

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
CONSERVAÇÃO

LAÍS AMÉRICO SOARES

**DINÂMICA E ESTRUTURA DA COMUNIDADE
PROCARIONTE DA REPRESA DE ITUPARARANGA –
BACIA DO RIO SOROCABA – SP**

Sorocaba
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E
CONSERVAÇÃO

LAÍS AMÉRICO SOARES

**DINÂMICA E ESTRUTURA DA COMUNIDADE PROCARIONTE DA
REPRESA DE ITUPARARANGA – BACIA DO RIO SOROCABA – SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de mestre em diversidade biológica e conservação.

Orientador: Prof. Dr. André Cordeiro Alves dos Santos

Sorocaba

2013

S676d Soares, Laís Américo
Dinâmica e estrutura da comunidade procarionte da represa de
Itupararanga – bacia do rio Sorocaba/SP. / Laís Américo Soares. --
Sorocaba, 2013.
80 f. : il. (color.) ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, *Campus*
Sorocaba, 2013
Orientador: André Cordeiro Alves dos Santos
Banca examinadora: Iolanda Cristina Silveira Duarte, Patricia Bortoletto
de Falco
Bibliografia

1. Archaea – Rio Sorocaba (SP). 2. Bactérias – Rio Sorocaba (SP). I.
Título. II. Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

CDD 579.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do *Campus* de Sorocaba.

LAÍS AMÉRICO SOARES

**DINÂMICA E ESTRUTURA DA COMUNIDADE
PROCARIONTE DA REPRESA DE ITUPARARANGA –
BACIA DO RIO SOROCABA – SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de
mestre em diversidade biológica e conservação.
Universidade Federal de São Carlos.
Sorocaba, 17 de maio de 2013.

Orientador (a)



Dr. André Cordeiro Alves dos Santos
CCTS – DBio - UFSCar

Examinador(a)



Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte
CCTS – DBio - UFSCar

Examinador(a)



Dra Patrícia Bortoletto de Falco
EESC - USP

DEDICATÓRIA

À minha saudosa avó, Dulce.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Prof. Dr. André Cordeiro Alves dos Santos por ter me oferecido a oportunidade de ser sua orientada.

À minha família pela transmissão de princípios e valores, pela oportunidade de estudar que me ofereceram e pelo incentivo ao longo dos anos.

À Professora Iolanda Cristina Silveira Duarte que me acolheu ainda na graduação e conseguiu tirar da minha cabeça a microbiologia médica e me inseriu na área de Microbiologia ambiental.

Aos professores Iolanda Cristina Silveira Duarte, Fernando de Faria Franco e Patrícia Bortoletto de Falco pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos professores rígidos da graduação que me ensinaram priorizar meus estudos e minhas metas e aos não tão rígidos assim que me ensinaram que quando algo não dava certo é porque ainda não tinha chegado ao final.

À Doutoranda Emiliana Manesco da Esalq que em duas semanas me ajudou a resolver minhas PCR e DGGE que não davam certo e ao laboratório de microbiologia de solo por ter me recebido.

À Profa Dra Maria do Carmo Calijuri, coordenadora do projeto temático, pelo apoio e confiança e aos colegas do BIOTACE, Simone, Davi, Sarah, Paulo e Raquel pela ajuda e suporte nas atividades de laboratório.

Um agradecimento especial para a técnica do BIOTACE Adriana Miwa pela ajuda nas análises e suporte técnico nas atividades laboratoriais.

Às companheiras de coleta, Simone, Raphaella e Aline, afinal foram longos dias, e extensas noites na represa, nos quais nos divertimos bastante e estreitamos laços. Às

pacientes amigas que dividiram comigo a república durante o mestrado, Mariana Beraldi e Andrea Cattaneo que aguentaram meu mau-humor e me ajudaram muito nos momentos de incertezas. Às colegas de laboratório que acompanharam meus dias de muito trabalho, Amanda e Mayara.

Aos técnicos de coleta não só pelo auxílio durante as amostragens, mas também pela comida maravilhosa (Benê) pela conversa boa (Betão) e pelas piadas e histórias engraçadas (Miro). Aos técnicos de laboratório da UFSCar-Sorocaba Elen (ex-técnica do lama) Mônica, Renato e Almir.

Ao CNPQ pela bolsa concedida e a FAPESP pelo financiamento do projeto temático no qual se insere esta pesquisa.

Ao programa de pós – graduação em Diversidade Biológica e Conservação no nome do atual coordenador Prof Dr. Alexander Christianini e a secretária Luciana Missae Kawamura.

RESUMO

SOARES, L. A. Dinâmica e Estrutura da Comunidade Procarionte da Represa de Itupararanga – Bacia do rio Sorocaba – SP. Sorocaba, 2013. 80 Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2013.

Com este trabalho objetivou-se quantificar a comunidade de bactérias e arqueias por meio de PCR em tempo real que determina o número de cópias do gene 16S de rDNA presentes nas amostras ambientais e comparar as comunidades de arqueia e bactérias em um perfil de bandas de PCR/DGGE, bem como relacioná-las às variáveis ambientais de dois pontos, Entrada e Barragem do reservatório de Itupararanga, bacia do rio Sorocaba. A quantidade de bactérias ($6,09 \times 10^8$ e $2,56 \times 10^9$ barragem e entrada, respectivamente) e de arqueias ($2,31 \times 10^2$ e $4,49 \times 10^2$ barragem e entrada, respectivamente) no sedimento foi maior do que na coluna d'água o que pode ser atribuído ao aumento da concentração de nutrientes da superfície para o fundo do reservatório. A partir de análise de correspondência canônica foi possível observar que a quantidade de arqueias relacionou-se a profundidade e à concentração de íons amônio indicando possível presença e abundância de arqueias amônio oxidantes (AOA), enquanto que as bactérias foram mais relacionadas às variáveis físico-químicas, como temperatura e oxigênio dissolvido indicando que este grupo é mais sensível às variações ambientais. A riqueza de ambos os grupos foi relacionada à disponibilidade de nutrientes, indicando que os recursos podem ser limitantes às comunidades.

Palavras-chave: Archaea. Bacteria. Coluna de água. PCR tempo real. PCR/DGGE. Sedimento.

ABSTRACT

SOARES, L. A. Structure and Dynamic of prokaryote communities on the Itupararanga reservoir, basin of Sorocaba's river – SP. Sorocaba, 2013.80p. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, ano.

This work aimed to quantify the archaeal and bacterial communities by real time PCR, that shown the number of copies of 16S gene, rDNA into the water samples and to compare the archaeal and bacterial profiles on the PCR/DGGE technique as well as relate them with environmental variables in two points, dam and input on the Itupararanga reservoir, Sorocaba's basin. The bacterial density on the sediment ($6,09 \times 10^8$ e $2,56 \times 10^9$, dam and input, respectively) was more than water column ($6,79 \times 10^7$ e $6,55 \times 10^7$, dam and input, respectively) this can be attributed to increase of the nutrients concentration from the surface to bottom. The bacterial ($6,09 \times 10^8$ e $2,56 \times 10^9$ dam and input, respectively) and archaeal ($2,31 \times 10^2$ e $4,49 \times 10^2$ dam and input, respectively) quantities on the reservoir were more in the water column than in the sediment, which can be caused by the higher nutrients concentration in the top and the lees nutrients concentration in the bottom of Itupararanga reservoir. Since the canonical correspondence analysis has been possible, identify that the archaeal community has correlated with profundity and ammonia concentration suggesting ammonia – oxidizing archaea's presence and abundance. The bacterial community quantity has correlated with physical – chemical properties like pH and dissolved oxygen suggesting the environmental variables influence the group's abundance. Richness has correlated with nutrients distribution like orthophosphate concentration suggesting that the resources may limit the communities.

Keywords: Archaea. Bacteria. Real time PCR. PCR/DGGE. Sediment. Water column.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Arvore filogenética dos três domínios proposto por Woese et. al. (1990). Os números correspondem ao Domínio Bacteria 1- Termotogales; 2- Flavobactérias; 3- Cianobactérias; 4- Bactérias Púrpuras; 5 – Gram positivas; 6 – Bactérias Verdes não Sulfurosas; Domínio Archaea Reino Crenarchaeota 7- Gênero Pirodictium; 8 – Gênero Termoproteus; Reino Euryarchaeota 9 – Thermococcales; 10 - Methanococcales; 11 – Methanobacteriales; 12 – Methanomicrobiales; 13 – Halófilas Extremas; Domínio Eucarya 14 – Animais; 15 – Ciliados; 16 – Plantas verdes; 17 – Fungos; 18 – Flagelados; 19 – Microsporídia. FONTE: WOESE et. al. (1990).....	17
Figura 2: As três vias da metanogênese. Setas vermelhas indicam a via hidrogenotrófica, setas azuis a via acetotrófica e por fim setas verdes a via metilotrófica, todas partindo de um composto de um carbono (C - 1) reduzido à metano (CH ₄). FONTE: GALAGAN <i>et al.</i> (2002).....	19
Figura 3: Conversão anaeróbia da matéria orgânica a metano - Adaptado de Demirel; Scherer, 2008.	20
Figura 4: Árvore filogenética para o domínio Bacteria. Em preto os 12 filios propostos por Woese <i>et al.</i> , 1987, em branco os 14 filios conhecidos desde 1987 e em cinza os 26 filios composto por representantes cultiváveis desconhecidos. A escala representa 0,05 mudanças nucleotídicas por posição. Fonte (Rappe; Stephen, 2003).	22
Figura 5: Municípios que fazem parte da sub-bacia do Alto Sorocaba.....	28
Figura 6: Estações de amostragem na represa de Itupararanga: próximo à barragem; próximo a entrada dos rios.	30
Figura 7: Esquema de amostragem de água nas duas estações de amostragem, Barragem e Entrada nas diferentes profundidades.	31
Figura 8: Temperatura da água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.....	42
Figura 9: Saturação de oxigênio dissolvido na água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água em coleta realizada no dia 16/04/2012.	43
Figura 10: Variação do pH da água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.	44

Figura 11: Alcalinidade da água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.....	45
Figura 12: Concentração de sólidos suspensos inorgânicos e orgânicos (SSI e SSO) em A: Barragem e B: Entrada da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.....	46
Figura 13: Modelo de compartimentalização de reservatórios proposto por Thorton (1990). Fonte: Cunha; Calijuri, (2012).....	46
Figura 14: Condutividade nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.	47
Figura 15: Concentração de nitrogênio total ao longo da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.....	48
Figura 16: Concentração de íons amônio nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.	49
Figura 17: Concentração de nitrito nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.....	49
Figura 18: Concentração de nitrato nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.....	50
Figura 19: Concentração de fósforo dissolvido nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.	51
Figura 20: Concentração de ortofosfato nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.	51
Figura 21: Concentração de clorofila nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.....	54
Figura 22: Perfil de bandas do DGGE da comunidade bacteriana presente na água do reservatório de Itupararanga na superfície (E1 e B1, entrada e barragem, respectivamente) meio (E2 e B2, entrada e barragem, respectivamente) e fundo (E3 e B3, entrada e barragem, respectivamente) no momento da coleta em 16/04/2013. MC – Marcador. Concentração de desnaturação 30% - 60%.....	56
Figura 23: Perfil de bandas do DGGE da comunidade bacteriana presente na água do reservatório de Itupararanga na superfície (E1 e B1, entrada e barragem, respectivamente) meio (E2 e B2, entrada e barragem, respectivamente) e fundo (E3 e B3, entrada e barragem, respectivamente) no momento da coleta em 16/04/2013. MC – Marcador. Concentração de desnaturação 15% – 55%.	57

Figura 24:Quantidade de cópias do gene 16S do rDNA de arqueias e bactérias presentes em A - entrada e B - barragem do reservatório de Itupararanga ao longo da coluna d'água.....	61
Figura 25: Abundância de bactérias e arqueias no sedimento de dois pontos da represa de Itupararanga em 16/04/2012.	63
Figura 26: Análise de correspondência canônica relacionando as variáveis microbiológicas (qPCR arc: PCR quantitativo 16S rDNA arqueia; qPCR bac: PCR quantitativo 16S rDNA bactérias; DGGE arc: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante de arqueias; DGGE bac: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante de bactérias; Clorof.: Clorofila) às variáveis ambientais (O.D: Oxigênio dissolvido; pH; Temp: temperatura; P. redox: Potencial redox; SSO: sólidos suspensos orgânicos; Prof.: Profundidade; Alca: alcalinidade; Cond.: Condutividade; Orto: Ortofosfato; NO2: Nitrito; NH4: íons amônia) da represa de Itupararanga em coleta realizada em 16/04/2012.....	64
Figura 27: Correlação linear entre os dados de qPCR e a concentração de clorofila nos pontos de entrada e barragem do reservatório Itupararanga.....	66
Figura 28: Participação do picoplâncton e fitoplâncton na alça microbiana. (Sarmiento, 2012 - Modificado).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de população rural e urbana em 2010, de abastecimento de água de 2000 e coleta e tratamento de esgoto doméstico nos municípios de drenagem do reservatório de Itupararanga.	27
Tabela 2: Métodos e referências das variáveis físico-químicas analisadas das amostras de água do reservatório de Itupararanga.	32
Tabela 3: Composição do Reagente Misto utilizado no método de determinação de fósforo total dissolvido.	34
Tabela 4: profundidades (m) utilizadas para as análises de DGGE de dois pontos, entrada e barragem, da represa de Itupararanga.	39
Tabela 5: Estado trófico de cinco reservatórios, Itupararanga, Billings, Guarapiranga, Broa e Barra Bonita.	52
Tabela 6: Média das variáveis físico-químicas na represa de Itupararanga em coleta realizada em 16/04/2012.	53
Tabela 7: Índice de similaridade de Jaccard para os OTUs de bactérias e arqueias mostrados no DGGE para os pontos da entrada e da barragem da represa de Itupararanga em coleta, presentes em coleta realizada em 16/04/2012. (E1: Entrada 0,0 m; E2: Entrada 4,0 m; E3: Entrada 8,0 m; B1: Barragem 0,0 m; B2: Barragem 4,0 m; B3: Barragem 15,5 m)	58
Tabela 8: Similaridade entre comunidades microbianas em diferentes ambientes.	60
Tabela 9: abundância de bactérias e arqueias por meio de qPCR em diferentes ambientes.	62

Lista de Siglas

AOA	Arqueia Oxidante de Amônia
AOB	Bactéria Oxidante de Amônia
CBH-SMT	Comitê de Bacias Hidrográficas rio Sorocaba e Médio Tietê
CNPQ	Centro nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
OTU	Unidade Taxinômica Operacional
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
qPCR	PCR em tempo real
UGRHI	Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos
V.G.P.	Vargem Grande Paulista

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Área de Amostragem	27
3.2	Coletas	29
3.3	Análises Físico-Químicas	31
3.3.1	Sólidos Suspensos	32
3.3.2	Alcalinidade Total	33
3.3.3	Ortofosfato	34
3.3.4	Fósforo total dissolvido	34
3.3.5	Nitrato	35
3.3.6	Nitrito	35
3.3.7	Íon amônio	35
3.4	Análises biológicas	36
3.4.1	Concentração de clorofila	36
3.4.2	Extração de DNA da água	37
3.4.3	Extração de DNA do sedimento	38
3.4.4	Reação em Cadeia de Eletroforese Em Gel De Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE)	38
3.4.5	PCR em Tempo Real (qPCR)	39
3.5	Análise estatística	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Caracterização Físico-Química da Água	42
4.2	Caracterização microbiológica da água	53
4.2.1	Clorofila	53
4.2.2	Riqueza de microrganismos	55
4.2.3	Densidade de procariontes	61
5	CONCLUSÕES	68
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
7	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO	80

1 INTRODUÇÃO

A água é um componente indispensável à vida e as diversas atividades industriais e econômicas. O uso de água doce de lagos, rios e aquíferos, bem como o crescimento populacional e econômico tornam necessárias medidas de conservação deste recurso (TUNDISI, 2003) que passa a ter valor não só ecológico, mas também econômico e político.

Os reservatórios provêm água para abastecimento público e podem ser utilizados para múltiplos fins, como geração de energia, lazer, irrigação, embora também gerem diversos problemas associados a sua construção e manutenção.

A construção de barragens em um corpo d'água traz modificações nas escalas horizontal e vertical, pois geram um sistema com características intermediárias entre ambientes lóticos e lênticos, de modo que reservatórios podem apresentar três zonas horizontais, a primeira sofre influência dos rios e possui alta concentração de material particulado e nutriente, a segunda é intermediária entre rios e lagos e a terceira possui características de lagos com menores concentrações de sólidos suspensos e nutrientes (THORTON *et al.*, 1990).

A dinâmica dos reservatórios é influenciada pela morfometria e pelos usos de suas águas. A vazão, altura de tomada de água e o tempo de residência são fatores que influenciam estes ambientes (STRASKRABA *et al.*, 1993).

Por serem ambientes artificiais que sofrem as consequências do uso e ocupação do entorno, os reservatórios podem ser considerados indicadores de impactos antropogênicos (TUNDISI, 1996).

Desta forma, estudos que relacionem a estrutura e distribuição de comunidades a fatores ambientais geram informações relevantes para compreensão dos processos de ciclagem de nutrientes, além de possibilitar modelagens com a finalidade de prever respostas a mudanças ambientais (FUHRMAN *et al.*, 2006).

As comunidades que ocorrem em reservatórios podem pertencer a três diferentes domínios: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, agrupamentos criados por Carl Woese e colaboradores em meados dos anos 1990, e que substituiu a nomenclatura inicial proposta por Whittaker (1969) que ordenava os organismos em cinco reinos.

Nos dois primeiros domínios estão alocados os organismos procariontes que são considerados os mais abundantes e diversos da natureza (WHITMAN *et al.*, 1998)

enquanto que no último grupo estão todos os organismos eucariontes (Fig. 1). Este agrupamento baseia-se em características moleculares, a partir de análises da subunidade do gene 16S do rRNA.

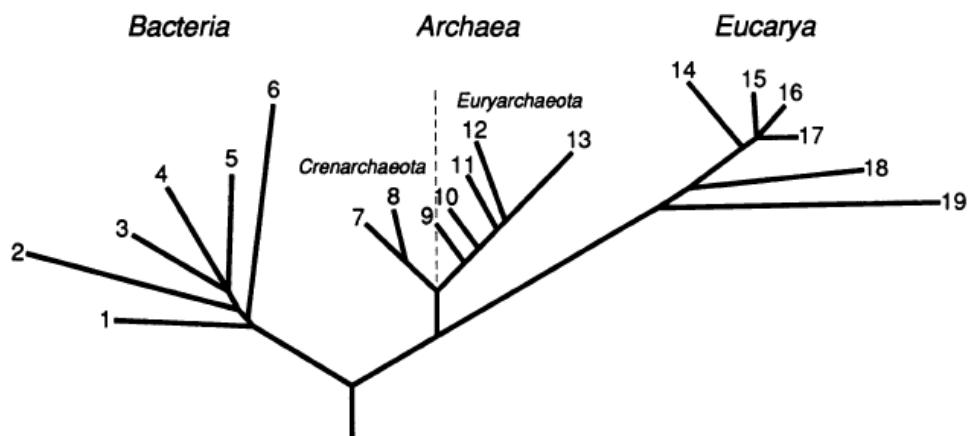


Figura 1: Árvore filogenética dos três domínios proposto por Woese et. al. (1990). Os números correspondem ao Domínio Bacteria 1- Termotogales; 2- Flavobactérias; 3- Cianobactérias; 4- Bactérias Púrpuras; 5 – Gram positivas; 6 – Bactérias Verdes não Sulfurosas; Domínio Archaea Reino Crenarchaeota 7- Gênero Pirodictium; 8 – Gênero Termoproteus; Reino Euryarchaeota 9 – Thermococcales; 10 - Methanococcales; 11 –Methanobacteriales; 12 – Methanomicrobiales; 13 – Halófilas Extremas; Domínio Eucarya 14 – Animais; 15 – Ciliados; 16 – Plantas verdes; 17 – Fungos; 18 – Flagelados; 19 – Microsporídia. FONTE: WOESE et. al. (1990)

Os organismos pertencentes aos domínios *Archaea* e *Bacteria* distinguem-se a partir de diferenças e semelhanças nucleotídicas, além de diferenças morfológicas como ausência de peptídeoglicano na parede celular em arqueia e ligação éter na membrana celular diferentemente da ligação éster, comumente encontrada nos procariontes (WOESE; FOX, 1977).

Os organismos pertencentes ao domínio *Archaea* foram inicialmente descobertos em ambientes de condições extremas como altas temperaturas, extremos de pH, grande salinidade e sob elevada pressão.

No entanto, atualmente diversos trabalhos descrevem a presença destes seres vivos em diferentes ambientes não extremos como sedimento de manguezais (TAKETANI, et al., 2010 a, b); solos alagados amazônicos (PAZINATO, et al., 2010); água marinha litorânea (CURY, et al., 2011); em associação com corais (LINS DE BARROS, et al., 2010) e em rumem de cabras (CUNHA, et al., 2011) embora ainda existam poucos exemplos que determinam presença destas comunidade em ambientes de águas tropicais. Graças et al. (2011) encontraram arqueias na zona anóxica (40

metros de profundidade) e sedimento do reservatório de Tucuruí porém não as quantificaram.

Inicialmente, apenas dois filos constituíam o domínio *Archaea*: o grupo *Euryarchaeota*, composto por organismos metanogênicos, halofílicos e termoacidófilos e *Crenarchaeota*, que inclui apenas espécies termófilas. Posteriormente, para se agrupar sequências distintas das presentes nos dois primeiros filos foi proposto um terceiro grupo: *Korarchaeota* (BARNS *et al.*, 1996).

Atualmente, mais dois filos compõem este domínio, *Nanoarchaeota*, composto por uma única espécie, *Nanoarchaeum equitans*, que é um parasita (HUBER, *et al.*, 2002) e *Thaumarchaeota*, constituído por um subgrupo mesofílico anteriormente alocado em *Crenarchaeota*, mas que diferencia-se dos demais organismos deste filo (PRESTON *et al.*, 2011).

Em sedimentos marinhos Antártico (BOWMAN; MCCUIG, 2003; GILLAN; DANIS, 2007; NAKAYAMA *et al.* 2011) e em associação com esponjas (TURQUE *et al.* 2010), o grupo predominante foi *Crenarchaeota*, enquanto que na Baía de Guanabara, arqueias do grupo *Euryarchaeota* foram as mais abundantes (CARDOSO *et al.* 2011).

Na coluna de água de ambiente marinho, os filos de *Archaea*: *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota* têm sido os mais abundantes, embora 95% das sequências encontradas por Cury *et al.* (2011) na região costeira do Brasil pertençam a grupos de Arqueias ainda não caracterizados.

Devido ao avanço das técnicas de microbiologia molecular, o estudo em ecologia microbiana tem sido mais frequente, porém a maioria dos organismos do domínio *Archaea* ainda não pode ser cultivada o que dificulta conhecimento sobre o papel que estes desempenham no ambiente.

Vários estudos indicam que as arqueias participam de diversos processos de produção e degradação de compostos, em solos amazônicos, por exemplo, Pazinato *et al.* (2010) encontraram e isolaram organismos dos gêneros *Thermoprotei* (filo *Crenarchaeota*) e *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (filo *Euryarchaeota*) que são organismos envolvidos na produção de metano.

As arqueias metanogênicas têm sido alvo de estudos recentes, principalmente, devido a sua participação na produção de metano, gás que possui importante papel nas mudanças climáticas atuais contribuindo com a intensificação do efeito estufa e consequente aquecimento global e por ser um grupo com metabolismo já identificado

(TAKETANI, *et al.*, 2010a; PAZINATO, *et al.*, 2010; BIDERRE-PETIT *et al.*, 2011; CUNHA *et al.* 2011).

Sendo o segundo gás causador do efeito estufa mais importante, o metano é capaz de acumular e emitir 21 vezes mais calor do que o gás carbônico sendo, portanto, responsável por 15 % do efeito estufa observado (HOLMES, 1999).

As arqueias podem produzir metano por três vias, hidrogenotrófica, acetoclástica e metilotrófica de acordo com a disponibilidade de substrato bem como de acordo com a competição pelo substrato com outros microrganismos (Fig.2).

Na via hidrogenotrófica o gás carbônico é reduzido a metano a partir do uso do hidrogênio como fonte de elétrons (REEVE *et al.*, 1997). Já na via acetoclástica ocorre a produção de gás carbônico e de um grupo metil, a partir do acetato, que é a fonte de elétrons para a síntese de metano (MEUER *et al.*, 2002). Por fim, na via metilotrófica os compostos de carbono podem se comportar como doadores ou aceptores de elétrons (GALAGAN *et al.*, 2002).

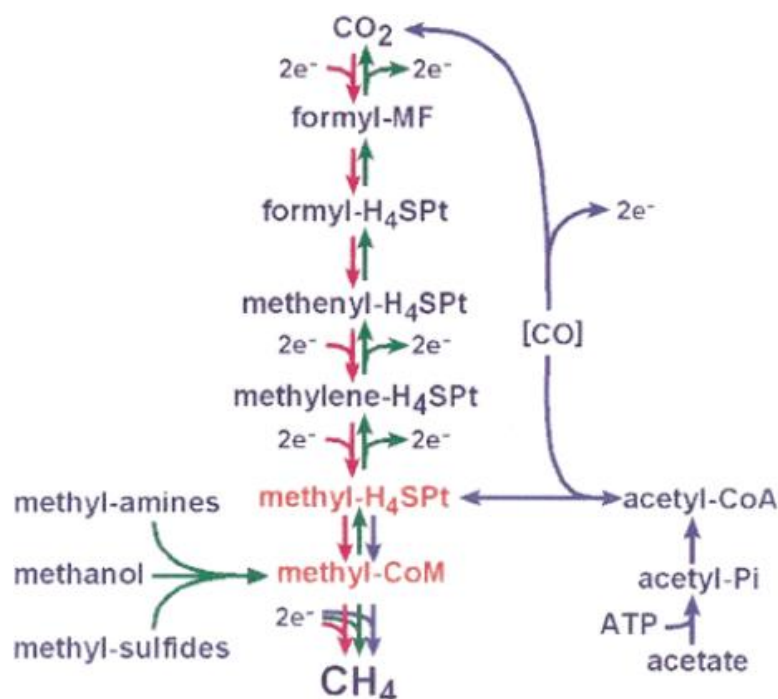


Figura 2: As três vias da metanogênese. Setas vermelhas indicam a via hidrogenotrófica, setas azuis a via acetoclástica e por fim setas verdes a via metilotrófica, todas partindo de um composto de um carbono (C - 1) reduzido à metano (CH₄). FONTE: GALAGAN *et al.* (2002).

A produção de metano (CH₄) é o passo final do fluxo do carbono em diversos ambientes anaeróbios como solos alagados, sedimentos, ambientes termais e trato gastro intestinal de animais (ZINDER, 1984; LYIMO *et al.* 2002). A hidrólise da matéria

orgânica particulada leva a produção de acetato e hidrogênio que em condições de anaerobiose são metabolizados por arqueias metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas, respectivamente, e dão origem ao metano (Fig. 3) (DEMIREL; SCHERER, 2008; BIDERRE-PETIT *et al.*, 2011).

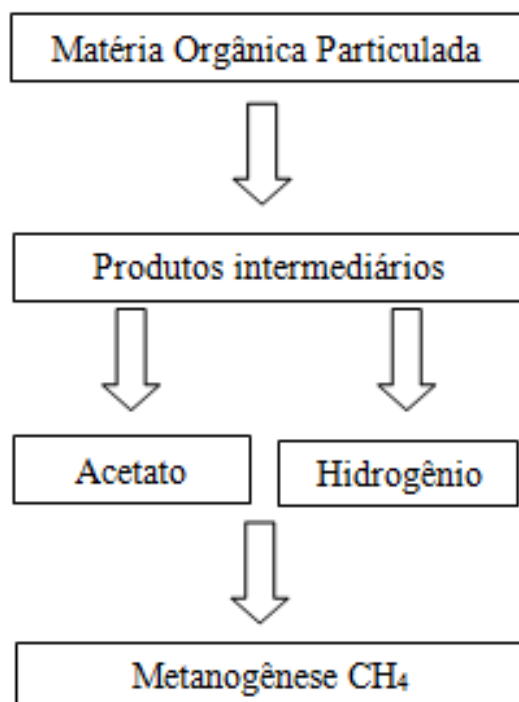


Figura 3: Conversão anaeróbica da matéria orgânica a metano - Adaptado de Demirel; Scherer, 2008.

Em solos amazônicos alagados, Pazinato et al. (2010) encontraram alta diversidade de organismos metanogênicos, principalmente *Methanosarcina sp*, *Methanospirillum sp* e *Methanosaeta sp*, que predominou inclusive em grandes profundidades onde a concentração de acetato era tão baixa ao ponto de limitar a presença das demais, indicando alta plasticidade destes organismos.

Existem poucas evidências da ocorrência da metanogênese na coluna d'água de ambientes continentais, devido às baixas concentrações de substratos ou presença de oxigênio. Em relação aos sedimentos. Biderre – Pettit et. al. (2011) encontraram arqueias metanogênicas ativas a partir de 70 m de profundidades e diferença significativa entre as comunidades de arqueias metanogênicas da coluna d'água e do sedimento no Lago Pavin, lago meromítico na área central de um maciço francês.

Outro importante papel desempenhado por arqueia é a oxidação de amônia, que era atribuído somente às bactérias (HEAD *et al.*, 1993), porém diversos artigos apontam a presença do gene *amoA*, responsável pela capacidade de oxidação de NH_4 , em ambos os grupos (SCLEPER, *et al.* 2005; LIU *et al.*, 2010).

No rio Dongjiang, Liu *et al.* (*op cit*) encontraram maior número de cópias (de 2 a 4 vezes) deste gene em Arqueia Oxidante de Amônia (AOA) com relação ao mesmo gene de AOB (Bacteria Oxidante de Amônia). Em locais de baixa concentração de amônia, as AOB diminuía enquanto que as AOA aumentavam indicando que além deste nutriente ser limitante para as bactérias há competição pelo substrato com as arqueias.

Apesar dos trabalhos já publicados e citados acima, o conhecimento sobre presença e papel destes microrganismos nos mais diversos ambientes ainda é restrito, principalmente se comparado aos estudos com bactérias, o que reforça a importância de pesquisas na área.

Com relação às bactérias, na proposta inicial dos três domínios, Woese *et al.*, (1987) propuseram 11 linhagens de bactérias (filos) a partir de análises de sequências do 16S rRNA. No ano de 2003, Rappe e Stephen elevaram este número para 52 filos (Fig. 4).

Em amostragens realizadas no verão no reservatório Guanting em Pequim, Cheng *et al.* (2011) encontraram dominância de Cyanobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Bacterioidetes e durante o outono Cyanobacteria e Proteobacteria.

Em trabalho na região costeira de São Sebastião, no Estado de São Paulo, foram encontrados gêneros de bactérias em amostras de macrorganismos marinhos, como ascídia, esponjas e algas. As sequências do gene 16S indicaram presença dos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacterioidetes (MENEZES, *et al.*, 2010).

Embora apenas parte da diversidade de bactérias planctônicas seja conhecida, este grupo é melhor caracterizado do que o domínio arqueia, além disso várias espécies já foram isoladas e seus papéis no metabolismo do ecossistema já foram desvendados.

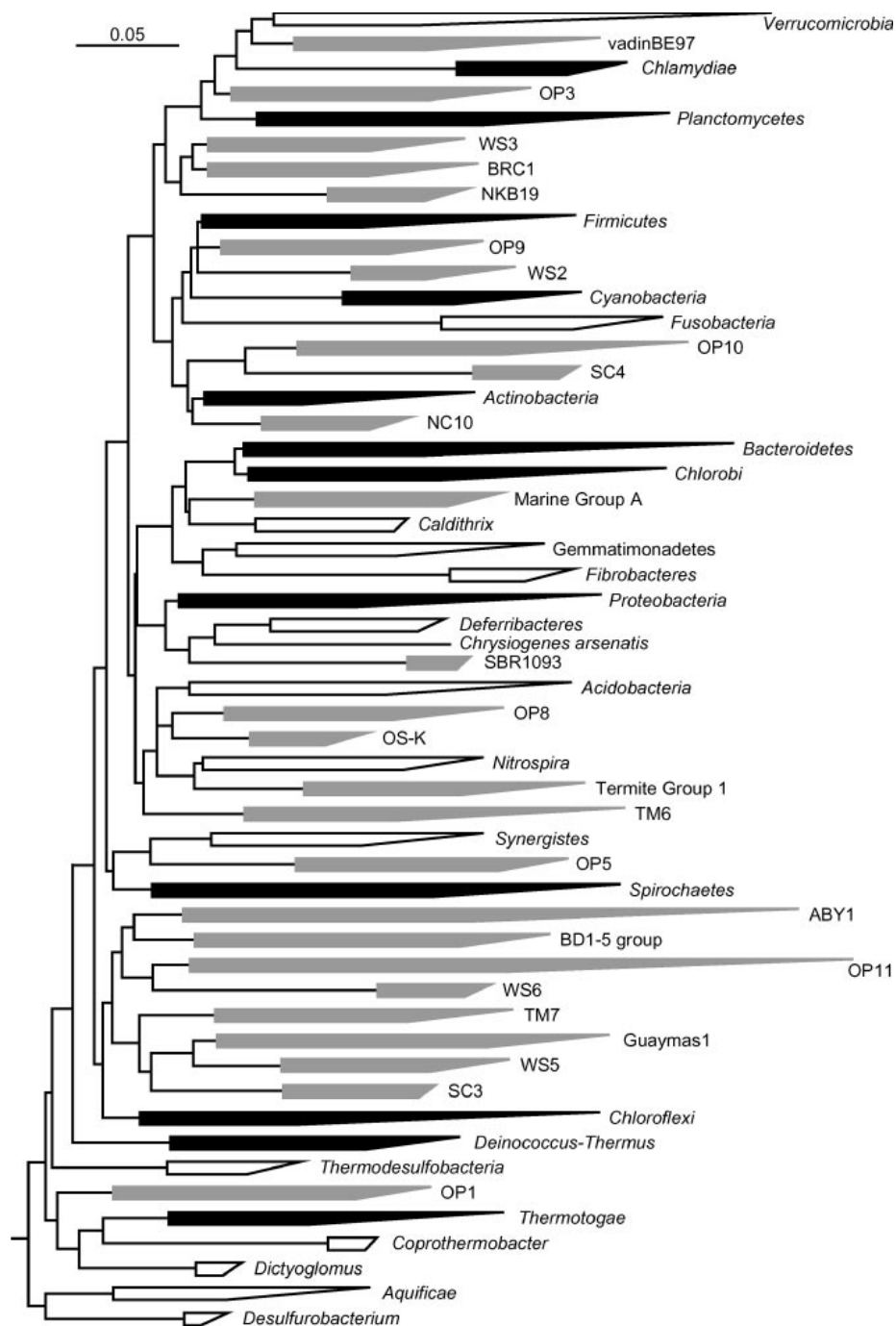


Figura 4: Árvore filogenética para o domínio Bacteria. Em preto os 12 filos propostos por Woese *et al.*, 1987, em branco os 14 filos conhecidos desde 1987 e em cinza os 26 filos composto por representantes cultiváveis desconhecidos. A escala representa 0,05 mudanças nucleotídicas por posição. Fonte (Rappe; Stephen, 2003).

A distribuição biogeográfica dos microrganismos, no entanto, ainda é um assunto que desperta a atenção de pesquisadores, uma vez que o tradicional conceito de que “tudo está em todo lugar” (Baas – Becking, 1934), para descrever a ubiquidade destes seres vivos é bastante contestado.

Na teoria de nicho (Hutchinson, 1961), as espécies possuem requerimento ecológico diferenciado com tolerâncias a fatores bióticos e abióticos que formam um espaço multidimensional chamado nicho. Assim, variações ambientais atuam na abundância e distribuição das espécies, pois permitem a substituições de nichos.

Corroborando a teoria de nicho de Hutchinson, os autores Langenheder; Ragnarsson, (2007), Van Der Gucht et al. (2007), Sommaruga; Casamayor, (2009) apontaram que a seleção ambiental é uma força que modula a distribuição das comunidades bacterioplantônicas em escala local.

No caso do fitoplâncton já é bem estabelecido que sua diversidade, riqueza e equitabilidade dependem de diversos fatores ambientais, como pH, temperatura nutrientes variações sazonais e geográficas, e da camada vertical, a qual é influenciada pela velocidade dos ventos e pela profundidade do ecossistema (CALIJURI *et al.*, 2002; ZENG *et al.*, 2009; TUNDISI *et al.*, 2010).

Espera-se que a comunidade microbiana em reservatórios também seja alterada de acordo com modificações dos mesmos fatores que afetam o fitoplâncton, já que estas variações na estrutura física determinam a heterogeneidade destes ecossistemas e grande parte do fitoplâncton em reservatórios eutróficos é composta por cianobactérias.

A heterogeneidade física dos ecossistemas aquáticos é um dos fatores fundamentais na hierarquia de funções de força que alteram os ecossistemas aquáticos e afetam os demais fatores como a distribuição dos nutrientes e das comunidades aquáticas (DOS SANTOS, 2003).

Segundo Zeng *et al.* (2009), em reservatórios e lagos, a estrutura das comunidades bacterioplantônicas sofre modificações de acordo com variações na qualidade da água.

A entrada de matéria orgânica e nutrientes inorgânicos, a partir de descargas de esgotos domésticos e industriais, leva a perda da qualidade da água e deve alterar a estrutura das comunidades microbianas. Taketani *et al.* (2010c) observaram alteração na comunidade de bactérias devido a diferentes condições ambientais em dois corpos d'água conectados por um canal, reforçando a influência ambiental sobre as comunidades.

Além dos fatores físicos e químicos do ambiente como temperatura e concentração de oxigênio, a interação com outras comunidades pode também modificar as comunidades bacterioplantônicas. A comunidade fitoplantônica pode influenciar o bacterioplâncton por meio de diversos mecanismos, como por associação física,

servindo de fonte de matéria orgânica após a morte e competindo por nutrientes. Mudanças na estrutura das comunidades planctônicas podem ocasionar alterações nas funções bacterianas promovendo impactos de níveis ecossistêmicos (PAVER; KENT,2010).

Isto ocorre porque a matéria orgânica em ambientes aquáticos pode ser metabolizada em um processo denominado “*microbial-loop*”, ou alça microbiana, o qual consiste na produção e transferência de energia e matéria em diversos níveis tróficos da teia alimentar, incluindo vírus, bactérias, arqueias, protozoários e fungos dando origem às complexas redes e à produção de biomassa e de diversidade aquática em um processo rápido que pode se completar em poucos dias e afetar o metabolismo do sistema (THOMPSON *et al.*, 2011).

A alça microbiana permite que a matéria orgânica proveniente de fontes alóctones e autóctones seja processada antes de alcançar as regiões mais profundas e o sedimento, tornando os nutrientes mais rapidamente disponíveis para os organismos da coluna de água e permitindo uma ciclagem rápida da matéria.

Apesar da maior parte do processo de ciclagem acontecer no sedimento é a alça microbiana que mantém a alta produtividade do fitoplâncton, principalmente em ambientes estratificados onde as trocas entre sedimento e coluna de água não são favorecidas (THOMPSON *et al.*, *op. cit.*).

A alça microbiana e a ciclagem de matéria orgânica nos ecossistemas aquáticos são mecanismos fundamentais no processo de eutrofização, pois são o elo entre a matéria orgânica dissolvida e a disponibilidade de nutrientes para as comunidades fitoplanctônicas.

A eutrofização, processo de entrada e acúmulo de nutrientes, principalmente de nitrogênio e fósforo, os quais são essenciais aos seres vivos, tem como consequência à proliferação de algas entre outros efeitos.

Com a proliferação de organismos fotossintéticos, a biomassa fitoplanctônica aumenta levando a diminuição da transparência da água que impede e autolimita o processo fotossintético em camadas mais profundas, e conseqüentemente pode levar a queda na concentração de oxigênio dissolvido e mortalidade de organismos aquáticos.

O aumento da biomassa fitoplanctônica ocasiona ainda, aumento na quantidade de agregados orgânicos na coluna d'água, formados por partículas orgânicas (restos de plantas ou animais) em associação com o zooplâncton e fitoplâncton e seus metabólitos (SIMON, *et.al.*, 2002).

Em ambiente eutrofizados, estes agregados são colonizados por inúmeras bactérias que realizam a decomposição e mineralização da matéria orgânica e são, portanto, responsáveis pela ciclagem de nutrientes (GAO *et. al.*, 2007).

A diversidade fitoplanctônica, com o aumento da biomassa algal, inicialmente aumenta, porém decresce significativamente com o contínuo enriquecimento de nutrientes gerado pela eutrofização (PROULX *et. al.*, 1996).

De acordo com a disponibilidade de nutrientes ocorre a substituição de organismos fitoplanctônicos, sendo que em elevadas concentrações de fósforo as clorofitas predominam, em baixas concentrações de nitrogênio e fósforo ocorre o predomínio de cianobactéria e quando a concentração de fósforo é alta e a de nitrogênio baixa, espécies de cianobactérias fixadoras de nitrogênio dominam (JENSEN *et al.* 1994; CHEN *et al.*, 2003).

O grande aporte de nutrientes em ambientes aquáticos eutrofizados ocasiona modificações também no bacterioplâncton, com a diminuição da diversidade bacteriana e substituição das bactérias autotróficas pelas heterotróficas (KOLMONEN *et al.*, 2004).

Portanto, o estudo das comunidades de microrganismos procariontes em ambientes aquáticos continentais além de permitir o melhor entendimento do metabolismo aquático é também importante na descoberta de uma biodiversidade que tem influência e é influenciada por todos os processos que ocorrem em determinado ecossistema. Assim, o presente trabalho insere-se no projeto temático “Contribuição ao conhecimento do ciclo do carbono no reservatório de Itupararanga como subsídio para a sustentabilidade da bacia hidrográfica do rio Sorocaba (SP)”.

Este projeto temático está sendo desenvolvido em colaboração entre diversas universidades da região (UFSCar, UNESP, UNIP) do reservatório e coordenado pela professora doutora Maria do Carmo Calijuri da EESC/USP.

2 OBJETIVOS

Avaliar a riqueza, densidade e abundância de microrganismos procariontes da água e sedimento em dois pontos do reservatório de Itupararanga em diferentes profundidades.

A partir deste objetivo geral, foram elaborados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Determinar a variação da riqueza e a densidade do Domínio *Bacteria* e do Domínio *Archaea* na água e no sedimento de dois pontos, entrada e barragem do reservatório;
- ✓ Identificar padrões de variação espacial (dois pontos e diferentes profundidades) da comunidade microbiana do reservatório.
- ✓ Relacionar a comunidade microbiótica com as variáveis físico-químicas da represa;
- ✓ Relacionar os dados referentes à comunidade microbiana com a biomassa fitoplanctônica medida pela concentração de clorofila.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Amostragem

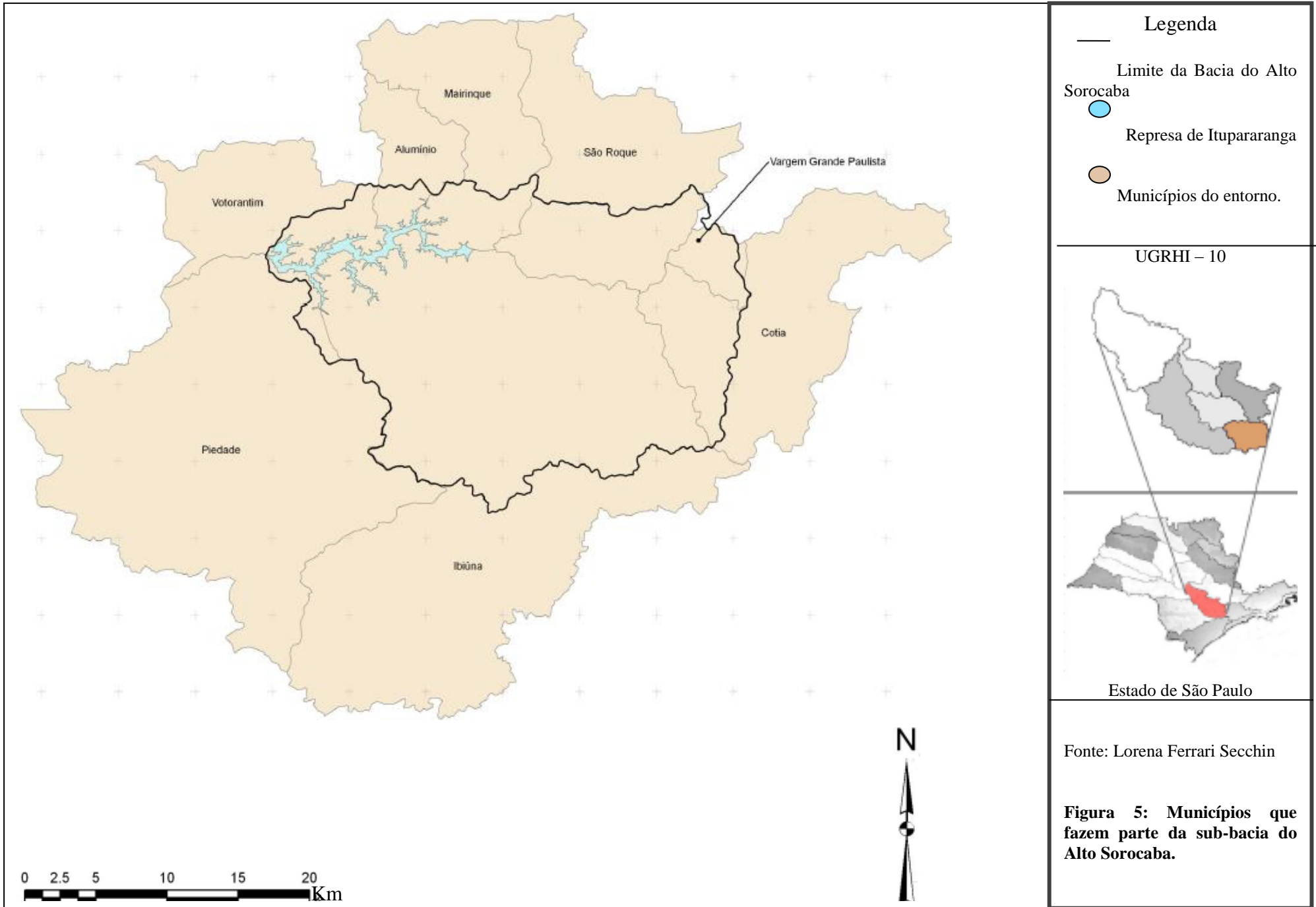
O reservatório de Itupararanga localizado no interior de São Paulo pertence à sub-bacia do Alto Sorocaba da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídrico - 10 (UGRHI -10) e abrange parcialmente oito municípios: Alumínio, Cotia, Ibiúna, Mairinque, Piedade, Vargem Grande Paulista e Votorantim (fig.5).

Destes municípios Ibiúna é o que possui maior área dentro da bacia enquanto o município de Vargem Grande Paulista está quase completamente inserido na bacia. Todos os municípios, apesar de terem quase universalizado a oferta de água tratada ainda não tratam ou tratam pouco os esgotos gerados (Tab. 1).

Tabela 1: Porcentagem de população rural e urbana em 2010, de abastecimento de água de 2000 e coleta e tratamento de esgoto doméstico nos municípios de drenagem do reservatório de Itupararanga.

Município	População			Água	Esgoto Sanitário	
	Total (hab.)	Urbana (%)	Rural (%)	Abastecimento (%)	Coletado (%)	Tratado*
Alumínio	16.825	84	16	97,5	80	0
Cotia	200.647	100	0	84,8	36	0
Ibiúna	71.157	35	65	86,7	70	66
Mairinque	43.195	80	20	96,9	77	0
Piedade	52.126	46	54	95,0	63	0
São Roque	78.711	91	9	93,7	73	5
VGP	42.899	100	0	81,9	19	0
Votorantim	108.695	96	4	98,6	96	22

Fonte: Compilado a partir dos dados apresentados por SEADE (2000, 2003, 2010). * Porcentagem do tratamento de esgoto doméstico da população urbana em relação ao esgoto coletado. VGP: Vargem Grande Paulista.



A bacia do Alto Sorocaba é representada, dentro do comitê de bacia, pelos municípios de Ibiúna e Vargem Grande Paulista e possui área de 1093,2 Km² com uma população de 114.214 habitantes, sendo que 40% vivem na área rural. A principal atividade econômica da região é a agrícola com grande produção de hortaliças fazendo parte do cinturão verde de São Paulo.

A represa de Itupararanga, atualmente, além de gerar energia elétrica para a indústria Votorantim Metais, antiga Companhia Brasileira de Alumínio – CBA é utilizada como fonte de abastecimento de água para cerca de um milhão de pessoas nos municípios de Sorocaba, Piedade, Votorantim, Ibiúna e São Roque (BEGHELLI et al., 2012), sendo considerado o principal manancial para as cidades do alto e médio Sorocaba (CBH-SMT, 2008).

Em 2009 o melhor índice de qualidade da água da UGRHI-10 foi observado na represa de Itupararanga, apesar de também ter sido observado, a partir deste ano, o predomínio de cianobactérias na comunidade fitoplanctônica (CBH - SMT, 2010) o que pode indicar o aumento no processo de eutrofização do reservatório que atualmente está classificado como mesotrófico.

Devido à grande importância regional deste reservatório e os poucos trabalhos existentes na avaliação de suas características limnológicas, em 2009 foi aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa, FAPESP, o projeto temático: “Contribuição ao conhecimento do ciclo do carbono no Reservatório de Itupararanga como subsídio para a sustentabilidade da Bacia Hidrográfica do Rio Sorocaba (SP)”, processo FAPESP nº. 08/55636-9, no qual este trabalho se insere e que tem como objetivo aumentar o conhecimento sobre ciclagem dinâmica do carbono em reservatórios subtropicais.

3.2 Coletas

Foram coletadas amostras de água com garrafa de Van Dorn e sedimento com Draga de Birke-Eckman em dois pontos ao longo da represa de Itupararanga, na entrada dos rios Sorocamirim, Sorocabuçu e Una (23°37'3.8"S / 47°13'41.4"W) e próximo à Barragem do reservatório (23° 36' 44,6"S / 47° 23' 40,9"W), conforme a figura 6.

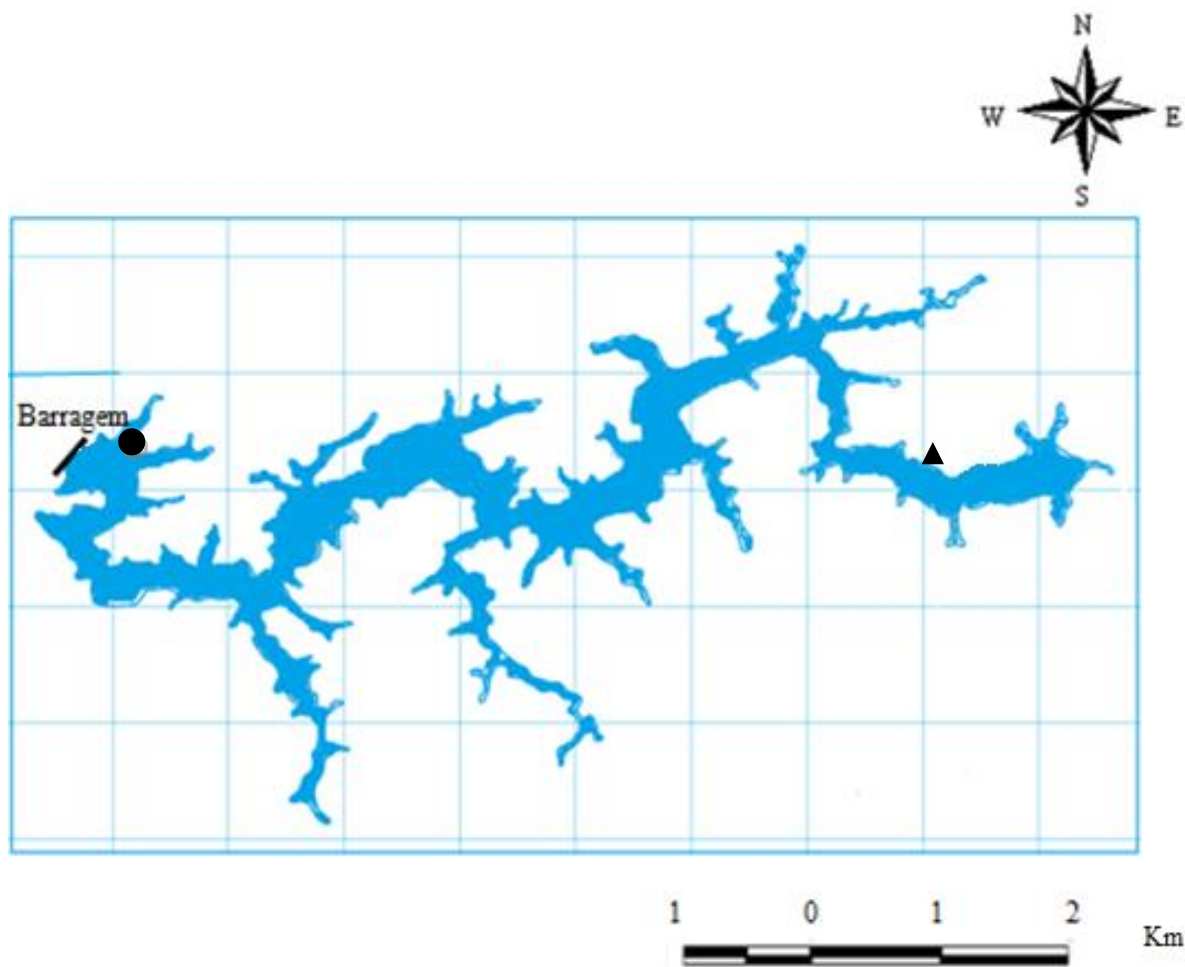


Figura 6: Estações de amostragem na represa de Itupararanga: ● próximo à barragem; ▲ próximo a entrada dos rios.

Os pontos de amostragem entrada e barragem deste trabalho correspondem aos pontos Trans e EC3 dos demais trabalhos incluídos no projeto temático “Contribuição ao conhecimento do ciclo do carbono no Reservatório de Itupararanga como subsídio para a sustentabilidade da Bacia Hidrográfica do Rio Sorocaba (SP)”.

No ponto da entrada foram retiradas amostras de três profundidades, superfície, meio e fundo (0,0 m; 4,0 m; 8,0m), enquanto que na barragem, por apresentar maior profundidade com relação ao ponto anterior, as amostras de água foram retiradas de cinco profundidades (0,0 m; 2,0 m; 4,0 m; 10,0 m; 15,5 m), conforme figura 7.

As coletas ocorreram no dia 16 de abril de 2012, na barragem às 14h00min e na entrada por volta das 15h30min. As amostras de água e sedimento coletadas nos dois pontos, entrada e barragem foram armazenadas à 4°C até o momento das análises.

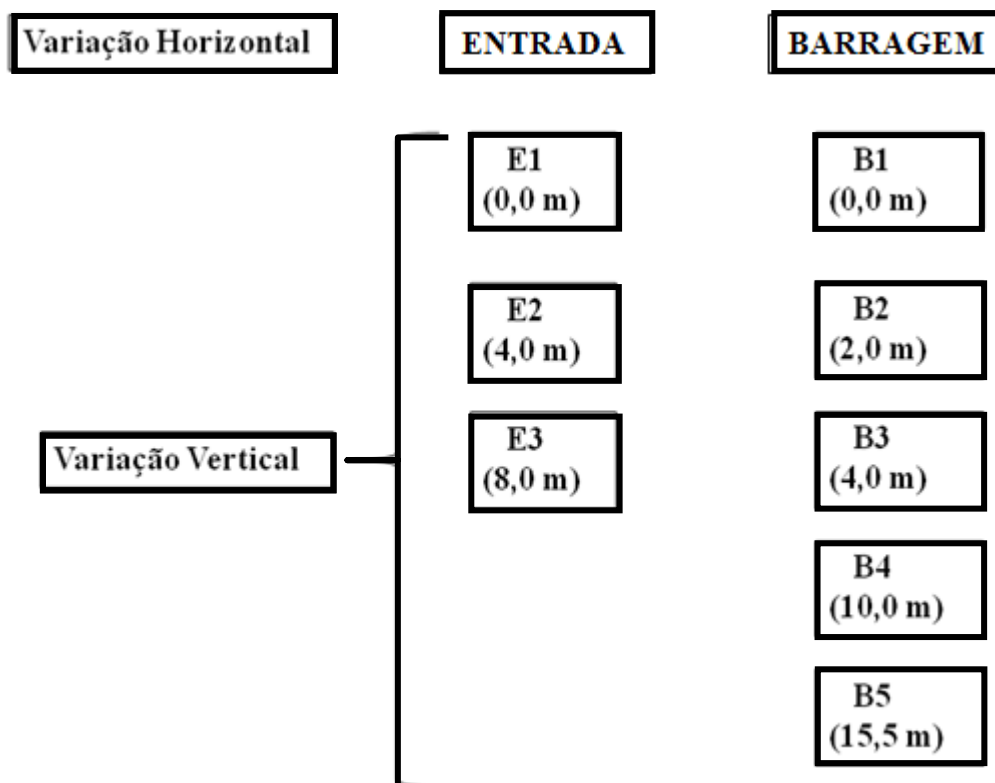


Figura 7: Esquema de amostragem de água nas duas estaes de amostragem, Barragem e Entrada nas diferentes profundidades.

3.3 Análises Físico-Químicas

Os perfis de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, condutividade e potencial redox foram determinados no campo através de sonda multiparâmetros YSI Modelo 556 MPS.

As variáveis físico-químicas foram determinadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do *Campus* Sorocaba da UFSCar e no Laboratório de Biotxicologia de guas Continentais e Efluentes (BIOTACE) da Escola de Engenharia de São Carlos da USP segundo os métodos descritos na tabela 2.

Tabela 2: Métodos e referências das variáveis físico-químicas analisadas das amostras de água do reservatório de Itupararanga.

Variáveis	Métodos e Referências
Temperatura (°C)	Método Potenciométrico
pH	Método Potenciométrico
Oxigênio dissolvido (mg/L)	Método Potenciométrico
Condutividade (µS/cm)	Método Potenciométrico
Potencial Redox (mV)	Método Potenciométrico
SST (mg/L)	APHA (2005) método - 2540D
SSI (mg/L)	APHA (2005) método - 2540D
SSO (mg/L)	APHA (2005) método - 2540D
Alcalinidade total (mgCaCO ₃ /L)	APHA (2005) método – 2320B
Clorofila	NUSH (1980)
Ortofosfato	APHA (2005) método – 4500PE
Fósforo total dissolvido	APHA (2005) método - 4500PE
Nitrato	APHA (2005) método - 4.500NO ₃ B
Nitrito	APHA (2005) método - 4.500NO ₂ B
Nitrogênio total	Büchi®I/APHA (2005)
Íons amônio	APHA (2005) método - 4.500NH ₃

3.3.1 Sólidos Suspensos

Foi determinado através de método gravimétrico utilizando o peso dos filtros calcinados (P0), filtros com amostras secos (P1) e novamente calcinados (P3).

Filtros de fibra de vidro GF/C de 1,2 µm de poro e 47 mm foram calcinados à 480°C por 1 hora. Após 40 minutos em dessecador, o peso obtido foi considerado P0 (peso inicial).

Filtrou-se 1000 mL de amostras em cada filtro calcinado e pesado, em duplicata. Após secos em temperatura ambiente, os filtros foram guardados em envelopes em dessecador.

Os filtros foram secos em estufas por 24 horas e esfriados por 40 minutos em dessecador. Posteriormente foram pesados (P1). Após a pesagem os filtros foram novamente calcinados em mufla por 1 hora a 480 °C e esfriou-se em dessecador por 40 minutos e posterior pesagem (P2).

Para calcular os Sólidos suspensos totais e suas frações foram utilizados as seguintes fórmulas:

$$SSO = \frac{(P1-P0)}{Vol} \times 1000 \quad SSI = \frac{(P2-P0)}{Vol} \times 1000 \quad SST = SST - SSI$$

Onde

SSO: Sólidos Suspensos Orgânicos;

SSI: Sólidos Suspensos Inorgânicos;

SST: Sólidos Suspensos Totais

P0: Peso do filtro seco;

P1: Peso do filtro pós-mufla;

P2: Peso final;

Vol.: Volume filtrado.

3.3.2 Alcalinidade Total

Para determinação da alcalinidade, 50 mL de amostra de água foram tituladas com H₂SO₄ (0,01N) até pH 5,75 (V₁). A titulação prosseguiu até pH 4,3 (V₂).

Para cálculo da alcalinidade foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Alcalinidade\ total\ (mg.L^{-1}\ como\ CaCO_3) = \frac{(V1 + V2)}{Vol} \times N\ H_2SO_4 \times 5000$$

Onde

V1: Volume até pH 5,75;

V2: Volume até pH 4,30;

Vol.: Volume da amostra;

N: Normalidade do ácido H₂SO₄

3.3.3 Ortofosfato

Adicionou-se 50 mL da amostra em um tubo, 1 gota de fenolftaleína, 1 gota de H_2SO_4 5N, 8 mL de reagente misto e homogeneizou no vórtex. A solução ficou 10 minutos em repouso e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 800nm. O controle foi realizado com o mesmo volume de água destilada. O cálculo da concentração foi feita a partir de curva padrão previamente elaborada, com limite mínimo: $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $250 \mu\text{g.L}^{-1}$.

3.3.4 Fósforo total dissolvido

As amostras foram filtradas em fibra de vidro GF/C de $1,2 \mu\text{m}$ de poro e 47 mm de diâmetro e em dois tubos de ensaio foram adicionados 5 mL de cada, ao controle foi adicionado o mesmo volume de água destilada. Adicionou-se 0,5 mL de solução concentrada de persulfato de potássio a cada tubo os quais foram fechados com papel alumínio e levados à autoclave por 30 minutos a 120°C .

Ao atingir temperatura ambiente foi adicionado à solução, 0,5 mL do reagente misto (Tab. 3) e agitou-se. Após 15 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 880 nm. O cálculo da concentração foi feito a partir de curva padrão previamente elaborada com limite mínimo: $10\mu\text{g.L}^{-1}$ e máximo: $250 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 3: Composição do Reagente Misto utilizado no método de determinação de fósforo total dissolvido.

Solução	Quantidade (mL)
Tartarato de potássio	10
Molibdato de Amônio	30
Ácido sulfúrico 5N	100
Ácido Ascórbico 0,1 M	60

Solução tartarato de potássio

Dissolveu-se 1,3715g de $K(SbO)C_4H_4)_6 \cdot 1/2 H_2O$ em 400 mL água destilada em balão volumétrico de 500mL e completou-se o volume que foi armazenado em frasco de vidro.

Solução de molibdato de amônio

Dissolveu-se 20g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ em 500 mL de água destilada e armazenou-se em frasco de vidro.

3.3.5 Nitrito

Adicionou-se 10 mL de amostra em um tubo, 0,2 mL de HCl 1N e homogeneizou no vórtex, até adquirir coloração azulada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 275 nm. O cálculo da concentração foi feita a partir de curva padrão previamente elaborada com limite máximo de $10mg.L^{-1}$.

3.3.6 Nitrito

Adicionou-se 10 mL de amostra em um tubo, 0,2 mL de sulfanilamida e homogeneizou no vórtex. Após 5 minutos de descanso, adicionou-se 0,2 mL de N-naftil e agitou no vórtex. Após 10 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 543 nm. O cálculo da concentração foi feita a partir de curva padrão previamente elaborada com limite máximo de $4.000\mu g.L^{-1}$.

3.3.7 Íon amônio

Adicionou-se 35 mL de amostra em um tubo, 1 mL de solução de citrato e agitou-se no vórtex. 1 mL de solução de fenol foi adicionado e a solução homogeneizada no vórtex. Adicionou-se 1 mL de solução de hipoclorito e agitou-se no vórtex. A solução foi mantida no escuro, em repouso, por 2 horas e posterior leitura foi realizada no

espectrofotômetro à 640 nm. O cálculo da concentração foi feita a partir de curva padrão previamente elaborada.

3.4 *Análises biológicas*

As análises de biologia molecular foram realizadas no laboratório de microbiologia do solo, Esalq e no laboratório de microbiologia ambiental (LAMA), UFSCar – Sorocaba.

3.4.1 **Concentração de clorofila**

Filtraram-se 500 mL de amostras, em duplicata, em filtro de fibra de vidro GF/C com diâmetro de 1,2 µm e 47 mm. Após secos, os filtros foram guardados em envelopes sob-refrigeração, até no máximo 24 horas antes do momento de análise (mínimo 12 horas).

Os filtros foram colocados dobrados em tubos de centrífuga encapados com papel alumínio. Adicionou-se 10 mL de etanol 80% centrifugou e os levou a banho - maria por 5 minutos à 75°C. Para extração deu-se um choque térmico, em gelo, e armazenou em geladeira de 6 a 24 horas. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 665 nm e 750 nm em cubetas de 1 cm.

Para a correção da feofitina acrescentou-se á solução HCl (0,4N) até atingir pH entre 2,6 e 2,8. Após 15 minutos foi realizada nova leitura espectrofotômetro a 665 nm e 750 nm em cubetas de 1 cm. O cálculo da concentração foi feita a partir de curva padrão previamente elaborada.

$$\text{Clorofila } a = 27,9x(EB - EA)x \text{ vol}$$

Onde:

EA: Diferença da amostra acidificada (750 nm – 665 nm);

EB: Diferença da amostra não acidificada;

$$\text{Vol.: } \frac{\text{Volume do solvente}(10 \text{ mL})}{\text{Volume filtrado (L)}} \times \text{diâmetro da cubeta.}$$

3.4.2 Extração de DNA da água

Amostras de DNA presentes na água dos dois pontos nas diferentes profundidades foram extraídas com o Kit para isolamento de DNA metagenômico de água (Epicerentre), segundo o protocolo do fabricante.

Inicialmente 1 L de água foi filtrado em membrana de poro 0,45 µm e 0,47 mm de diâmetro (Millipore modelo HAWG047S3) para retirada do material em suspensão e grandes partículas. Posteriormente, filtrou-se em membrana de policarbonato com tamanho de poro 0,22 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore modelo GSWPO47SO).

A membrana filtrante foi cortada em quatro partes e colocada em tubo falcon de 50 mL no qual foi adicionada a solução de lavagem (2µL de Tween 20 e 1mL de solução de Tampão de lavagem). O tubo foi levado ao vórtex por 2 minutos.

As células em suspensão foram transferidas para um *eppendorf* e centrifugadas à 11.500 rpm por 2 minutos, descartando-se o sobrenadante. O pellet foi suspenso em 300 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH = 7,5) 2 µL de Solução de Ready-Lyse-Lysozyme Solution, 1 µL de RNase A, agitado no vórtex e incubado à 37°C por 30 minutos.

À solução foram adicionados 300 µL de solução Meta-Lysis Solution (2x) e 1 µL de proteinase K, agitando-se no vórtex. Incubou-se à 65°C por 15 minutos e após atingir temperatura ambiente foi colocada no gelo por 5 minutos.

Adicionou-se 350 µL de MPC (reagente de precipitação de proteínas) e levou-se ao vórtex vigorosamente e centrifugou-se a 11.500 RPM por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo *eppendorf* onde foram adicionados 570 µL de isopropanol para precipitação do DNA.

A solução foi centrifugada a 11.500 RPM por 10 minutos à 4°C e, posteriormente, o pellet foi lavado com álcool 70% e centrifugado por 10 minutos à 11500 RPM. Descartou-se o sobrenadante e deixou o pellet secar no escuro.

A eficiência da extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, usando 1 µL de DNA controle, próprio do kit de extração usado e blue green (LGC) como corante.

3.4.3 Extração de DNA do sedimento

Amostras de DNA presentes nos sedimentos de ambos os pontos foram extraídas com o power soil DNA isolation kit para extração de solo Mobio, conforme as orientações do fabricante.

3.4.4 Reação em Cadeia de Eletroforese Em Gel De Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE)

A região V6 do gene 16S do rDNA de Bacteria de amostras de água de três profundidades de cada ponto, superfície, meio e fundo, foi amplificada em 25 µL de solução contendo: 1,25 µL de buffer (10X), 1,25 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,1 µL de mix dNTPs (2,5mM), 0,25 µL de Formamida (100%), 0,2 µL de cada primer (100pmol), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5U), 1 µL de DNA e água milli-Q autoclavada para completar o volume, nas seguintes condições: Desnaturação inicial à 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final à 72°C por 10 minutos. Os iniciadores utilizados foram: U968FGC (5'-CGC CCG GGG GCG GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TA-3') e 1378 (5'-CGG TGT GTA CAA CGC CCG GGA ACG -3') (HEUER *et al.*, 1997).

Para a amplificação do gene 16S do rDNA de Arqueia foi realizada reação de 25 µL contendo 1,25 µL de buffer (10X), 1,80 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,1 µL de mix dNTPs (2,5mM), 0,50 µL de BSA (bovine sérum albumin), 0,10 µL de cada primer (100pmol), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5U), 1 µL de DNA e água milli-Q autoclavada para completar o volume, nas seguintes condições: Desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minutos e extensão final à 72°C por 6 minutos. A primeira reação foi realizada com os seguintes primers: ARCH21F (5'-TTC YGG TTG ATC CYG CCR GA -3') e ARCH 958R (5'-YCC GGC GTT GAN TCC AAT T -3') (MOYER *et al.*, 1998) e a segunda reação (nested PCR) com: ARCH340FGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA G -3') e ARCH519R (5'-TTA CCG CGG CKG CTG -3') (OVREAS *et al.*, 1997).

Os produtos das PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% e o DNA foi visualizado por coloração com SYBR-Green usando como padrão de tamanho o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) e em seguida analisados em eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

Para as análises de DGGE foram usados os produtos de PCR de bactéria e arqueia de ambos os pontos entrada e barragem em três diferentes profundidades (Tab.4).

Tabela 4: profundidades (m) utilizadas para as análises de DGGE de dois pontos, entrada e barragem, da represa de Itupararanga.

Entrada	Barragem
0,0 m	0,0 m
4,0 m	4,0 m
8,0 m	15,0 m

Para as análises de DGGE os produtos de PCR de Bacteria foram aplicados em gel de eletroforese com 8% de acrilamida, bisacrilamida (37,5 : 1) à um gradiente 30 % a 60% de formamida e ureia, em que 100% de desnaturação apresenta m 7M de ureia e 80% de formamida . A eletroforese foi realizada a 180V e 60°C por 4 horas.

Para o domínio Archaea os produtos da PCR foram adicionados em gel de eletroforese com 8% de acrilamida : bisacrilamida, em um gradiente de 15% a 55% de formamida e ureia. A eletroforese foi realizada durante 3,5 horas a 200V e 60 °C.

Cada banda visualizada no gel de eletroforese foi considerada uma unidade taxonômica operacional (OTU) que segundo Smeti *et al.*, (2013) é a unidade básica em estudos de diversidade microbiana.

3.4.5 PCR em Tempo Real (qPCR)

A quantificação microbiana em amostras de água tem sido realizada por meio de técnicas que envolvem o cultivo ou a hibridização de amostras. No entanto estas técnicas subestimam a real quantidade de organismos que existem no ambiente, pois nem todos podem ser cultivados e o método de FISH usado na hibridização exige contagem dos

organismos em microscópio de fluorescência o que não gera resultado robusto, pois é uma estimativa da riqueza.

Neste trabalho a quantidade de bactérias e arqueias foi determinada por meio de real time PCR. Esta técnica tem sido usada para quantificar as comunidades de arqueias em diversos solos, mas nunca foi usada para quantificar os domínios Bacteria e Archaea em amostras de água de diferentes profundidades de um reservatório tropical.

Para quantificação do gene 16S rDNA foi realizada reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) no laboratório de Genética da Esalq/USP. As reações foram feitas em duplicata e corridas no equipamento Bio-Rad iQ5 Optical System. A reação para o domínio *Bacteria* foi feita para um volume final de 25 µL, contendo: 12,5 µL de Planium® Quantitative PCR Super-Mix-UDG (Invitrogen), 1,0µL de cada primer, 0,25 µL de BSA e água milli-Q autoclavada. Os primers usados foram: P1 (5'- CCT AGC GGA GGC AGC AG - 3') e P2 (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3') (MUYZER et al., 1993).

As condições para amplificação usadas para o domínio *Bacteria* foram: Desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguidos por extensão final variando 72°C a 96°C.

Para o domínio *Archaea* a reação conteve 12,5 µL de Planium® Quantitative PCR Super-Mix-UDG (Invitrogen), 10 pmol de cada primer, 50pmol de MgCl₂, 0,25 µL de BSA e 8,25 µL de água milli-Q autoclavada. Os primers usados foram 340F (5'- CCC TAY GGG GYG CAS CAG - 3') E 1000R (5'- GAG ARG WRG TGC ATG GCC - 3') (GANTNER et al., 2011).

As condições para amplificação usadas para o domínio *Archaea* foram: Desnaturação inicial à 98°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos 57°C por 30 segundos e 72°C por 90 segundos, seguidos por extensão final variando 72°C a 90°C.

3.5 Análise estatística

O perfil obtido pelo PCR/DGGE foi analisado e comparado utilizando o programa imageJ (Rasband 1997 – 2012), visando gerar uma matriz de presença e ausência de bandas a partir das intensidades captadas pelo software. A partir das matrizes geradas foram realizadas análises de similaridade no software *Past* (Hammer, et al., 2001),

adotando o índice de Jaccard para estimar a similaridade sendo considerados como perfis distintos aqueles que apresentaram similaridade inferior a 70% (PEREIRA *et al.*, 2007).

Para correlacionar as variáveis ambientais com as comunidades microbiológicas foi realizada análise de correspondência canônica correlação linear utilizando o software *Past* (Hammer, *et al.*, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Físico-Química da Água

O dia de coleta estava nublado e com vento forte. O limite da zona eufótica no ponto da entrada foi a 2,79 cm de profundidades enquanto que no ponto da barragem foi de 3,69 metros. Foi observada nos dois locais de amostragem estratificação térmica e química. Foi observada estratificação térmica (Fig. 8), em ambos os pontos, com maiores valores na superfície (24,30°C e 23,14°C, na barragem e na entrada, respectivamente) e menores no fundo da represa (22,70°C e 22,28°C, na barragem e na entrada, respectivamente).

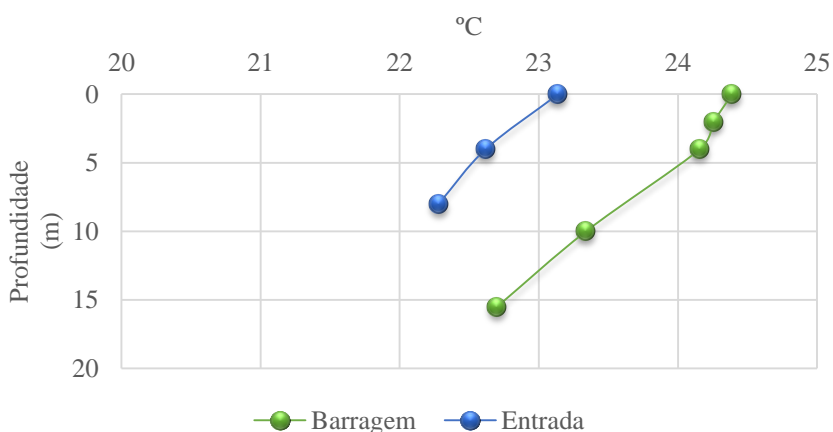


Figura 8: Temperatura da água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.

Miwa *et al.*, (2011) e Cunha *et al.*, (2012) encontraram estratificação térmica no eixo central do reservatório de Itupararanga no verão o que foi atribuído às temperaturas elevadas e baixa velocidade do vento, enquanto que durante o inverno no mesmo ponto foi observada homogeneidade térmica. Nos braços do reservatório, os quais possuem menor profundidade foi observada estratificação térmica em ambos os períodos, mesmo na presença de ventos.

Períodos de estratificação térmica e isotermlia, também foram verificados em diferentes reservatórios brasileiros, o reservatório da lagoa das Garças (TUCCI; SANT'ANNA, 2003), por exemplo, pode ser considerado polimítico, bem como as

lagoas Camargo e Coqueiral, localizadas na entrada do rio Paranapanema do reservatório Jurumirim, que apresentaram isotermla, com estratificação térmica relacionada a dias com maiores temperaturas do ar (GRANADO; HERY, 2012).

Apesar de não ter sido encontrada condição de anoxia, uma vez que para ser considerada anóxica a água deve apresentar concentração de oxigênio abaixo de $0,016 \text{ mg.L}^{-1}$ (BERNER, 1981) foi verificada hipoxia, caracterizada por saturação de oxigênio menor do que 30% (SALCHER *et al.*, 2011) na região próxima ao sedimento dos dois locais (28% e 14% nos pontos da Entrada e Barragem, respectivamente).

O ponto em que foi observada maior porcentagem de saturação de oxigênio foi na barragem (99%) na região da superfície, enquanto que na mesma posição no ponto da entrada registrou-se 96% (Fig. 9).

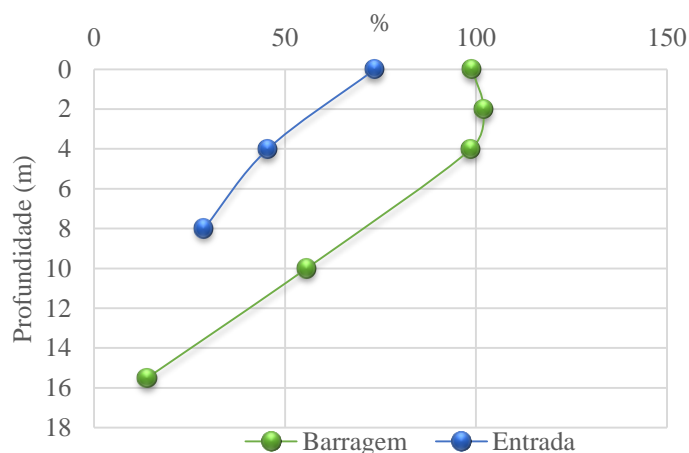


Figura 9: Saturação de oxigênio dissolvido na água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água em coleta realizada no dia 16/04/2012.

A queda na saturação de oxigênio com o aumento da profundidade tem sido considerada um fenômeno associado à estratificação térmica (SALCHER, *et al.*, 2011). O pH apresentou o mesmo padrão de distribuição do oxigênio dissolvido com o maiores valores medidos na superfície dos pontos (7,34 e 6,92, barragem e entrada respectivamente) e o menor no fundo (6,45 e 6,33, barragem e entrada respectivamente) (Fig.10).

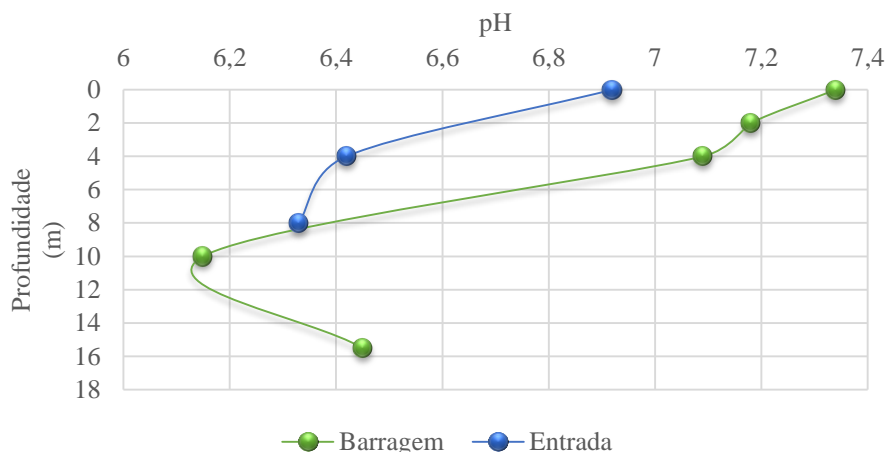


Figura 10: Variação do pH da água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.

O fitoplâncton, principalmente cianobactérias, se distribui em maior quantidade na superfície dos corpos de água em função da disponibilidade de luz (SALCHER *et al.*, 2011), sendo a principal fonte de oxigênio, que pode ser transportado ao fundo do reservatório por turbulência ou movimentos hidrodinâmicos, porém em períodos de estratificação esta circulação não ocorre diminuindo a concentração deste gás nas maiores profundidades.

No reservatório Ribeirão das Lajes no Rio de Janeiro, Branco *et al.*, (2009) por exemplo, verificaram que a presença de termoclina inibiu a reposição de oxigênio na região inferior da represa.

Outro fator que também ocasiona a depleção de oxigênio dissolvido no fundo de reservatórios é o descarte de esgoto sem tratamentos. No reservatório de Itupararanga esta entrada ocorre a partir dos rios formadores (BEGHELLI *et al.*, 2012) aumentando a demanda por oxigênio para a decomposição da matéria orgânica que se acumula no fundo do reservatório.

O processo de produção e decomposição da matéria orgânica causa alteração também no pH, uma vez que esta variável é elevada pela fotossíntese (GOLOMBIESKI *et al.*, 2005) que ocorre na zona eufótica com consumo de gás carbônico (PEDRAZZI *et al.*, 2013), enquanto que na decomposição há liberação de CO_2 e consequente formação de ácido carbônico (H_2CO_3) e íons hidrogênio (H^+) que acidificam a água (KRUGER *et al.*, 2003), o que explica o padrão encontrado em ambos os pontos, ou seja, maiores valores na superfície e menores no fundo.

Com relação a alcalinidade, no ponto da Barragem, foi observado aumento da concentração em função da profundidade, variando de 0,94 mg de $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ na superfície para 2,11 mg de $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ próximo ao sedimento. Já no ponto da Entrada, a alcalinidade diminuiu com o aumento da profundidade, indo de 2,4 mg de $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ na superfície a 2,22 mg de $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ no fundo (Fig.11).

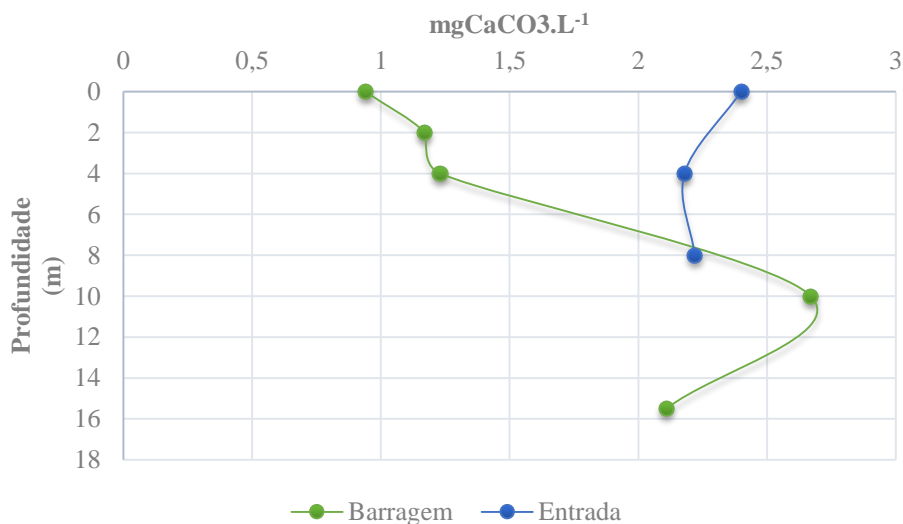


Figura 11: Alcalinidade da água nos pontos da Barragem e da Entrada ao longo da coluna d'água da represa de Itupararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.

Como a alcalinidade relaciona-se a capacidade tampão de sistemas aquáticos ela afeta diretamente as variações no pH (MERINO-IBARRA *et al.*, 2008). No ponto da entrada, com exceção a profundidade de 10 metros, foram observados menores valores de alcalinidade o que foi refletido no pH, enquanto que a entrada observaram-se maiores valores de alcalinidade e menor variação no pH.

No ponto da entrada do reservatório foi observada maior concentração de sólidos suspensos inorgânicos (sendo maior valor 5,5 mg.L⁻¹, no fundo), enquanto que na barragem houve predomínio de sólidos suspensos orgânicos (sendo a maior concentração 4 mg.L⁻¹, na superfície) (Fig. 12 A e B).

A

B

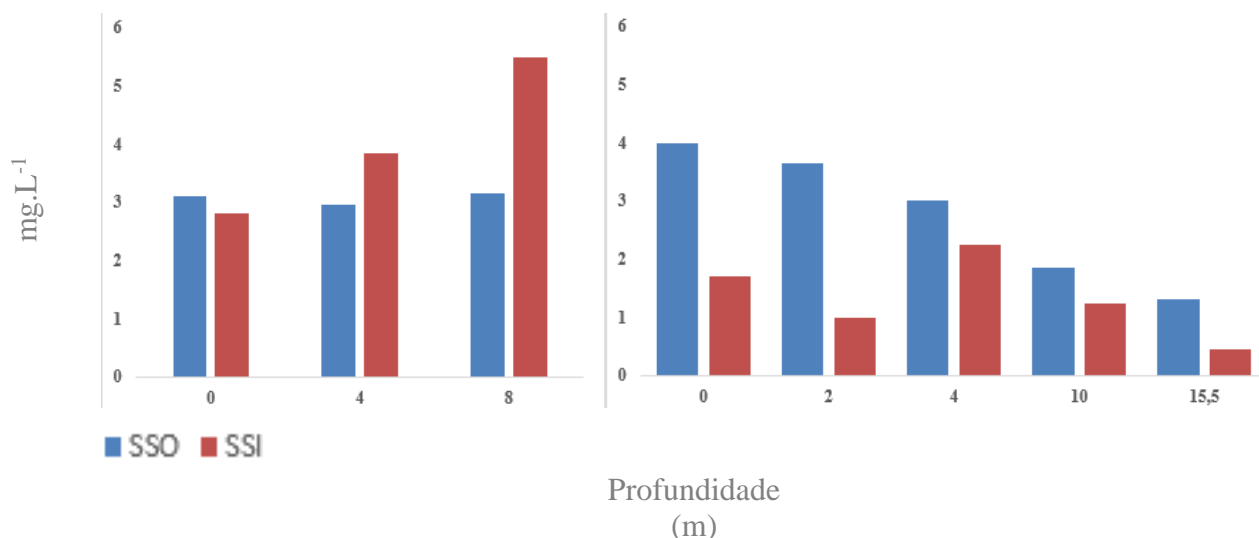


Figura 12: Concentração de sólidos suspensos inorgânicos e orgânicos (SSI e SSO) em A: Barragem e B: Entrada da represa de Itapararanga em coleta realizada no dia 16/04/2012.

Esta distribuição de material em suspensão corrobora o zoneamento dos reservatórios proposto por Thorton (1990) que assume que reservatórios possuem três compartimentos ao longo do eixo horizontal (Fig. 13).

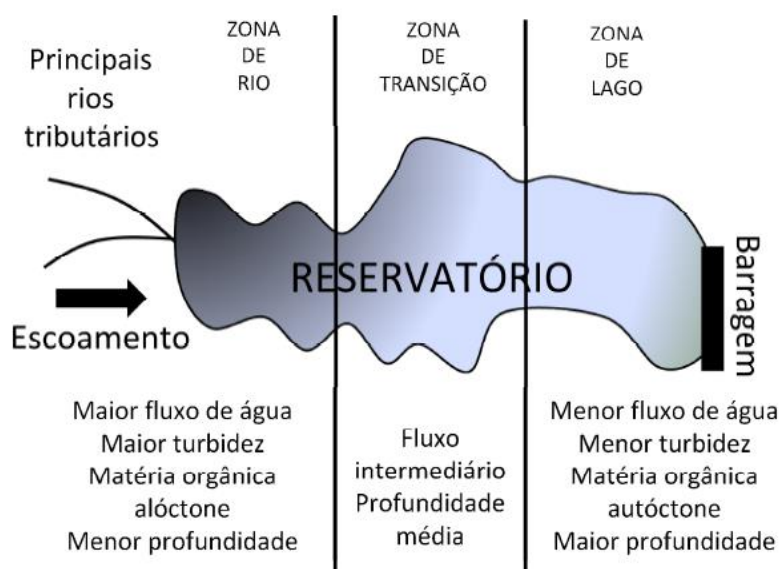


Figura 13: Modelo de compartimentalização de reservatórios proposto por Thorton (1990). Fonte: Cunha; Calijuri, (2012).

O ponto da entrada do reservatório de Itapararanga corresponde a zona de rio que sofre influência de afluentes que carregam materiais para o reservatório e por isso, a maior parte dos sólidos nesta região é composta por material inorgânico que aumenta em direção ao fundo, devido a sedimentação destes compostos (CHAPMAN, *et. al.*, 1996).

No ponto da barragem, que corresponde a zona de lago, há o predomínio de sólidos suspensos orgânicos, proveniente de fontes autóctones.

A condutividade em ambos os pontos, entrada e barragem, aumentou quanto maior a profundidade da amostra (Fig. 14), com menores valores observados na superfície e maiores no fundo ($67 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $96 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; $98 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $101 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, Barragem e Entrada, respectivamente).

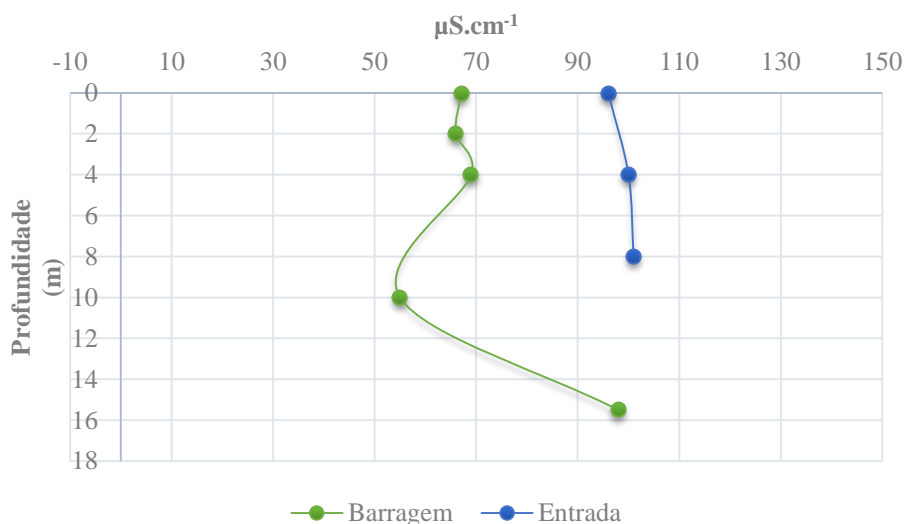


Figura 14: Condutividade nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

A condutividade elétrica foi maior no ponto da entrada, pois é a partir deste ponto que a matéria orgânica e inorgânica alóctone chega ao reservatório. Ao longo do eixo central, a influência da entrada de material pelos rios vai diminuindo e com isso a condutividade é reduzida com menores valores na coluna d'água da barragem. Porém devido a altas taxas de decomposição de compostos orgânicos alóctones e autóctones depositados no fundo do reservatório, esta variável volta a aumentar próximo ao sedimento.

Foi observada pouca variação na concentração de nitrogênio entre as profundidades analisadas (Fig. 15). Na superfície a concentração de nitrogênio foi de $0,28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, nos pontos da barragem e da entrada, respectivamente, enquanto que no fundo os valores foram $0,27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nos pontos da barragem e da entrada, respectivamente (desvio padrão $0,06$ e $0,04$ na barragem e entrada respectivamente).

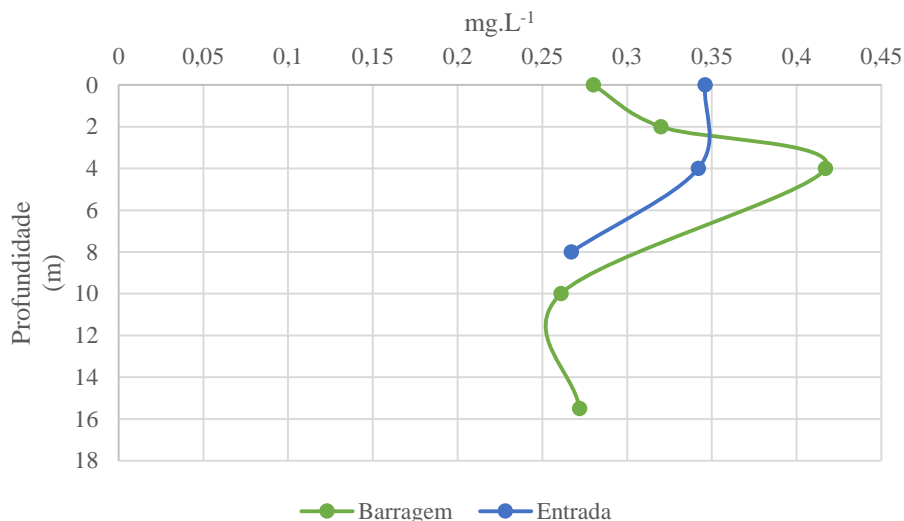


Figura 15: Concentração de nitrogênio total ao longo da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

O nitrogênio que entra em um sistema hídrico pode ter diversas fontes, como esgotos domésticos e industriais, fertilizantes, compostos biológicos e fixação biológica. Ele é indispensável para o crescimento do plâncton, mas quando em excesso leva a proliferação acelerada de algas (MIWA *et al.*, 2011).

A maior concentração deste nutriente foi verificada no ponto da entrada, indicando que sua principal fonte neste reservatório foi alóctone, provavelmente derivado de lançamentos de esgoto e resíduos domésticos.

No ponto da barragem foi observado um pico de nitrogênio a 4,0 metros de profundidade na coluna d'água, provavelmente devido a incorporação deste nutriente a comunidade microbiana e na matéria orgânica particulada.

A concentração de íons amônia em ambos os pontos aumentou com a profundidade. No ponto da barragem a concentração passou de 5,4 mg.L⁻¹ na superfície para 51,05 mg.L⁻¹ no fundo e no ponto da entrada variou de 4,37 mg.L⁻¹ na superfície para 10,9 mg.L⁻¹ no fundo da represa (Fig. 16).

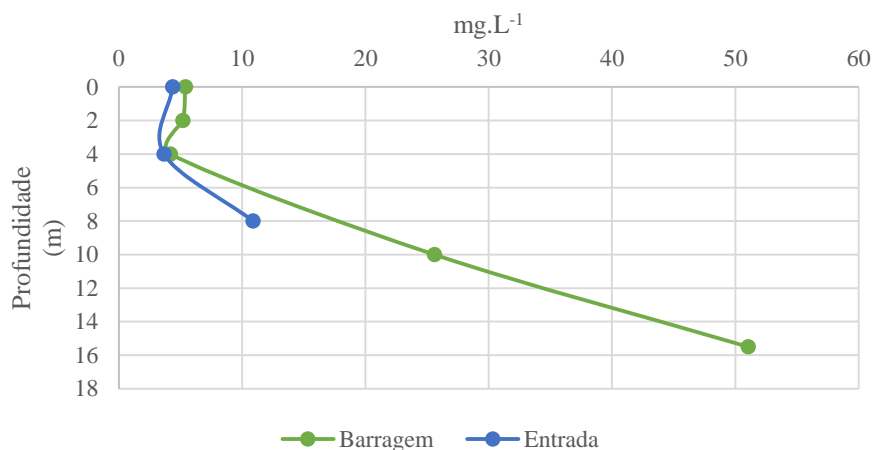


Figura 16: Concentração de íons amônio nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

O mesmo padrão de aumento de amônio no fundo foi verificado para o lago Averno, localizado na Itália, onde Paganin *et al.* (2012) encontraram valores crescentes de amônia em camadas profundas. Isto pode ser justificado pela decomposição de matéria orgânica nitrogenada, em um processo anaeróbico realizado por bactérias produtoras de amônia.

O nitrito variou menos no ponto da barragem (0,66 mg.L⁻¹ e 0,64 mg.L⁻¹, na superfície e fundo, respectivamente, desvio padrão de 0,05), se comparado ao ponto da entrada onde a concentração variou de 4,64 mg.L⁻¹ para 6,55 mg.L⁻¹ na superfície e fundo, respectivamente, desvio padrão de 1,30 (Fig. 17).

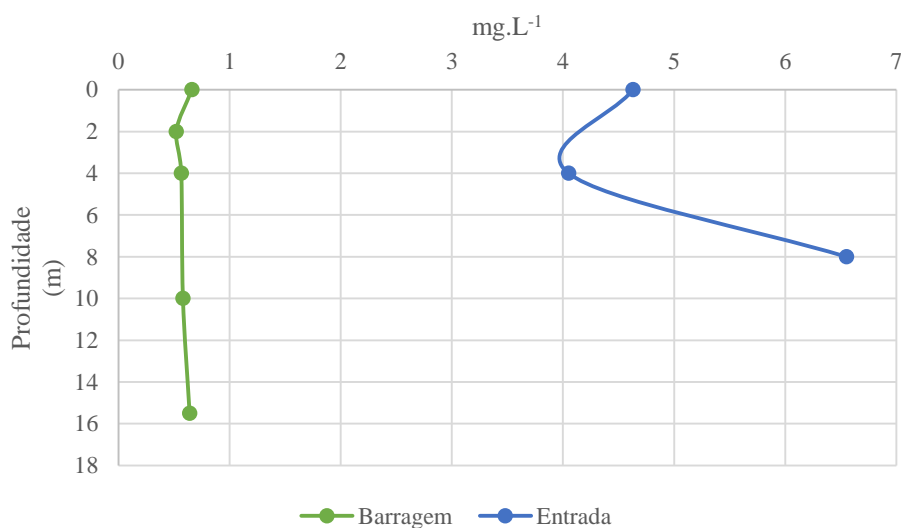


Figura 17: Concentração de nitrito nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012

A concentração de nitrato na superfície da barragem foi de 0,35 mg.L⁻¹ e no fundo de 0,39 mg.L⁻¹. Já no ponto da entrada tanto na superfície quanto no fundo a concentração foi de 0,61 mg.L⁻¹ (Fig. 18).

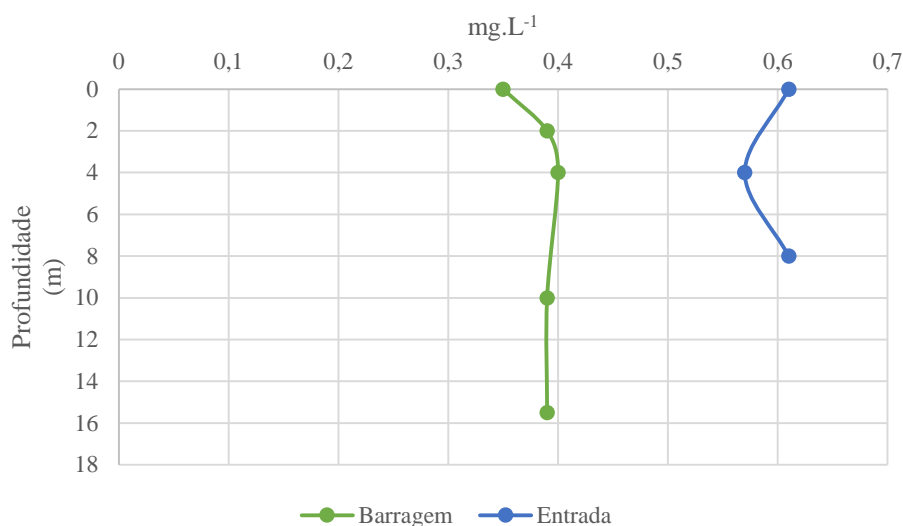


Figura 18: Concentração de nitrato nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

No ponto da entrada as maiores concentrações de nitrito e nitrato são justificadas pela chegada dos nutrientes a partir dos rios formadores e no ponto da barragem a diminuição dos nutrientes ocorre pelo metabolismo e incorporação pelos organismos.

Maiores concentrações de compostos nitrogenados foram encontradas também no ponto da entrada do reservatório, nos períodos de outubro de 2009 e abril de 2010 a concentração de nitrato foi de 1,04 e 0,57 mg.L⁻¹, respectivamente e a concentração de nitrito foi de 0,29 e 0,28 µg.L⁻¹, respectivamente (DUARTE; DA SILVA, 2011).

A presença de compostos nitrogenados na represa de Itupararanga favorece o crescimento de bactérias desnitrificantes em regiões anóxicas do reservatório. Duarte; da Silva (2011) encontraram grande concentração destas bactérias no sedimento do ponto da barragem ($4,3 \times 10^{10}$ NMP.gSSV⁻¹) devido a decomposição da matéria orgânica.

As maiores concentrações de fósforo foram encontradas no fundo do reservatório (0,57 e 1,73 nos pontos da barragem e da entrada, respectivamente) e menores na superfície (0,37 e 1,06 nos pontos da barragem e da entrada, respectivamente) indicando que sua principal fonte é alóctone já que a maior concentração foi verificada no ponto de encontro dos rios (Fig.19).

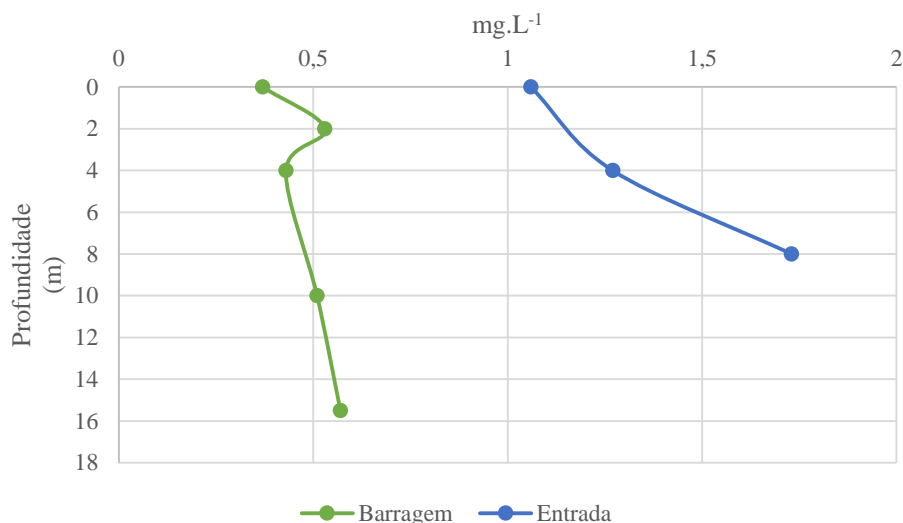


Figura 19: Concentração de fósforo dissolvido nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

A forma de fósforo disponível para o metabolismo de microrganismos é o ortofosfato que variou ao longo da coluna d'água, aumentando de 2,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na superfície para 2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no fundo da barragem e de 6,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 7,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 20).

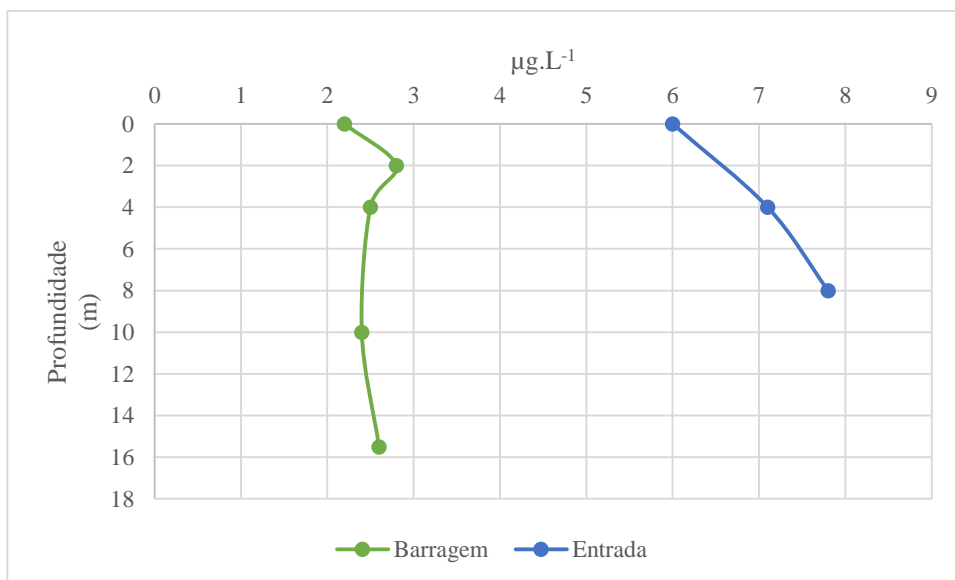


Figura 20: Concentração de ortofosfato nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

Na entrada do reservatório foi observada a maior concentração de ortofosfato se comparada a barragem, isto pode ser explicada pela origem deste nutriente que pode ser a

partir da dissolução de compostos do solo, da decomposição de matéria orgânica, lançamento de compostos como surfactantes provenientes de esgoto, fertilizantes entre outros. É um nutriente essencial para o desenvolvimento do plâncton, logo ele é incorporado rapidamente pelas comunidades, porém em altas concentrações favorece a eutrofização do corpo hídrico.

A concentração de nutrientes é um dos parâmetros usados para determinação da trofia a partir de um índice de estado trófico (Tab. 5). As represas Billings e Guarapiranga, por exemplo, foram classificadas como hipereutróficas de acordo com a alta concentração de fósforo que acelerou o crescimento do fitoplâncton (GEMELGO *et al.*, 2009).

O reservatório de Itupararanga, no entanto, foi considerado mesotrófico e eutrófico na estação chuvosa e seca respectivamente de acordo com o índice de estado trófico, sendo a região próxima a entrada dos rios a de pior qualidade de águas (PEDRAZZI *et al.*, 2013).

Tabela 5: Estado trófico de cinco reservatórios, Itupararanga, Billings, Guarapiranga, Broa e Barra Bonita.

Reservatório	Estado trófico	Fósforo dissolvido (mg.L ⁻¹)	Referência
Itupararanga	Mesotrófico/Eutrófico	0,07– 0,23	PEDRAZZI <i>et al.</i> , 2013
Itupararanga	Mesotrofico	-	BEGHELLI <i>et al.</i> , 2012
Itupararanga	Mesotrófico	0,01 -0,1	CUNHA, 2012
Billings	Eutrofico	-	CUNHA <i>et al.</i> , 2011
Guarapiranga	Hipereutrófico	-	GEMELGO <i>et al.</i> , 2009
Broa	Mesotrófico/Eutrófico	3,72x10 ³ – 0,16	FREITAS, 2012
Barra Bonita	Eutrofico	0,01– 0,31	CALIJURI <i>et al.</i> , 2002

Os dados deste trabalho parecem indicar um ambiente eutrófico, mas devido a pequena amostragem não é possível determinar o Estado Trófico do sistema. Cunha (2012) e Beghelli *et al.*, (2012) consideraram o sistema mesotrófico.

Para facilitar a segunda parte da discussão que trata das variáveis biológicas foi elaborado uma tabela com as principais características ambientais encontradas nos dois pontos de amostragem (Tab. 6).

Tabela 6: Média das variáveis físico-químicas na represa de Itupararanga em coleta realizada em 16/04/2012.

Variáveis	Barragem	Entrada
Temperatura (°C)	24,16	22,62
pH	7,09	6,42
O. D. (mg.L⁻¹)	8,29	3,6
Condutividade (µS.cm⁻¹)	67	100
P. redox (mV)	-66	-26,8
SST (mg g.L⁻¹)	4,65	6,8
SSO (mg g.L⁻¹)	3,0	3,1
SSI (mg g.L⁻¹)	1,25	3,85
Alcalinidade (mgCaCO₃.L⁻¹)	1,23	2,22
Ortofosfato (mg.L⁻¹)	2,5	7,1
Nitrato (mg. L⁻¹)	0,39	0,61
Nitrito (mg. L⁻¹)	0,58	4,63
Íons amônia (mg. L⁻¹)	5,4	4,37
Fósforo dissolvido (mg.L⁻¹)	0,51	1,27
Nitrogênio (mg. L⁻¹)	0,28	0,34

4.2 Caracterização microbiológica da água

4.2.1 Clorofila

Apesar das diferenças entre os grupos e entre as condições de crescimento que podem alterar a composição pigmentar de cada célula a biomassa do fitoplâncton pode ser estimada a partir da determinação da clorofila (DOS SANTOS *et al.*, 2003).

No ponto da barragem foi observada a maior concentração de clorofila no fundo do reservatório (28,46 µg.L⁻¹) e a menor a 10 metros de profundidade (10,32 µg.L⁻¹) o mesmo padrão foi verificado no ponto da entrada com maiores concentrações no fundo (22,43 µg.L⁻¹) e menor a 4 metros de profundidade (8,37 µg.L⁻¹) (Fig. 21).

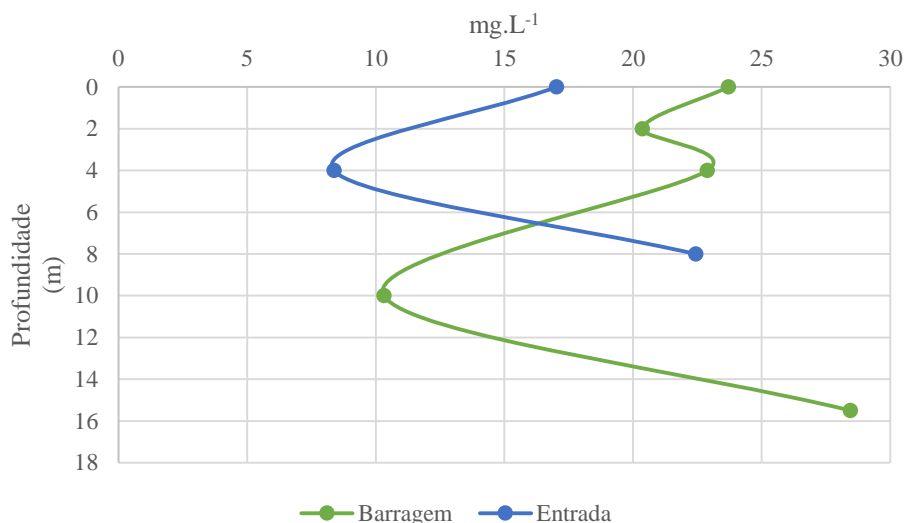


Figura 21: Concentração de clorofila nas profundidades da coluna d'água nos pontos da Barragem e Entrada do reservatório Itupararanga no dia 16/04/2012.

Maiores concentrações de clorofila no fundo do ponto da entrada podem ter tido sua origem em fontes alóctones, sendo que parte deste valor corresponde a clorofila degradada, já que segundo Dos Santos, (2003) o método usado para detecção do pigmento sofre interferência da feoftina e outros pigmentos resultantes da degradação da clorofila.

Os maiores valores de clorofila observados no fundo do ponto da barragem podem estar relacionado a matéria orgânica viva, uma vez que a comunidade de cianobactérias pode migrar na coluna de água (HENRY-SILVA *et al.*, 2010).

No ponto da barragem foram encontrados maiores valores de clorofila (média), isto pode ter sido influenciado pela maior zona eufótica encontrada neste ponto (3,69 m) em relação à entrada (2,79 cm). O mesmo padrão foi verificado por Dos Santos, (2003) nos reservatórios do Lobo e Salto Grande corroborando o modelo de compartimentalização proposto por Thorton (1990) no qual a área próxima á barragem apresenta maior zona eufótica, com condições que favorecem o crescimento da comunidade fitoplanctônica se comparadas a entrada do sistema.

Os valores de clorofila observados nas superfícies dos pontos provavelmente estão relacionados às comunidades fitoplanctônicas que ocorrem no reservatório. A presença de cianobactérias em reservatórios tem sido relatada por diversos estudos (TUCCI *et al.*, 2006; PANOSSO *et al.*, 2007; CUNHA; CALIJURI, 2011, VARGAS, 2012) e tem predominado em várias épocas do ano no reservatório de Itupararanga (CASALI, dados não publicados).

4.2.2 Riqueza de microrganismos

Na represa de Itupararanga nesta amostragem foi encontrada maior riqueza de bactérias (41 OTU) em relação à arqueias (31 OTU) no ponto da entrada, enquanto que na barragem para ambas as comunidades foi observado o mesmo número de bandas (30 OTU) como pode ser observado na Fig. 22 e 23 respectivamente.

Graça *et al.*, (2011) observaram que nas camadas mais profundas da coluna de água (40 metros) do reservatório de Tucuruí no rio Tocantins (Estado do Pará) ocorriam mais unidades taxonômicas operacionais (OTU's) de bactérias do que de arqueias após clonagem e sequenciamento das bandas de DGGE.

A maior riqueza de bactérias se comparado a arqueia parece ser padrão. Maior riqueza de arqueias em relação a bactérias tem sido encontrada somente em ambientes com stress crônico uma vez que as arqueias são organismos mais adaptados a condições adversas do que bactérias que por sua vez apresentam uma vasta gama de vias metabólicas, genéticas e fisiológicas (VALENTINE, 2007).

As adaptações apresentadas por arqueias ao stress ambiental podem ser ilustradas pela composição lipídica da membrana, vias catabólicas e mecanismos de conservação de energia que faz com que estes organismos comportem-se como especialistas enquanto que as bactérias podem se distribuir em ambientes mais dinâmicos atuando como generalistas (SMETI *et al.*, 2013).

Neste trabalho foi observada variação na riqueza de microrganismos nos diferentes pontos amostrados, entrada e barragem e nas diferentes profundidades ao longo da coluna d'água.

Este padrão parece não confirmar a teoria de que todos os microrganismos estão em todos os lugares (BASS-BECKING, 1934) já que mostra que nas condições encontradas na represa de Itupararanga no momento da coleta, os microrganismos estavam distribuídos de forma heterogênea ao longo da coluna d'água e dos pontos analisados.

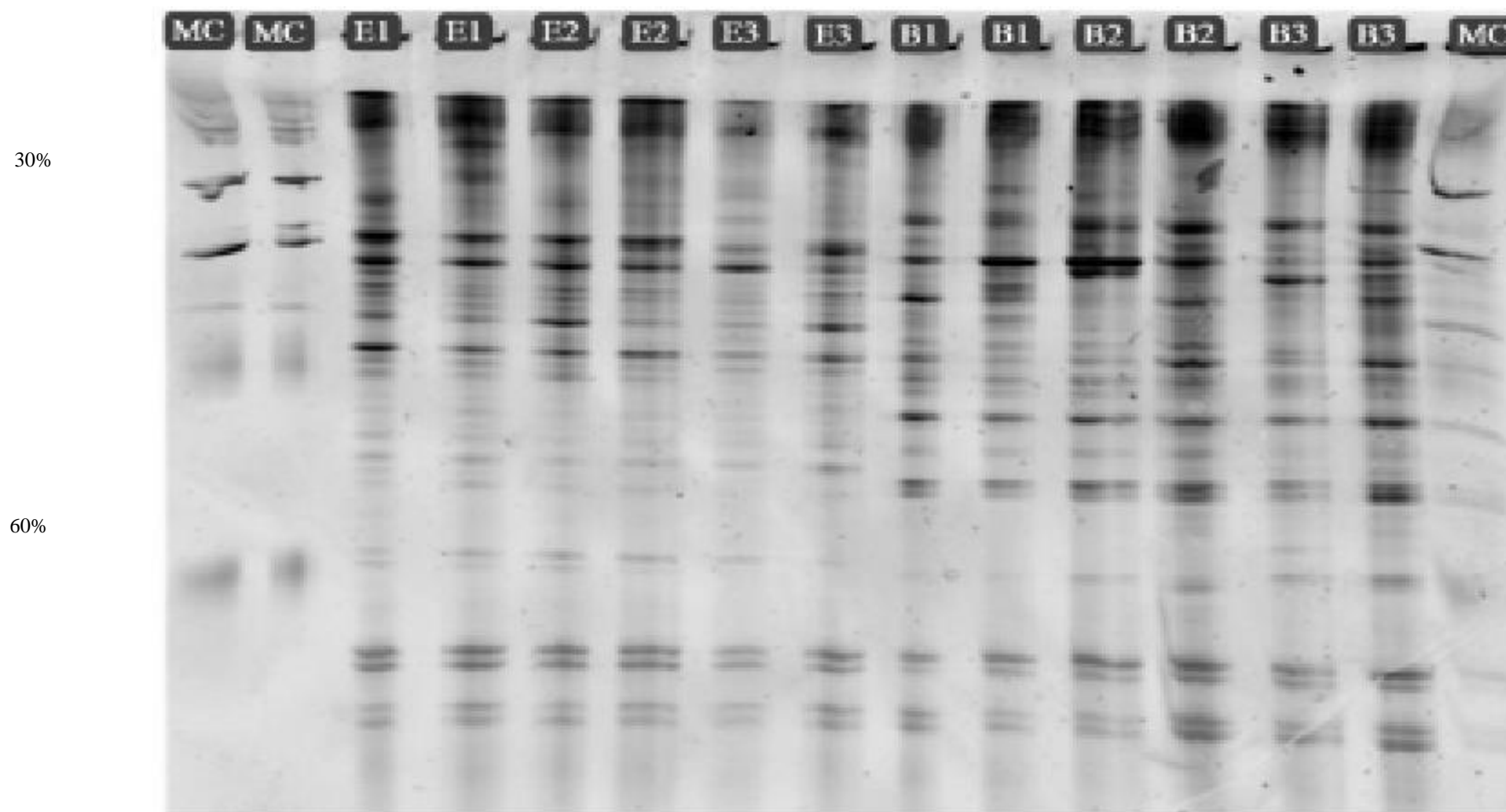


Figura 22: Perfil de bandas do DGGE da comunidade bacteriana presente na água do reservatório de Itupararanga na superfície (E1 e B1, entrada e barragem, respectivamente) meio (E2 e B2, entrada e barragem, respectivamente) e fundo (E3 e B3, entrada e barragem, respectivamente) no momento da coleta em 16/04/2013. MC – Marcador. Concentração de desnaturação 30% - 60%.

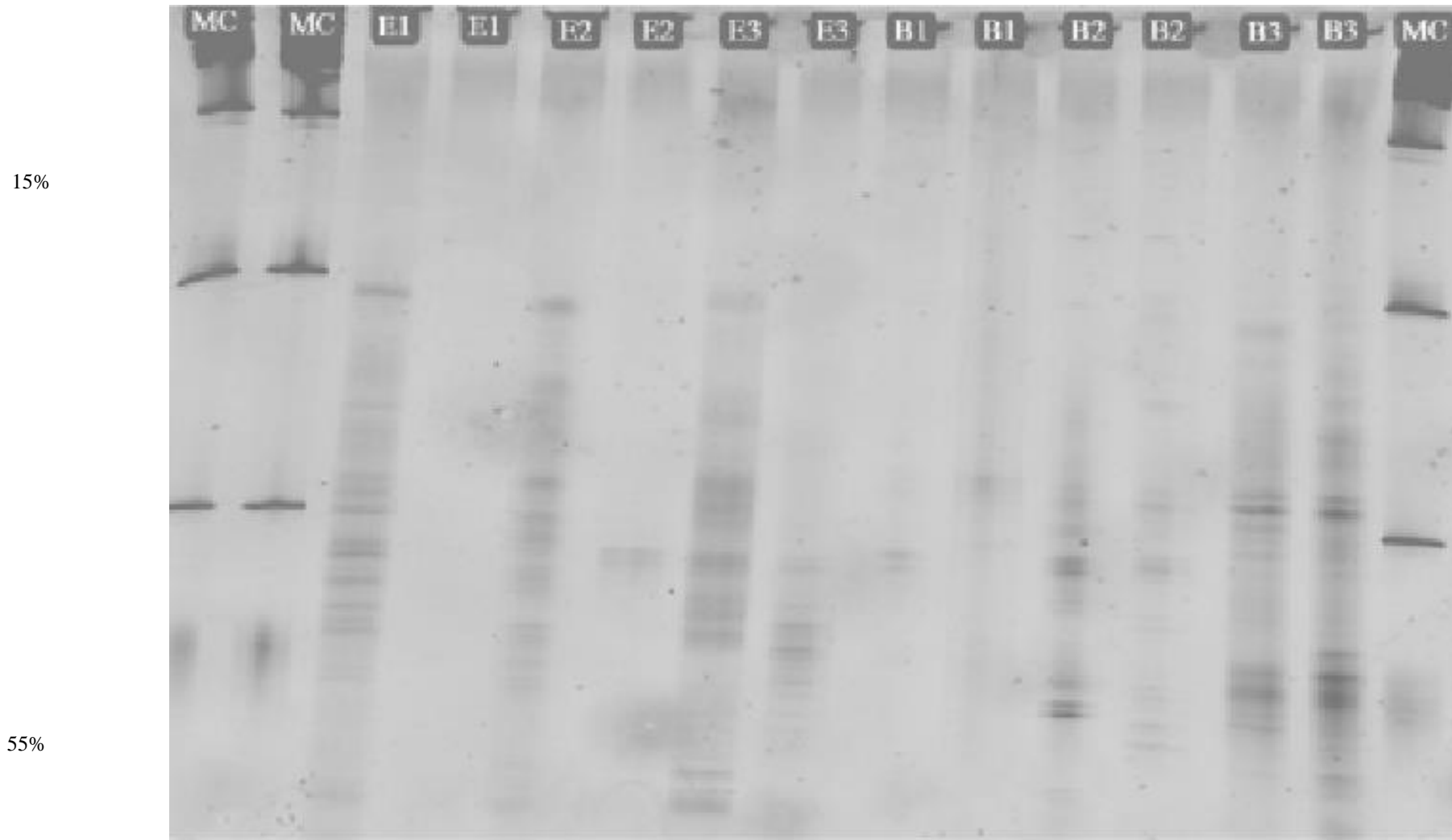


Figura 23: Perfil de bandas do DGGE da comunidade bacteriana presente na água do reservatório de Itupararanga na superfície (E1 e B1, entrada e barragem, respectivamente) meio (E2 e B2, entrada e barragem, respectivamente) e fundo (E3 e B3, entrada e barragem, respectivamente) no momento da coleta em 16/04/2013. MC – Marcador. Concentração de desnaturação 15% – 55%.

Assim como é observado em organismos de maior porte, os microrganismos possuem limitações que determinam sua ocorrência e sua distribuição é determinada além de variações ambientais e disponibilidade de nutrientes pelo histórico do ambiente.

Turque *et al.* (2010) encontraram maior diversidade de arqueias na baía de Guanabara em relação ao arquipélago Cagarras o que foi atribuído a maior concentração de nutrientes e poluentes no estuário. Na baía de Guanabara foi encontrada associação entre esponjas a arqueias oxidantes de amônia, o que pode indicar uma adaptação à eutrofização.

Taketani *et al.* (2010a) em experimentos com bactérias e arqueias de manguezal concluíram que as comunidades bacterianas que tiveram contato prévio com contaminação por óleo apresentaram maior riqueza em um novo contato com o poluente em relação às comunidades que nunca haviam sido expostas ao óleo, indicando que o histórico também é determinante da ocorrência de comunidades microbianas.

Em sedimentos de manguezais, Taketani *et al.* (2010b) encontraram perfil de bandas do DGGE semelhante em profundidades de 0 a 30 m de profundidade, enquanto em solos mais profundos (acima de 35 metros) o padrão foi distinto, sendo que neste ambiente a matéria orgânica foi o fator que exerceu maior efeito na diversidade de arqueias metanogênicas.

A similaridade entre os pontos e entre as profundidades foi determinada a partir do índice de Jaccard (Tab. 7) e indicou que a composição da comunidade microbiana é diferente ao longo da coluna d'água.

Tabela 7: Índice de similaridade de Jaccard para os OTUs de bactérias e arqueias mostrados no DGGE para os pontos da entrada e da barragem da represa de Itupararanga em coleta, presentes em coleta realizada em 16/04/2012. (E1: Entrada 0,0 m; E2: Entrada 4,0 m; E3: Entrada 8,0 m; B1: Barragem 0,0 m; B2: Barragem 4,0 m; B3: Barragem 15,5 m)

Locais	Índice de Similaridade de Jaccard (%) bactéria	Índice de Similaridade de Jaccard (%) arqueia
E1 x E2	41	36
E1 x E3	46	42
E2 x E3	55	50
B1 x B2	43	33
B1 x B3	40	22
B2 x B3	39	36
Entrada x Barragem	81	71

A comunidade bacteriana da superfície e fundo de ambos os pontos foram mais semelhantes (46% e 40%, entrada e barragem, respectivamente) do que a comunidade de arqueias nas mesmas regiões (42% e 22%, entrada e barragem, respectivamente), indicando que grande parte das bactérias não é restrita às condições de hipoxia ou aeróbias, enquanto que diferentes populações de arqueias ocorrem nas diferentes profundidades.

Smeti *et al.* (2013) encontraram grande variação entre as comunidades de arqueias e bactérias em diferentes ambientes, água doce, lama de vulcões e fontes termais, sendo que as diferenças mais pronunciadas foram encontradas entre bactérias e arqueias de um mesmo ambiente do que considerando a mesma assembleia de diferentes ambientes.

A diferença observada entre ambas as comunidades neste trabalho foi maior ao longo da coluna d'água de cada ponto do que entre os dois pontos, entrada e barragem, isto é, foi verificada maior heterogeneidade vertical e maior homogeneidade horizontal para ambas as comunidades.

O padrão heterogêneo de distribuição vertical da comunidade microbiana pode estar relacionada à estratificação térmica e química verificada na coluna d'água. A saturação de oxigênio, por exemplo, variou de 100% na superfície da barragem para 14% no fundo e de 74% na superfície da entrada para 28% no fundo.

De acordo com a saturação de oxigênio dissolvido na coluna d'água da represa pode-se verificar uma região óxica na superfície e uma região hipóxica no fundo, o que provavelmente afetou a distribuição das comunidades, principalmente de arqueia cuja diferença entre as comunidades da superfície e fundo foi de 78%, enquanto que para bactéria esta variação foi de 60%.

A semelhança verificada entre as comunidades da entrada e barragem (81 % e 71%, bactéria e arqueia, respectivamente) indicou que as condições ambientais encontradas nos pontos ocasionaram menores efeitos aos microrganismos do que as variações verticais, isto porque, ambos os pontos apresentaram estratificação térmica e química que exercem grande pressão nas comunidades microbianas.

Estudos revelam diferentes similaridades entre a comunidade bacteriana de diversos ambientes. A similaridade de Jaccard, por exemplo, entre o bacterioplâncton e a comunidade do sedimento da região da Grande barreira de Corais na Austrália foi de 15%, enquanto que considerando apenas a comunidade do sedimento deste local, ao longo de um transecto de 140 metros à similaridade foi de 46%.

Na tabela 8 estão descritos diversos trabalhos que utilizam o índice de Jaccard para comparar a riqueza de diferentes comunidades. Apesar de não serem do mesmo ambiente do atual estudo é possível determinar uma ordem de grandeza para medir a similaridade entre comunidades.

Tabela 8: Similaridade entre comunidades microbianas em diferentes ambientes.

Amostra	Local	Similaridade (Jaccard) %	Referência
Sedimentos	Austrália	46	Hewson; Fuhrman, 2006
Água X sedimento -	Austrália	15	Hewson; Fuhrman, 2006
Águas	Austrália	48	Hewson; Fuhrman, 2005
Sedimento puro X sedimento utilizado em reator hidrogenotrófico	Reservatório Itupararanga	38	Maintinguer <i>et al.</i> , 2011

As maiores similaridades encontradas para o domínio *Bacteria* foram observadas entre o meio e o fundo do ponto da entrada e entre a superfície e meio da coluna de água no ponto da barragem (55% e 43%, respectivamente) enquanto que as maiores diferenças foram observadas entre a superfície e meio do ponto da entrada e entre meio e fundo da barragem.

No ponto da barragem as amostras da superfície e meio foram coletadas na zona eufótica e a coleta do fundo na zona afótica, enquanto que no ponto da entrada a coleta da superfície foi realizada na zona eufótica enquanto que as amostragens do meio e fundo foram realizadas na zona afótica.

A maior similaridade da barragem ocorreu entre as comunidades presentes na zona eufótica, que favorece o crescimento de organismos fotossintetizantes, enquanto que na entrada maior similaridade foi verificada na zona afótica que favorece o crescimento de organismos heterotróficos.

Em reservatórios estratificados, a temperatura diminui abruptamente abaixo da termocline de modo que não ocorre mistura de águas. As condições da região superficial, como luz, favorecem a distribuição de bactérias fotossintetizantes ou aquelas que utilizam os sub-produtos da fotossíntese como substrato, enquanto que abaixo desta camada, forma-se uma camada anóxica e rica em matéria orgânica que favorece processos de

decomposição e conseqüentemente a presença de bactérias heterotróficas (FEARNSIDE, 2008).

4.2.3 Densidade de procariontes

A quantidade de cópias do gene 16S de bactérias (média: $4,19 \times 10^7$ cópias.L⁻¹ e $5,60 \times 10^7$ cópias.L⁻¹, entrada e barragem respectivamente) foi maior do que de arqueia (média: $4,29 \times 10^2$ cópias.L⁻¹ e $2,60 \times 10^2$ cópias.L⁻¹ entrada e barragem, respectivamente) (Figura 24).

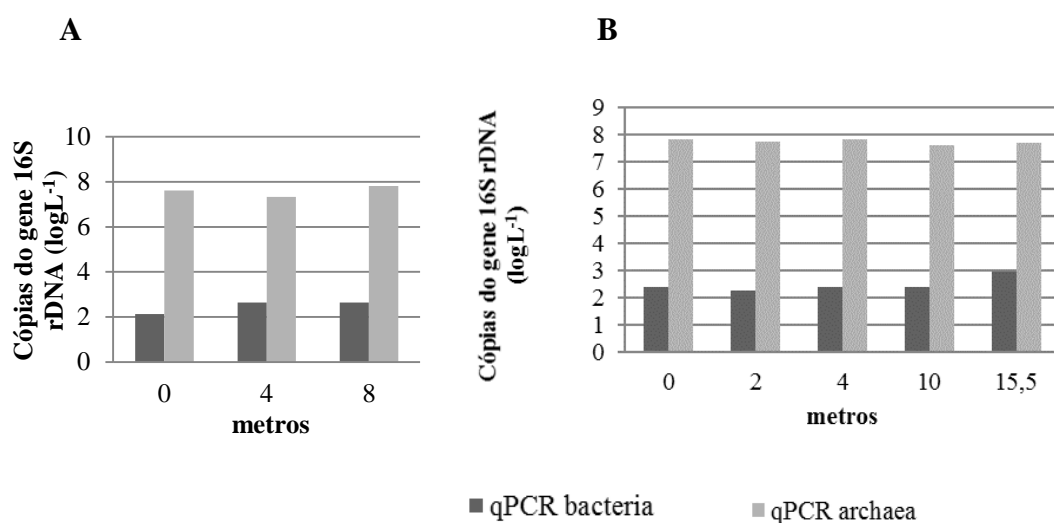


Figura 24:Quantidade de cópias do gene 16S do rDNA de arqueias e bactérias presentes em A - entrada e B - barragem do reservatório de Itupararanga ao longo da coluna d'água.

A ausência de trabalhos que determinem a abundância de ambos os grupos em ambientes tropicais de água doce represados dificultam comparações entre os dados obtidos na represa de Itupararanga, além disso, a maioria dos trabalhos encontrados que usam qPCR para comparar a abundância de bactérias e arqueias consideram as oxidantes de amônio (AOB e AOA, respectivamente), enquanto poucos utilizam o gene 16S nesta comparação que ocorrem em diferentes ambientes como solo, áreas alagadas e fonte termal (Tab.9).

Tabela 9: abundância de bactérias e arqueias por meio de qPCR em diferentes ambientes

Ambiente	Abundância bactéria	Abundância arqueia	Gene	Referência
Tundra ártica	$5,4 \times 10^9$ copias.g solo ⁻¹	$1,96 \times 10^8$ copias.g solo ⁻¹	16S	Lee <i>et al.</i> , 2012
Solo de mata atlântica	$4,2 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	16S	Lima, 2011
Kimchi (alimento coreano fermentado)	$3,3 \times 10^5$ - $1,2 \times 10^7$ cópias.ng ⁻¹	$3,2 \times 10^3$ - $3,8 \times 10^4$ cópias.ng ⁻¹	16S	Park <i>et al.</i> , 2009
Sedimento – lago Kinneret Israel	10^{10} copias.cm ⁻¹	10^8 copias. cm ⁻¹	16 S	Schwarz <i>et al.</i> , 2007
Solo pantanoso	$1,2 \times 10^6$ – $1,9 \times 10^7$ copias.g solo ⁻¹	$1,2 \times 10^7$ – $1,5 \times 10^8$ copias.g solo ⁻¹	Amônio oxidante	Sims <i>et al.</i> , 2012
Sedimento estuário Rio das Pérolas - China	$9,5 \times 10^4$ – $6,2 \times 10^5$ copias.g solo ⁻¹	$9,6 \times 10^6$ – $5,1 \times 10^7$ copias.g solo ⁻¹	Amônio oxidante	Jin <i>et al.</i> , 2011
Água - Rio Dongjiang -China	$6,3 \times 10^3$ – $5,4 \times 10^4$ copias.L ⁻¹	$4,1 \times 10^6$ – $6,6 \times 10^7$ copias.L ⁻¹	Amônio oxidante	Liu <i>et al.</i> , 2011

Neste trabalho, a densidade de bactérias foi maior do que a de arqueias seguindo o mesmo padrão observado para a riqueza. Em solo de mata atlântica, Lima (2011) encontrou maior abundância de bactérias em relação a arqueias, o que foi atribuído à quantidade de nutrientes disponível que favorece intensa ciclagem de nutrientes e, portanto, é mais adequado ao desenvolvimento de bactérias.

A quantidade de cópias do gene 16S rDNA, abundância, de ambos os domínios *Bacteria* e *Archaea* foi maior no sedimento em relação à coluna d'água (Fig. 25). Isto pode ocorrer devido a maior disponibilidade de nutrientes e elevado teor de matéria orgânica do sedimento.

Beghelli et al., (2012) fizeram análises do sedimento da represa de Itupararanga e encontraram, no período chuvoso (fevereiro 2010), concentrações de nitrogênio (aproximadamente $2,4 \text{ mg.g}^{-1}$ e $1,7 \text{ mg.g}^{-1}$, entrada e barragem, respectivamente) e fósforo (aproximadamente $8,0 \text{ mg.g}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg.g}^{-1}$, entrada e barragem, respectivamente) maiores do que as observadas neste trabalho, na água.

Em três das quatro coletas realizadas no reservatório de Itupararanga por Beghelli et al (op cit) foi observado sedimento mais grosso no ponto da entrada em relação ao sedimento da barragem. Em contrapartida o sedimento da barragem possuía maior teor de matéria orgânica (maior ou igual a 15%) em relação ao sedimento da entrada (menor ou igual a 5%) (Beghelli et al., 2012). Apesar disso, no ponto da entrada foi observada maior quantidade de bactérias e arqueias, indicando que a matéria orgânica sozinha não determinou, nessas condições, a abundância dos microrganismos, mas outro fator, como por exemplo a condição de anoxia do sedimento.

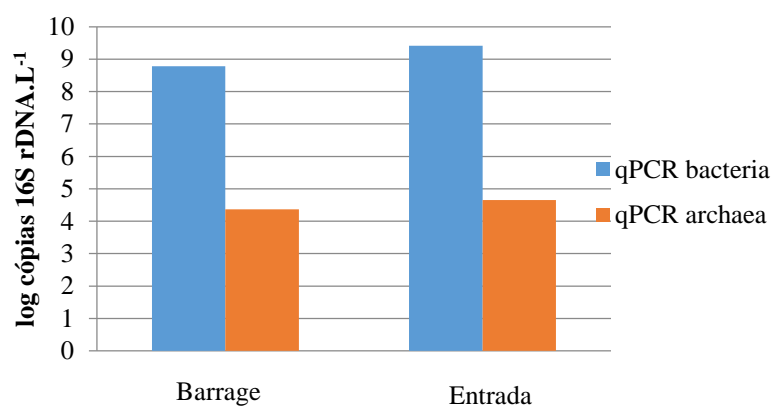


Figura 25: Abundância de bactérias e arqueias no sedimento de dois pontos da represa de Itupararanga em 16/04/2012.

Maintinguer *et al.* (2011) isolaram do sedimento da represa de Itupararanga consorcio de bactérias hidrogenotróficas na forma de bacilos, endósporos ou bacilos com endósporos e obtiveram geração de biohidrogênio em reator em batelada alimentado com xilose. A contagem do número mais provável (NMP) de bactérias acidogênicas revelou $4,3 \times 10^2 \text{ NMP.mL}^{-1}$ equivalente a $3,3 \times 10^5 \text{ células.gSTV}^{-1}$ indicando que provavelmente ocorre produção biológica de hidrogênio no sedimento do reservatório.

A maior abundancia de bactérias em relação a arqueias na água e no sedimento pode ser atribuída a maior plasticidade metabólica da comunidade bacteriana que faz com

que esta se comporte como generalistas, enquanto que arqueias por serem mais adaptadas às condições de stress sejam mais especialistas (SMETI et al., 2013).

Adicionalmente, a grande quantidade de matéria orgânica favorece um ambiente com intensa ciclagem de nutrientes que possivelmente seja mais adequado ao desenvolvimento de bactérias do que de arqueias.

Para facilitar o estabelecimento de hipótese sobre a distribuição destas comunidades no ambiente relacionado às condições ambientais foi realizada uma análise exploratória dos dados a partir de análise de correspondência canônica (Fig. 26).

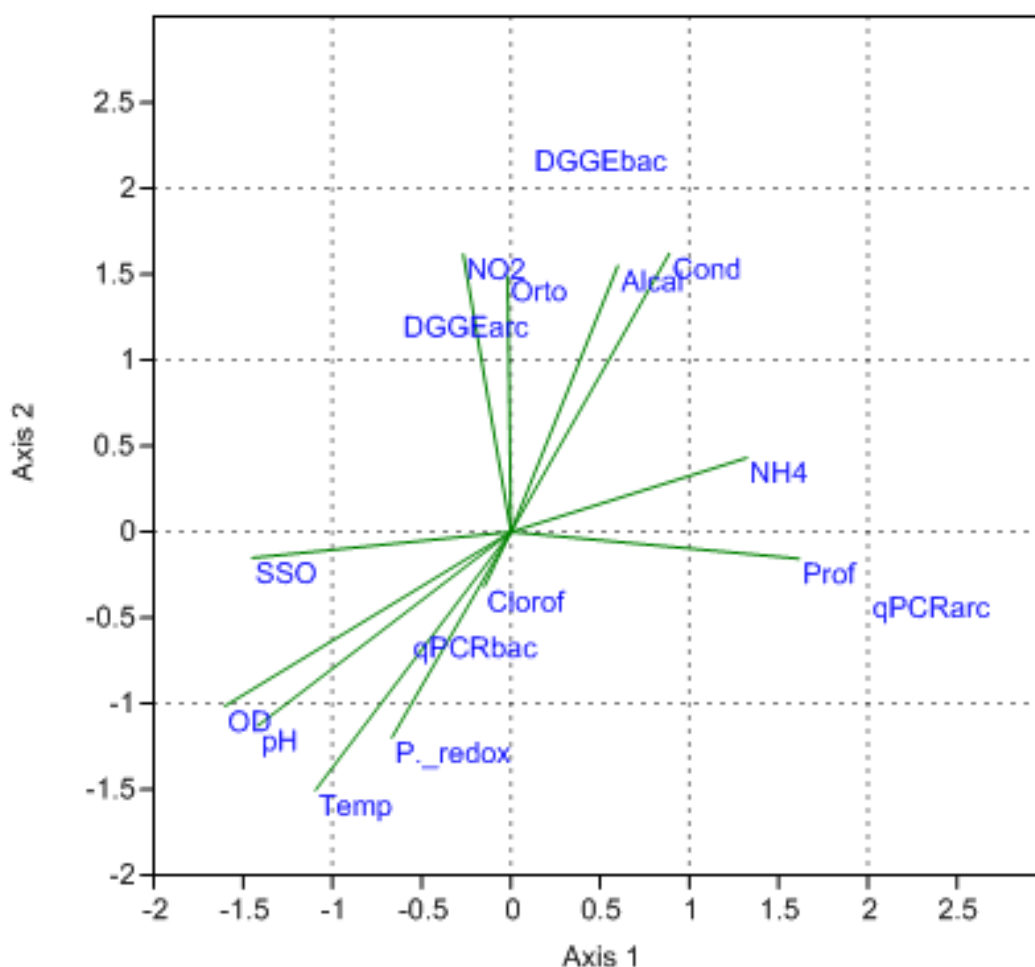


Figura 26: Análise de correspondência canônica relacionando as variáveis microbiológicas (qPCR arc: PCR quantitativo 16S rDNA arqueia; qPCR bac: PCR quantitativo 16S rDNA bactérias; DGGE arc: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante de arqueias; DGGE bac: Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante de bactérias; Clorof.: Clorofila) às variáveis ambientais (O.D: Oxigênio dissolvido; pH; Temp: temperatura; P. redox: Potencial redox; SSO: sólidos suspensos orgânicos; Prof.: Profundidade; Alca: alcalinidade; Cond.: Condutividade; Orto: Ortofosfato; NO2: Nitrito; NH4: íons amônia) da represa de Itupararanga em coleta realizada em 16/04/2012.

A partir da análise de correspondência canônica puderam-se delimitar três agrupamentos. A quantidade de arqueias (número de cópia do 16S por qPCR) foi

relacionada à profundidade e à concentração de íons amônia. Esse agrupamento sugere presença e abundância de arqueias oxidante de amônia na coluna d'água da represa de Itupararanga.

Francis *et al.* (2005) sugeriram que estes organismos são amplamente distribuídos na coluna d'água (do Mar Negro e bacia de Monterey) e nos sedimentos (a Baía de São Francisco e Baía del Tóbari, México) com importante papel no ciclo do nitrogênio, pois são responsáveis pelo processo de nitrificação. Segundo este autor, na coluna d'água dos ambientes estudados, estes organismos possuem distribuição ubíqua, enquanto que no sedimento a maioria das sequências é única para cada região amostrada, sendo poucas as comunidades com padrão de distribuição cosmopolita.

Os autores *op cit* encontraram maior riqueza de AOA (arqueias oxidantes de amônia) em relação ao descrito na literatura para AOB (bactérias oxidantes de amônia). Romagnoli (2011) encontrou maior abundância de AOA em relação à AOB em amostras de solo da Mata Atlântica.

Liu *et al.*, (2011) em estudo realizado no rio Dongjiang, China, encontraram maior densidade de AOA em relação a AOB, sendo que o local com menor concentração de íons amônia ($510\mu\text{g.L}^{-1}$) possuía maior abundância de arqueias em relação a bactérias oxidantes de amônia indicando que as primeiras podem ser mais eficientes em explorar o recurso e possuem papel mais importante no processo de oxidação de amônia em relação às bactérias, no ambiente estudado.

O segundo agrupamento relacionou a quantidade de bactérias (qPCR) às condições ambientais, tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido, e à clorofila, isto pode indicar que a maior parte das bactérias da represa de Itupararanga é composta por cianobactérias ou por bactérias que utilizam metabolitos secundários destes organismos. Cunha (2012) encontrou na represa de Itupararanga $4,2 \times 10^6$ ind.L⁻¹ de cianobactéria que se concentravam na superfície do reservatório devido a estratificação térmica.

Como neste trabalho foi extraído DNA de organismos menores que $0,4 \mu\text{m}$ (diâmetro do poro do pré-filtro), provavelmente os organismos encontrados na superfície não são da mesma espécie encontrada por Cunha (2012) que é uma cianobactéria filamentosa de tamanho maior (*Cylindrospermopsis raciborskii*), porém pode ser uma espécie de menor porte ou bactérias que vivem associadas as cianobactérias e que fazem parte do picoplâncton.

O picoplâncton é constituído por bactérias autótrofas, principalmente *Synechococcus* sp e heterótrofas de 0,2 a 2,0 μm que possuem um amplo espectro nutricional e segundo Sarmento (2012) tem sua abundância elevada com a eutrofização.

Apesar da pequena quantidade de dados é possível determinar uma correlação entre a concentração de clorofila e a densidade de bactérias determinada pelo número de cópias de DNA (qPCR) (figura 26) o que indica, pelo menos, uma relação entre as comunidades de organismos fototróficos (microfitoplâncton) e o picoplâncton.

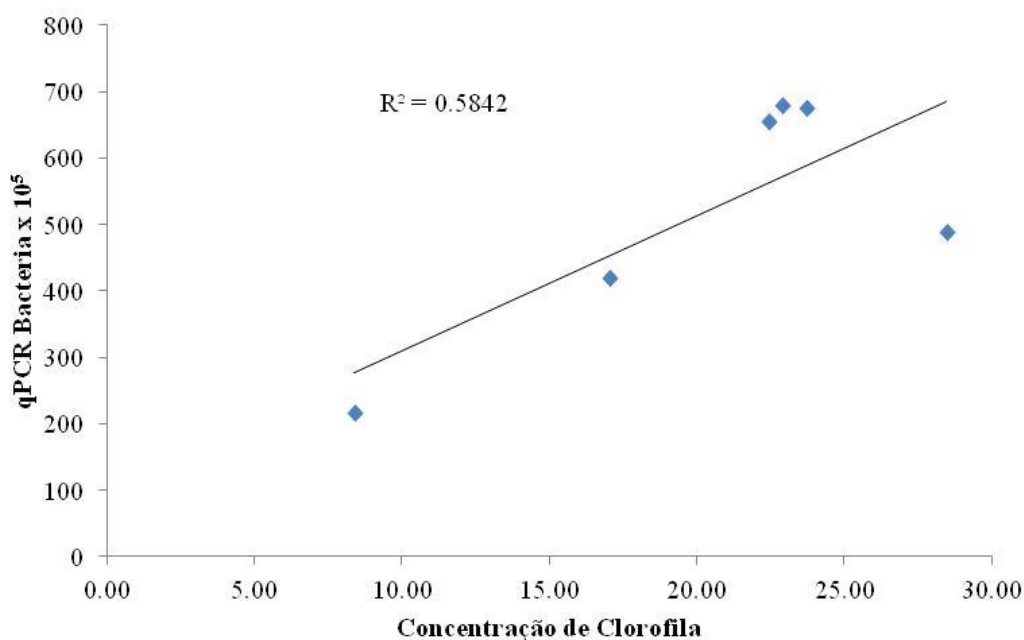


Figura 27: Correlação linear entre os dados de qPCR e a concentração de clorofila nos pontos de entrada e barragem do reservatório Itupararanga.

Em lagos tropicais o picoplâncton possui importante papel na alça microbiana (Fig. 27) já que sua excreção e decomposição disponibilizam matéria orgânica que quando mineralizada leva ao aumento na concentração de nutrientes e favorece a produtividade primária (SARMENTO, 2012).

Tenebaum et al., (2001) mostraram que 1,5% da biomassa planctônica da baía de Guanabara, RJ, era constituída pelo picoplâncton, sendo que foi verificado aumento na biomassa de bactérias autótrofas em relação às heterótrofas, já que as primeiras foram maiores, em tamanho, do que as heterótrofas. Siqueira (2006) encontrou predomínio de bactérias heterotróficas no picoplâncton de amostras do litoral paranaense que aumentou durante a estação chuvosa em relação ao nano e microplâncton.

Por fim, a riqueza de arqueia e bactéria foi relacionada à disponibilidade de nutrientes, como ortofosfato e nitrato, indicando que estes podem ser limitantes para as

comunidades permitindo ou excluindo grupos que competem pelo recurso. Isto ocorre porque alta concentração de nutrientes favorece o aumento de microrganismos produtores e conseqüentemente de outros microrganismos da cadeia alimentar, como de bactérias heterotróficas que utilizam da matéria orgânica morta.

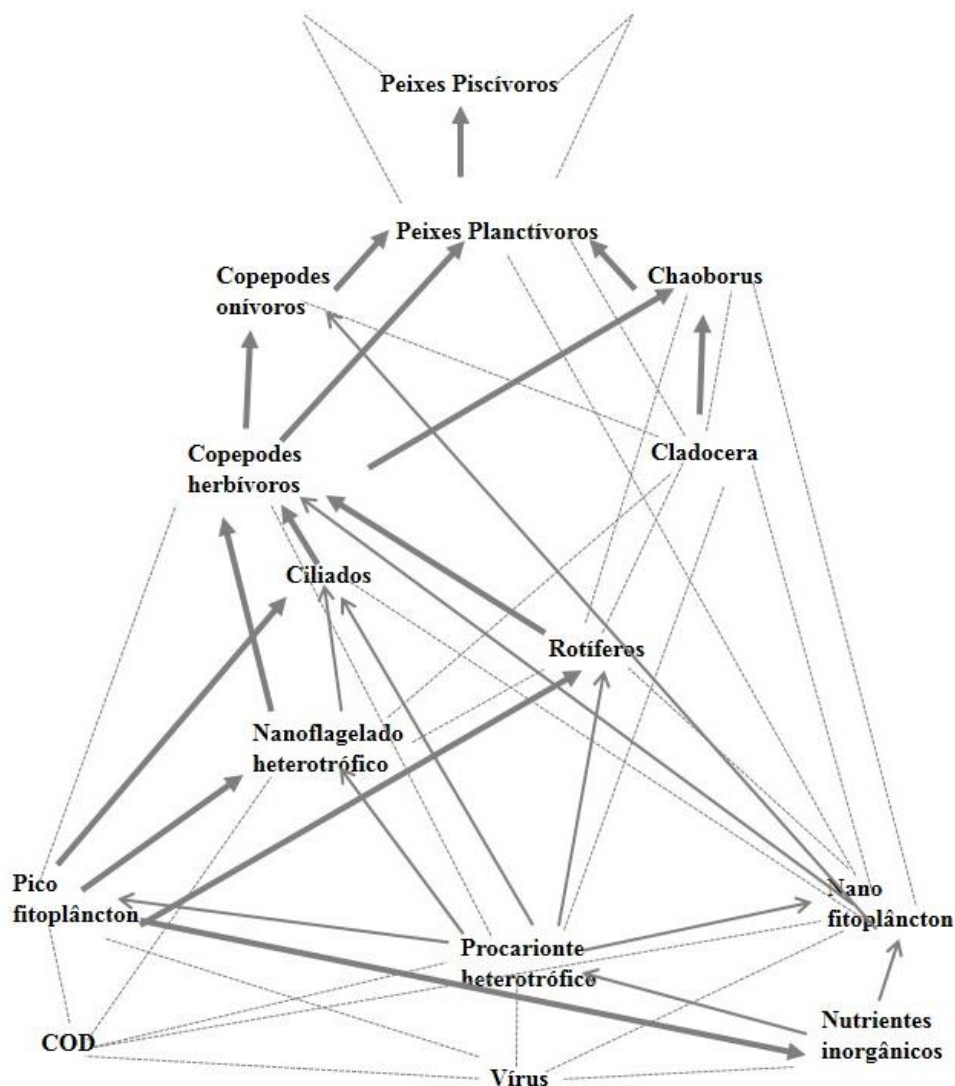


Figura 28: Participação do picoplâncton e fitoplâncton no fluxo do carbono em uma teia alimentar em ambiente tropical. A largura da linha representa a força da interação (fluxo do carbono) que é dividida em três categorias: forte (linha espessa) média (linha fina) e fraca (linha tracejada). (Sarmiento, 2012 - Modificado).

Com este trabalho foi possível determinar a presença de organismos de dois domínios, bactéria e arqueia, na água e sedimento do reservatório de Itupararanga e, apesar de não terem sido identificados os grupos a que pertencem nem os metabolismos que apresentam, pode-se inferir, a partir da relação entre os dados ambientais e da comunidade biológica, os possíveis papéis desempenhados por ambos os grupos e sua fundamental importância ecológica para o ecossistema.

5 CONCLUSÕES

- Foram encontrados organismos pertencentes aos domínios *Archaea* e *Bacteria* tanto na água quanto no sedimento do reservatório de Itupararanga. No caso das arqueias nenhum trabalho conhecido havia até o momento as observado na coluna de água em reservatórios tropicais;
- A riqueza de microrganismos dos dois domínios, *Bacteria* e *Archaea*, foi maior no fundo nos dois pontos coletados do reservatório se comparados à superfície;
- A riqueza de Bactérias, determinada pelo número de bandas de DGGE (OTU), foi maior do que a de arqueia, sendo que as comunidades bacterianas são mais similares entre si que as de arqueias observadas. Isso ocorreu provavelmente em função da maior plasticidade metabólica das bactérias se comparadas a arqueias;
- A quantidade de bactérias e arqueias presentes no sedimento do reservatório foi maior do que na coluna d'água e a quantidade de arqueias e bactérias foi maior no ponto da entrada do que no ponto da barragem, provavelmente em função da maior disponibilidade de matéria orgânica e condições anóxicas;
- A quantidade de arqueia esteve relacionada a quantidade de íons amônia, indicando possível presença de arqueias envolvidas no metabolismo de amônia;
- A quantidade de bactérias esteve associada às variáveis limnológicas que são maiores próximas a superfície (pH, OD e temperatura), indicando que este grupo provavelmente está relacionado a produção primária seja no processo de fototrofia ou metabolizando produtos derivados do processo autotrófico oxigênico;
- A riqueza dos grupos relacionou-se a disponibilidade de nutrientes, indicando que estes podem ser limitantes às populações microbianas e que no reservatório, nas atuais condições, o aumento da trofia está relacionado a maiores riquezas de organismos procariontes.
- Apesar da pequena quantidade de dados houve uma tendência ao aumento da densidade de bactérias medida pelo qPCR em relação ao aumento da concentração de clorofila, podendo indicar que parte das bactérias presentes no reservatório são fotossintetizantes ou vivem em associação com o fitoplâncton utilizando os produtos secundários da fotossíntese.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinação da diversidade das comunidades de bactérias e arqueias (sequenciamento) para melhor conhecimento da diversidade e distribuição destes organismos no reservatório;
- Determinação de genes funcionais (como o gene amoA) e metabolismos (produção de biogás, como metano e hidrogênio) de ambos os grupos para identificação dos papéis ecológicos desenvolvido por eles e a possível participação em processos biogeoquímicos;
- Exploração de novos ambientes aquáticos tropicais para verificar possível presença de arqueias;
- Determinar o uso de arqueias como bio - indicadores de poluição;
- Identificar possíveis papéis de bactérias e arqueias na alça microbiana;
- Determinar a importância do picoplâncton na produtividade primária de reservatórios.

7 REFERÊNCIAS

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington, DC: APHA. 2005

Baas Becking L. G. M. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde *Diligentia Wetensch.* Serie 18/19, **van Stockum's Gravenhange**, p. 263, 1934.

BARNS, S. M. et al. Perspective on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 93, n. 17, p. 9188 - 9193, Aug. 1996.

BEGHELLI, F. G. de S. et al. Relationship between space distribution of the benthic macroinvertebrates community and trophic state in a neotropical reservoir (Itupararanga, Brazil). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 114- 124, Oct./Dec. 2012.

BERNER, R. A. A new geochemical classification of sedimentary environments. **Journal of Sedimentary Petrology**, USA, v. 51, n. 2, p. 359-365, Jun. 1981.

BIDERRE-PETIT, C. et al. Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. **Microbiology Ecology**. [S. l.], v. 77. n.1, p. 533-545. 2011.

BOWMAN, J. P.; McCUAIG, R. D. Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Austrália, v. 69, n. 5, p. 2463–2483, May 2003.

BRANCO, C. W. C. KOZLOWSKY-SUZUKI, B. SOUSA-FILHO, I. F. GUARINO, A. W. S. ROCHA, R. J. Impact of climate on the vertical water column structure of lajes reservoir (Brazil): a tropical reservoir case. **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 14, n. 3, p. 175-191, 16 Sept. 2009.

CALIJURI, M. C.; SANTOS, A. C. A.; JATI, S. Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, S.P.—Brazil). **Journal of Plankton Research**, São Paulo, v. 24, n. 7, p. 617- 634, 2002.

CARDOSO, A. M. et al. Hunting for extremophiles in Rio de Janeiro. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1 -3, 2011.

CBH-SMT – Comitê de Bacias Hidrográficas do Rio Sorocaba e Médio Tietê. (2008) Plano de Bacia da UGRHI 10. CBH-SMT, IPT, 1- 512

CHAPMAN, P. M. et al. A Triad study of sediment quality associated with a major relatively untreated marine sewage discharge. **Marine Pollution Bulletin** [S. l.], v. 32, n. 1, p. 47-64, Jan. 1996.

CHEN, Y. Long-term dynamics of phytoplankton assemblages: *Mycrocystis* – domination in lake Taihu, a large shallow lake in China. **Journal of Plankton Research**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 445 – 453, 2003.

CHENG, C. Bar-coded pyrosequencing reveals the bacterial community during microcystis water bloom in guanting reservoir Beijing. **Procedia Engineering**, ([S. l.], v.18, p. 341-346, 2011.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. C. Variação sazonal dos grupos funcionais fitoplanctônicos em braços de um reservatório tropical de uso múltiplos no estado de São Paulo (Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 822- 831, 2011.

CUNHA, I. S. et al. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*capra hircus*) from de semiarid region of Brazil. **Anaerobe**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 118-124, Jun. 2011.

CUNHA, D. G. F. **Heterogeneidade espacial e variabilidade temporal do reservatório de Itupararanga**: uma contribuição ao manejo sustentável dos recursos hídricos da bacia do rio Sorocaba (SP). 2012. 235 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Carlos, 2012.

CUNHA, D. G. F.; OGURA, A. P.; CALIJURI, M. D. C. Nutrient reference concentrations and trophic state boundaries in subtropical reservoirs. **Water Science and Technology**, São Paulo v. 65, n. 8 , p. 1461 – 1467, 2012.

CURY, J. C. et al. Microbial diversity of a Brazilian coastal region influenced by an upwelling system and anthropogenic activity. **Plos One**, [S. l.], v. 6, p. 1-13, 2011.

DEMIREL, B.; SCHERER, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [S. l.], v.7, n. 2, p. 173-190, Jun. 2008.

SANTOS, A. C. A. dos. **Heterogeneidade espacial e variabilidade temporal de dois reservatórios com diferentes graus de trofia, no estado de São Paulo**. 2003. 207 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, São Carlos, 2003.

SANTOS, A. C. A. dos et al . Comparison of three methods for chlorophyll determination: spectrophotometry and fluorimetry in samples containing pigment mixtures and spectrophotometry in samples with separate pigments through high

performance liquid chromatography. **Acta Limnologica Brasiliensia**, [S. l.], v.15, n. 3, p. 7-18, 2003.

DUARTE, I. C. S. da SILVA, V. F. V. Diversidade de microrganismos In Beu, S. E. dos Santos, A. C. A. Casali, S (orgs). **Biodiversidade na APA Itupararanga**. SMA/FF/UFSCar/ccr-Via Oeste; São Paulo. p. 108 – 114, 2011

FEARNSIDE, P. M. Hidrelétricas como “fábricas de metano”: o papel dos reservatórios em áreas de florestas tropicais na emissão de gases de efeito estufa. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, p. 100 – 115, 2008.

FRANCIS, C. A. et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 41, p. 14683 – 14688, Oct. 2005.

FREITAS, L. D. **Heterogeneidade especial e temporal do zooplâncton em sistemas lóticos e lênticos da bacia hidrográfica do Lobo (Itirapina – Brotas/ SP)**. 2012. 164 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

FUHRMAN, J. A. et al. Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, (USA), v. 103, p. 13104-13109, 2006.

GALAGAN et al., The genome of *m. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. **Genome research**, [S. l.], v. 12, p.532- 542, 2002.

GANTNER, S. et al. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**. [S. l.], v. 84, p. 12-18, 2011.

GAO, G. et al. The bacterioplâncton on the lake Taihu, China: abundance, biomass and production. **Hydrobiology**, [S. l.], v. 581, p. 177 – 187, 2007.

GEMELGO, M.C.P.; MUCCI, J.L.N. NAVAS-PEREIRA, D. Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in brazilian reservoirs (billings and Guarapiranga, São Paulo). **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 1001-1013, nov. 2009.

GILLAN, D. C. & DANIS, B. The archaeobacterial communities in Antarctic bathypelagic sediments. **Deep-Sea Research II**, [S. l.], v. 54, n. 16-17, p.1682–1690, Aug. 2007.

GOLOMBIESKI, J. I. et al. Qualidade da água no consórcio de peixes com arroz irrigado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1263-1268, nov./dez. 2005.

GRAÇAS, D. A. et al. Microbial diversity of an anoxic zone of a hydroelectric Power station reservoir in Brazilian Amazonia. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 62, p. 853-861, 2011.

GRANADO, D. C.; HENRY, R. Changes in abiotic characteristics of water in the Paranapanema river and three lateral lagoons at mouth zone of the Jurumirim reservoir during the flood period, São Paulo, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, [S. l.], v. 40, p. 79- 89, 2012.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistic software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, [S. l.], v. 4, p.1-9, 2001.

HENRY-SILVA, G. G. et al . Características limnológicas da coluna d'água e dos efluentes de viveiros de criação de camarão da Amazônia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 10, p. 2099-2107, 2010.

HEUER, H. et al., Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environmental Microbiology*. [S.l:], v. 63, p. 3232 – 3241, 1997.

HEWSON, I.; FUHRMAN, J. A. Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 51, p. 147-153, 2005.

HEWSON, I.; FUHRMAN, J. A. Spatial and vertical biogeography of coral reef sediment bacterial and diazotroph communities. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.] v. 306, p. 79-86, 2006.

HOLMES, A. J. et al. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. **Applied Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 65, p. 3312-3318, 1999.

HEAD I. M. et al. The phylogeny of autotrophic ammoniaoxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal-RNA rene-sequences. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 139, p. 1147- 1153, 1993.

HUBER, H. *et al.*, A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. **Nature**, [S. l.],v. 417, p. 63- 67, 2002.

HUTCHINSON, G. E. The paradox of plankton. **The American Naturalist**, [S. l.], v. 95, p. 137-145, 1961.

JENSEN, J. P. et al. Impact of nutrients and physical factors on the shift from cyanobacterial to chlorophyte dominance in shallow Danish lakes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, [S. l.], v. 51, p. 1692-1699, 1994.

JIN, T. ZHANG, T. YE, L. LEE, O. O. WONG, Y. H. QIAN, P. Y. Diversity and quantity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in sediment of the Pearl river estuary, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 90, p. 1137-1145, 2011.

KOLMONEN, E. et al. Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in lake Joutikas, Finland. **Aquatic Microbial Ecology**, [S. l.], v. 36, p. 201-211, Sept. 2004.

KRUGER, G. C. T. et al. Dinâmica de carbono orgânico dissolvido no estuário do rio Paraíba do Sul, R. J., sob diferentes condições de maré e descarga fluvial. **Atlântica**, [S. l.], v. 25, p. 27- 33, 2003.

LANGENHEDER, S. ; RAGNARSSON, H. The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial community. **Ecology**, [S. l.], v. 88, p. 2154- 2161, 2007.

LEE, S. H. et al. Organic layers serves as a hotspot of microbial activity and abundance in arctic tundra soils. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 2, p. 405-414, 2012.

LIMA, J. E. de **Diversidade de bactérias e archaea em solo de mata atlântica no estado de São Paulo**. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Esalq, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011.

LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Archaea, bacteria and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Buzios, south atlantic ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 59, p. 523-532, 2010.

LIU, Z. HUANG, S. SUN, G. XU, Z. XU, M. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in the Dongjiang River, China. **Microbiology Research**, [S. l.], v. 166, p. 337-345, 2011.

LYIMO T. J.; POL, A.; CAMP, H. J. M. O. D. Sulfate reduction and methanogenesis in sediments of Mtoni mangrove forest, Tanzania. **Ambio: A Journal of the Human Environment**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 614–616, 2002.

MAINTINGUER, S. I., et al. Consorcio microbiano anaeróbico do sedimento do reservatório de Itupararanga (Sorocaba) aplicado à produção biológica de H₂. São Paulo. Anais do I seminário Temático: Produção de bioenergia no tratamento de águas residuárias e adequação ambiental dos efluentes e resíduos gerados. 2011. 346p

MENEZES, C. B. A., et al. Microbial diversity associated with algae, ascidian and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbial Research**, [S. l.], v. 165, p. 466-482, 2010.

MERINO-IBARRA, M., et al. Physical and chemical limnology of a wind-swept tropical highland reservoir. **Aquatic Reservoir**, v. 3, p. 335-345, 2008.

MEUER, J., et al. *Genetic analysis of the archaeon methanosarcina barkeri fusaro reveals a central role for ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation.* **Proceedings of The National Academy Sciences**, [S. l.] v. 99, p. 5632–5637, 2002.

MIWA, A. C. P. et al. Limnologia do reservatório de Itupararanga. In Beu, S. E. dos Santos, A. C. A. Casali, S (orgs). **Biodiversidade na APA Itupararanga.** SMA/FF/UFSCar/ccr-Via Oeste; São Paulo. p. 65-71, v. 1, 2011.

MOYER, C. L. et al., *Diversity of deep-sea hydrothermal vent Archaea from Loihi Seamount, Hawaii.* **Deep –sea research.** [S. l.], v. 45, p. 303 – 317, 1998.

MUYZER, G. et al., *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* **Applied Environmental Microbiology.** [S. l.], v. 59, p. 695-700, 1993.

NAKAYAMA, C. R., et al. *Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities.* **Deep Sea Research II**, [S. l.], v. 58, p. 128-138, 2011.

NUSH, E. A. *Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination.* **Archiv fur Hydrobiologie** [S. l.], v. 14, p14-36, 1980.

OVREAS, L. et al. *Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of pcr-amplified gene fragments coding for 16s rrna.* **Applied Environmental Microbiology.**]S. l.], v. 63, p. 3366 – 3373, 1997.

PAGANIN, P., et al. Vertical distribution of bacterioplankton in lake Averno in relation to water chemistry. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, n.1, p. 176-188, 2013.

PANOSSO, R. , et al. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Oecologia Brasiliensis**, [S. l.], v.11, n. 3, p. 433–449, 2007.

PARK, E. J. et al. Application of quantitative real – time pcr for enumeration of total bacterial, archaeal and yeast populations in Kimchi. **The Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 47, p. 683-685, 2009.

PAVER, S., KENT, A. D. Temporal patterns in glycolate – utilizing bacterial community composition correlate with phytoplankton population dynamics in humic lakes. **Microbiology of Aquatic Systems**, [S. l.], v. 60, p. 406-418, 2010.

PAZINATO, J. M., et al. Molecular characterization of the archaeal community in an amazonian wetland soil and culture –dependent isolation of methanogenic Archaea. **Diversity**, [S. l.], v. 2, p. 1026-1047, 2010.

PEDRAZZI, F. J. de M. et al. Spatial and temporal quality of water in the Itupararanga reservoir, alto Sorocaba basin (SP) Brazil. **Journal of Water Resource and Protection**, [S. l.], v. 5, p. 64-71, 2013.

PEREIRA, A. A., et al. Variações quantitativas e qualitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, [S. l.], v. 31, p. 1397-1412, 2007.

PRESTON, C. M. et al. Underwater Application of Quantitative PCR on an Ocean Mooring. **Plos One**, [S. l.], v. 6, p. 1-12, 2011.

PROULX, M., et al., Experimental evidence for interactive impacts of human activities on lake algal species richness. **Oikos**, [S. l.], v. 76, p.191-195, 1996.

RASBAND, W. S. ImageJ U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012. Disponível em:< <http://imagej.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 8 de jan. 2013.

RAPPÉ, M. S.; STEPHEN, G. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of microbiology**, [S. l.], v. 57, p. 369-394, 2003.

Relatório de situação dos recursos hídricos UGRHI-10 2010. Disponível em: http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/index/publicacoes_files/guia/19_sorocaba.pdf. Acesso em: 3 jul. 2012,

REEVE, J. N., et al. Methanogenesis: genes, genome and who's the first? **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 179, p. 260 -296, 1997.

ROMAGNOLI, E. M. **Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e micro-organismos amônio – oxidantes em solo de mata atlântica do estado de São Paulo**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Esalq, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SALCHER, M. M. et al. Vertical and longitudinal distribution patterns of different bacterioplankton populations in a canyon-shaped, deep prealpine lake. **Limnology and Oceanography**, [S. l.], v. 56, p. 2027–2039, 2011.

SARMENTO, H. New paradigms in tropical limnology: the importance of the microbial food web. **Hydrobiology**, [S. l.], v. 686, p 1-14, 2012.

SCHWARZ, J. I. K.; ECKERT, W.; CONRAD, R. Community structure of archaea and bacteria in a profundal lake sediment lake Kinneret (Israel). **Systematic and Applied Microbiology**, [S. l.], v. 30, p. 239-254, 2007.

SCLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 3, p. 479- 489, 2005.

SEADE (2000, 2003, 2010) – População e estatísticas vitais. Fundação Sistema Estadual de análise de dados. Disponível em: < <http://www.seade.gov.br/>>. Acesso em: 21 abr. 2013.

SIMON, M., et al. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. **Aquatic Microbial Ecology**, [S. l.], v. 28, p. 175-211, 2002.

SIMS, A., et al. Temporal and spatial distributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria and their ratio as an indicator of oligotrophic conditions in natural wetlands. **Water Research**, [S. l.], v. 46, p. 4121- 4129, 2012.

SIQUEIRA, A. **Componentes estruturais abióticos e bióticos e caracterização do grau de trofia de gamboas do litoral sul do Paraná, Brasil**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, São Carlos. 2006.

SMETI, E.; KORMAS, K. A.; SPARTHARIS, S. A non – phylogenetic alpha diversity approach on prokariotic community structure in aquatic systems. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 29, p. 361-366, 2013.

SOMMARUGA, R.; CASAMAYOR, E. O. Bacterial cosmopolitanism and importance of local environmental factors for community composition in remote high-altitude lakes. **Freshwater Biology**, [S. l.], v. 54, p. 994-1005, 2009.

STRASKRABA, M.; TUNDISI, J. G.; DUNCAN, A. State of the art of reservoir limnology and water quality management. In Comparative reservoir limnology and water quality management. **Kluwer Academic Publishers**, [S. l.], p.213-288, 1993.

TAKETANI, R. G. et al. Diversity and identification of methanogenic Archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 97, p. 401-411, 2010.

TAKETANI, R. G. et al. Microbial community response to simulated hydrocarbon spill in mangrove sediment. **Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 48, p. 7-15, 2010.

TAKETANI, R. G., et al. Influence of bacterioplankton community of a tropical eutrophic lagoon on the bacterial community of its neighbouring ocean. **World Journal of Microbiology and Biothechnology**, [S. l.], v. 26, p. 1865-1873, 2010.

TENEBAUM, D. R., et al. A new “sight” on microbial plankton ecology coastal x oceanic system in Brazil. **Oecologia Brasiliensis**, [S. l.], p. 133-152, 2001.

TURQUE, A. S., et al. Environmental shaping os sponge associated archaea communities. **PlosOne**, [S. l.],v. 5, p. 1-10, 2010.

THOMPSON, F. L., et al. Coastal bacterioplankton community diversity along a latitudinal gradient in latin american by means of v6 tag pyrosequencing. **Archives Microbiology**, [S. l.], v. 193, n. 2, p. 105-114, 2011.

THORNTON, K. W. Perspectives on reservoir limnology. In: THORNTON, K. W.; KIMMEL, B. L.; PAYNE, F. E. (Ed.). **Reservoir Limnology: ecological perspectives**. New York: A Wiley-Interscience, 1990. p. 1-13.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindropermopsis raciborskii* (wołoszynska) seenayya & subba raju (cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, [S. l.], v. 26, p. 97-112, 2003.

TUCCI, A. , et al. Fitoplâncton do lago das Garças, São Paulo, Brasil: um reservatório urbano eutrófico. **Hoehnea**, [S. l.], v. 33, p 147–175, 2006.

TUNDISI, J. G. Reservoirs as complex systems. **Ciência e Cultura**, [S. l.], v. 48, p. 383-387, 1996.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI : enfrentando a escassez**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2003. 248 p.

TUNDISI, J. G., et. al. Cold Fronts and reservoir limnology: an integrated approach towards the ecological dynamics of freshwater ecosystems. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 70, p. 815-824, 2010

VAN DER GUCHT, K. et al. The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 104, p. 20404-20409, 2007.

VALENTINE, D. L. Adaptation to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 5, p. 316-323, 2007.

VARGAS, S. R. **Influencia na concentração de nutrientes na interação entre duas espécies fitoplanctônicas isoladas do reservatório de Itupararanga – SP**. 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological analysis**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 2000, p.1 - 429.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBER, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. [S. l.], v. 95, p. 6578-6583, 1988.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, v. 163, p. 150 – 160, 1969.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p.5088-5090, 1977.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**. Bacterial evolution microbiological reviews [S. l.], v. 51, p. 221 -271, 1987.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria and eucarya. **Proceedings of national Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 87, p. 4576 – 4579, 1990.

ZENG, J. YANG, et al. Bacterioplankton community structure in a eutrophic lake in relation to water chemistry. In World J. **Applied Microbiology and Biothchnology**, [S. l.], v. 25, p. 763-772, 2009.

ZINDER, S. H.; KOCH, M. Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic co-culture. **Archives of Microbiology** [S. l.], v. 54, p. 263–272, 1984.

ANEXO

Anexo 1: Resultados das análises de variáveis bióticas, Clorofila, qPCR de arqueia, qPCR de bactéria, DGGE de arqueia, DGGE de bactéria e abióticas, profundidade, temperatura, pH, Oxigênio dissolvido, condutividade, Potencial redox, Sólidos suspensos totais (SST), Sólidos suspensos inorgânicos (SSI), Sólidos suspensos orgânicos (SSO), alcalinidade, Ortofosfato, nitrato, nitrito, amônia, nitrogênio fósforo em coleta realizada na represa de Itupararanga no dia 16/04/2012

Prof.	Temp.	pH	O.D.	Cond.	P.redox	SST	SSI	SSO	Alc.	Orto	NO3	NO2	NH4	Nitrogênio	Fósforo	Cloro	qPCRarc	qPCRbact	DGGEarc	DGGEarc
0,0	24,39	7,34	8,29	67	-78,40	5,70	1,70	4,00	0,94	0,0022	0,35	0,66	5,40	0,28	0,37	23,71	2,52+E02	6,65+E07	31	30
2,0	24,26	7,18	8,65	66	-69,80	4,65	1,00	3,65	1,17	0,0028	0,39	0,52	5,20	0,32	0,53	20,36	1,85+E02	5,60+E07	Nd	Nd
4,0	24,16	7,09	8,30	69	-66,00	5,25	2,25	3,00	1,23	0,0025	0,40	0,65	4,20	0,41	0,43	22,88	2,60+E02	6,79+E07	25	24
10,0	23,34	6,15	5,60	55	-27,20	3,10	1,25	1,85	2,67	0,0024	0,39	0,58	25,60	0,26	0,51	10,32	2,60+E02	4,35+E07	Nd	Nd
15,5	22,70	6,45	1,40	98	-27,40	1,75	0,45	1,30	2,11	0,0026	0,39	0,64	51,04	0,27	0,57	28,45	9,30+E02	4,88+E07	30	43
0,0	23,14	6,92	5,65	96	-53,30	5,90	2,20	3,10	2,40	0,0060	0,61	4,63	4,37	0,43	1,06	17,02	1,32+E02	4,19+E07	31	41
4,0	22,62	6,42	3,60	100	-26,80	6,80	3,85	2,95	2,18	0,0071	0,57	4,05	3,67	0,43	1,27	8,37	4,29+E02	2,16+E07	22	36
8,0	22,28	6,33	2,50	101	-2,19	8,65	5,50	3,15	2,22	0,0078	0,61	6,55	10,9	0,65	1,73	22,43	4,40+E02	6,55+E07	44	47