e decomposição dessa biomassa por bactérias heterotróficas consome rapidamente o oxigênio dissolvido na água, levando à formação de zonas anóxicas ou hipóxicas ("zonas mortas"). Essa condição provoca a mortandade de peixes e outros organismos aeróbicos, causando um colapso na estrutura trófica aquática (Huisman et al., 2018).

Consequências Toxicológicas: Muitas linhagens de *Microcystis* spp. são capazes de produzir um potente grupo de hepatotoxinas conhecidas como microcistinas. Estas toxinas são estáveis e podem persistir no ambiente mesmo após o colapso do *bloom*. A ingestão de água ou organismos contaminados representa um risco agudo e crônico para a saúde humana e animal, podendo causar desde danos hepáticos até promover tumores (Svirčev et al., 2019). A presença de microcistinas em reservatórios de abastecimento público é um desafio global para a segurança hídrica.

3.2 Ferramentas moleculares e bioinformáticas

O uso de DNA ambiental (eDNA) em estudos ecológicos têm revolucionado a forma de analisar comunidades microbianas, permitindo a detecção e identificação de espécies por meio de sequências genéticas sem necessidade de cultivo (Thomsen & Willerslev, 2015). Além de ampliar a compreensão da dinâmica microbiana em ecossistemas aquáticos, essa abordagem tem ganhado destaque na biotecnologia ambiental, ao possibilitar a prospecção de genes e microorganismos com potencial para aplicações em biorremediação, biodegradação e monitoramento de poluentes.

A análise de eDNA associada ao metabarcoding do gene 16S rRNA oferece uma abordagem robusta para caracterizar a diversidade bacteriana e inferir relações filogenéticas. Essa técnica utiliza regiões hipervariáveis do gene 16S para diferenciar taxonomicamente microorganismos presentes nas amostras ambientais.

O pipeline bioinformático empregado (QIIME2, SILVAngs) permite realizar etapas de controle de qualidade, agrupamento em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e análises estatísticas de diversidade alfa e beta. Essa abordagem proporciona uma visão abrangente sobre a estrutura das comunidades bacterianas e suas relações ecológicas.

3.2.1 Metabarcoding Aplicado ao Estudo de Comunidades Microbianas Aquáticas

O metabarcoding representa um avanço metodológico crucial para a caracterização de comunidades microbianas ambientais. Esta técnica baseia-se no sequenciamento em larga escala de marcadores genéticos taxonômicos, sendo o gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA) o marcador mais amplamente utilizado para estudos bacterianos (Caporaso et al., 2012).

A escolha deste gene como marcador deve-se à sua estrutura única, que combina regiões altamente conservadas, que permitem o desenho de primers universais e regiões multivariáveis (como V3-V4), que funcionam como "códigos de barras" para distinção taxonômica, é a partir da comparação das semelhanças e diferenças dela comparadas a sequenciamentos armazenados em bancos de dados que é feita a identificação de cada leitura. Esta abordagem supera as limitações dos métodos tradicionais de cultivo, revelando a verdadeira complexidade das comunidades microbianas ambientais (Newton et al., 2011). A alta sensibilidade do método permite detectar até espécies raras ou pouco abundantes, proporcionando uma visão abrangente da diversidade bacteriana em ecossistemas aquáticos. Por estas características esta tecnologia tem sido utilizada para caracterização de comunidades bacterianas para análises e monitoramentos ambientais (Wang et al., 2020).

3.3 Afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III

A Usina Hidrelétrica de Itaipu (25°24'28"S, 54°35'24"W) é uma hidrelétrica binacional localizada no Rio Paraná, na fronteira entre o Brasil e o Paraguai. A área de pesquisa nas microbacias hidrográficas que drenam para o reservatório Itaipú-Binacional foi apresentada na Figura 02. Entre os principais rios que integram essa bacia destacam-se o Rio São Francisco, cujo curso tem origem no município de Cascavel, e o Rio Guaçu, que nasce no município de Toledo. Outro rio de relevância é o Rio São Francisco Falso, composto pelos braços Norte e Sul, responsável por drenar parte do Subplanalto São Francisco antes de desembocar no reservatório. O Rio Ocoí, embora de menor porte, também contribui significativamente para a drenagem regional, direcionando suas águas ao Lago de Itaipu. Além desses cursos principais, a Bacia Paraná III inclui diversos rios de menor extensão, entre eles o Rio Taturi, o Rio Chororó e o Rio São Vicente, que, em conjunto, formam uma rede de drenagem essencial para o equilíbrio hidrológico e ambiental da região.

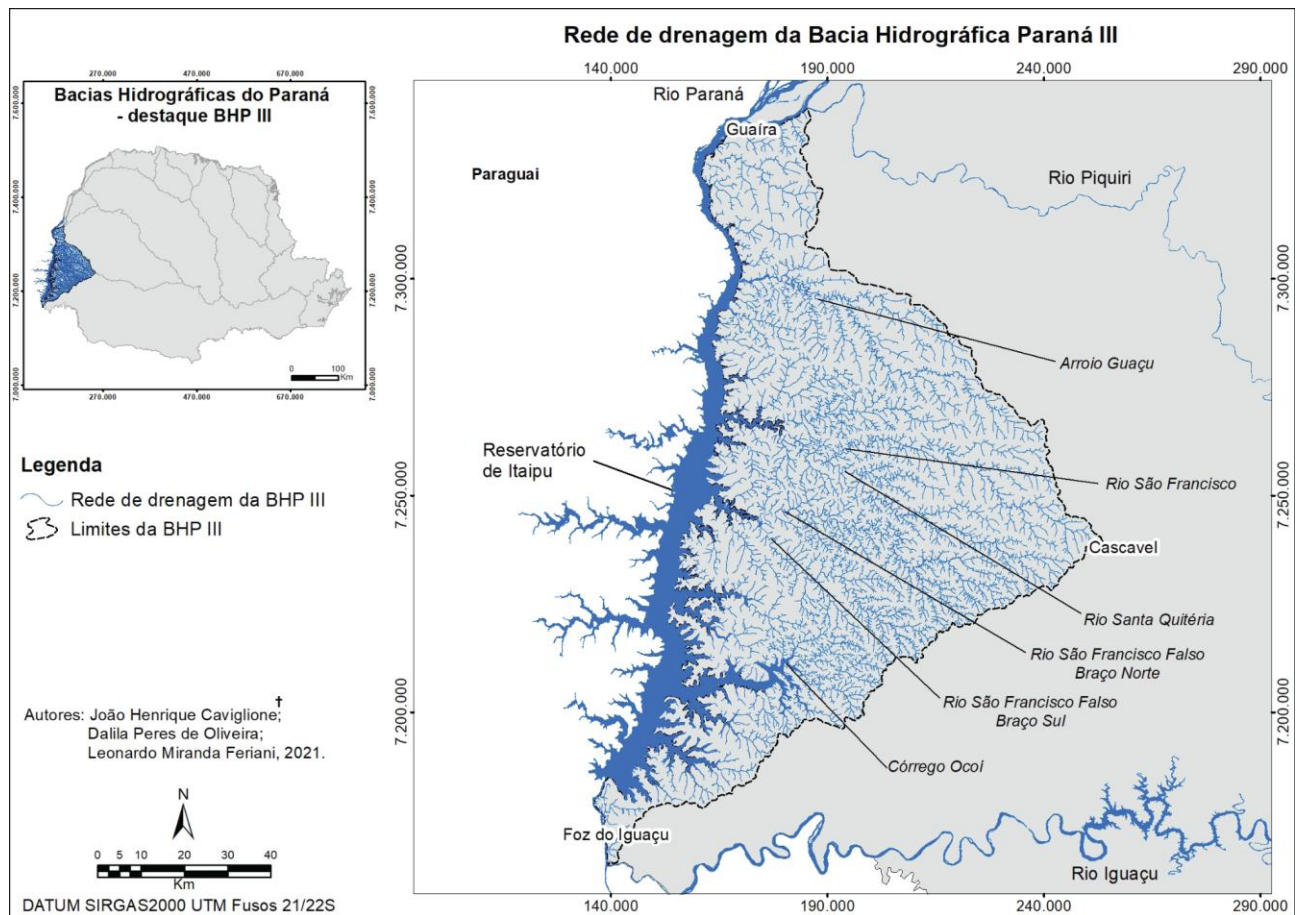


Figura 2. Mapa da rede de drenagem da Bacia Hidrográfica Paraná III (BHP III) (EMBRAPA, 2021)

A margem brasileira pertence à Bacia Hidrográfica do rio Paraná 3 (BP3), mesorregião do Oeste do Paraná, com aproximadamente 8.000 km² e 28 municípios que totalizam uma população de 997.721 habitantes (IBGE, 2010; Rocha & Bade, 2018). O clima na região é subtropical úmido mesotérmico, classificado por Köppen como Cfa, apresentando amplitudes térmicas anuais com cerca de 11°C de diferença média entre o inverno e verão devido à influência reduzida da maritimidade. Apresenta verão com máximas médias em torno dos 33°C e inverno ameno porém com quedas bruscas de temperaturas que podem cair abaixo de zero durante a passagem de frentes frias de massas de ar polar. A precipitação anual é de aproximadamente 1.800 mm, com poucas flutuações ao longo do ano e redução no inverno (Castaño et al., 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em afluentes do reservatório de Itaipu, localizados na região Oeste do Paraná. O clima da região é subtropical úmido (Cfa, segundo Köppen), com verões quentes e invernos amenos. A média anual de temperatura é de aproximadamente 22 °C, e a precipitação média anual é de cerca de 1.600 mm. As coletas foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Luiz Henrique Garcia Pereira entre 2021 e 2022 em duas campanhas distintas: uma durante o período chuvoso (verão - dezembro de 2021) e outra no período seco (inverno - agosto de 2022), permitindo avaliar variações nas condições ambientais e na diversidade bacteriana. Os pontos de coleta foram distribuídos em diferentes áreas representativas dos níveis de antropização, previamente identificados por meio de análise de uso e ocupação do solo.

Foram selecionados doze pontos de coleta (figura 3), nomeados conforme a codificação BR-01 a BR-17, abrangendo áreas com diferentes graus de impacto antrópico:

- Grupo A (verde): áreas preservadas, com vegetação nativa e/ou pastagem com baixo nível de interferência humana;
- Grupo B (amarelo): áreas de uso agropecuário moderado;
- Grupo C (vermelho): áreas de maior impacto antrópico, com práticas agrícolas intensivas.

O mapeamento foi realizado com base em imagens de satélite de alta resolução, classificadas quanto ao uso do solo por meio de softwares de geoprocessamento (QGIS e Google Earth Pro).

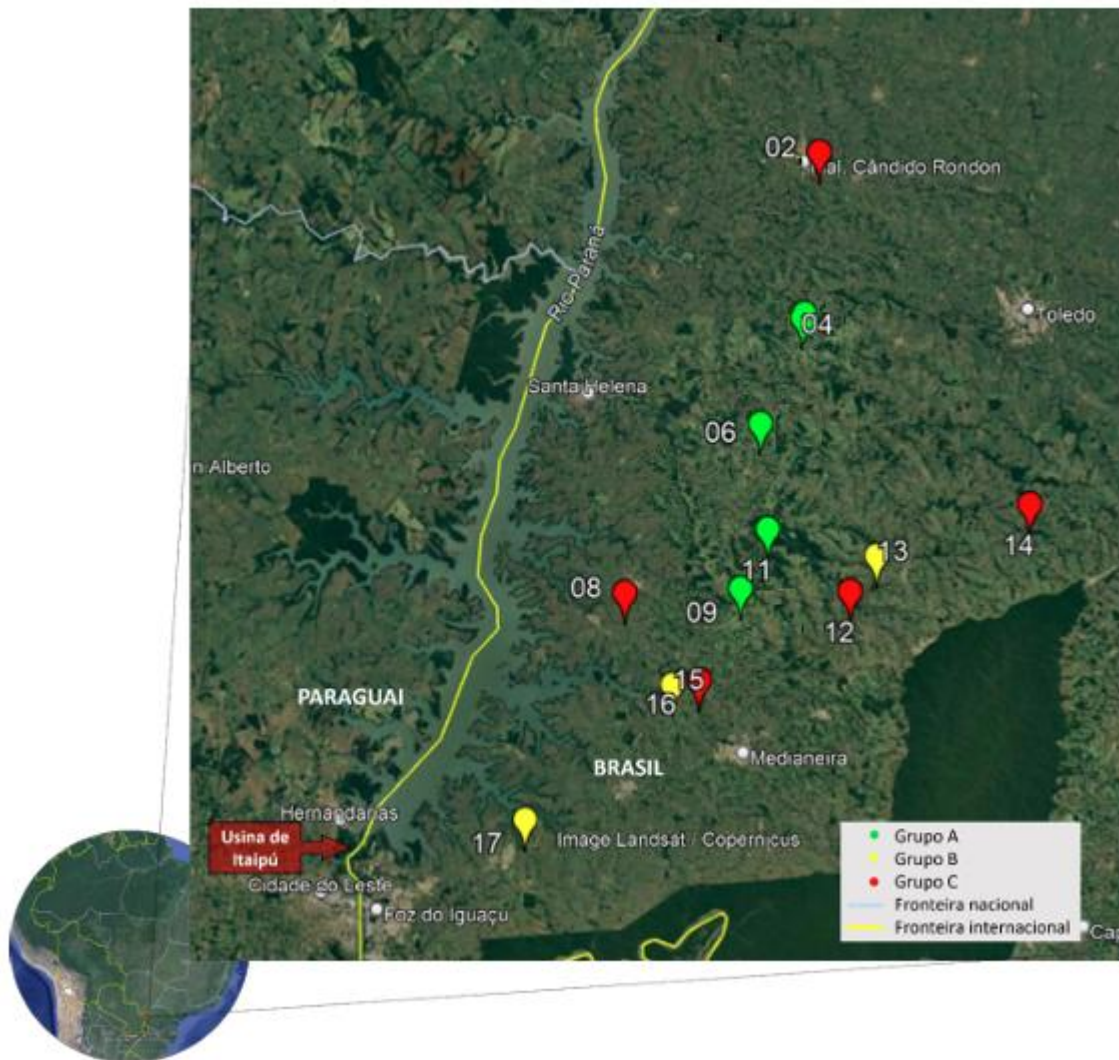


Figura 3. Mapa dos pontos de coleta (BR-02 ao BR-17) nos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III, classificados segundo o grau de antropização. Verde: áreas preservadas (Grupo A); Amarelo: uso misto (Grupo B); Vermelho: áreas impactadas (Grupo C). Fonte: Relatório final**** (2025).

4.1.1 Pontos de coleta que tiveram rDNA(v3-v4) amplificados e parâmetros físico-químicos aferidos para análises:

Pontos: 02, 04, 06, 08, 09, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17

4.1.2 Por grupo de utilização do solo:

Grupo A: 04, 06, 09, 11

Grupo B: 13, 16, 17

Grupo C: 02, 08, 12, 14, 15

Fotos de cada ponto com imagens aproximadas de Satélite no Anexo A

4.2 Coleta de amostras

As amostras de água foram filtradas em campo, com o uso de bomba peristáltica portátil seguindo o protocolo desenvolvido pelo laboratório de Biodiversidade e Ecologia Molecular (Labem) da UNILA, descritos a seguir: Foram filtrados em campo, usando um filtro de 0,7 um, 1,2 L de água do riacho, os quais foram acondicionadas em frasco âmbar estéril. Em seguida, foi realizada uma segunda filtragem, da água pré-filtrada em com filtro de 0,45 um. Ambos os filtros foram acondicionados em frasco âmbar estéril e mantidos sob refrigeração até a chegada ao laboratório, onde foram acondicionados em freezer -20 °C até o momento da análise. Durante as coletas, foram medidos *in situ* os seguintes parâmetros físico-químicos com a sonda Horiba-U51: Temperatura (°C), ; pH, ; Oxigênio dissolvido (OD), ; Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), ; Turbidez (NTU), ; Dióxido de carbono dissolvido (DCD), . Os valores médios e desvios-padrão desses parâmetros foram posteriormente analisados estatisticamente para identificar diferenças significativas entre grupos e estações do ano. Tabela de parâmetros físico-químicos por ponto de coleta e data no ANEXO B (pág. 56).

4.3 Extração, Amplificação, Sequenciamento do eDNA

Para as etapas de extração, amplificação, sequenciamento e processamento inicial de dados brutos, contratou-se uma empresa especializada, considerando sua expertise e o custo relativamente baixo por amostra. A empresa BPI Biotecnologia (Botucatu, SP, Brasil) foi selecionada para execução destes procedimentos. Os frascos âmbar contendo os filtros com as amostras de eDNA foram enviados à empresa sob refrigeração (~10 °C).

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research cat. D6005), conforme protocolo do fabricante. Partes iguais de cada filtro (0,7 e 0,45 um) foram utilizadas para formar uma amostra composta, respeitando o volume máximo recomendado pelo protocolo. O eDNA extraído foi quantificado por fluorescência utilizando o Fluorômetro Qubit® 3.0 e o kit de ensaio Qubit™ dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific).

A amplificação ocorreu utilizando os primers universais para região V3/V4 para bactérias, já padronizado pela BPI Biotecnologia. Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com Red Gel 0,03% (v/v) e quantificados por fluorescência, utilizando o Fluorômetro Qubit® 3.0 e o kit de ensaio Qubit™ dsDNA BR (Thermo Fisher Scientific). Subsequentemente, iniciou-se a construção da biblioteca de NGS/*metabarcoding*.

A reação de indexação foi realizada, inserindo os indexadores nos adaptadores universais, necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras, seguindo o

protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). Em seguida, a biblioteca foi amplificada conforme o seguinte programa: incubação a 72°C por 3 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, seguida de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em um Termociclador Veriti™ (Applied Biosystems). As bibliotecas geradas foram submetidas a etapas de purificação utilizando esferas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) para remover fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e resíduos de primers. Posteriormente, realizou-se a quantificação por PCR em tempo real utilizando o kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit - Illumina/Universal), conforme protocolo do fabricante. Um pool de DNA equimolar foi gerado normalizando todas as amostras para 4 nM, procedendo-se ao sequenciamento utilizando o sistema de sequenciamento de nova geração Illumina MiSeq (Illumina® Sequencing) e três unidades do kit de reagentes MiSeq v2 500 ciclos (reads de 2 x 250 pb) com 20% de Controle de Sequenciamento PhiX V3 (Illumina).

4.5 Processamento bioinformático

O pipeline de análise foi conduzido no software QIIME2 (v.2024.2). As etapas incluíram: Demultiplexagem e filtragem de qualidade com DADA2; Agrupamento em OTUs a 97% de similaridade; Atribuição taxonômica utilizando o banco de dados SILVA (v.138); Cálculo de índices de diversidade alfa (Shannon, Simpson, Chao1) e beta (Bray-Curtis); Análise de ordenação (NMDS e PCA) para visualização de padrões de similaridade entre amostras; Testes estatísticos (ANOSIM e PERMANOVA) para verificar diferenças significativas entre grupos.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R (v.4.3.2) e PAST (v.4.11). As diferenças entre grupos foram testadas por meio de ANOVA unifatorial e teste de Kruskal-Wallis, conforme a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk). As correlações entre variáveis ambientais e grupos bacterianos foram avaliadas pelo coeficiente de Spearman (ρ). A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coleta Verão um total de 754519 transcritos foram gerados a partir das 12 amostras que após processamento de qualidade (filtragem, denoising e remoção de quimera), foi reduzido a um conjunto final com 250269 de sequências para a fitas *forward*, as quais foram agrupadas em 10.377 OTUs, e após descartar as OTUs com uma ocorrência menor que 10 reads, 2.529 OTUs foram mantidas. Para a coleta de Inverno 754940 transcritos foram gerados desde a partir das 12 amostras, que após processamento de qualidade (filtragem, denoising e remoção de quimera), foi reduzido a um conjunto final com 384010 de sequências para a fitas *forward*, as quais foram agrupadas em 10.428 OTUs, e após descartar as OTUs com uma ocorrência menor que 10 reads, 3.939 OTUs foram mantidas.

5.1 Taxonomia dos OTUs

Na coleta realizada no inverno, dentre os 7404 OTUs foram identificados 45 filos (Figura 4) com *cutoff* de 5 reads. Observa-se que a maioria das amostras é dominada principalmente pelos filos Proteobacteria, Actinobacteriota, Cyanobacteria e Firmicutes, embora com variações entre os pontos de coleta. Filos como Verrucomicrobiota, Planctomycetota, Chloroflexi, Bdellovibrionota, Bacteroidota e Patescibacteria aparecem em menores proporções, mas sua presença é ecologicamente relevante (Saneha, 2023). Esses grupos estão associados a: degradação de compostos refratários; processos de nitrificação/denitrificação; interação predatória (caso dos Bdellovibrionota); ciclagem de nutrientes.

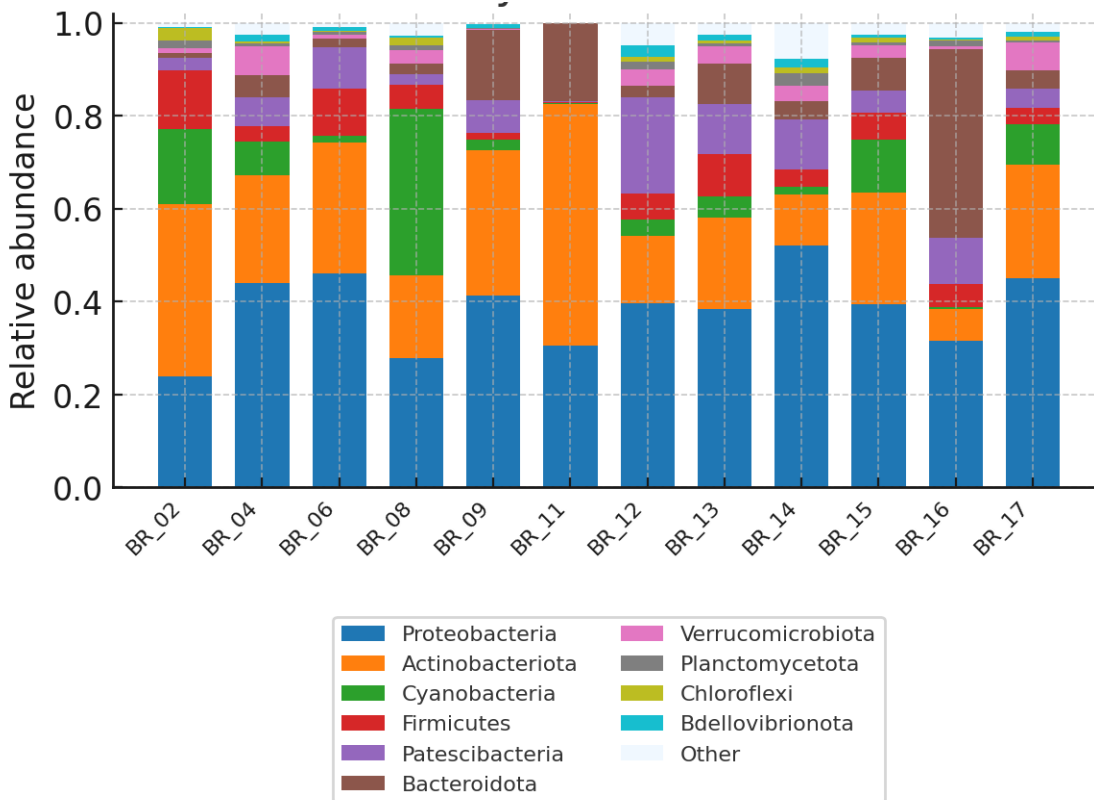


Figura 4. Distribuição relativa dos principais filos bacterianos, presentes na água dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III (BR) na coleta Inverno.

Nota-se uma variação clara entre as amostras (BR_02 a BR_17), o que sugere influência de fatores ambientais locais, tais como: proximidade de fontes de nutrientes, características físico-químicas do ambiente, impactos antrópicos, micro-habitats específicos. O ponto BR_11 apresentou predominância de Actinobacteria. O ponto BR_16 mostrou um aumento expressivo de Bacteroidota e outros filos associados à degradação de matéria orgânica, sugerindo possivelmente maior aporte de detritos ou condições mais eutrofizadas (Chen, 2019).

Na coleta realizada no verão, dentre os 2.529 OTUs foram identificados 36 filos (Figura 5) com o *cutoff* de 5 reads. Destacam-se as variações nos pontos BR_06, BR_11, novamente, e BR_12 com predominância de Actinobacteria e BR_16 com aumento expressivo de Firmicutes.

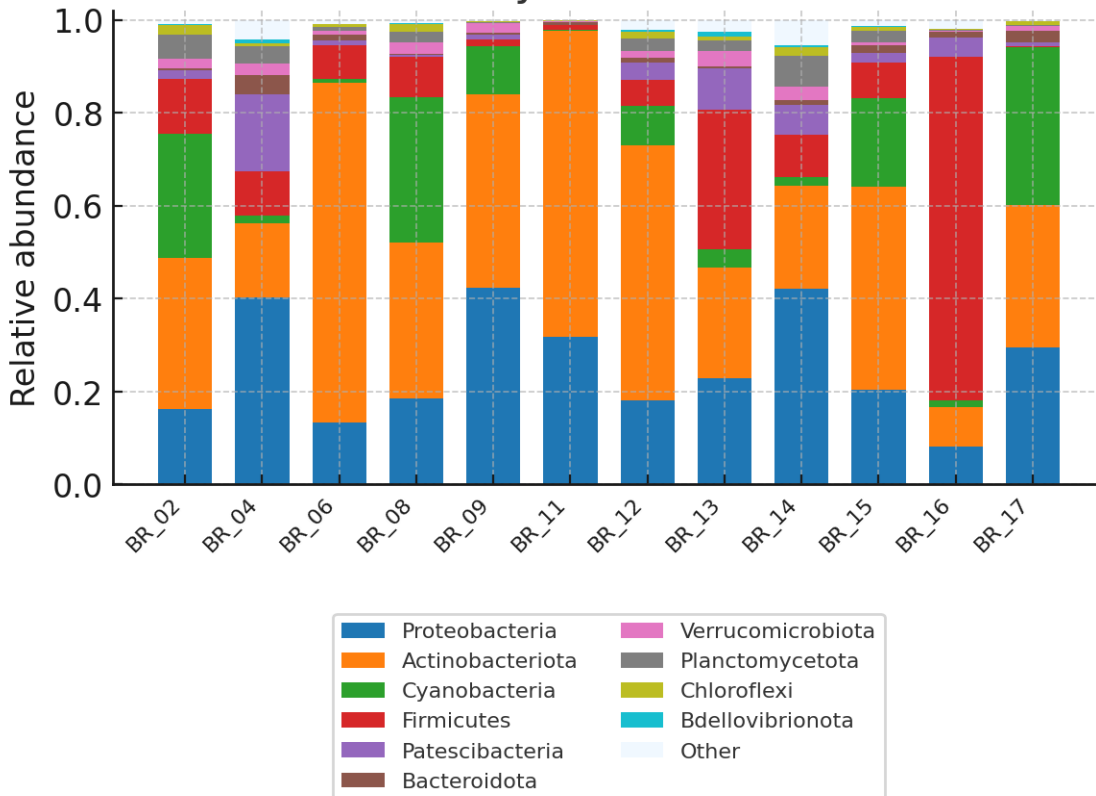


Figura 5. Distribuição relativa dos principais filos bacterianos, presentes na água em dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III (BR) na coleta Verão.

Conforme a figura 6, de modo geral, a coleta de estação seca (representada como inverno) apresentou uma comunidade mais estável e dominada majoritariamente por Proteobacteria, indicando condições mais homogêneas e possivelmente menor disponibilidade de nutrientes. Já na estação chuvosa (representada como verão) exibiu maior diversidade e heterogeneidade entre os pontos, com aumento expressivo de Actinobacteriota, Cyanobacteria e Bacteroidota, indicando intensificação da atividade biológica, maior produtividade primária e possíveis sinais de eutrofização em pontos específicos (ex.: BR_16). As diferenças sazonais observadas refletem mudanças físico-químicas típicas entre os períodos frio e quente, que modulam a estrutura e função da microbiota aquática (Chen, 2019).

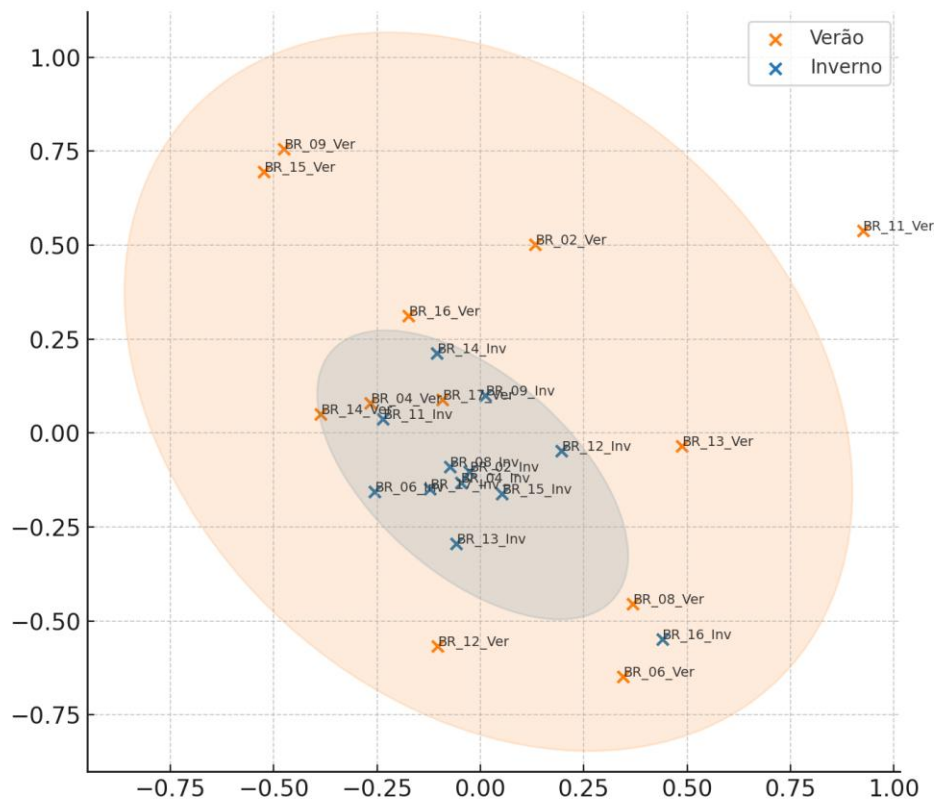


Figura 6. Análise NMDS da comunidade de bactérias presentes nos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III (BR) na coleta de verão e de inverno.

5.2 Diversidade Alfa e Agrupamento de acordo com o grau de antropização

A análise da diversidade alfa foi realizada a partir do agrupamento de acordo com o grau de antropização usando os índices de Shannon e Chao1 (Figura 7 e 8). Os resultados permitem avaliar tanto a diversidade (Shannon) quanto a riqueza estimada de espécies (Chao1) entre os grupos. O índice de Shannon reflete tanto o número de espécies quanto a uniformidade de suas abundâncias e com base na análise a diversidade é mais estável e consistente em áreas preservadas (Grupo A), diminuindo em áreas com uso agropecuário moderado (Grupo B). O Grupo C apresenta valores de Shannon consistentemente menores e com pouca variabilidade, refletindo uma comunidade microbiana empobrecida e homogênea, típica de ambientes sob forte impacto antrópico. Em contraste, o Grupo A exibe maior diversidade e maior variabilidade natural, característica de ecossistemas mais complexos e estruturalmente estáveis. Já o índice de Chao1 indica áreas preservadas ricas e estáveis; áreas agropecuárias moderadas mostram empobrecimento microbiano; áreas de alto impacto (Grupo C), apresentam em geral menor riqueza local, mas de forma instável e associada a distúrbios ecológicos.

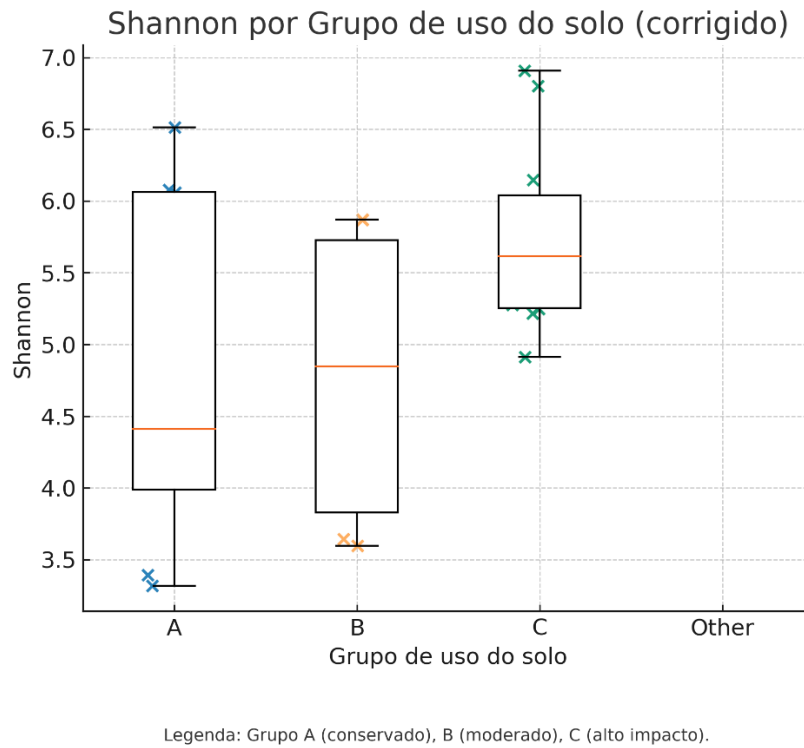


Figura 7. Diversidade Alfa dos agrupamentos de acordo com o grau de antropização dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III. A) índice de Shannon

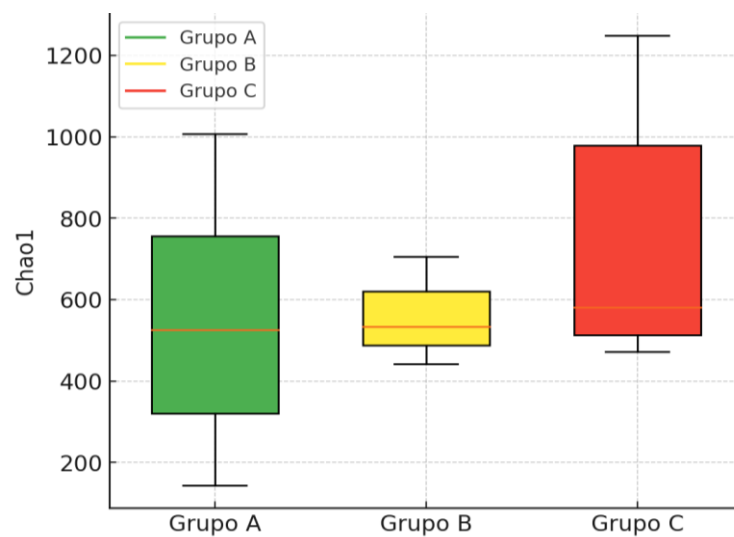


Figura 8. Diversidade Alfa dos agrupamentos de acordo com o grau de antropização dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III. Índice de Chao1

5.4 Diversidade Beta

A análise de diversidade beta revelou diferenças marcantes entre os grupos de uso do solo. A matriz de distâncias Bray–Curtis (Figura 9) destaca elevada coesão interna no Grupo A, sugerindo comunidades mais estáveis e homogêneas. Em contraste, amostras do Grupo C apresentaram maior dispersão, indicando heterogeneidade microbiana, possivelmente decorrente de estressores ambientais associados a áreas agrícolas. Esses padrões são consistentes com estudos que demonstram que a intensificação do uso do solo resulta em aumento da variabilidade ambiental, o que promove comunidades mais divergentes e sujeitas a flutuações (Lozupone & Knight, 2007; Rodrigues et al., 2013).

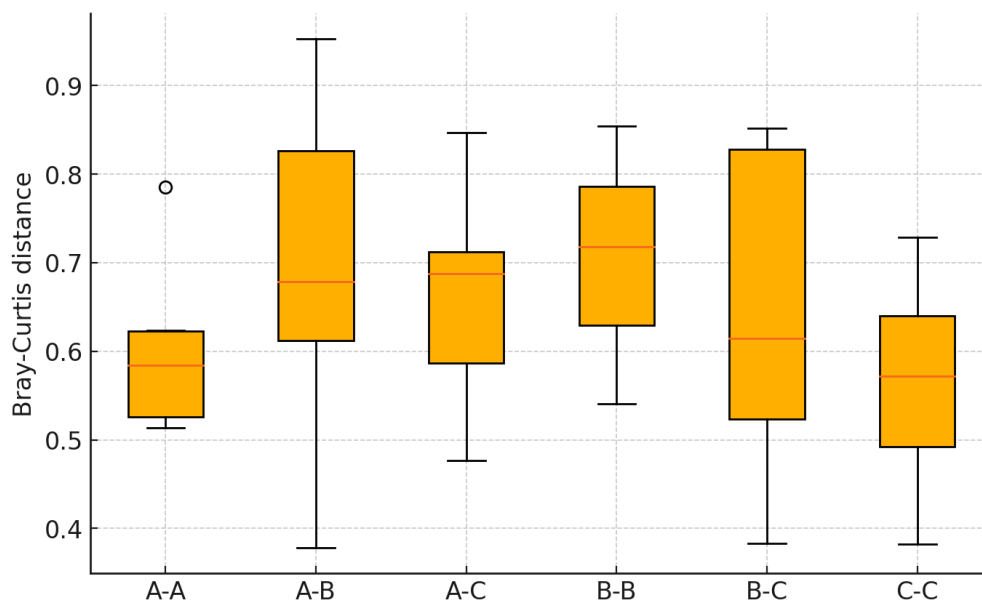


Figura 9. Análise de dissimilaridade de Bray–Curtis mostrando o agrupamento das comunidades bacterianas de acordo com o grau de antropização dos afluentes da BHP III.

O NMDS baseado em distâncias Bray–Curtis (Figura 10) apresentou stress adequado, indicando boa representação da estrutura das comunidades bacterianas no espaço multidimensional. A separação entre grupos A, B e C foi evidente, sugerindo forte influência do uso do solo sobre a composição microbiana. Esse comportamento é amplamente reportado em estudos de rios e reservatórios impactados (Merbt et al., 2017; Ruiz-González et al., 2015).

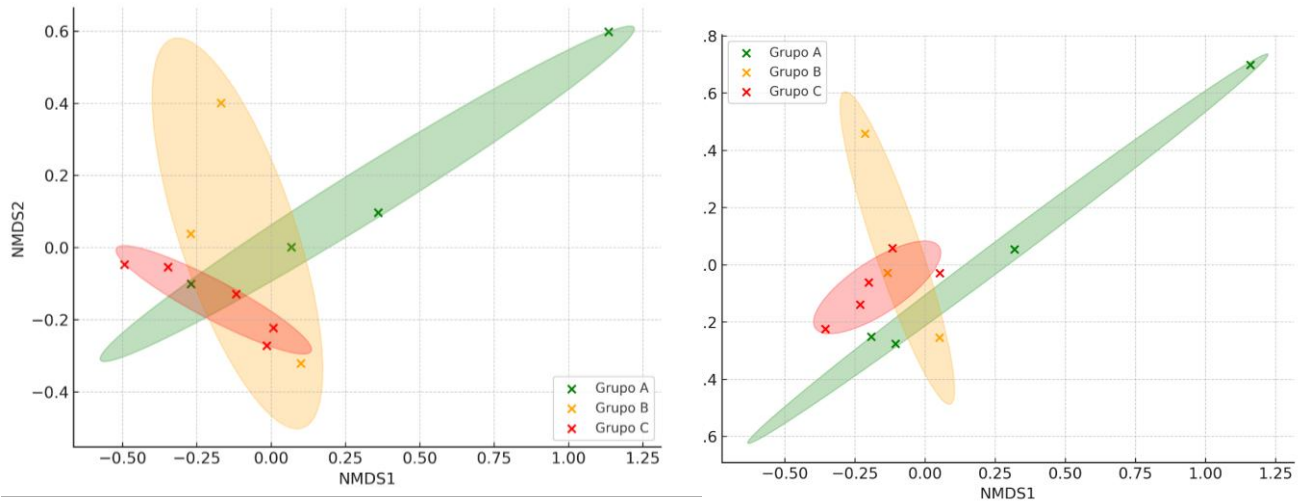


Figura 10. Análise de NMDS das comunidades bacterianas por Filo (A) e por Gênero (B), mostrando o agrupamento das amostras conforme o grau de antropização dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III nos períodos de verão e inverno.

Conforme figura 7, no Grupo A, destacaram-se táxons típicos de ambientes oligotróficos, como membros de Actinobacteria e Verrucomicrobia, frequentemente associados a águas limpas (Newton et al., 2011). No Grupo C, houve aumento de representantes de Proteobacteria e Bacteroidota, táxons amplamente documentados como indicadores de impacto urbano e agrícola (Ghai et al., 2011; Sun et al., 2022). Táxons sensíveis à sazonalidade apresentaram variação entre inverno e verão, reforçando que tanto clima quanto uso do solo moldam a comunidade microbiana.

Ao analisar a diversidade microbiana dos pontos de coleta (Figura 4 e 5) tendo em mente o uso de solo dos mesmos (Grupo A: 04, 06, 09, 11; Grupo B: 13, 16, 17; Grupo C: 02, 08, 12, 14, 15) foram revelados padrões distintos de diversidade e composição taxonômica. Nos pontos do Grupo A (áreas preservadas), predominam Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes, grupos amplamente associados à ciclagem de nutrientes e ao equilíbrio ecológico (Zhang, 2018). Nas áreas intermediárias (Grupo B, uso agropecuário moderado), observou-se uma transição na composição microbiana, com aumento de Firmicutes e redução de Actinobacteria. Por fim, nas áreas fortemente antropizadas (Grupo C, urbano), destacaram-se Cyanobacteria e Firmicutes, associadas à eutrofização e à presença de nutrientes em excesso, provavelmente do uso intensivo de insumos agrícolas.

Esses resultados reforçam a hipótese de que a diversidade bacteriana é diretamente afetada pelo grau de antropização. Ambientes conservados tendem a sustentar comunidades mais equilibradas e funcionais, enquanto ecossistemas degradados são dominados por grupos oportunistas, com menor diversidade e redundância funcional. A diversidade alfa revelou

padrões espaciais e sazonais consistentes com o gradiente de impacto antrópico observado nos locais de amostragem. As coletas de riachos de áreas mais preservadas (Grupo A), caracterizados por menor interferência humana, apresentaram os maiores valores de Shannon e Chao1, indicando maior diversidade e riqueza estimada. Esse comportamento é amplamente documentado na literatura, onde ambientes menos perturbados tendem a manter comunidades microbianas mais complexas e estáveis (Newton et al., 2011; Jiao & Lu, 2020).

Por outro lado, pontos do Grupo C, localizados em áreas mais antropizadas, exibiram redução significativa na riqueza localmente, porém diferenciando-se mais entre si, aumentando a riqueza do grupo, . Esse padrão é frequentemente associado ao aumento de nutrientes antropogênicos, poluentes orgânicos ou micropoluentes emergentes, que favorecem grupos taxonômicos mais tolerantes e reduzem a diversidade total (Barberán et al., 2012; Sun et al., 2022).

A sazonalidade também desempenhou papel relevante. Amostras coletadas no verão apresentaram maior diversidade média em comparação ao inverno, o que possivelmente reflete maior produtividade primária, temperaturas mais elevadas e condições ambientais mais favoráveis ao crescimento bacteriano (Crump et al., 2003; Fortunato et al., 2013).

5.5 Integração Físico-químicos × Metagenômica

A integração entre variáveis físico-químicas e dados metagenômicos mostrou relações fortes entre características ambientais e estrutura microbiana (Figura 11). Parâmetros como condutividade e sólidos totais dissolvidos (STD) apresentaram elevados valores de R^2 nos testes permutacionais, indicando forte acoplamento ambiental. Esses resultados são consistentes com evidências de que variáveis relacionadas à mineralização da água e entrada de poluentes são importantes determinantes da estrutura microbiana (Staley et al., 2015; Savio et al., 2015).

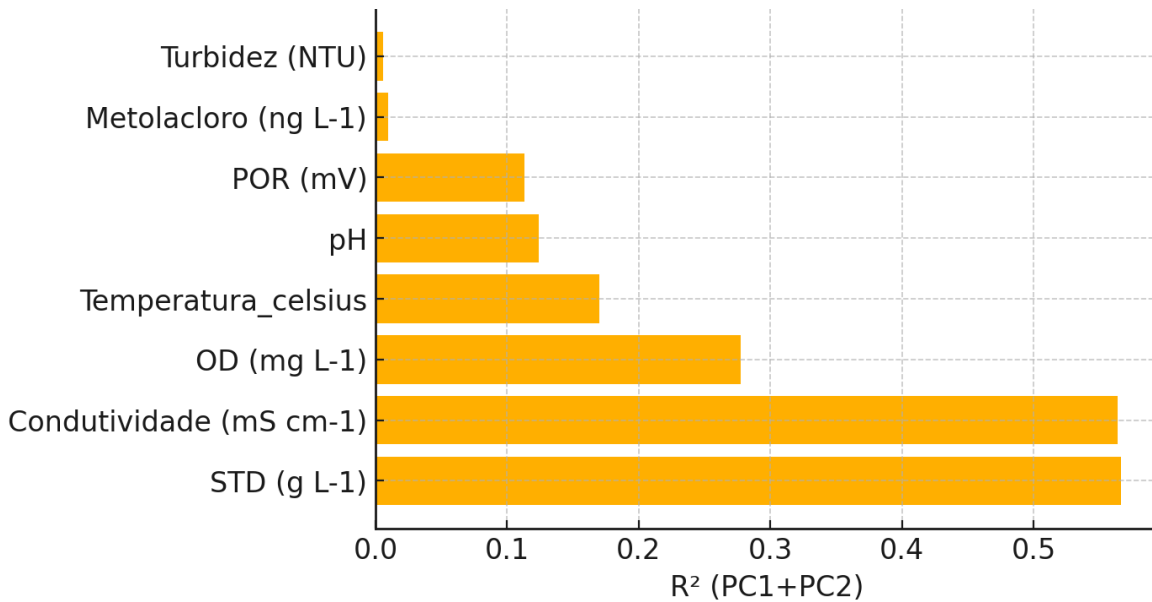


Figura 11. Análise Envfit-like (R^2 das Variáveis Físico-químicas)

Em geral, observou-se que áreas mais impactadas (Grupo C) apresentaram pH mais baixo, maior turbidez e menores concentrações de OD, enquanto áreas preservadas (Grupo A) mostraram condições mais estáveis e valores mais próximos de pH neutro. Essas diferenças estão associadas ao aporte de matéria orgânica e nutrientes provenientes de atividades agrícolas e urbanas, que aumentam a carga de carbono e reduzem a disponibilidade de oxigênio. Resultados semelhantes foram relatados por Huszar et al. (2021) e Shu et al. (2020), que relacionaram ambientes eutrofizados à redução da diversidade bacteriana e aumento de grupos oportunistas.

As correlações de Spearman (Figura 12) apontaram táxons que respondem positivamente aos impactos (por exemplo, Gammaproteobacteria) e táxons que diminuem em abundância com o aumento da interferência antrópica, atuando como bioindicadores de qualidade ambiental (Ortiz-Alvarez & Casamayor, 2016).

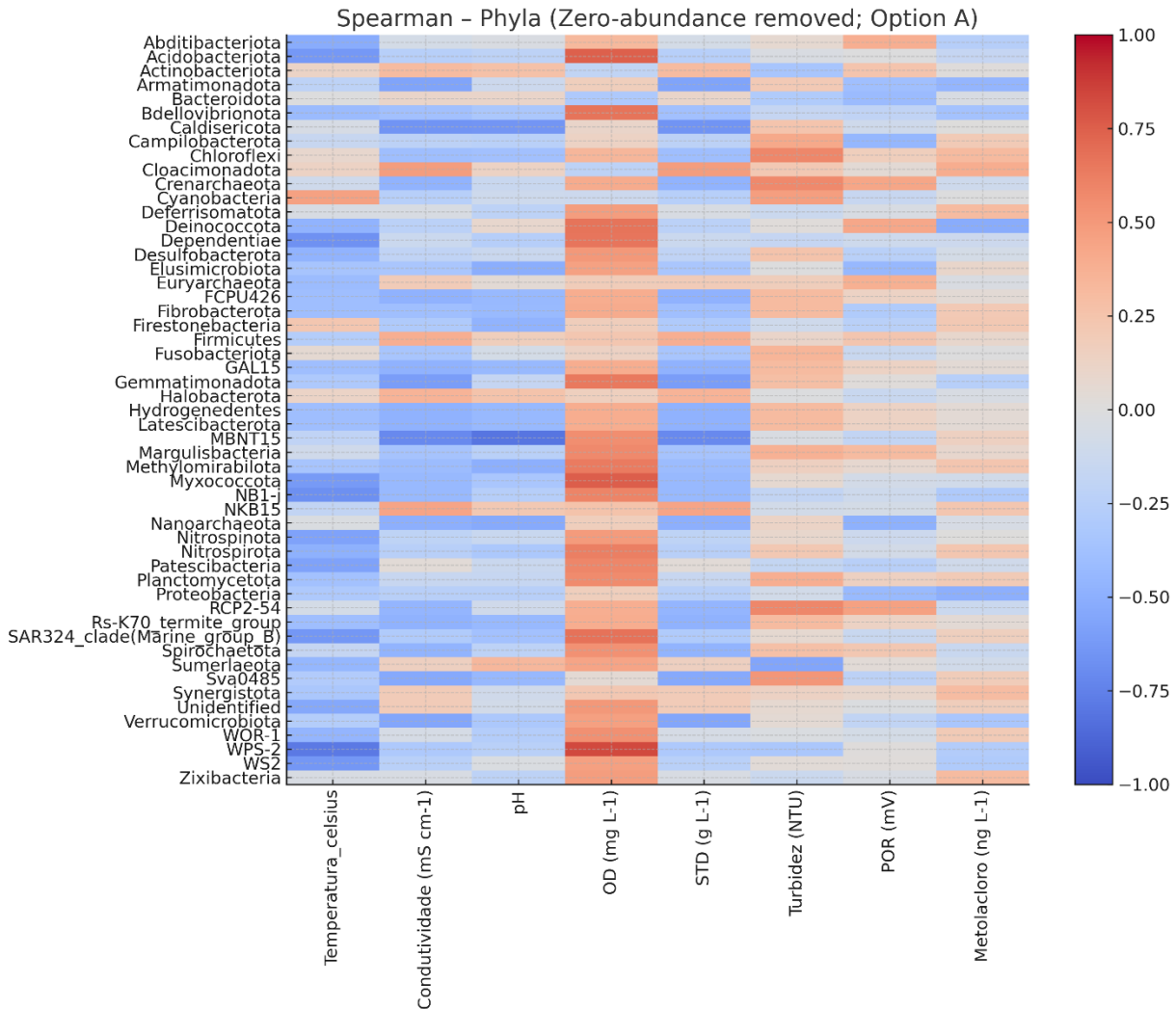


Figura 12. – Correlações Táxons × Variáveis (Spearman)

5.6 Afluentes BR_11 e BR_16

Os afluentes BR_11 e BR_16 mostraram a maior variação microbiana e a avaliação da diversidade microbiana com seus respectivos grupos de utilização do uso do solo revelou que, mesmo dentro de ambientes semelhantes em termos de ocupação, alguns pontos apresentam condições físico-químicas suficientemente distintas para promover alterações expressivas na comunidade microbiana. No Grupo A (BR_04, BR_06, BR_09 e BR_11), o ponto BR_11 apresentou valores mais elevados de nutrientes nitrogenados, sobretudo nitrato e nitrogênio total, acompanhados por maior potencial de oxirredução e concentrações detectáveis de herbicidas agrícolas (principalmente metolacoloro e DEA). Esses fatores sugerem um aporte mais ativo de compostos nitrogenados e micropoluentes, possivelmente derivados de manejo agrícola localizado,

drenagem superficial ou fontes pontuais. Ambientes com maior disponibilidade de nitrogênio tendem a favorecer filos associados à ciclagem biogeoquímica do elemento, resultando em uma estrutura microbiana distinta mesmo diante de uso do solo semelhante aos demais pontos do grupo.

Durante o verão, essas diferenças físico-químicas se tornam mais evidentes, sugerindo que períodos mais quentes podem intensificar transformações bioquímicas, acelerar o metabolismo bacteriano e favorecer organismos com maior capacidade para a degradação de compostos orgânicos, herbicidas ou resíduos nitrogenados. No inverno, embora as diferenças físico-químicas se tornem mais sutis, o ponto BR_11 continua apresentando singularidade em termos de turbidez, potencial redox e resíduos de herbicidas, indicando um microambiente persistente ao longo das estações.

Contudo, conforme figuras 13 e 14, a maior variação taxonômica do aflente BR_11 é a presença do gênero *Rhodoluna* spp. *Rhodoluna* spp. é uma bactéria aeróbica de água doce cuja abundância está fortemente relacionada a parâmetros de qualidade da água, especialmente ao oxigênio dissolvido (Wu et al., 2019). Interessantemente, em rios poluídos ou com “água preta e odor desagradável”, a abundância de *Rhodoluna* tende a ser baixa devido aos baixos níveis de oxigênio e às altas cargas de matéria orgânica e nutrientes, que favorecem microrganismos anaeróbios e tolerantes à poluição (Wu et al., 2019). Quando a qualidade da água melhora, por exemplo, após tratamentos que aumentam o oxigênio dissolvido e reduzem poluentes químicos, as populações de *Rhodoluna* aumentam significativamente, juntamente com outras bactérias aeróbicas e funcionais (Wu et al., 2019). Estudos mostram que *Rhodoluna* se torna mais dominante após ações de mitigação da poluição, como o uso de tecnologia de micro e nanobolhas, que eleva rapidamente o oxigênio e reduz a demanda química de oxigênio e a amônia (Wu et al., 2019). Assim, a presença de *Rhodoluna* é considerada um indicador de condições mais saudáveis e menos poluídas em rios, estando associada à restauração de comunidades microbianas aeróbicas.

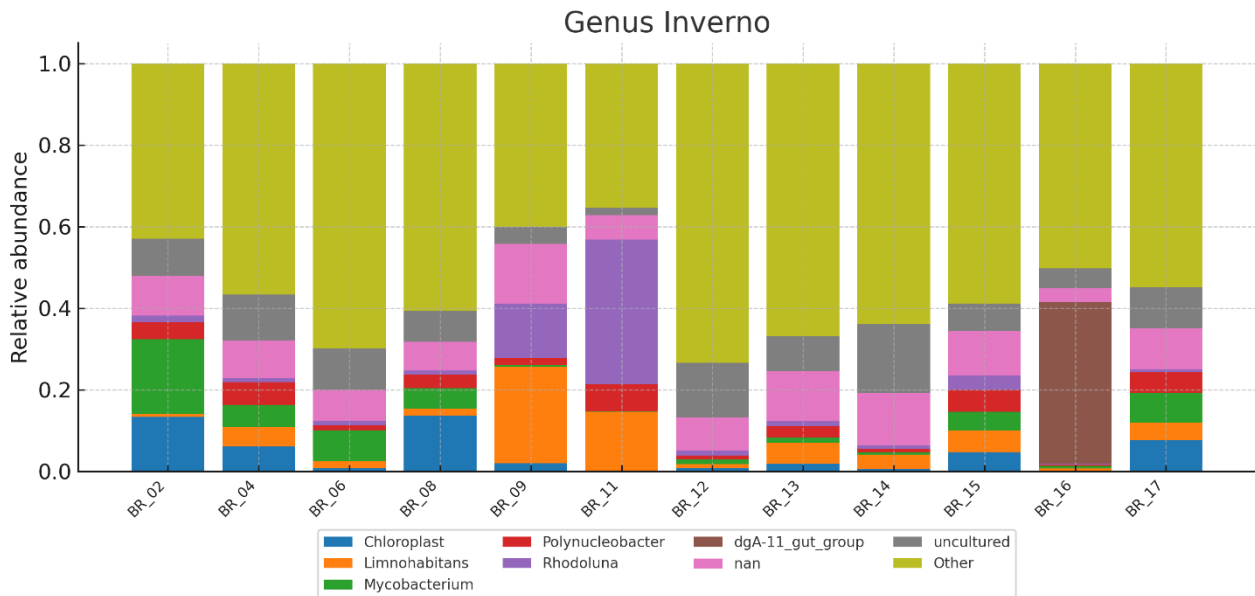


Figura 13. Distribuição relativa dos principais gêneros bacterianos, presentes na água dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III (BR) na coleta Inverno.

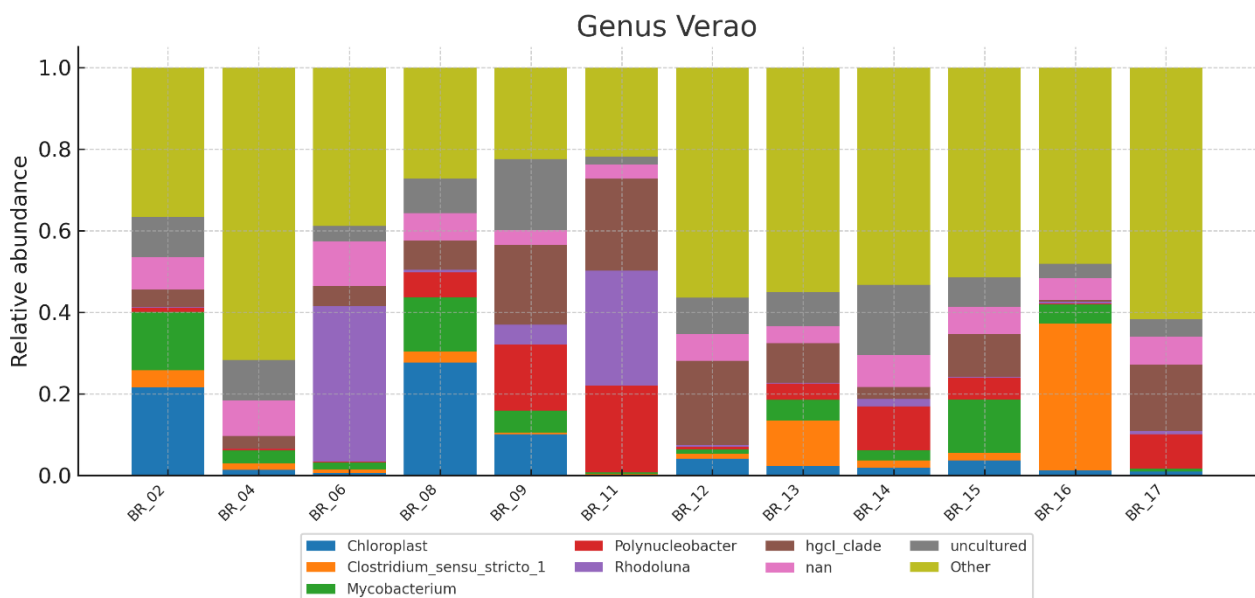


Figura 14. Distribuição relativa dos principais gêneros bacterianos, presentes na água dos afluentes da Bacia Hidrográfica do Paraná III(BR) na coleta Verão.

Outro grupo com relevância, especialmente no verão (Figura 14) para o afluente BR_11 é o gênero *Polynucleobacter*, uma bactéria central das comunidades microbianas de água doce, especialmente em rios urbanos ou impactados por altos níveis de nutrientes (Yang et al.,

2019; Donchev et al., 2024; Lili et al., 2016). Sua presença está associada a alterações na estrutura comunitária, frequentemente coincidindo com a redução da diversidade microbiana e com modificações nas redes de coocorrência sob condições de poluição intensa (Yang et al., 2019; Hu et al., 2017). Trata-se de uma bactéria copiotrófica, capaz de prosperar em ambientes enriquecidos em nutrientes, tornando-se dominante em rios com elevada carga de nitrogênio decorrente de atividades antrópicas (Yang et al., 2019; Lili et al., 2016). A abundância de *Polynucleobacter* tende a ser maior em trechos urbanos ou a montante, que recebem efluentes domésticos ou escoamento superficial rico em nutrientes, sendo frequentemente utilizada como indicador de eutrofização e contaminação (Yang et al., 2019; Lili et al., 2016). Assim, o aumento de nutrientes, particularmente nitrogênio total, impulsionado pela poluição constitui um dos principais fatores responsáveis por mudanças na estrutura das comunidades de bacterioplâncton, favorecendo *Polynucleobacter* e outros gêneros com estratégias copiotróficas (Yang et al., 2019).

Esses resultados estão alinhados com os parâmetros físico-químicos analisados e indicam claramente que, no inverno, ocorre uma redução na abundância de *Polynucleobacter* e um aumento de *Rhodoluna*, padrão associado à melhora das condições ambientais. Por outro lado, no verão observa-se o predomínio de *Polynucleobacter* e a redução de *Rhodoluna*, refletindo maior impacto antrópico e enriquecimento nutricional.

Apesar desse cenário, no aflente BR_11 há presença da hgcl-clade (Actinobacteria), um grupo bacteriano-chave em ambientes de água doce, cuja abundância e papel ecológico são sensíveis a gradientes de poluição, sobretudo à poluição orgânica e ao enriquecimento por nutrientes provenientes da urbanização, de efluentes domésticos e de descargas industriais (Ruprecht et al., 2021; Małecká-Adamowicz & Kubera, 2021; Zhang et al., 2022; Chen et al., 2021; Adedire et al., 2022). Em rios com níveis moderados a elevados de efluentes, a abundância do hgcl-clade tende a diminuir à medida que a poluição se intensifica, enquanto outros táxons, tornam-se mais dominantes. Essa mudança está associada a alterações nos processos de ciclagem do nitrogênio e no funcionamento geral do ecossistema (Ruprecht et al., 2021). Em alguns trechos de rios urbanizados ou impactados industrialmente, o hgcl-clade pode permanecer dominante ou codominante, especialmente nos cursos inferiores e mais urbanizados. No entanto, sua abundância e função ecológica variam conforme o tipo e a intensidade da poluição presente (Małecká-Adamowicz & Kubera, 2021; Zhang et al., 2022; Adedire et al., 2022).

Importante ressaltar, que além da mudança do clima, a época de Vazio Sanitário, que é estipulada por 90 dias, geralmente entre junho e setembro (inverno), diminui drasticamente utilização de insumos agrícolas nas propriedades, o que também pode ser uma influência na redução dos impactos dos nutrientes e micropoluentes. De forma integrada, os resultados demonstram que a heterogeneidade físico-química dentro de grupos de uso do solo semelhantes é suficiente para explicar padrões de biodiversidade microbiana distintos, destacando especialmente o papel do enriquecimento por nitrogênio, fósforo e compostos xenobióticos. Ambientes com alta

carga de nutrientes favorecem grupos bacterianos com funções metabólicas específicas, como transformação de compostos nitrogenados, degradação de matéria orgânica e tolerância a herbicidas, enquanto ambientes mais equilibrados tendem a sustentar comunidades mais diversas e funcionalmente distribuídas. Esse comportamento está alinhado com evidências amplamente descritas na literatura, segundo as quais condições eutrofizadas ou contaminadas reduzem a riqueza microbiana, aumentam a dominância de grupos adaptados e alteram a dinâmica de competição entre filos (Canfield et al., 2010; Falkowski et al., 2008; Newton et al., 2011; Sorenson et al., 2019).

No Grupo B (BR_13, BR_16 e BR_17), o ponto BR_16 mostrou parâmetros substancialmente diferente dos demais, tanto no verão quanto no inverno, com destaque para concentrações muito elevadas de nitrogênio total, nitrato, fósforo total e fosfato, além de resíduos de herbicidas. Esses resultados evidenciam condições de eutrofização localizada, associada a maior carga de nutrientes e micropoluentes agrícolas. Ambientes eutrofizados frequentemente favorecem a dominância de poucos grupos bacterianos funcionalmente especializados e reduzem a diversidade relativa, padrão observado no perfil taxonômico do ponto BR_16, sobretudo no verão, no qual a comunidade se mostra fortemente simplificada e dominada por um único filo.

Mesmo durante o inverno, quando a diluição hídrica geralmente reduz o impacto de nutrientes, BR_16 manteve valores anormalmente altos de compostos nitrogenados, indicando que a intensidade do impacto ambiental não é exclusivamente sazonal, mas intrinsecamente associada ao local. A persistência desses gradientes físico-químicos fornece filtros ambientais fortes, que modulam a composição microbiana ao longo de todo o ano.

Conforme figura 13, as comunidades bacterianas em ambas as coletas apresentaram menor diversidade, no inverno o grupo dominante recebe o nome de dgA-11. O dgA-11 *gut group* é identificado como parte da microbiota fecal e intestinal normal em determinadas populações animais (vacas leiteiras e porcos). Sua presença ou ausência costuma ser utilizada como um marcador de diferenças na dieta, variações geográficas ou condições de saúde específicas, como a Síndrome da Água Fecal em equinos. No entanto, não foram encontrados estudos que associam esse grupo a ambientes fluviais ou que avaliem sua relação com influências antrópicas. Isso evidencia a necessidade de pesquisas adicionais e de uma caracterização mais detalhada desse táxon em sistemas aquáticos.

Por fim, no verão, a aflente BR_16 destaca-se pela presença principalmente de bactérias do gênero *Clostridium*, fortemente associados a trechos de rios poluídos, especialmente aqueles impactados por esgoto doméstico, escoamento agrícola e efluentes industriais (Lenart-Boroń et al., 2022; Pan et al., 2022; Cao et al., 2020; Pantha et al., 2021). A abundância desses grupos tende a aumentar em áreas com elevadas concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo), metais pesados e baixos níveis de oxigênio, condições geralmente resultantes de pressões antrópicas (Yang et al., 2022; Lenart-Boroń et al., 2022; Pan et al., 2022; Cao et al., 2020; Pantha

et al., 2021). Em adição, Clostridium é amplamente reconhecido como bioindicador de contaminação fecal e de degradação da qualidade da água, sendo frequentemente detectado a jusante de descargas de esgoto e em trechos urbanos e agrícolas de rios (Lenart-Boroń et al., 2022; Cao et al., 2020; Mushi et al., 2021; Pantha et al., 2021).

5.5 Conclusões

Os resultados integrados demonstram forte influência do uso do solo na estrutura das comunidades bacterianas. Ambientes preservados apresentaram maior diversidade e estabilidade, enquanto locais impactados mostraram menor riqueza local e maior variação interna no grupo. Padrões espaciais e sazonais foram evidenciados pelo NMDS, reforçando que tanto variáveis ambientais quanto interferências humanas moldam intensamente a comunidade microbiana. As análises físico-químicas confirmaram que condutividade e STD são importantes indicadores ambientais, capazes de prever a estrutura microbiana em diferentes escalas espaço-temporais.

Essas evidências reforçam o papel da metagenômica como ferramenta poderosa para o monitoramento ecológico, permitindo detectar respostas sutis da microbiota às mudanças ambientais e ao uso do solo. A integração das análises físico-químicas, moleculares e espaciais evidencia que o uso e ocupação do solo exercem influências significativas sobre a diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas nos afluentes do Rio Paraná.

As áreas menos impactadas exibem comunidades mais diversas e estruturalmente mais semelhantes entre si, com maior proporção de grupos relacionados à ciclagem de nutrientes. Por outro lado, áreas antropizadas apresentam dominância de taxa associadas à eutrofização e baixa qualidade da água, como Cyanobacteria e Firmicutes.

Os padrões observados também se assemelham intragrupos conforme o período chuvoso intensifica o transporte de nutrientes e sedimentos, aumentando a turbidez e reduzindo o oxigênio dissolvido. Esses achados reforçam o potencial do eDNA como ferramenta de monitoramento ambiental de alta resolução.

6. PERSPECTIVAS

A realização de novas pesquisas com maior frequência de amostragem, idealmente com coletas mensais ou até quinzenais, representaria um avanço essencial para compreender de forma aprofundada a dinâmica microbiana em ambientes aquáticos. Estudos mostram que comunidades bacterianas em rios e riachos respondem rapidamente a mudanças ambientais de curta escala, e que campanhas espaçadas podem perder eventos críticos de reorganização comunitária (Crump et al., 2003; Fortunato et al., 2013). Embora este estudo tenha identificado padrões robustos de diversidade alfa e beta e suas relações com variáveis físico-químicas, a limitação temporal restringe a capacidade de detectar transições rápidas, eventos episódicos e respostas imediatas da microbiota às perturbações ambientais.

Ambientes de água doce exibem elevada variabilidade temporal, impulsionada por fatores como precipitação, vazão, transporte de nutrientes, intensidade de uso do solo e eventos climáticos extremos. Tais processos podem gerar alterações abruptas na estrutura microbiana, modificando riqueza, equitabilidade e dissimilaridade entre comunidades (Newton et al., 2011; Ruiz-González et al., 2015). Coletas mais frequentes permitiriam capturar essa dinâmica fina da diversidade alfa e beta, revelando variações que frequentemente passam despercebidas em séries temporais com poucos pontos de amostragem (Caporaso et al., 2011).

Do ponto de vista físico-químico, parâmetros como condutividade, pH, turbidez, oxigênio dissolvido e nutrientes podem oscilar intensamente ao longo de dias ou semanas, especialmente em regiões sob impacto agrícola ou urbano (Staley et al., 2015; Savio et al., 2015). Essas oscilações exercem pressão direta sobre a composição microbiana, selecionando grupos bioindicadores associados à eutrofização, presença de xenobióticos e estresse ambiental (Sun et al., 2022; Gao et al., 2021). Assim, coletas mensais ou quinzenais proporcionariam uma visão mais completa do acoplamento temporal entre variáveis ambientais e metagenômica, permitindo compreender não apenas a estrutura das comunidades, mas também a velocidade das mudanças, a resiliência ecológica e a ocorrência de respostas imediatas pós-distúrbio.

Nesse contexto, séries temporais mais densas — integrando observações físico-químicas e análises metagenômicas — fortalecem análises preditivas, possibilitam identificar períodos críticos de proliferação microbiana e melhoram a capacidade de monitoramento ambiental em ecossistemas lóticos (Henson et al., 2020; Fuhrman et al., 2015). Portanto, recomenda-se que futuros estudos adotem estratégias de monitoramento mais frequentes e contínuas, a fim de capturar com maior resolução as complexas interações entre uso do solo, variáveis ambientais e dinâmica microbiana.

7. REFERÊNCIAS

- ADEDIRE, D. et al.** Microbiome diversity analysis of the bacterial community in Idah River, Kogi State, Nigeria. *Advances in Microbiology*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/aim.2022.125025>.
- BESEMER, K.; SINGER, G.; QUINCE, C.; BERTUZZO, E.; SLOAN, W. T.; BATTIN, T. J.** Headwaters are critical reservoirs of microbial diversity for fluvial networks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 280, n. 1771, p. 20131760, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1760>.
- CANFIELD, D. et al.** A conceptual model for microbial diversity influenced by redox and nutrient gradients. *Nature Reviews Microbiology*, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>.
- CAO, X.; WANG, Y.; XU, Y.; DUAN, G.; HUANG, M.; PENG, J.** Adaptive variations of sediment microbial communities and indication of fecal-associated bacteria to nutrients in a regulated urban river. *Water*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w12051344>.
- CAPORASO, J. G. et al.** Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
- CAPORASO, J. G. et al.** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS*, v. 108, supl. 1, p. 4516–4522, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>.
- CHEN, F.; KOH, X.; TANG, M.; GAN, J.; LAU, S.** Microbiological assessment of ecological status in the Pearl River Estuary, China. *Ecological Indicators*, v. 130, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108084>.
- CHEN, X. et al.** Seasonal variability in the microbial community and pathogens in wastewater final effluents. *Water*, v. 11, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w11122586>.
- COELHO, Y. K. S. et al.** Rios da Bacia Hidrográfica Paraná III. Colombo: Embrapa Floresta, 2021. DOI não localizado automaticamente.
- COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L.** Transcriptional control in marine copiotrophic bacteria with global impact on carbon cycling. *PNAS*, v. 113, n. 14, p. 3915–3920, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1516770113>.
- CRUMP, B. C.; HOBBIE, J. E.** Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnology and Oceanography*, v. 50, n. 6, p. 1718–1729, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.6.1718>.
- CRUMP, B. C. et al.** Microbial diversity in arctic freshwaters. *The ISME Journal*, v. 6, n. 3, p. 599–608, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.124>.
- CRUMP, B. C. et al.** Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 4, p. 2253–2268, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2253-2268.2003>.

- DEEMER, B. R. et al.** Greenhouse gas emissions from reservoir water surfaces. *BioScience*, v. 66, n. 11, p. 949–964, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biosci/biw117>.
- DONCHEV, D.; IVANOV, I.; STOIKOV, I.; IVANOVA, M.** Metagenomic investigation of temporal and spatial bacterial dynamics downstream of a wastewater treatment plant in the Iskar River, Bulgaria. *Microorganisms*, v. 12, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061250>.
- DUDGEON, D. et al.** Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, v. 81, n. 2, p. 163–182, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>.
- FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F.** The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, v. 320, p. 1034–1039, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1153213>.
- FORTUNATO, C. S. et al.** Spatial variability overwhelms seasonal patterns across a river–ocean gradient. *The ISME Journal*, v. 7, p. 2254–2263, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.102>.
- FUHRMAN, J. A.; CRAM, J. A.; NEEDHAM, D. M.** Marine microbial community dynamics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, p. 133–146, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3417>.
- FUHRMAN, J. A. et al.** Global patterns of bacterial diversity in aquatic environments. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3441>.
- GAO, J. et al.** Heavy metal exposure shapes microbial communities. *Science of the Total Environment*, v. 754, p. 142–157, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142157>.
- GAO, M. et al.** Heavy metal tolerance in *Bacillus* spp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 216, p. 112–135, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112135>.
- GOBLER, C. J. et al.** Nitrogen control of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, v. 54, p. 87–97, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.005>.
- HANSKI, I. et al.** Cyclic vole populations. *Ecology Letters*, v. 20, n. 11, p. 1376–1383, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ele.12828>.
- HENSON, M. W. et al.** Cultivation and genomics of freshwater SAR11. *The ISME Journal*, v. 14, p. 1604–1620, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0647-1>.
- HO, J. C. et al.** Increase in phytoplankton blooms since the 1980s. *Nature*, v. 574, p. 667–670, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1648-7>.
- HORTON, R. E.** Erosional development of streams and their drainage basins. *Geological Society of America Bulletin*, v. 56, n. 3, p. 275–370, 1945.
- HU, A. et al.** Anthropogenic contamination impacts co-occurrence patterns in riverine microbial communities. *Environmental Microbiology*, v. 19, p. 4993–5009, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13942>.
- HUISMAN, J. et al.** Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 8, p. 471–483, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>.

- HUSZAR, V. L. M.; SANT'ANNA, C. L.; FELISBERTO, S. A.** Cyanobacterial blooms in tropical reservoirs. *Water Research*, v. 187, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116421>.
- IBEKWE, A. M. et al.** Bacterial composition in reclamation plants. *Science of the Total Environment*, v. 562, p. 719–731, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.062>.
- JASROTIA, A. S. et al.** Morphometric watershed analysis. *Journal of the Geological Society of India*, v. 82, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12594-013-0108-5>.
- KLINDWORTH, A. et al.** Evaluation of general 16S rRNA primers. *Nucleic Acids Research*, v. 41, e1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/qks808>.
- KOEHLER, B.; STEIN, T.** Bacillus subtilis exoproteome. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>.
- LENART-BORÓN, A. et al.** Pollution gradient in mountain river. *Scientific Reports*, v. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22642-x>.
- LIU, J. et al.** Anthropogenic impacts on microbial biodiversity. *Environmental Science & Technology*, v. 56, n. 4, p. 2331–2341, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06886>.
- MA, L.; MAO, G.; LIU, J.; GAO, G.; ZOU, C.; BARTLAM, M.; WANG, Y.** Spatial-temporal changes of bacterioplankton community along an exorheic river. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00250>.
- MADDOCK, I.; HILL, G.** Rivers of Worcestershire. 2007. Sem DOI.
- MAHAJAN, R.; KAUR, A.** Bacterial bioindicators of pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 193, n. 6, p. 198, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09093-2>.
- MAŁECKA-ADAMOWICZ, M.; KUBERA, Ł.** Patterns of structural and functional bacterioplankton metacommunity under anthropogenic pressure. *Sustainability*, v. 13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su132011518>.
- MATEO, P.; LEGANÉS, F.; PERONA, E.; et al.** Cyanobacteria as bioindicators and bioreporters of environmental analysis in aquatic ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, v. 24, p. 909–948, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0903-y>.
- MOUSSA, R.; CHAHINIAN, N.; BOCQUILLON, C.** Definition of new Horton–Strahler indices. *Water Resources Research*, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1029/2008WR007585>.
- MUSHI, D. et al.** Microbial fecal pollution in Ethiopian watershed. *Journal of Water and Health*, v. 19, n. 4, p. 575–591, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wh.2021.269>.
- NAIR, A.; SHUKLA, A. K.; SHARMA, P.** Degradation of pesticides by soil bacteria. *Biodegradation*, v. 24, n. 6, p. 893–909, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10532-013-9636-z>.
- NEWTON, R. J. et al.** History of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 1, p. 14–49, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>.
- PAERL, H. W.; PAUL, V. J.** Climate change and harmful cyanobacteria. *Water Research*, v. 46, n.

- 5, p. 1349–1363, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>.
- PAERL, H. W. et al.** Dual nutrient reductions. *Environmental Science & Technology*, v. 50, n. 20, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01243>.
- PAN, Y. et al.** Microbial response to land use, nutrients and metals. *Journal of Environmental Management*, v. 321, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115855>.
- PANTHA, K. et al.** Fecal source tracking via 16S sequencing. *npj Clean Water*, v. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41545-021-00099-1>.
- PENG, X. et al.** Responses of bacterial communities to pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 176–183, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.037>.
- PEREIRA, A. A. L. et al.** Bacterioplankton in tropical reservoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, p. 1121–1135, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00531-0>.
- READ, D. S. et al.** Catchment-scale biogeography. *The ISME Journal*, v. 9, n. 2, p. 516–526, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.156>.
- RUIZ-GONZÁLEZ, C.; NIÑO-GARCÍA, J. P.; DEL GIORGIO, P. A.** Terrestrial origin of freshwater bacteria. *Ecology Letters*, v. 18, n. 11, p. 1198–1206, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ele.12499>.
- RUPRECHT, J. et al.** Wastewater effluents cause microbial community shifts and change trophic status. *Water Research*, v. 200, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117206>.
- SANEHA, S. et al.** Nitrogen dynamics in oxidation ponds. *Global Journal of Environmental Science and Management*, v. 9, n. 4, p. 707–718, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.22034/gjesm.2023.04.11>.
- SAVITCHCHEVA, O.; OKABE, S.** Alternative indicators of fecal pollution. *Water Research*, v. 40, p. 2463–2476, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.014>.
- SAVIO, D. et al.** Seasonal bacterial dynamics in a river. *Environmental Science & Technology*, v. 49, n. 22, p. 13245–13253, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03603>.
- SHARMA, S.; KHAN, S.; ANSARI, S. A.** Microbes as bioindicators of pollution. *Applied Water Science*, v. 8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0742-4>.
- SHEKAR, P. R.; MATHEW, A.** *Morphometric analysis of watersheds: a comprehensive review of data sources, quality, and geospatial techniques*. *Watershed Ecology and the Environment*, v. 6, p. 13–25, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wsee.2023.12.001>.
- SHU, D. et al.** Seasonal bacterioplankton distribution. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa118>.
- SILVA, C. R.; DIAS, R. J. S.; TUNDISI, J. G.** Ecotoxicological assessment of urban rivers. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 192, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08484-w>.
- SILVA, D. D.; PRUSKI, F. F.; PINTO, F. A.** Caracterização morfológica de bacias hidrográficas. *RBRH*, v. 19, n. 1, p. 243–252, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.21168/rbrh.v19n1.p243-252>.

- SINGH, B. K.; WALKER, A.** Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 3, p. 428–471, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>.
- SORENSEN, P.; WUEST, A.** Nutrient enrichment and microbial simplification in aquatic systems. *Water Research*, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115061>.
- STALEY, C. et al.** Core functional traits of bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 6, p. 2047–2058, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.03695-14>.
- STRAHLER, A. N.** Watershed geomorphology. *Transactions of the American Geophysical Union*, v. 38, p. 913–920, 1957.
- SVIRČEV, Z. et al.** Global overview of cyanotoxin distribution. *Archives of Toxicology*, v. 93, n. 9, p. 2429–2481, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02583-6>.
- SUN, C.; CHEN, X.; ZHAO, Y.** Microbial shifts along urbanization gradients. *Ecological Indicators*, v. 142, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109166>.
- VANNOTE, R. L. et al.** The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 37, p. 130–137, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/f80-017>.
- WANG, J. et al.** Spatial and temporal bacterioplankton variation. *Limnology and Oceanography*, v. 65, n. 4, p. 832–847, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lno.11354>.
- WHITE, D. C. et al.** Sphingomonads in biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 167–175, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.62.1.167-175.1996>.
- WU, Y.; LIN, H.; YIN, W.; SHAO, S.; LV, S.; HU, Y.** Water quality and microbial community changes in an urban river after micro-nano bubble technology in situ treatment. *Water*, v. 11, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w11010066>.
- YANG, C.; ZENG, Z.; ZHANG, H.; GAO, D.; WANG, Y.; HE, G.; LIU, Y.; WANG, Y.; DU, X.** Distribution of sediment microbial communities and their relationship with surrounding environmental factors in a typical rural river, Southwest China. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, p. 84206–84225, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21627-7>.
- YANG, Y. et al.** Adaptive shifts of bacterioplankton communities in response to nitrogen enrichment. *Environmental Pollution*, v. 245, p. 290–299, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.002>.
- ZANG, C. et al.** Sediment microbial communities in rural river. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21627-7>.
- ZEGGINI, E.; YANG, J.; NIELSEN, R.** Microbial communities as early-warning indicators. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, p. 241–250, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0320-y>.
- ZHANG, H. H. et al.** Water bacterial and fungal communities in urban lakes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph15071323>.
- ZHANG, M. et al.** Colony structure of prokaryotes in Jialing River waters, Chongqing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/ijerph19095525>.

ANEXO A
Figuras 01A-05A Fotos de Satélite Google Earth.
Pontos de coleta 01-17.

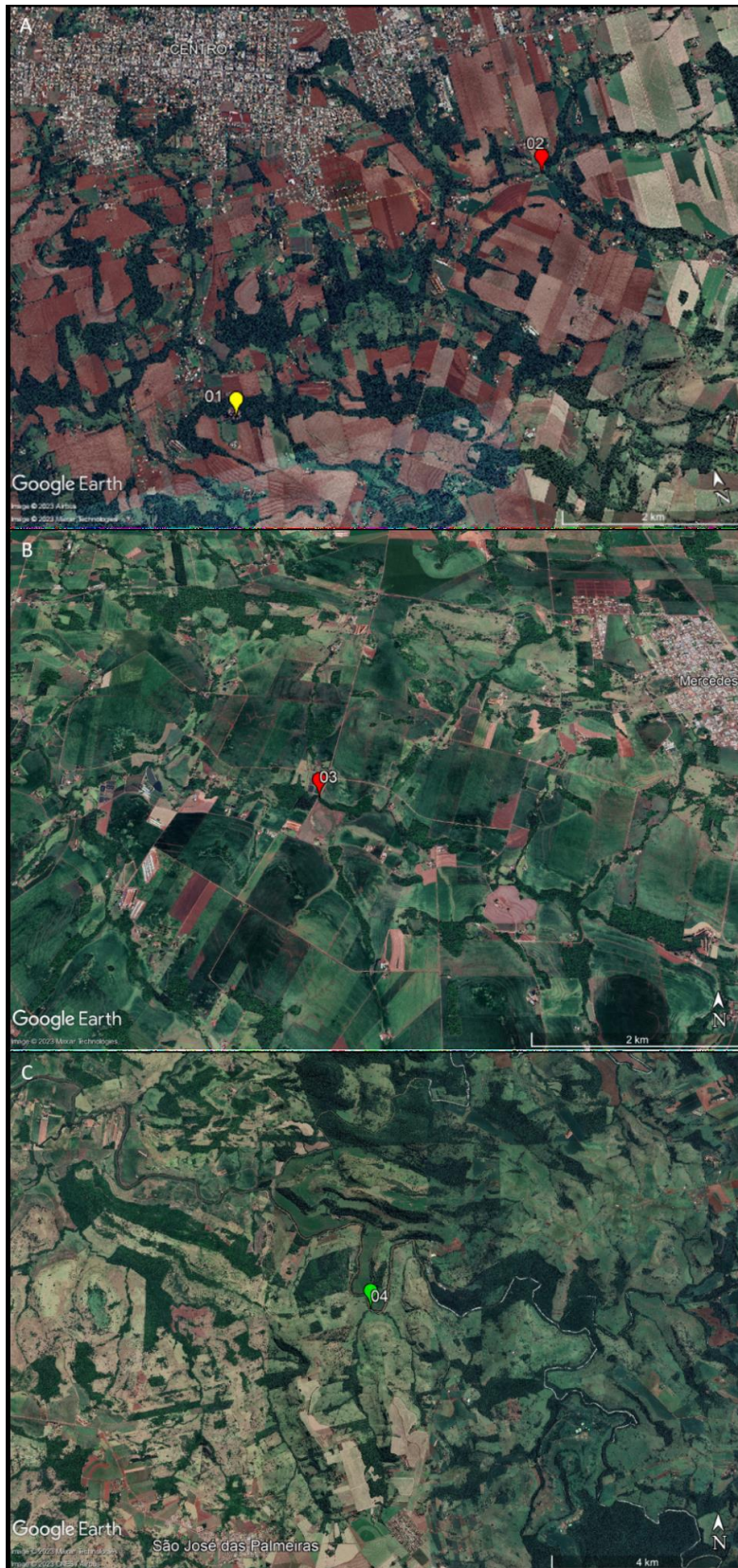


Figura 01A. Visualização dos pontos de coleta dos peixes na bacia do Rio Paraná 3. A. Pontos 01 (grupo B) e 02 (grupo C). B. Ponto 03 (grupo C). C. Ponto 04 (grupo A). Fonte. Google Earth Pro 2023.



Figura 02A. Visualização dos pontos de coleta dos peixes na bacia do Rio Paraná 3. A. Ponto 05 (grupo B). B. Ponto 06 (grupo A). C. Ponto 07 (grupo B). Fonte. Google Earth Pro 2023.

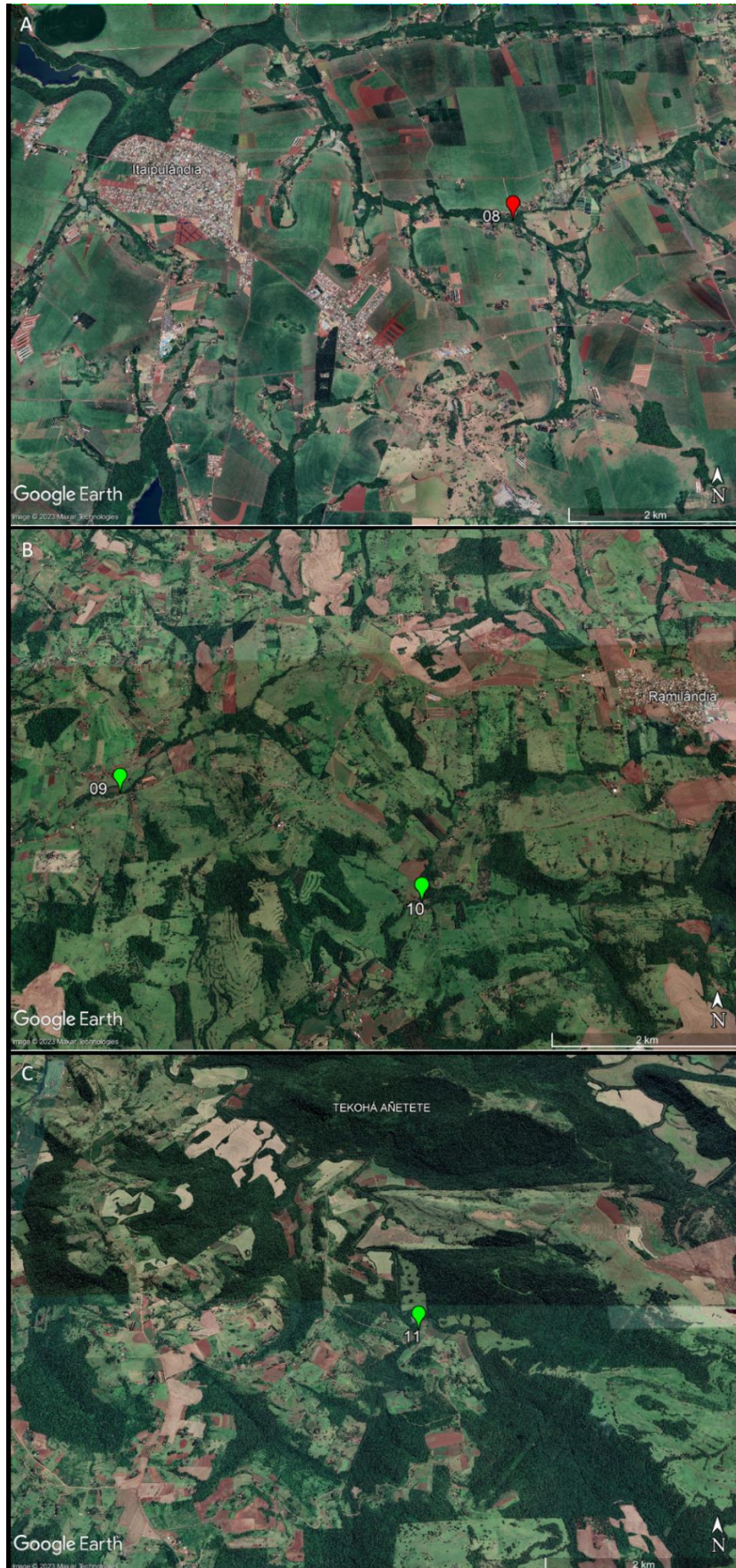


Figura 03A. Visualização dos pontos dos coleta de peixes na bacia do Rio Paraná 3. A. Ponto 08 (grupo C). B. Pontos 09 (grupo A) e 10 (grupo A). C. Ponto 11 (grupo A). Fonte. Google Earth Pro 2023.



Figura 04A. Visualização dos pontos de coleta dos peixes na bacia do Rio Paraná 3. A. Pontos 12 (grupo C) e 13 (grupo B). B. Ponto 14 (grupo C). C. Ponto 15 (grupo B). Fonte. Google Earth Pro 2023.



Figura 05A. Visualização dos pontos de coleta dos peixes na bacia do Rio Paraná 3. A. Ponto 16 (grupo C). B. Ponto 17 (grupo B). Fonte. Google Earth Pro 2023.

ANEXO B

PONTO	DATA	Temp (°C)	Conduct.	pH	OD	STD	Turbidez	POR	DEA	Metolactoro	N Total	Nitrito	Nitrato	P Total	Fosfato
BR_02	nov/21	24,3	0,128	7,37	7,45	0,083	4,6	323	27,47	450,45	4396,89	ND	13252,2	<25	61,28
BR_04	nov/21	21,86	0,113	7,66	9,44	0,073	0,4	275	19,63	16,43	1595,94	ND	4250,36	<25	63,97
BR_06	nov/21	23,14	0,134	7,63	8,11	0,087	0,2	306	50,93	19,37	<75	ND	2306,85	<25	66,59
BR_08	nov/21	26,16	0,093	7,66	8,32	0,061	4,8	311	10,54	20,79	100,11	ND	5684,42	<25	68,85
BR_09	nov/21	27,33	0,126	7,18	6,21	0,082	3,8	132	9,23	24,27	445,59	ND	649,4	<25	72,77
BR_11	nov/21	23,38	0,107	7,47	8,95	0,069	0	322	8,39	38,27	387,65	ND	1092,82	<25	74,68
BR_12	nov/21	24,01	0,086	7,01	8,47	0,056	0,3	291	18,32	124,56	1641,33	ND	7564,15	<25	97,4
BR_13	nov/21	22,65	0,051	6,78	8,94	0,033	0	274	9,52	26,12	405,9	ND	2601,33	99,67	68,53
BR_14	nov/21	21,4	0,032	6,79	10,87	0,022	7,7	285	11	24,74	428,92	ND	1248,39	<25	66,38
BR_15	nov/21	24,99	0,084	7,41	6,85	0,054	2	132	32,01	23,07	1599,11	ND	3859,1	<25	72,73
BR_16	nov/21	25,08	0,436	7,52	7,16	0,284	1,5	299	15,73	99,08	8316	1848,03	>15000	1530,67	1194,43
BR_17	nov/21	26,26	0,03	7,11	6,69	0,02	1,6	311	15,33	18,91	<75	ND	1245,22	<25	70,99
BR_02	jul/22	21,25	0,138	7,55	11,86	0,09	2,9	219	14,25	50,34	2991,33	<50	15088,22	<25	<75
BR_04	jul/22	17,63	0,127	7,92	12,8	0,083	3,6	240	6,28	10	1402,29	<50	8092,89	25,22	<75
BR_06	jul/22	17,59	0,164	7,89	11,95	0,107	4,2	240	11,91	10	386,41	<50	2511,07	<25	<75
BR_08	jul/22	19,62	0,096	7,77	12,74	0,063	20,6	258	5	14,33	173,37	79,36	7703,8	27,44	<75
BR_09	jul/22	21,72	0,108	7,79	9,1	0,07	2,7	241	6,63	10	412,25	<50	1323,99	<25	<75
BR_11	jul/22	18,11	0,116	7,89	10,84	0,075	0,9	222	5,86	10,97	361,46	ND	1143,55	<25	<75
BR_12	jul/22	18,17	0,12	7,6	17,02	0,078	5,2	225	ND	19,78	2241,33	<50	15435,5	<25	<75
BR_13	jul/22	18,27	0,041	7,71	15,21	0,027	3,4	214	ND	10	616,22	ND	2873,44	<25	<75
BR_14	jul/22	18,15	0,027	7,63	13,38	0,018	7,1	252	ND	14,52	301,14	ND	1613,45	<25	<75
BR_15	jul/22	19,08	0,086	7,45	10,07	0,056	13,1	86	5	29,39	291,33	<50	5399,71	<25	<75
BR_16	jul/22	19,82	0,273	7,5	11,51	0,178	6,5	233	5	48,25	4504,89	1584,65	49620,42	930,67	84,08
BR_17	jul/22	20,63	0,033	7,31	10,74	0,021	4,9	173	ND	17,6	467,37	<50	2459,09	<25	<75

TABELA 1. Parâmetros Físico-Químicos por ponto e data de coleta. (nov/21 = Verão; jul/22 = Inverno)